



HAL
open science

Etude des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer de *Clostridium acetobutylicum* et de ses partenaires d'oxydo-réduction

Marie Demuez

► **To cite this version:**

Marie Demuez. Etude des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer de *Clostridium acetobutylicum* et de ses partenaires d'oxydo-réduction. Biochimie [q-bio.BM]. INSA de Toulouse, 2007. Français. NNT: . tel-00435141

HAL Id: tel-00435141

<https://theses.hal.science/tel-00435141>

Submitted on 23 Nov 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE

Présentée à

L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Par

Marie DEMUEZ

En vue de l'obtention du

DOCTORAT

de Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Filière : Microbiologie et Biocatalyse industrielles

**ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTIONS
DE L'HYDROGENASE A FER DE *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*
AVEC SES PARTENAIRES D'OXYDO-REDUCTION**

N° D'ORDRE : 886

THESE
présentée en vue de l'obtention du grade
de Docteur de l'Université de Toulouse,
délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Spécialité : Microbiologie et Biocatalyse industrielles

par

M^{elle} Marie DEMUEZ

INTITULE

ETUDE DES RELATIONS STRUCTURE-FONCTIONS
DE L'HYDROGENASE A FER DE *CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM*
ET DE SES PARTENAIRES D'OXYDO-REDUCTION

DATE DE SOUTENANCE : 05 Novembre 2007

JURY :

Dr ATTA Mohamed
Dr DOLLA Alain
Dr GIRBAL Laurence
Pr SOUCAILLE Philippe
Dr LINDLEY Nic
Dr COURNAC Laurent

FONCTION :

Rapporteur
Rapporteur
Directeur de thèse
Co-directeur de thèse
Examineur
Examineur

ECOLE DOCTORALE : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

LABORATOIRE : Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

A mes parents,

REMERCIEMENTS

Le travail effectué au cours de cette thèse a été réalisé au sein du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) au Département de Génie Biochimique et Alimentaire (DGBA) de l'INSA de Toulouse.

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement tous les membres de mon jury de thèse, et en particulier mes rapporteurs, Mohamed ATTA et Alain DOLLA qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail, ainsi que Laurent COURNAC avec qui nous avons collaboré au cours de ce travail de thèse, et qui a participé au jury. Merci beaucoup pour les échanges d'idée et d'opinion scientifiques discutés au cours de la soutenance de thèse, et au cours de notre collaboration.

Je voudrais également remercier Pr. Jacques MEYER, pour tous ses conseils, et pour avoir suivi mon travail de thèse.

Je remercie mon co-directeur de thèse, Pr. Philippe SOUCAILLE pour m'avoir accueillie dans son équipe d'ingénierie métabolique et d'évolution moléculaire in vivo des procaryotes et permis d'obtenir la bourse de thèse de l'école doctorale SEVAB. Je tiens à remercier très sincèrement ma directrice de thèse Laurence GIRBAL qui a été mon mentor dans mon apprentissage scientifique, merci beaucoup pour sa disponibilité, sa patience, sa bonne volonté, et son soutien à toute épreuve au cours de toutes les étapes de cette thèse.

Ma sincère gratitude est également transmise aux membres passés et présents de l'équipe du Pr. SOUCAILLE, les membres permanents : Christian CROUX, Isabelle MEYNIAL-SALLES, les post-doctorants : Hervé CAPIAUX, Céline RAYNAUD, Florence SAINT-PRIX, Claire STINES, les ingénieurs et doctorants : Mylène DARRICAU, Olivier GUERRINI, Chumponuch VIRUNANON, Clément AURIOL, Claudia SANTOS GAI, et notre technicienne : Sophie MONDEIL. Merci à tous pour leur assistance et leurs discussions scientifiques d'une grande aide et pour m'avoir permis de bénéficier de leur connaissance.

Merci à tous ceux de l'équipe et du laboratoire LISBP, qui ont permis de faire régner une ambiance sympathique et chaleureuse et qui sont désormais mes amis...

Et 'The last but not least', je remercie profondément ma famille, mon père, ma mère et mon frère pour m'avoir toujours soutenue, aidée, encouragée au cours de mes années d'études, et au cours de ma thèse.

Merci,

ABREVIATIONS

°C	degré Celsius
aa	acide aminé
Abs	absorbance
ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messager
ATP	adénosyl-5-triphosphate
CoA	coenzyme A
dNTP	désoxy-nucléosides-5'-triphosphate
DO	densité optique
DTT	1,4-dithiothréitol
Fd	ferrédoxine
Fe	fer
Flx	flavodoxine
GTP	guanine-5triphosphate
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside
kb	kilobases
kDa	kiloDaltons
Km	Constante d'affinité de michaelis
ORF	Open Reading Frame
ox	oxydé
PCR	Polymerase Chain Reaction
pb	paires de bases
red	réduit
Rnase	ribonucléase
rpm	rotation par minute
NAD(P) ⁺	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) oxydé
NAD(P)H	nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate) réduit
nt	nucléotides
Ni	nickel
Vmax	Vitesse maximale

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	1
ABREVIATIONS.....	1
SOMMAIRE.....	1

CHAPITRE 1 : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE.....	13
2. LA BACTERIE <i>C. ACETOBUTYLICUM</i>	15
2.1. Généralités sur <i>C. acetobutylicum</i>	15
2.2. Physiologie de <i>C. acetobutylicum</i>	16
2.2.2. Voies et gènes du métabolisme primaire de <i>C. acetobutylicum</i>	16
2.2.3. La voie centrale.....	17
2.2.3.1. La production des acides.....	18
2.2.3.2. La production des solvants.....	18
2.2.3.3. Métabolisme énergétique.....	19
2.2.3.4. Sa régulation physiologique :.....	23
3. LES HYDROGENASES.....	31
3.1. Rôle des hydrogénases.....	31
3.2. Localisation des hydrogénases.....	32
3.3. Classification des hydrogénases.....	32
3.3.1. Les hydrogénases sans centre fer-soufre.....	33
3.3.2. Les hydrogénases à nickel-fer.....	36
3.3.2.1. Localisation.....	36
3.3.2.2. Classification des [NiFe]-hydrogénases.....	37
3.3.2.3. Structure globale.....	39
3.3.2.4. Génétique.....	44
3.3.2.5. Maturation.....	45
3.3.3. Les hydrogénases à fer.....	48
3.3.3.1. Localisation.....	49
3.3.3.2. Génétique.....	49
3.3.3.3. Structure globale.....	51
3.3.3.4. Phylogénie.....	60
3.3.3.5. Maturation des [FeFe]-hydrogénases.....	63
3.3.3.6. Transfert intra-moléculaire :.....	66
3.3.3.7. Transfert inter-moléculaire des électrons.....	69
3.3.3.8. Caractérisation biochimique.....	76

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1. SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES.....	85
1.1. Souches et plasmides.....	85
1.2. Conservation des souches :.....	86
2. MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE.....	87

2.1.	<i>Milieux de culture et conditions de croissance de C. acetobutylicum</i>	87
2.1.1.	Conditions de croissance.....	87
2.1.2.	Milieux de culture.....	87
2.1.3.	Culture en fermenteur.....	89
2.2.	<i>Milieux de culture et conditions de croissance d'E. coli</i>	90
2.2.1.	Cultures en fermenteur.....	91
2.3.	<i>Evaluation de la concentration cellulaire</i>	91
3.	TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE.....	92
3.1.	<i>Isolement et manipulation des acides nucléiques</i>	92
3.1.1.	Transformation d' <i>E. coli</i>	92
3.1.2.	Mini-préparations d'ADN plasmidique d' <i>E. coli</i>	93
3.1.3.	Transformation de <i>C. acetobutylicum</i>	94
3.1.4.	Mini-préparations d'ADN plasmidique de <i>C. acetobutylicum</i>	95
3.1.5.	Techniques de clonage.....	96
3.1.6.	Amplification de fragments d'ADN.....	97
4.	TECHNIQUES ANALYTIQUES – PURIFICATION ET DOSAGES ENZYMATIQUES.....	98
4.1.	<i>Purification de la protéine de fusion Hyda–Strep-tag</i>	98
4.2.	<i>Purification de la protéine de fusion flavodoxine–Strep-tag</i>	99
4.2.1.	Purification.....	99
4.2.2.	Libération du FMN de la flavodoxine et reconstitution <i>in vitro</i>	99
4.3.	<i>Purification de la protéine ferrédoxine</i>	100
4.4.	<i>Dosages des protéines</i>	100
4.4.1.	Méthode de Bradford :.....	100
4.4.2.	Analyse des acides aminés :.....	101
4.5.	<i>Dosage des atomes de fer</i> :.....	101
4.6.	<i>Dosage des activités enzymatiques de l'hydrogénase à fer</i>	101
4.6.1.	Activité de consommation de l'hydrogène.....	101
4.6.2.	Activité de production de l'hydrogène :.....	103
4.6.3.	Détermination des paramètres cinétiques.....	103
4.6.4.	Activité d'échange proton/deutérium.....	104
4.6.5.	Activité de conversion para-H ₂ / ortho-H ₂	104
4.7.	<i>Analyse en gel de polyacrylamide des protéines</i>	105
4.7.1.	En conditions dénaturantes.....	105
4.7.1.1.	Préparation du gel SDS-PAGE.....	105
4.7.1.2.	Préparation des échantillons.....	105
4.7.1.3.	Migration et coloration.....	106
4.7.2.	En conditions natives.....	106
4.7.2.1.	Préparation du gel de polyacrylamide.....	106
4.7.2.2.	Préparation des échantillon.....	107
4.7.2.3.	Migration et coloration.....	107
4.8.	<i>Analyse en Western-blot des protéines</i>	107

CHAPITRE 3: RESULTATS ET DISCUSSIONS

PARTIE 1 : SYNTHÈSE DES HYDROGENASES A FER NATIVE ET MODIFIEES 111

1. INTRODUCTION.....	111
2. CONSTRUCTION DES PLASMIDES pPHHYDA-C-TAG C48A, pPHHYDA-C-TAG C100A ET pPHHYDA-C-TAG H93C.....	113
3. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pPHHYDA-C-TAG C48A-C100A.....	114
4. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pPHHYDA-C-TAG Δ DA.....	114
5. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pPHHYDA-C-TAG Δ FS2.....	116
6. EXPRESSION DES HYDROGENASES MODIFIEES DANS <i>E. COLI</i> PUIS DANS <i>C. ACETOBUTYLICUM</i>	118
7. CONCLUSION.....	118

PARTIE 2 : OPTIMISATION DE LA METHODE DE PURIFICATION..... 121

1. INTRODUCTION.....	121
2. QUALITE DES HYDROGENASES PURIFIEES AVEC LE PROTOCOLE CLASSIQUE.....	122
2.1. <i>Protocole de purification classique de l'hydrogénase à fer</i>	122
2.2. <i>Analyse des hydrogénases purifiées</i>	123
2.3. <i>Activités spécifiques des hydrogénases native et modifiées</i>	124
2.4. <i>Mise en évidence de l'instabilité</i>	125
3. MODIFICATIONS DU PROTOCOLE.....	126
3.1. <i>Lavages des cellules</i>	126
3.2. <i>Purification en une étape</i>	126
3.3. <i>Réduction des échantillons</i>	126
4. AMELIORATION DE LA QUALITE DES HYDROGENASES PURIFIEES GRACE AU PROTOCOLE MODIFIE.....	127
4.1. <i>Analyse de la pureté des hydrogénases</i>	127
4.2. <i>Effet sur les paramètres cinétiques</i>	128
4.3. <i>Vérification de l'amélioration de la stabilité</i>	129
4.3.1. <i>Stabilité à 4°C</i>	129
4.3.2. <i>Stabilité à -80°C</i>	131
4.4. <i>Protocole final</i>	132
4.4.1. <i>Ajout d'additifs pour augmenter la stabilité</i>	132
4.4.2. <i>Effet de la congélation des cellules et/ou des protéines</i>	134
4.4.3. <i>Protocole final</i>	135
5. CONCLUSION.....	137

PARTIE 3 : PURIFICATION DES PARTENAIRES D'OXYDO-REDUCTION : FERREDOXINE ET FLAVODOXINE DE *C. ACETOBUTYLICUM*..... 139

1. INTRODUCTION.....	139
2. FERREDOXINE DE <i>C. ACETOBUTYLICUM</i>	140
2.1. <i>Choix de l'approche de purification</i>	140
2.2. <i>Purification de la ferrédoxine de <i>C. acetobutylicum</i></i>	141
2.3. <i>Analyse de la fraction purifiée</i>	141
3. FLAVODOXINE DE <i>C. ACETOBUTYLICUM</i>	145
3.1. <i>Choix de la flavodoxine</i>	145
3.2. <i>Construction du vecteur d'expression</i>	146
3.3. <i>Culture et purification</i>	147

3.4. Analyse de la flavodoxine purifiée	147
3.5. Reconstitution in vitro de la flavodoxine.....	148
4. CONCLUSION.....	149

**PARTIE 4 : CARACTERISATION CINETIQUE DE L’HYDROGENASE A FER
HYDA NATIVE DE C. ACETOBUTYLICUM 151**

1. INTRODUCTION.....	151
2. PROFIL CATALYTIQUE DE L’HYDROGENASE A FER NATIVE	152
3. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES	155
4. CONCLUSION.....	158

**PARTIE 5 : CARACTERISATION CATALYTIQUE DES MUTANTS DE
L’HYDROGENASE..... 161**

1. INTRODUCTION.....	161
2. FONCTIONNALITE DU SITE CATALYTIQUE	162
3. ANALYSE DU MUTANT H93C	164
4. CONCLUSION.....	166

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....171

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 181

PUBLICATION (DEMUEZ ET AL., 2007).....197

INTRODUCTION

La diminution des ressources d'énergies fossiles, mène à l'émergence de nouvelles sources d'énergie. Les énergies durables sont des énergies qui viennent de sources renouvelables telles que la lumière du soleil, l'eau, la biomasse. En tant que source d'énergie alternative aux combustibles fossiles générateurs de gaz carbonique, ces dernières décennies, l'hydrogène connaît un intérêt croissant. La voie biotechnologique de production d'hydrogène présente l'avantage d'une autonomie totale de cette filière énergétique vis-à-vis des combustibles fossiles et donne ainsi pleinement à l'hydrogène son titre d'énergie renouvelable.

A notre connaissance, la productivité d'hydrogène la plus élevée, en culture continue sur glucose, parmi toutes les bactéries produisant de l'hydrogène est réalisée par la bactérie anaérobie *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 avec 2,4 litres d'hydrogène produit par litre de culture et par heure (Soni *et al.*, 1987).

La production d'hydrogène est réalisée grâce aux hydrogénases. Ces hydrogénases sont des métalloenzymes capables de catalyser la réaction d'interconversion de l'hydrogène et de ses constituants élémentaires des protons et des électrons. Il existe trois groupes différents d'hydrogénases, classés par rapport à la teneur en métaux de leur cofacteur. Les hydrogénases à fer, ou [FeFe]-hydrogénases, forment l'un de ces groupes. Elles ont la particularité de catalyser préférentiellement la réaction de production de l'hydrogène. Deux [FeFe]-hydrogénases fonctionnelles ont été caractérisées chez *C. acetobutylicum* ATCC824 : HydA (64 kDa) et HydB (53 kDa), et seule HydA possède une efficacité catalytique pertinente (Gorwa *et al.*, 1996 ; King *et al.*, 2006).

La séquence en acides aminés de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* possède 71 % d'identité avec celle de l'hydrogénase à fer I de *Clostridium pasteurianum* (Gorwa *et al.*, 1996) (Figure 20). Par homologie de structure, l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* contient les domaines structuraux suivants : le centre H (site actif) et le centre F (comprenant 2 centres [4Fe-4S]) enfouis au sein de la protéine, et deux domaines accessoires (contenant respectivement les centres FS4C et FS2) situés à la surface de la protéine. De par leur localisation, ces deux derniers centres sont donc potentiellement impliqués dans le transfert d'électrons entre les partenaires d'oxydo-réduction et le site actif de l'enzyme (Peters *et al.*, 1998).

Dans la perspective de mieux comprendre et d'améliorer les capacités de ce micro-organisme pour la production d'hydrogène, nous avons effectué un travail de recherche fondamentale de

caractérisation des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* avec ses partenaires d'oxydo-réduction.

Notre objectif a été d'étudier le transfert inter-moléculaire des électrons entre l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* et ses partenaires d'oxydo-réduction physiologiques : ferrédoxine et flavodoxine, et artificiel : méthyl viologène, afin de déterminer l'implication de chacun des centres fer-soufre de surface FS4C et FS2 dans le transfert inter-moléculaire d'électrons. Pour cela, des mutations de HydA ont été effectuées au niveau de ces centres. Dans cette étude, des problèmes d'instabilité des hydrogénases à fer native et modifiées ont été mis en évidence et le protocole de purification a été amélioré.

Chez *C. acetobutylicum*, le partenaire physiologique d'oxydo-réduction de l'hydrogénase est la ferrédoxine. En condition de carence en fer, la flavodoxine se substitue *in vivo* et *in vitro* à la ferrédoxine (Fitzgerald *et al.*, 1980 ; Chen et Blanchard, 1979). Les partenaires physiologiques de l'hydrogénase ont été exprimés et purifiés. Un profil catalytique complet et les paramètres cinétiques des activités de consommation et de production d'hydrogène de l'hydrogénase à fer native avec différents substrats (ferrédoxine, flavodoxine, méthyl viologène) ont été déterminés. Les activités catalytiques des hydrogénases à fer modifiées ont été analysées.

Ce mémoire est composé de trois chapitres :

(I) Le premier chapitre est une étude bibliographique qui rend compte de l'état des connaissances actuelles sur l'intérêt de produire du biohydrogène, la bactérie *C. acetobutylicum* et sur les hydrogénases.

(II) Le deuxième chapitre décrit l'ensemble du matériel biologique et des techniques utilisés lors des expériences.

(III) Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans le troisième chapitre qui est divisé en cinq parties différentes :

- (i) Le choix des cibles à muter et la construction des hydrogénases modifiées sont détaillés dans la première partie,
- (ii) Dans la deuxième partie, les problèmes de variabilité des activités obtenues avec les hydrogénases native et modifiées sont mis en évidence et l'optimisation du protocole de purification qui en découle est rapportée,

- (iii) Les purifications des partenaires physiologiques d'oxydo-réduction de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum*, la ferrédoxine et la flavodoxine sont décrites dans la troisième partie,
- (iv) La quatrième partie contient la caractérisation cinétique de l'hydrogénase à fer HydA native avec ses différents partenaires d'oxydo-réduction,
- (v) La dernière partie présente les résultats des activités catalytiques obtenus avec les hydrogénases à fer modifiées.

Pour finir, une conclusion générale reprend les principaux apports scientifiques de ce travail, elle est complétée de perspectives à poursuivre.

CHAPITRE 1 :
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. PRODUCTION DE BIOHYDROGENE

Parmi tous les nouveaux combustibles en cours de développement, le gaz d'hydrogène est l'un des plus prometteurs. Une molécule d'eau peut être utilisée pour générer de l'hydrogène. De nombreux microorganismes sont capables de produire de l'hydrogène grâce à des réactions liées à leurs métabolismes énergétiques. Ces microorganismes utilisent les protons de la molécule d' H_2O comme accepteurs d'électrons pour disposer d'un excès de pouvoir réducteur dans la cellule, et pour réoxyder leurs coenzymes en absence d'oxygène.

Différentes approches de production d'hydrogène par voie microbienne sont à l'étude à l'heure actuelle (voir comme référence le livre intitulé « Bio-methane and Bio-hydrogen », Reith *et al.*, 2003) :

- par des procédés photobiologiques en utilisant des algues (en particulier l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*) et des cyanobactéries, soit par la photolyse de l'eau directement par la lumière, soit par photofermentation de substrats organiques. La première approche est plutôt privilégiée aux Etats-Unis alors que le Japon prête plus d'attention à la deuxième. Cependant, pour que la photoproduction d'hydrogène devienne une alternative pertinente, des améliorations d'efficacité de conversion de l'énergie lumineuse en énergie hydrogène sont encore nécessaires; pour exemple, cette efficacité est comprise sur la base du spectre total de la lumière entre 1,5% pour une production d'hydrogène par photolyse (via la nitrogénase) et 10% (valeur maximale théorique) pour une production par photofermentation. Dans le cas de la photolyse de l'eau, cette faible efficacité étant due principalement à l'inhibition du catalyseur hydrogénase par l'oxygène, trouver une parade à cette inhibition est devenu un enjeu crucial. Par ailleurs, des efforts pour optimiser la collecte de la lumière et la conception des bioréacteurs seront aussi nécessaires. Des expériences ont montré que la productivité d'hydrogène atteinte par *C. reinhardtii* varie de 0,08 à 0,1 mmoles d' H_2 .l⁻¹.h⁻¹ (Melis et Happe, 2001).
- par fermentation dite « obscure » de la biomasse par des micro-organismes *Archea* ou bactéries (hyper)thermophiles ou mésophiles. Les hyperthermophiles (par exemple la bactérie *Thermotoga maritima*) ont l'avantage d'atteindre 83-100% du rendement théorique maximal de conversion des hexoses en hydrogène (4 moles d' H_2 par mole de glucose) et de ne pas requérir des conditions de stérilité pour leur

croissance (température de croissance entre 65 et 80 °C), mais le gros inconvénient d'une productivité faible (maximum 10 mmoles d'H₂.l⁻¹.h⁻¹), conséquence de leur faible densité cellulaire. Au contraire des thermophiles, les bactéries mésophiles, anaérobies strictes (*Clostridium*) et anaérobies facultatives (*Enterobacter*) ont des productivités d'hydrogène beaucoup plus élevées (plus de 100 mmoles d'H₂.l⁻¹.h⁻¹) pour *C. acetobutylicum* (Soni *et al.*, 1987) et 58 mmoles d'H₂.l⁻¹.h⁻¹ pour *Enterobacter aerogenes* mais en contrepartie un rendement de production d'hydrogène par mole de glucose plus de deux fois plus faible.

Ainsi, la productivité d'hydrogène la plus élevée par rapport à toutes les bactéries produisant de l'hydrogène est réalisée par *C. acetobutylicum* en culture continue sur glucose.

2. LA BACTERIE *C. ACETOBUTYLICUM*

2.1. Généralités sur *C. acetobutylicum*

Les membres du genre *Clostridium* sont des bactéries anaérobies strictes à Gram positif, générant des spores capables de tolérer des conditions extrêmes de croissance. Les cellules végétatives ont la forme de bâtonnets aux extrémités arrondies et possèdent des flagelles. Certaines espèces sont capables de sécréter des toxines puissantes responsables de maladies telles que la gangrène, le botulisme, le tétanos... (*Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*). D'autres espèces qui ne présentent pas de caractère pathogène ont la particularité de produire des composés d'intérêt industriel tels que le butanol et l'acétone à partir d'un large spectre de substrats carbonés grâce à une grande flexibilité de leur métabolisme. C'est le cas de *Clostridium beijerinckii* (ou *Clostridium butylicum*), *Clostridium aurantibutyricum*, *Clostridium tetanomorphum*, *Clostridium butyricum*, *C. pasteurianum* et *C. acetobutylicum*. Cette dernière est présente dans la nature au niveau de certains sols, vases et eaux et dans de nombreux végétaux (racines, pelures de tubercules), graines (maïs, fève, avoine) et mélasses de sucreries.

La souche type *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été isolée du sol en 1924 dans le Connecticut (Weyer et Rettger, 1927) pour ses propriétés solvantogènes. La carte physique et génétique du chromosome de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été construite par Cornillot *et al.*, en 1997a. La carte génétique de *C. acetobutylicum* a été comparée à celle de *Bacillus subtilis*, *C. beijerinckii* et *Clostridium perfringens*. Paradoxalement, elle montre une plus grande similitude avec celle de *B. subtilis* (40,3% d'identité entre leurs protéines orthologues). La séquence complète du génome de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été publiée (Nölling *et al.*, 2001). Ce génome est composé d'un chromosome de 3,94Mb et d'un mégaplasmide de 192kb (appelé pSOL1) qui contient une majorité de gènes responsables de la production de solvants (Cornillot *et al.*, 1997a). Le génome de *C. acetobutylicum* présente la particularité de contenir une faible teneur en bases G-C (31%) (Nölling *et al.*, 2001). Cette faible teneur influe profondément sur l'usage des codons. Pour un acide aminé donné, le micro-organisme privilégie généralement le codon où les bases A-T prédominent.

2.2. Physiologie de *C. acetobutylicum*

C. acetobutylicum est capable de métaboliser de nombreuses sources carbonées telles que le glucose, le saccharose, le xylose, le pyruvate, le gluconate, le mannitol, l'arabinose (Lee *et al.*, 1985 a et b ; Janati-Idrissi *et al.*, 1989 ; Junelles *et al.*, 1987) et même l'insuline, la pectine, mais cette bactérie n'est pas capable de réduire le sulfate ni de métaboliser la cellulose cristalline (Avicel). Deux produits sont nécessaires à sa croissance sur un milieu synthétique : l'acide para-aminobenzoïque et la biotine. Sa température optimale de croissance est d'environ 35°C.

C. acetobutylicum est capable de réaliser la fermentation acétonobutylique grâce à un métabolisme biphasique où sont produits majoritairement des acides (acidogénèse) tels que l'acétate, le butyrate, et de l'hydrogène moléculaire, et des solvants neutres (solvantogénèse) comme l'acétone, le butanol et l'éthanol.

2.2.2. **Voies et gènes du métabolisme primaire de *C. acetobutylicum***

Chez *C. acetobutylicum*, les voies métaboliques conduisant à la production des différents acides et solvants sont bien connues (Doelle, 1975 ; Papoutsakis, 1984 ; Rogers, 1986).

Les hexoses (mono-, di-, tri- et polysaccharides) sont dégradés par la voie d'Embden-Meyerhorf-Parnas (voie de la glycolyse). Une mole d'hexose est convertie en deux moles de pyruvate avec production de deux moles d'ATP et deux moles de NADH (Thauer *et al.*, 1977). Les pentoses sont dégradés par la voie des pentoses-phosphate. Les sucres sont d'abord transformés en pentoses 5-phosphate puis convertis, *via* une transaldolase et une transcétolase, en fructose 6-phosphate et glycéraldéhyde 3-phosphate qui vont entrer dans la glycolyse. Trois moles de pentoses sont converties en 5 moles de pyruvate avec production de 5 moles d'ATP et 5 moles de NADH (Rogers, 1986).

Le pyruvate issu de la glycolyse subit une décarboxylation oxydative par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase pour donner de l'acétyl-CoA, de la ferrédoxine réduite et du dioxyde de carbone. L'acétyl-CoA est le point charnière sur lequel vont se brancher les voies fermentaires conduisant à la production d'acides et de solvants (Figure 1).

2.2.3. La voie centrale

Dans la voie centrale, l'acétyl-CoA est converti en acétoacétyl-CoA, puis en butyryl-CoA. La voie centrale est représentée dans la Figure 1.

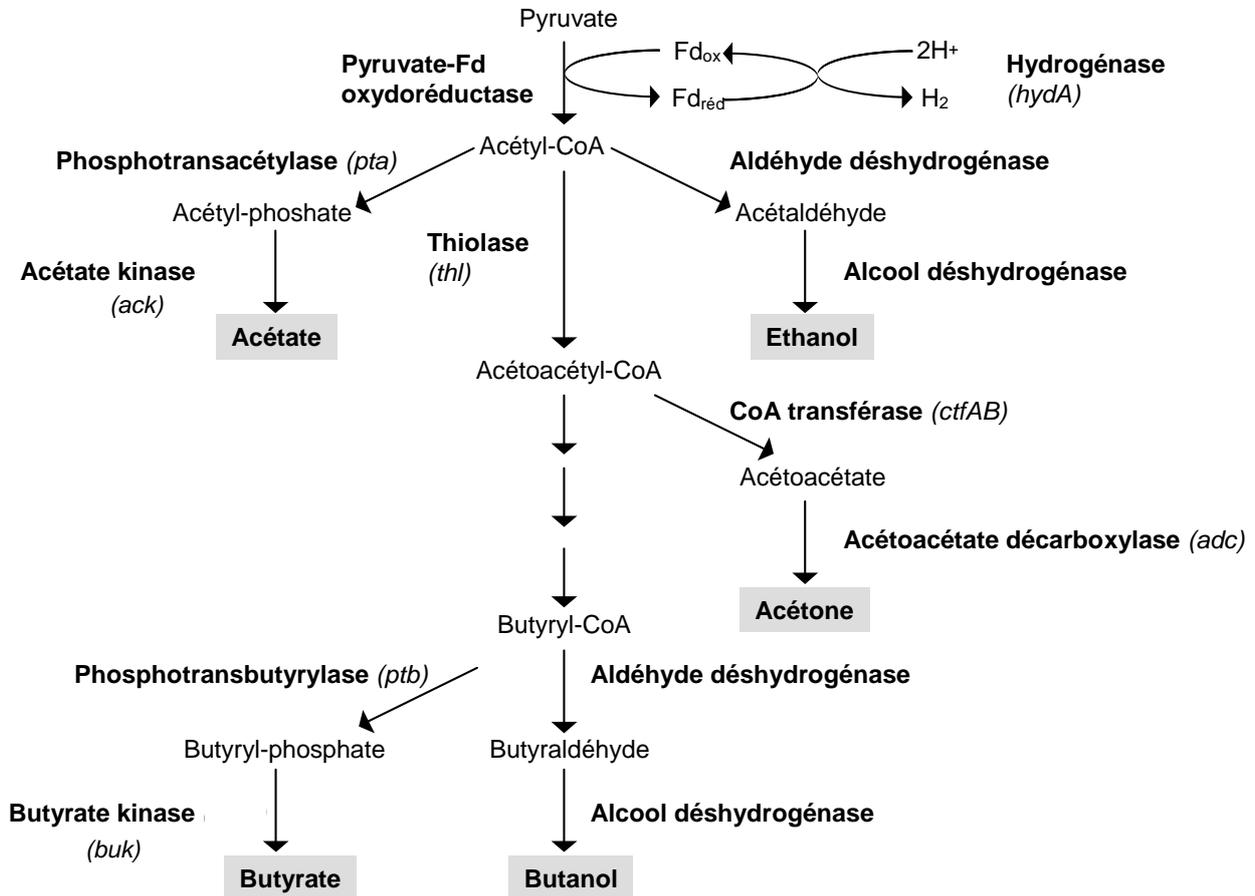


Figure 1 : Voies métaboliques et enzymes impliquées dans la conversion du pyruvate en acides et en solvants chez *C. acetobutylicum*. (Dans le cas où les gènes codant pour ces enzymes ont été clonés et séquencés, le nom du gène est indiqué entre parenthèses).

La thiolase (ou acétyl-CoA-acétyltransférase) catalyse la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA pour former une molécule d'acétoacétyl-CoA, le précurseur des solvants à quatre carbones. Cette réaction joue un rôle important dans la détermination du ratio entre les produits à deux (acétate, éthanol), trois (acétone) ou quatre (butyrate, butanol) carbones. La thiolase de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été purifiée (Wiesenborn *et al.*, 1988) et son gène (*thl*) a été cloné et séquencé (Petersen et Bennett, 1991; Stim-Herndon *et al.*, 1995), et il a été suggéré que son activité serait régulée *in vivo* par le rapport Coenzyme-A : acétyl-CoA. Deux

gènes codant pour les thiolases ont été clonés chez *C. acetobutylicum* DSM 794 *thlA*, correspondant à *thl* chez *C. acetobutylicum* ATCC 824, et *thlB* (Winzer *et al.*, 2000).

En trois étapes consécutives, l'acétoacétyl-CoA est réduit en butyryl-CoA par la β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase, la crotonase et la butyryl-CoA déshydrogénase. Deux moles de NADH sont consommées par mole de butyryl-CoA formée. De ces trois enzymes, seule la crotonase a été purifiée chez *C. acetobutylicum* (Waterson *et al.*, 1972). Les gènes *crt*, *bcd* et *hbd* (codant pour la crotonase, la butyryl-CoA déshydrogénase, et la β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase respectivement) sont situés sur un seul opéron, appelé l'opéron *bcs* pour « butyryl-CoA synthesis » (Bennett et Rudolph, 1995).

2.2.3.1. *La production des acides*

L'acétyl-CoA est converti en acétate et ATP par la phosphotransacétylase et l'acétate kinase. Les gènes *pta* et *ack* qui codent pour ces deux enzymes sont organisés en opéron (Boynton *et al.*, 1996). Le butyryl-CoA est converti en butyrate par la phosphotransbutyrylase et butyrate kinase, et les deux gènes codant ces enzymes, *ptb* et *buk* sont aussi organisés en opéron (Walter *et al.*, 1993).

2.2.3.2. *La production des solvants*

2.2.3.2.1 **Voie de synthèse de l'acétone**

La formation d'acétone provenant de l'acétoacétyl-CoA implique une CoA-transférase et une acétoacétate décarboxylase. La CoA-transférase de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été purifiée (Wiesenborn *et al.*, 1989) et contient deux sous-unités différentes (Cary *et al.*, 1990). Ces sous-unités sont codées par les gènes *ctfA* et *ctfB*, qui font partie de l'opéron *sol* (Petersen *et al.*, 1993 ; Fischer *et al.*, 1993). L'acétoacétate décarboxylase a été purifiée et son gène *adc* a été cloné et séquencé à partir des souches *C. acetobutylicum* ATCC 824 et DSM 792 (Gerischer et Dürre, 1990 ; Petersen et Bennett, 1990). Ce gène, adjacent à l'opéron *sol*, est transcrit en sens opposé sous le contrôle de son propre promoteur (Petersen *et al.*, 1993 ; Dürre *et al.*, 1995).

2.2.3.2.2 Voie de synthèse des alcools éthanol et butanol

L'éthanol et le butanol sont produits à partir de l'acétyl-CoA et du butyryl-CoA respectivement, en deux étapes réductrices catalysées par des aldéhyde et alcool déshydrogénases. Des aldéhyde-alcool déshydrogénases bifonctionnelles codées par les gènes *aad* (ou *adhE*) et *adhE2* chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Nair *et al.*, 1994 ; Fontaine *et al.*, 2002) et le gène *adhE* chez *C. acetobutylicum* DSM 792 (Fisher *et al.*, 1993), ont été identifiées. Ces gènes sont tous situés dans le mégaplasmide pSOL1, mais seuls *aad* et *adhE* font partie de l'opéron *sol*. Cette aldéhyde-alcool déshydrogénase est principalement impliquée dans la formation de butanol (Nair et Papoutsakis, 1994 ; Sauer et Dürre, 1995 ; Green et Bennett, 1996 ; Fontaine *et al.*, 2002).

Deux butanol déshydrogénases NADH dépendantes (BDH I et BDH II) ont été purifiées et leurs gènes (*bdhA* et *bdhB*) ont été clonés (Welch *et al.*, 1989 ; Petersen *et al.*, 1991). Ces gènes sont adjacents, mais chacun est transcrit avec son propre promoteur (Walter *et al.*, 1992). BDH I et BDH II diffèrent dans leur spécificité de substrat : BDH II est 50 fois plus active avec le butyraldéhyde qu'avec l'acétaldéhyde, alors que BDH I ne l'est que d'un facteur 2 (Welch *et al.*, 1989). Pendant la purification de BDH I et BDH II, la présence d'une butanol déshydrogénase NADPH-dépendante a été révélée.

Le mégaplasmide porte l'opéron *sol* et les gènes *adc* et *adhE2*, mais pas les gènes *bdhA* et *bdhB*, qui sont situés sur le chromosome (Cornillot *et al.*, 1997a). La perte du mégaplasmide mène à l'abolition totale de la production de solvants (Cornillot et Soucaille, 1996 ; Cornillot *et al.*, 1997b).

2.2.3.3. Métabolisme énergétique

2.2.3.3.3 Les enzymes du flux électronique

Le basculement du flux carboné des acides vers les solvants est associé à une modification du flux électronique. Les enzymes clé de la distribution du flux électronique sont les hydrogénases et les ferrédoxine-NAD(P)⁺ oxydoréductases (Figure 2).

Chez *C. acetobutylicum*, trois hydrogénases fonctionnelles sont présentes. Deux hydrogénases à fer HydA (64kDa) et HydB (53kDa) ont été isolées, elles sont codées par les gènes *hydA* (Gorwa *et al.*, 1996) et *hydB* (Vignais *et al.*, 2001, King *et al.*, 2006). Des gènes codant pour une hydrogénase nickel-fer ont été mis en évidence lors du séquençage du génome de *C.*

acetobutylicum (Nolling *et al.*, 2001). Ces gènes ont été clonés par L. Fontaine (résultats non-publiés de sa thèse, 2001), qui a aussi montré la fonctionnalité de l'enzyme.

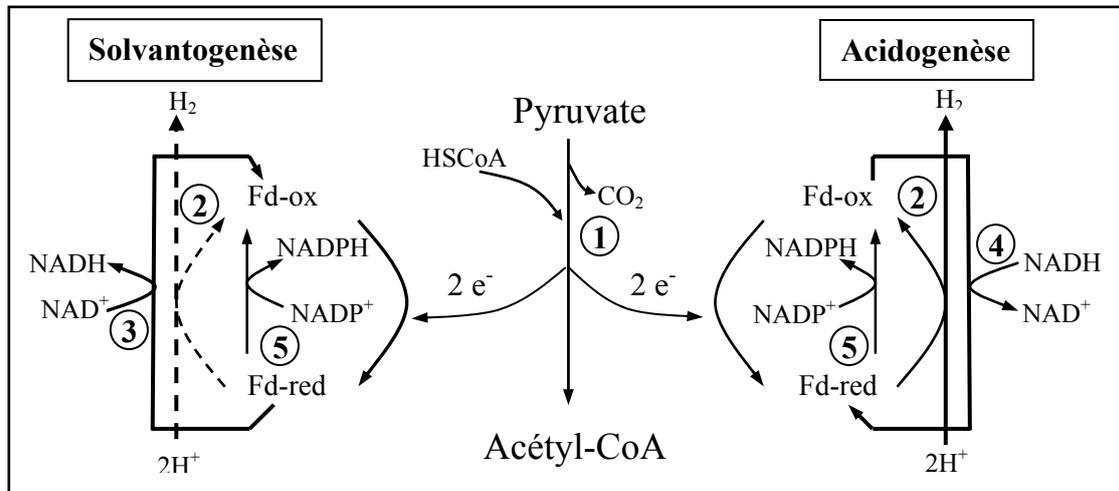


Figure 2 : Flux d'électrons en acidogénèse et en solvantogénèse. 1. Pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase ; 2. Hydrogénase ; 3. Ferrédoxine-NAD⁺ réductase ; 4. NADH-ferrédoxine réductase ; 5. Ferrédoxine-NADP⁺ réductase. (D'après Jones et Wood, 1986 et Girbal *et al.*, 1995b).

Au moment de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase il y a un transfert d'électrons vers la ferrédoxine. La pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase a été purifiée chez *C. acetobutylicum* DSM 1731 (Meinecke *et al.*, 1989).

- Durant la phase de production majoritaire d'acides acétique et butyrique, appelée **acidogénèse**, une partie seulement du NADH produit lors de la glycolyse est consommée pour la production du butyrate. Une NADH-ferrédoxine réductase intervient en parallèle de la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase, dans la réduction de la ferrédoxine en consommant l'excès de NADH provenant de la glycolyse. La ferrédoxine oxydée est régénérée par l'hydrogénase capable d'utiliser des protons comme accepteurs finaux d'électrons, avec production d'hydrogène gazeux (Adams *et al.*, 1980). La consommation des protons permet de plus une désacidification du cytoplasme (Girbal *et al.*, 1994b).
- Durant la phase de production majoritaire des solvants, appelée **solvantogénèse**, les voies de production de l'éthanol et du butanol consomment plus de NAD(P)H que ne peut en fournir la glycolyse. L'oxydation de la ferrédoxine réduite (produite par le clivage phosphoroclastique du pyruvate) par les ferrédoxine-NAD(P)⁺ réductases, va

alors permettre de produire le NAD(P)H nécessaire au détriment de la production d'hydrogène.

2.2.3.3.4 Protéines transporteurs d'électrons

La ferrédoxine a un rôle pivot dans la distribution du flux électronique (Figure 2).

- La ferrédoxine est une petite protéine monomérique à centres fer-soufre. La plupart des ferrédoxines sont capables de transporter des électrons de faible potentiel par l'intermédiaire de leurs centres fer-soufre (Valentine, 1964 ; Bruschi et Guerlesquin, 1988).

Les ferrédoxines peuvent être classées en deux groupes différents, l'enchaînement des cystéines ligands des deux types de centres fer-soufre est schématisé figure 3 :

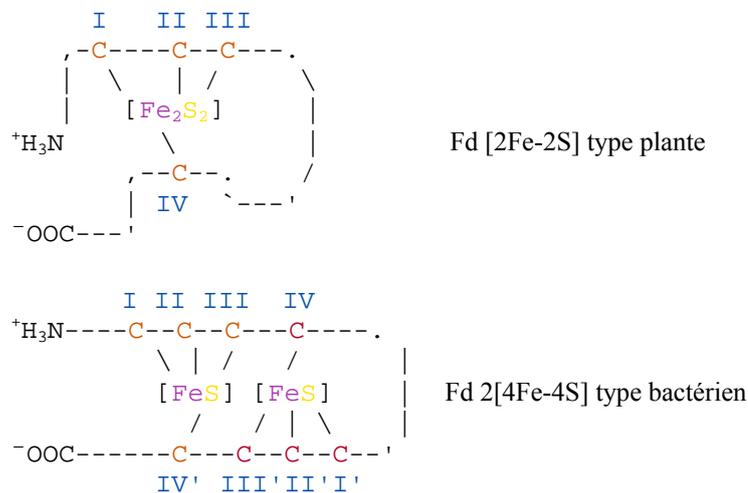


Figure 3 : Schéma de l'enchaînement des cystéines ligands des centres [2Fe-2S] et 2[4Fe-4S] des ferrédoxines respectivement de type plante et de type bactérien.

- Les ferrédoxines [2Fe-2S] sont plus répandues. Elles incluent les ferrédoxines de plantes et d'algues qui fonctionnent dans la photosynthèse, et les ferrédoxines qui transfèrent des électrons dans la chaîne d'oxydo-réduction des hydroxylases et oxygénases des bactéries ou des mammifères. C'est pourquoi ces ferrédoxines sont appelées ferrédoxine [2Fe-2S] de type plante et mammifère.
- Les ferrédoxines 2[4Fe-4S] ont été isolées de bactéries anaérobies. La présence de ferrédoxine est une caractéristique de toutes les clostridia. Chez *C. acetobutylicum*, une ferrédoxine a été partiellement isolée (Marczak *et al.*, 1985). La ferrédoxine 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum* (~ 6 kDa) est très bien caractérisée (Bertini *et al.*,

1995) (Figure 4). Elle est capable d'interagir avec de nombreuses enzymes (formate déshydrogénase, sulfite réductase, nitrogénase) en agissant en donneur ou accepteur d'électrons. La plupart des flux d'électrons sont généralement orientés vers l'hydrogénase qui réduit les protons pour produire de l'hydrogène moléculaire.

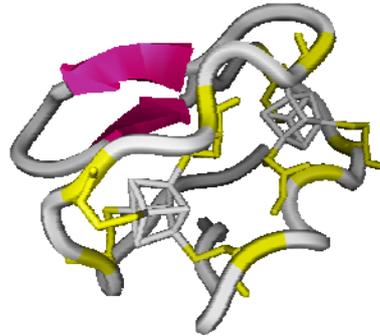


Figure 4 : Représentation de la structure 1CLF de la ferrédoxine oxydée 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum*.

La ferrédoxine peut être substituée par la flavodoxine lors des conditions de carence en fer (Knight et Hardy, 1966).

- La flavodoxine appartient à une famille de transporteurs ne possédant pas de fer, mais contenant un cofacteur, la flavine mono-nucléotide. Elle est produite lors d'une carence en fer dans le milieu de culture (Knight et Hardy, 1966). Un gène codant pour une flavodoxine a été cloné chez *C. acetobutylicum* P262 (Santangelo *et al.*, 1991). La flavodoxine est une petite protéine de 16 kDa (Figure 5A). Elle a la particularité de contenir un cofacteur fixé de façon non-covalente à la protéine : une flavine mono-nucléotide (FMN) (Figure 5B) qui confère des propriétés redox à la protéine et permet de participer au transfert d'électrons à faible potentiel.

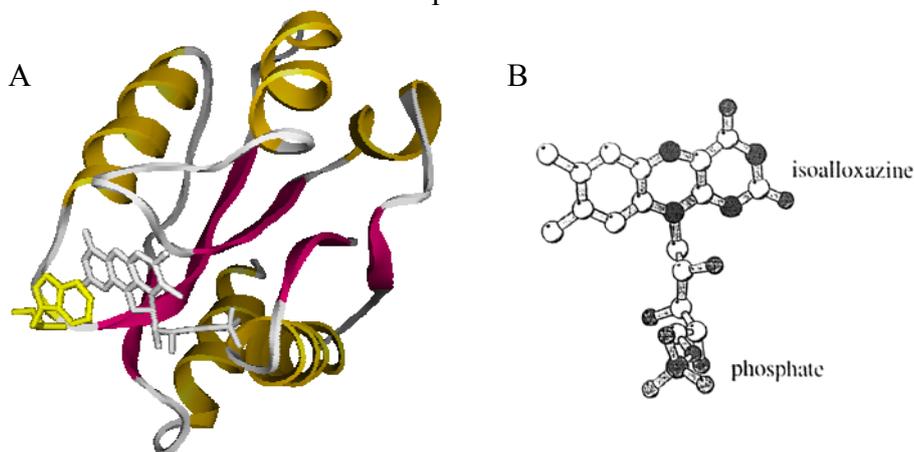


Figure 5 : **A** Représentation de la structure 5ULL de la flavodoxine réduite de *C. beijerinckii* et de son site de fixation du FMN (Ludwig *et al.*, 1997), **B**. Structure du FMN, avec ses cycles isoalloxazine et son extension phosphate.

La fixation du FMN dans l'apoflavodoxine s'effectue grâce à des interactions hydrophobes et de Van der Waals des résidus aromatiques tryptophane et tyrosine qui sont situés de part et d'autre des cycles isoalloxazine redox-actifs du FMN, et grâce à des liaisons hydrogène entre le 5' phosphate du FMN et le motif de fixation du phosphate : Ser/Thr-X-Thr-Gly-X-Thr. Les deux résidus tryptophane et tyrosine sont très conservés chez les flavodoxines de *Desulfovibrio desulfuricans* (Figure 6) (Muralidhara *et al.*, 2005) et *Anabaena* (Maldonado *et al.*, 1998), tandis qu'un seul résidu aromatique, le tryptophane est retrouvé chez celles de *C. beijerinckii* et *Megasphaera elsdenii*. En contrepartie, des liaisons hydrogènes avec des résidus aspartate et glutamate ont été démontrées dans la flavodoxine de ces deux dernières bactéries (Bradley et Swenson, 1999).

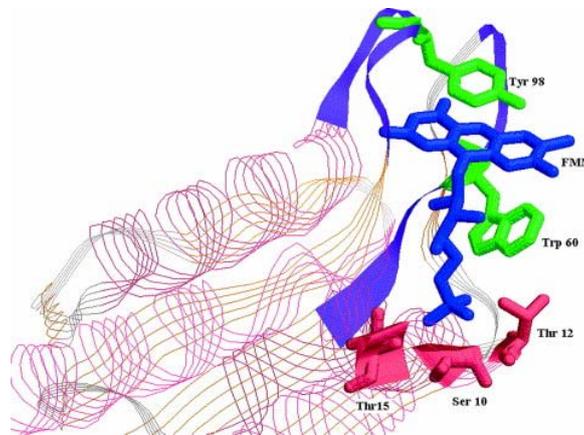


Figure 6 : Site de fixation du FMN de la flavodoxine de *D. desulfuricans* (Muralidhara *et al.*, 2005)

Il existe des transporteurs artificiels d'électrons comme le bleu de méthylène, le méthyl viologène, le benzyl viologène ou le rouge neutre qui sont utilisés en culture ou *in vitro* lors de tests d'activité pour remplacer des transporteurs physiologiques.

2.2.3.4. Sa régulation physiologique :

2.2.3.4.5 En culture discontinue ou « batch »

En culture discontinue ou « batch » et en condition de pH non régulé, *C. acetobutylicum* possède un métabolisme biphasique (Jones et Woods, 1986) (Figure 7):

- En **acidogénèse**, a lieu la production d'acides acétique et butyrique et la croissance cellulaire est rapide. D'importantes quantités d'ATP sont produites, ainsi que d'hydrogène et de dioxyde de carbone dans un rapport H₂/CO₂ supérieur à 1.

- En **solvantogénèse**, un ralentissement de la prolifération cellulaire est caractéristique, en effet les acides produits au cours de l'acidogénèse sont toxiques pour la cellule. Elle va donc les consommer pour former les solvants butanol, acétone et éthanol entraînant une légère remontée du pH du milieu. L'hydrogène et le dioxyde de carbone sont encore produits, mais le rapport H_2/CO_2 devient inférieur à 1.

Finalement la croissance des bactéries s'arrête de par la toxicité du butanol quand il atteint une concentration d'environ 13g/l. Le butanol a pour effet d'augmenter la fluidité membranaire qui inhiberait les fonctions membranaires et la croissance cellulaire (Vollherbst-Schneck *et al.*, 1984).

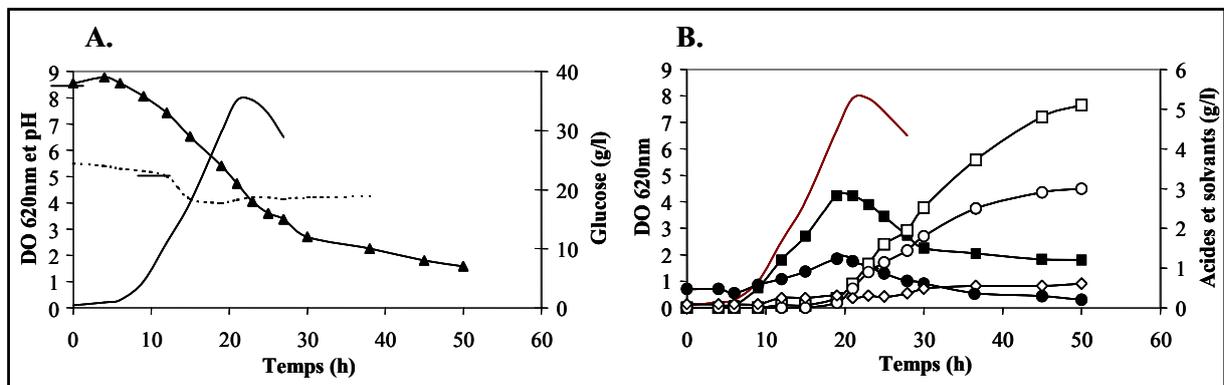


Figure 7 : Culture discontinue de *C. acetobutylicum* ATCC 824, à pH non régulé. A. Suivi de la croissance (DO 620nm \bullet), du pH (.....) et de la consommation du glucose (\blacktriangle). B. Production des acides, acétate (\bullet) et butyrate (\blacksquare) et production des solvants, acétone (\circ), butanol (\square) et éthanol (\diamond) en fonction du temps et de la croissance bactérienne ($_$).

Afin d'étudier les facteurs impliqués dans la transition entre la phase acidogène et la phase solvantogène (effets de différentes sources carbonées, du pH,...), les cultures continues ont largement été utilisées.

2.2.3.4.6 En culture continue ou « chemostat »

Il est possible de maintenir une culture de *C. acetobutylicum* dans un état physiologiquement stable. Une culture dite continue est réalisée en maintenant un certain nombre de paramètres constants (pH, composition du milieu, taux de dilution de la culture, température). De

nombreuses expériences ont été réalisées et ont permis de décrire au niveau physiologique, mais aussi génétique (dans une moindre mesure), trois états physiologiques stables en cultures continues : l'acidogénèse (production majoritaire des acides acétique et butyrique, et de l'hydrogène), la solvantogénèse (production majoritaire de solvants : butanol, éthanol et acétone), et l'alcoologénèse (production de butanol et d'éthanol, mais pas d'acétone).

Les produits, concentrations en nucléotides, niveaux des transcrits et activités enzymatiques pour des cultures continues en solvantogénèse et alcoologénèse ont été décrits dans la littérature et comparés à ceux d'une culture en acidogénèse.

2.2.3.4.6.1. La solvantogénèse

2.2.3.4.6.1.1. *Données physiologiques*

En régime continu, sans limitation de glucose, à bas pH (de 4,5 à 5,5), avec recyclage de la biomasse (Meyer et Papoutsakis, 1989a), il y a production de butanol, d'éthanol et d'acétone (avec une distribution 6/0,5/3 respectivement). Lors de cultures continues, en limitation de phosphate, à pH 4,4, les concentrations intracellulaires en NADH sont comparables à celles présentes dans une culture en acidogénèse (Girbal *et al.*, 1995b). Par contre, la concentration interne en ATP est multipliée d'un facteur 2,1 et la concentration intracellulaire en butyrate, en raison de la valeur forte du Δ pH, est élevée. Dans ce cas, le facteur d'induction de la production de solvants semble être le niveau intracellulaire élevé en ATP et /ou butyrate.

La quantité d'ATP est un facteur déterminant de la condition solvantogène. En effet, il y a production de solvants dans des cultures avec des limitations qui n'induisent pas de fortes demandes en ATP : limitations en fer, en azote, en phosphate ou en sulfate (Bahl *et al.*, 1986 ; Bahl *et al.*, 1982).

2.2.3.4.6.1.2. *Données enzymatiques et génétiques (Figure 8)*

En 1995, Sauer et Dürre ont montré l'induction de la transcription des gènes impliqués dans la formation du butanol : *aad*, *bdhA* et *bdhB*, en culture continue lors de la transition d'un métabolisme acidogène vers un métabolisme solvantogène induit par la baisse du pH.

L'ordre d'initiation de la transcription des gènes impliqués dans la formation du butanol est : *bdhA-aad-bdhB*. La transcription de *adhE2* n'est pas détectée dans une culture solvantogène à pH 4,4 (Fontaine *et al.*, 2002).

En culture solvantogène à pH 4,4, la production de butanol est principalement associée à des activités butanol déshydrogénase et butyraldéhyde déshydrogénase NADPH-dépendantes (Girbal *et al.*, 1995b). La production d'acétone est corrélée à une expression élevée des gènes de la CoA transférase *ctfA* et *ctfB* et de l'acétoacétate décarboxylase *adc* (Girbal *et al.*, 1995b; Sauer et Dürre, 1995).

Une division par deux de la formation d'hydrogène est observée en culture solvantogène par rapport à une culture acidogène, ceci est corrélé à une diminution importante de 83% de l'activité *in vitro* de l'hydrogénase dans le sens de production (Girbal *et al.*, 1995b) liée à un niveau d'ARNm transcrit plus bas en solvantogène qu'en acidogénèse (Gorwa *et al.*, 1996). Au cours de la solvantogénèse, l'expression de l'hydrogénase est donc régulée à un niveau transcriptionnel. Deux séquences inversées-répétées sont situées dans la région promotrice de *hydA*. La première, la tige A, de 29pb, est localisée en aval de la région -10. La seconde, la tige B, est située en amont de la région promotrice -35. Ces séquences inversées-répétées sont capables de former des structures en tige-boucle, qui pourraient être impliquées dans la régulation transcriptionnelle du gène *hydA*.

Aucune activité ferrédoxine-NAD(P)H réductase n'a pu être détectée en solvantogénèse, bien que l'activité spécifique *in vivo* de production de NAD(P)H soit positive, indiquant qu'il y a production de coenzyme réduit à partir de la ferrédoxine réduite. Un mécanisme envisagé serait la synthèse de NAD(P)H à partir de la ferrédoxine réduite via un système de transport membranaire d'électrons et de protons (Girbal *et al.*, 1995b).

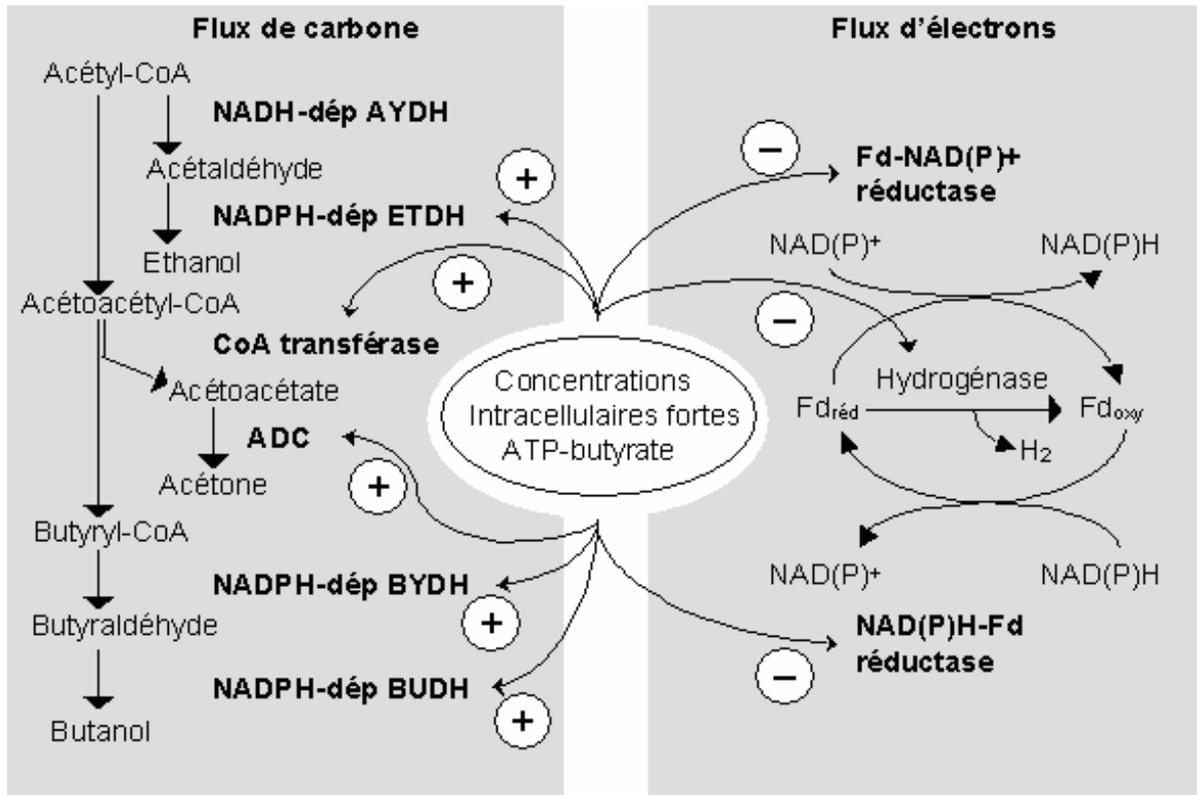


Figure 8 : Expression *in vitro* des enzymes impliquées dans les flux de carbone et d'électrons de *C. acetobutylicum* au cours de la solvantogénèse (Fd, ferrédoxine ; Fd red, ferrédoxine réduite ; Fd ox, ferrédoxine oxydée ; dep, dépendant ; AYDH, acétaldéhyde déshydrogénase ; ETDH, éthanol déshydrogénase, ADC, acétoacétate décarboxylase ; BYDH, butyraldéhyde déshydrogénase ; BUDH, butanol déshydrogénase ; +, haut niveau d'activité enzymatique *in vitro* ; -, faible niveau d'activité enzymatique *in vitro*) (D'après Girbal et Soucaille, 1998).

2.2.3.4.6.2. L'alcoologénèse

2.2.3.4.6.2.1. *Données physiologiques*

Une production d'alcools (butanol, éthanol, et pas de production d'acétone) est obtenue dans des conditions de forte disponibilité en NAD(P)H dans la cellule, au détriment de la formation d'hydrogène. Ceci a été observé dans différentes conditions de cultures continues :

- Sur substrat mixte glucose/glycérol à pH 6,5 : le glycérol étant un substrat plus réduit que le glucose (pour la même quantité de carbone, le métabolisme du glycérol libère deux fois plus de NADH que le glucose), l'excès de pouvoir réducteur produit par la conversion du glycérol en acétyl-CoA, est oxydé par les voies consommatrices de NADH. Ce pouvoir réducteur n'est que très faiblement éliminé dans la production d'hydrogène, mais est utilisé pour la production d'alcools (Vasconcelos *et al.*, 1994).

- Après addition de transporteurs artificiels d'électrons tels que le bleu de méthylène (Ballongue *et al.*, 1986), le benzyl viologène, le méthyl viologène (Grupe et Gottschalk, 1992 ; Peguin et Soucaille, 1995) ou le rouge neutre (Girbal *et al.*, 1995a), le métabolisme est perturbé en modifiant le flux d'électrons.
- En inhibant l'activité hydrogénase dans la culture : en faisant buller du monoxyde de carbone qui est un inhibiteur réversible de l'activité hydrogénase, (Thauer *et al.*, 1974 ; Kim *et al.*, 1984) dans la culture, la production de butanol et d'éthanol est induite, sans production d'acétone, avec une augmentation du niveau de NADH (d'un facteur 3) et du ratio NADH/NAD (d'un facteur 4) (Meyer et Papoutsakis, 1989b ; Datta et Zeikus, 1985 ; Kim *et al.*, 1984).
- En condition de limitation en fer dans la culture : l'activité hydrogénase est inhibée puisque l'activité de l'hydrogénase est dépendante de l'incorporation de fer au sein de la protéine.

Ainsi, une concentration élevée en NAD(P)H semble jouer un rôle clé dans la production d'alcools.

2.2.3.4.6.2.2. *Données enzymatiques et génétiques (Figure 9)*

En culture continue alcoologène, la production de butanol est liée à l'induction d'une butyraldéhyde déshydrogénase, ainsi que d'une butanol déshydrogénase, toutes deux NADH-dépendantes (Vasconcelos *et al.*, 1994). Contrairement à ce qui est observé en solvantogénèse, Sauer et Dürre, (1995) ont montré que la transcription des gènes *bdhA*, *bdhB*, et *adhE* n'est pas induite. La protéine AdhE2 a été montrée comme butyraldéhyde et butanol déshydrogénase NADH-dépendante, et spécifiquement responsable de la formation de butanol en alcoologénèse (Fontaine *et al.*, 2002).

En culture sur substrat mixte glucose/glycérol, des activités éthanol déshydrogénases NADH-dépendantes accrues sont observées, avec une activité acétaldéhyde déshydrogénase comparable à celle mesurée en acidogénèse.

L'activité *in vitro* hydrogénase, dans une culture continue sur glucose/glycérol ou en présence de rouge neutre, est inchangée par rapport à une culture acidogène mais la production d'hydrogène est, elle, divisée par trois (Vasconcelos *et al.*, 1994 ; Girbal *et al.*, 1995b). Ceci est en accord avec l'étude de Gorwa *et al.*, 1996, qui ne montre aucun changement apparent du niveau de transcription du gène *hydA* entre les conditions d'alcoologénèse (culture sur glucose-glycérol) et d'acidogénèse. L'expression de l'hydrogénase, dans ce cas, n'est pas

régulée à un niveau transcriptionnel et/ou traductionnel mais plus probablement au niveau de la disponibilité de son substrat : la ferrédoxine réduite.

La déviation du flux d'électrons vers la production de coenzymes réduits est à relier à une forte activité *in vitro* ferrédoxine-NAD⁺ réductase et à la faible activité *in vitro* de la NADH-ferrédoxine réductase. La ferrédoxine réduite produite par la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase serait en partie utilisée pour produire du NADH, au détriment de la production d'hydrogène.

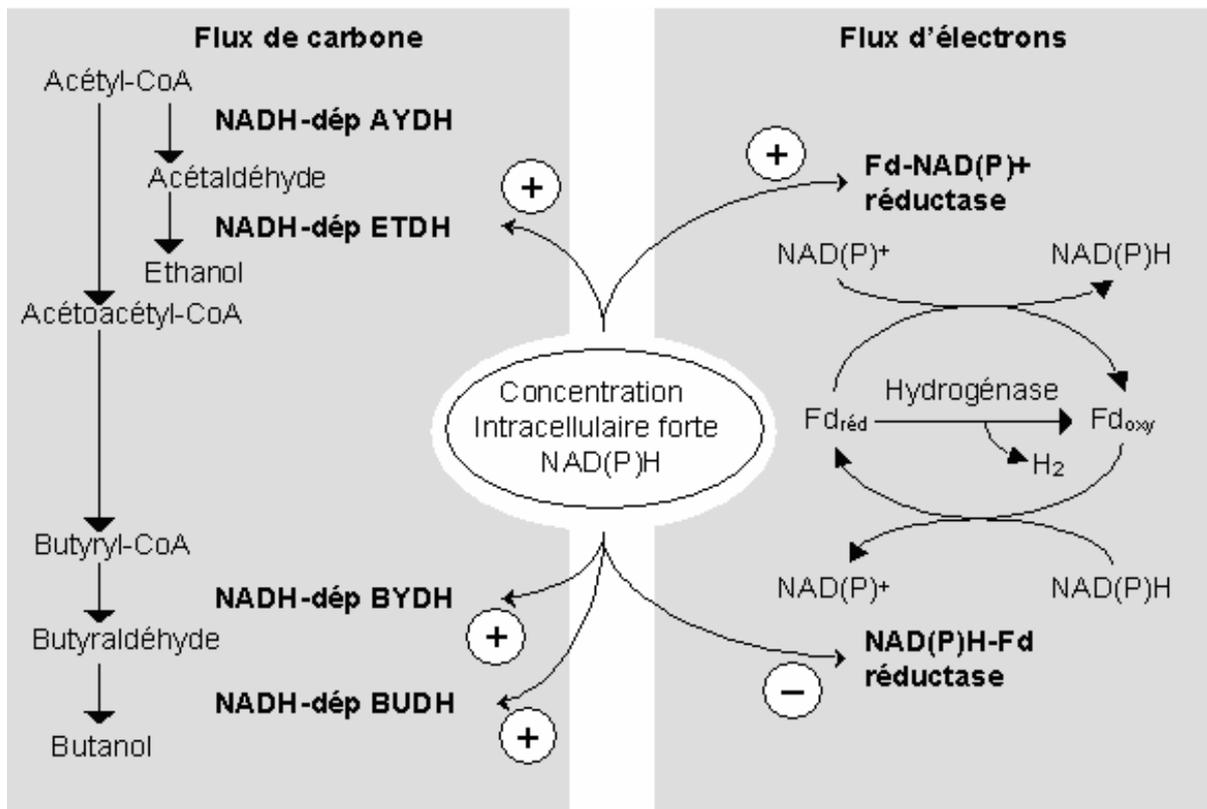


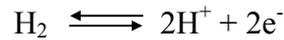
Figure 9 : Expression *in vitro* des enzymes impliquées dans les flux de carbone et d'électrons de *C. acetobutylicum* au cours de l'alcoologénèse (Fd, ferrédoxine ; Fd red, ferrédoxine réduite ; Fd ox, ferrédoxine oxydée ; dep, dépendant ; AYDH, acétaldéhyde déshydrogénase ; ETDH, éthanol déshydrogénase ; BYDH, butyraldéhyde déshydrogénase ; BUDH, butanol déshydrogénase ; +, haut niveau d'activité enzymatique *in vitro* ; -, faible niveau d'activité enzymatique *in vitro*) (D'après Girbal et Soucaille, 1998).

Ainsi la production d'hydrogène est favorisée au détriment de celle des alcools, quand la part des électrons allant vers la production d'hydrogène est augmentée soit par une expression plus forte de l'enzyme hydrogénase, soit par la diminution de la synthèse de la ferrédoxine-NAD(P)⁺ réductase couplée à l'augmentation de celle de la NADH-ferrédoxine réductase qui génèrerait un niveau plus élevé de ferrédoxine réduite.

Les conditions de cultures les plus favorables pour le rendement de production d'hydrogène chez *C. acetobutylicum* ATCC 824, sont donc celles qui permettent de générer un métabolisme acidogène, lors de cultures continue/discontinue, sur glucose, à pH 6,5.

3. LES HYDROGENASES

L'activité hydrogénase a été découverte en 1931 par Stephenson et Stickland. Les hydrogénases sont définies comme des métalloenzymes capables de catalyser le clivage hétérolytique de la molécule d'hydrogène ou inversement sa synthèse à partir de protons et d'électrons selon la réaction réversible suivante (Adams, 1990):



Presque toutes, sinon toutes les hydrogénases peuvent catalyser cette réaction dans les deux directions *in vitro*, mais elles favorisent habituellement *in vivo* la catalyse de, soit la production, soit l'oxydation de l'hydrogène, suivant les besoins du micro-organisme.

Les premières hydrogénases ont été isolées chez des procaryotes notamment des bactéries et ensuite chez des archa. Puis, des hydrogénases (de type [FeFe]-hydrogénase seulement) ont été découvertes dans des organelles subcellulaires des eucaryotes nommées hydrogénosomes chez les protozoa, et chloroplastes chez les algues vertes.

3.1. Rôle des hydrogénases

L'hydrogénase joue un rôle central dans le métabolisme énergétique de la plupart des micro-organismes produisant de l'hydrogène. L'hydrogène produit par certains micro-organismes peut être utilisé comme pouvoir réducteur par d'autres micro-organismes.

Le rôle physiologique des hydrogénases peut être classé en trois fonctions différentes :

- Les bactéries utilisent les hydrogénases pour catalyser la production d'hydrogène, ou la réduction du proton, au cours d'un processus fermentatif couplé à l'oxydation de substrats carbonés. Ce processus a lieu chez les bactéries anaérobies strictes, telles que les Clostridia, en leur permettant de disposer d'un excès de pouvoir réducteur éliminé avec les protons comme seuls accepteurs d'électrons (Adams *et al.*, 1980).
- Chez de nombreuses bactéries aérobies ou anaérobies, l'oxydation de l'hydrogène est une source d'électrons et peut être couplée à des réactions productrices d'énergie telles que la phosphorylation oxydative de l'hydrogène au cours d'un processus respiratoire. Des molécules ou ions tels que l'oxygène, le nitrate, le fumarate, le sulfate et le dioxyde de carbone peuvent être utilisés comme accepteurs terminaux

d'électrons. Ces réactions permettent la formation du méthane, la corrosion du fer par les bactéries sulfo-réductrices, et la fixation du nitrate.

- La réduction cytoplasmique des protons induit l'alcalinisation du cytoplasme et l'oxydation périplasmique de l'hydrogène cause l'acidification du périplasma. Ce processus contribue à générer un gradient de protons ou force protomotrice. Ainsi, il a été montré que l'hydrogénase était directement impliquée dans la génération d'une force protomotrice chez *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 1994b).

Ainsi, les hydrogénases peuvent interagir avec des systèmes de transport d'électrons, attachés à la membrane pour maintenir l'équilibre d'oxydo-réduction (chez les micro-organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries). Les hydrogénases impliquées dans les processus fermentatifs jouent un rôle biologique important dans la conservation de l'énergie et dans la génération de la force protomotrice.

3.2. Localisation des hydrogénases

Ces différentes fonctions sont souvent associées à différentes localisations cellulaires. La production d'hydrogène est souvent cytosolique tandis que la consommation d'hydrogène est périplasmique ou associée aux membranes. Les hydrogénases bidirectionnelles sont localisées dans le cytoplasme. Certaines bactéries possèdent plusieurs hydrogénases différentes, qui sont situées dans des compartiments cellulaires différents. La multiplicité des hydrogénases dans certains organismes reflète l'importance de l'hydrogène dans leur métabolisme et assure une réponse rapide et efficace aux variations des besoins énergétiques lors de changements de conditions environnementales de croissance.

3.3. Classification des hydrogénases

La classification des hydrogénases était initialement basée sur l'identification des donneurs et accepteurs spécifiques d'électrons : NAD (hydrogénases de la classe EC 1.12.1.12), cytochromes (classe 1.12.2.1), coenzymes F₄₂₀ (classe 1.12.99.1) ou ferrédoxines (classe 1.18.99.1). En comparant les éléments de séquences conservés des régions de fixation du nickel de 16 hydrogénases, Voordouw (1992) a classé ces enzymes en 5 sous-groupes. Par la suite, Wu et Mandrand (1993) ont proposé une classification plus élaborée basée sur la séquence en acides aminés de 30 hydrogénases bactériennes.

Depuis, plus d'une centaine d'hydrogénases ont été caractérisées génétiquement et/ou biochimiquement. Quelques réajustements étaient nécessaires. Par comparaison de la nature de leur site catalytique, c'est-à-dire de leur teneur en métaux, trois classes phylogénétiquement distinctes d'hydrogénases peuvent être mises en évidence (Vignais *et al.*, 2001 ; Vignais et Colbeau, 2004) :

- Les [NiFe]-hydrogénases, [NiFeSe]-hydrogénases sont les plus connues. Elles sont largement majoritaires. Elles possèdent un atome de nickel et du fer dans leur site actif. Certaines d'entre elles contiennent un atome de nickel chélaté par un atome de sélénium sous la forme d'une sélélocystéine (He *et al.*, 1989). *In vivo*, elles fonctionnent principalement dans le sens de consommation d'hydrogène.
- Les [FeFe]-hydrogénases, leur site actif ne contient pas de nickel mais seulement du fer. Elles sont en général présentes chez les micro-organismes fermentatifs anaérobies stricts produisant de l'hydrogène. *In vivo*, elles fonctionnent préférentiellement dans le sens de production d'hydrogène.
- Les hydrogénases anciennement « sans métaux » (Berkessel et Thauer, 1995), et maintenant plus justement appelées hydrogénases sans centre fer-soufre (EC 1.12.99.4) sont minoritaires. Elles possèdent un cofacteur organique contenant un atome de fer en guise de site catalytique (Lyon *et al.*, 2004a).

Par comparaison de leur séquence en acides aminés, et de leur structure et par corrélation des informations biochimiques, physiologiques et génétiques, il est possible d'identifier des classes et sous-groupes d'hydrogénases comme définis dans la revue de Vignais *et al.*, 2001.

3.3.1. Les hydrogénases sans centre fer-soufre

Les hydrogénases sans centre fer-soufre ont été découvertes en 1990 par le groupe du Pr. Thauer chez quelques archa méthanogènes (Shima et Thauer, 2007) Ce sont des enzymes homodimériques ou homotétramériques, de 38 kDa par sous-unité, qui possèdent deux atomes de fer par homodimère (Zirngibl *et al.*, 1990, 1992). Elles sont décrites comme des « déshydrogénases N⁵, N¹⁰-méthylène-tétra-hydro-méthanoptérine formant de l'hydrogène » ou Hmd, EC 1.12.99.4 (Thauer *et al.*, 1996). Elles catalysent la réduction réversible du N⁵,N¹⁰-méthényl-tétra-hydro-méthanoptérine (méthényl-H₄MPT⁺) avec de l'hydrogène en N⁵,

N¹⁰-méthylène-tétra-hydro-méthanoptérine (méthylène-H₄MPT) (Figure 10), qui est une réaction intermédiaire de la voie de formation du méthane à partir de H₂ et CO₂.

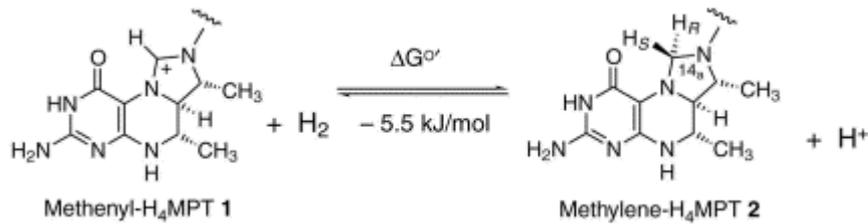


Figure 10 : Réaction catalysée par les hydrogénases Hmd : réduction réversible du méthényl-H₄MPT⁺ avec de l'hydrogène en méthylène-H₄MPT : (Berkessel, 2001).

Dans cette réaction catalytique, un hydride est stéréo-spécifiquement transféré de l'H₂ vers le méthényl-H₄MPT⁺. Ce mécanisme est dépendant de la catalyse de la réduction du coenzyme F₄₂₀ avec l'hydrogène par Hmd. Contrairement aux autres hydrogénases, les Hmd ne catalysent ni la réduction réversible du méthyl viologène avec l'hydrogène, ni *per se* (c'est-à-dire en l'absence d'accepteurs d'électrons) les réactions d'échange des isotopes simples et doubles entre H₂ et les protons de l'eau et de conversion du para-H₂ en ortho-H₂. Cependant, les Hmd sont capables de catalyser ces deux dernières réactions en présence du substrat : le méthényl-H₄MPT⁺. Ceci indique que le clivage hétérolytique de l'hydrogène nécessite la complexation de l'enzyme avec le méthényl-H₄MPT⁺.

L'holoenzyme de *Methanothermobacter marburgensis* est la Hmd la plus facilement purifiée en grande quantité et donc la plus étudiée. L'activité spécifique de Hmd de *M. marburgensis* est augmentée par 6 au cours de la croissance de cet archeon en chemostat lors de conditions de limitation en nickel, par rapport à des conditions de croissance sur milieu contenant du nickel. Cette augmentation est directement corrélée à une augmentation 5 fois plus importante de la concentration en Hmd. Il a été démontré que l'expression de Hmd chez *M. marburgensis* est régulée à un niveau transcriptionnel (Afting *et al.*, 2000).

Ces hydrogénases Hmd ne contiennent ni centre fer-soufre ni atome de nickel, par contre, elles présentent la caractéristique de posséder un cofacteur non-peptidique extractable. Ce cofacteur organique est extrait par dénaturation de l'enzyme en présence d'urée, de guanidine-HCl, ou de β-mercaptoéthanol. Il peut être réincorporé à l'apoprotéine Hmd inactive pour obtenir une Hmd active (Buurmann *et al.*, 2000).

L'activité des Hmd est sensible à la lumière et à la température, est inhibée par le monoxyde de carbone et le cyanure, mais pas par l'oxygène. Lyon *et al.*, (2004a et b) ont montré que

l'activité des Hmd dépend du fer contenu dans son cofacteur. Shima *et al.*, (2004) ont observé que par action de la lumière le cofacteur des Hmd est cindé en un atome de fer, deux molécules CO, et en un cofacteur dérivé du pyridone de 542 Da inactivé par la lumière (Figure 11). Le cofacteur Hmd contient donc deux ligands CO intrinsèques liés à l'atome de fer.

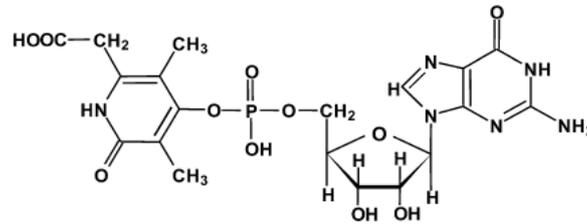


Figure 11 : Produit inactivé du cofacteur Hmd irradié par la lumière UV-visible (Pilak *et al.*, 2006).

Les structures cristallines des apoenzymes Hmd de *Methanocaldococcus jannaschii* (Figure 12) et de *Methanopyrus kandleri* ont été récemment déterminées par Pilak *et al.*, (2006) à une résolution de 1,75 Å et de 2,4 Å respectivement. Les gènes *hmd* de ces deux méthanogènes, contrairement à celui de *M. marburgensis*, peuvent être exprimés de façon hétérologue dans *E. coli*. L'homodimère est formé de trois domaines : deux domaines N-terminaux, et un domaine central composé des moitiés C-terminales des deux sous-unités.

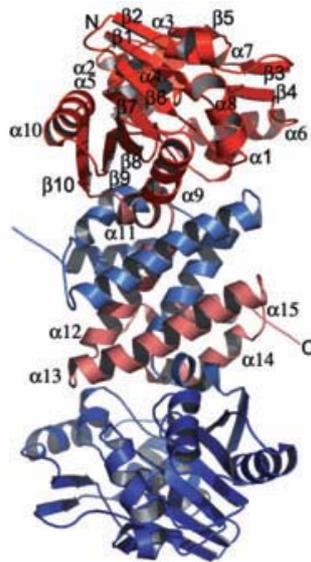


Figure 12 : Structure de l'apoenzyme hydrogénase sans centre-fer soufre (Hmd) de *Methanocaldococcus jannaschii*. Diagramme en ruban du dimère (Pilak *et al.*, 2006).

Une étude structure-fonction de l'enzyme a été récemment menée par spectroscopie d'absorption au rayon X pour définir le motif de fixation du fer dans la protéine et le rôle du fer dans la réaction catalytique (Korbas *et al.*, 2006). Les mesures d'activité des holoenzymes

Hmd reconstituées, provenant d'apoenzymes Hmd de *M. jannaschii* mutées et du cofacteur contenant du fer, ont révélé que parmi les trois résidus cystéine conservés (C10, C176 et C250), seule la cystéine C176 est essentielle à l'activité de l'enzyme. L'atome de fer de l'enzyme Hmd active n'est pas redox actif et est en résonance paramagnétique électronique (RPE) silencieux. Les spectroscopies infrarouge (IR), Mössbauer et d'absorption aux rayons X ont révélé que, comme dans le cofacteur Hmd, l'atome de fer dans l'enzyme est de bas spin et lié à la cystéine C176 de la protéine grâce à une liaison thiolate, et donc, coordonné à 2 CO, 1 S, et 1 ou 2 atomes N/O, ligands de la partie organique du cofacteur Hmd. Dans l'enzyme inhibée par le monoxyde de carbone, 3 CO, 1 S et 1 O/N sont à des distances ligantes du fer, et dans l'enzyme inhibée par le cyanure, 2 CO, 1 CN et 1 O/N sont observés. A cause de la fixation du CO, CN ou H₂, ce site de fixation est considéré comme étant le site d'activation de l'H₂.

3.3.2. Les hydrogénases à nickel-fer

Les [NiFe]-hydrogénases constituent une grande famille d'enzymes très diverse, répandue, et donc largement étudiée. La famille des [NiFe]-hydrogénases ne contient que des hydrogénases possédant un atome de nickel au niveau du site actif. Ces enzymes catalysent préférentiellement l'oxydation de l'hydrogène. Elles peuvent être multimériques, mais la plupart sont hétérodimériques. Ces hétérodimères sont constitués d'une grande sous-unité α et d'une petite sous-unité β , distinctes sur le plan immunologique (Kovacs *et al.*, 1989).

La grande sous-unité α (46 à 72 kDa) comprend le site actif constitué du centre bimétallique nickel-fer profondément enfoui dans la protéine. La petite sous-unité β (23 à 38 kDa) ne contient pas plus de trois centres fer-soufre.

Les donneurs ou accepteurs d'électrons physiologiques des [NiFe]-hydrogénases sont le cytochrome c₃, le F₄₂₀ et le NAD(P)⁺.

3.3.2.1. Localisation

Les [NiFe]-hydrogénases ont été isolées chez des procaryotes, c'est-à-dire des bactéries telles que les protéobactéries et cyanobactéries, et des archa méthanogènes.

Les [NiFe]-hydrogénases existent sous forme cytoplasmique, périplasmique et /ou membranaire. Pour être exportées vers le périplasme ou importées dans un organelle

(chloroplaste ou hydrogénosome), les protéines sont dotées d'un peptide signal de 30 à 50 acides aminés à l'extrémité N-terminale de la petite sous-unité. Le peptide signal contient un motif très conservé de double arginine (S/T)RRxFxK reconnu par une voie de translocation Sec-indépendante (Sargent *et al.*, 1998 a) appelée système Tat pour « Twin-arginine translocation » (Sargent *et al.*, 1998 b ; Berks *et al.*, 2000).

3.3.2.2. Classification des [NiFe]-hydrogénases

D'après les alignements de séquences nucléiques des petite et grande sous-unités, il a été montré que les deux sous-unités des [NiFe]-hydrogénases évoluaient conjointement. Cette analyse mène à la classification des [NiFe]-hydrogénases en différents groupes (Przybyla *et al.*, 1992 ; Wu et Mandrand, 1993 ; Vignais *et al.*, 2001, Vignais et Colbeau, 2004). Une représentation simplifiée de l'arbre phylogénétique des [NiFe]-hydrogénases mettant en évidence quatre principaux groupes, a été réalisée par Vignais et Colbeau, (2004) (Figure 13):

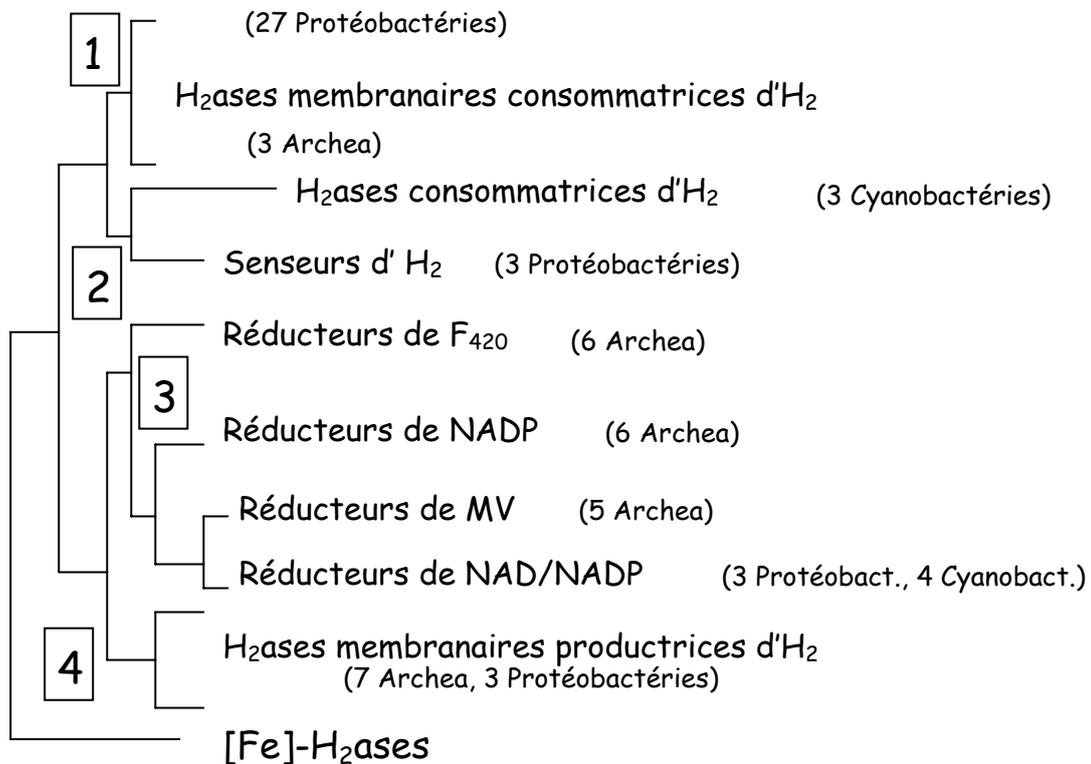


Figure 13 : Représentation schématique de l'arbre phylogénétique des [NiFe]-hydrogénases basée sur la séquence nucléotidique complète des petite et grande sous-unités (le même arbre a été obtenu pour chaque type de sous-unité) (Vignais *et al.*, 2001, Vignais et Colbeau, 2004).

Groupe 1 : Les [NiFe]-hydrogénases membranaires consommatrices d'hydrogène

Ces enzymes sont capables de supporter une croissance avec de l'hydrogène comme seule source énergétique. Ces hydrogénases réalisent l'oxydation de l'hydrogène, les électrons de l'hydrogène sont transférés au cytochrome lié à un complexe membranaire de la chaîne respiratoire effectuant la translocation transmembranaire de protons. Certaines sont périplasmiques et membranaires, et sont présentes dans les protéobactéries réductrices du fumarate ou d'oxydants inorganiques : *Wolinella succinogenes*, dans les protéobactéries réductrices d'oxygène et photosynthétiques : *Ralstonia eutropha* (Kleihues *et al.*, 2000), dans les protéobactéries fixatrices d'azote : *Rhizobium leguminosarum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Azotobacter vinelandii*, *Azotobacter chroococcum*, et dans des protéobactéries anaérobies sulfo-réductrices sous forme périplasmique soluble du genre *Desulfovibrio*. Ce groupe 1 comprend également les hydrogénases 1 et 2 d'*E. coli* (Sargent *et al.*, 1998a), et l'hydrogénase nickel-fer putative de *C. acetobutylicum* dont l'opéron est localisé sur le mégaplasmide pSOL1 (Thèse de L. Fontaine, 2001 ; Vignais *et al.*, 2001). Enfin, les hydrogénases nickel-fer du groupe 1 sont également trouvées dans des archa méthanogènes sous forme membranaire : *Methanosarcina mazei*.

Groupe 2 : Les [NiFe]-hydrogénases cytoplasmiques senseurs d'hydrogène et consommatrices d'hydrogène

Ces enzymes sont divisées en deux groupes (2a) en hydrogénases consommatrices d'hydrogène présentes chez les protéobactéries fixatrices d'azote et chez certaines cyanobactéries (*Nostoc*, *Anabaena variabilis*) (Oxelfelt *et al.*, 1998 ; Happe *et al.*, 2000a), et (2b) en hydrogénases cytoplasmiques « senseurs » d'hydrogène ne contenant pas de peptide signal à l'extrémité N-terminale de la petite sous-unité. Les hydrogénases de *Bradyrhizobium japonicum*, HupUV de *R. capsulatus* et HoxBC de *R. eutropha* font partie de ce groupe. Récemment des travaux ont montré que les hydrogénases senseurs d'hydrogène peuvent participer à la régulation de l'expression des gènes.

Groupe 3 : Les [NiFe]-hydrogénases cytoplasmiques hétéromultimériques réversibles

Ces enzymes ont la capacité de lier des cofacteurs solubles tels que le F₄₂₀, NAD⁺ ou NADP⁺ et fonctionnent de façon réversible. Elles sont présentes chez les bactéries hyperthermophiles, chez les archa anaérobies méthanogènes telles que *M. mazei*, *Methanococcus voltae*, *Methanococcus jannaschii*, et hyperthermophiles *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus*

litoralis, et chez les cyanobactéries *Nostoc sp.*, *Anacystis nidulans*, *Anabaena variabilis*, *Synechocystis sp.*.

Groupe 4 : Les [NiFe]-hydrogénases membranaires productrices d'hydrogène

Ces enzymes associent l'oxydation d'un groupe carbonyle de composés organiques à un carbone (CO, formate, acétate) à la réduction de protons de l'eau, pour produire de l'hydrogène. Elles forment un grand groupe d'hydrogénases comprenant l'hydrogénase 3 d'*E. coli* (oxydation du formate), l'hydrogénase de *Rhodospirillum rubrum* (oxydation du CO), mais aussi celles d'archaea telles que *Methanosarcina barkeri*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *P. furiosus*.

3.3.2.3. *Structure globale*

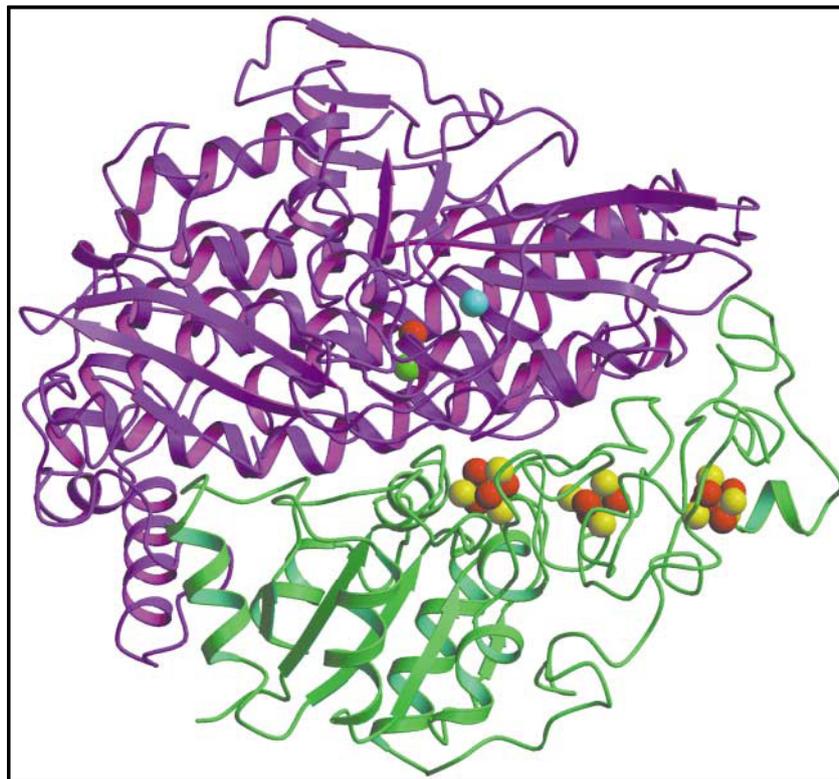


Figure 14 : Structure tridimensionnelle de la [NiFe]-hydrogénase de *D. gigas* (1FRV). Les petite et grande sous-unités sont colorées respectivement en vert et violet. Les métaux et atomes de soufre inorganiques sont représentés en sphères, montrant la présence de trois centres fer-soufre dans la petite sous-unité et trois ions métalliques dans la grande sous-unité (Ni, Fe, Mg). L'ion métallique nickel (en vert) est proche du centre de la structure hétérodimérique.

La structure tridimensionnelle de la [NiFe]-hydrogénase de *Desulfovibrio gigas* (Figure 14) (Volbeda *et al.*, 1995, 1996) a été la première structure d'une hydrogénase à nickel-fer déterminée, suivie par celles de *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (Higuchi *et al.*, 1997, 1999), *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774 (Matias *et al.*, 2001) et *Desulfovibrio fructosovorans* (Montet *et al.*, 1997 ; Volbeda *et al.*, 2005).

La structure tridimensionnelle de la [NiFeSe]-hydrogénase de *Desulfomicrobium norvegicum* (ou *Desulfomicrobium baculatum*) a été rapportée par Garcin *et al.*, en 1999. Les structures de ces hydrogénases nickel-fer ont montré que les deux sous-unités interagissent fortement au niveau d'une large surface de contact et forment un hétérodimère globulaire. Globalement, ces [NiFe]- et [NiFeSe]-hydrogénases sont très similaires, et montrent un degré élevé d'homologie de séquences et d'identité de structures. Elles contiennent toutes un site actif bimétallique nickel-fer et trois centres fer-soufre. Un ion magnésium a été découvert dans la grande sous-unité de la NiFe-hydrogénase de *D. gigas* et *D. vulgaris* Miyazaki F, situé à seulement 13Å du métal Ni et coordonné à l'histidine H552 et le glutamate E62. Le rôle de ce Mg²⁺ reste inconnu.

3.3.2.3.7 La grande sous-unité α

La grande sous-unité α contient le site catalytique de l'enzyme. Ce site actif bimétallique nickel-fer est coordonné à la protéine par 2 liaisons thiolate avec 2 cystéines liées à l'atome de nickel et 2 liaisons thiolate avec 2 autres cystéines qui pontent les deux atomes métalliques (Figures 15). La séquence protéique de la grande sous-unité présente de fortes homologies entre espèces. Les motifs RxCGxCxxxH dans la région N-terminale et DPCxxCxxH dans la région C-terminale sont très conservés et interviendraient dans la fixation du nickel dans le site actif (Przybyla *et al.*, 1992 ; Vignais *et al.*, 2001). Dans la [NiFeSe]-hydrogénase, la sélénocystéine est pontée à l'atome de nickel. Le ligand sélénium semble protéger le nickel de l'oxydation.

Par spectroscopie infrarouge de transformée de Fourier (FTIR) et par cristallographie aux rayons X, il a été montré que l'atome de fer de la [NiFe]-hydrogénase de *D. gigas* est lié à des ligands diatomiques non-protéiques, deux molécules de cyanure (CN⁻) et une molécule de monoxyde de carbone (CO) (Volbeda *et al.*, 1996 ; Happe *et al.*, 1997 ; Pierik *et al.*, 1999). Certains sites actifs de [NiFe]-hydrogénases peuvent diverger. Les propriétés FTIR et de résonance paramagnétique électronique du site actif de la [NiFe]-hydrogénase de *D. vulgaris*

Miyazaki ont permis de montrer la présence des ligands : SO, CO et CN⁻ (Higuchi *et al.*, 1997, 2000) et celles de l'hydrogénase NAD-réductrice soluble de *R. eutropha* (SH) suggèrent la présence de deux ligands CN⁻ additionnels, ainsi le site actif serait composé de Ni(CN)Fe(CN)₃(CO) (Happe *et al.*, 2000b). Le site actif est enfoui profondément dans la protéine à une distance de 30Å de la surface de la protéine.

Ce site actif peut être activé ou désactivé de façon réversible, suivant son état d'oxydation et de photosensibilité. L'état d'oxydation est induit selon l'état divalent ou trivalent de l'ion nickel. L'atome de fer reste tout le temps un ion Fe²⁺ de bas spin. La forme oxydée inactive du site actif de l'enzyme isolée de façon anaérobie, présente un ligand exogène pontant les atomes de fer et de nickel, tandis que la forme réduite active n'en possède pas (Figure 15). Sous réduction induite par la présence d'hydrogène, le ligand est libéré, la distance entre les atomes de nickel et de fer se raccourcit et devient optimale pour la fixation d'un hydride sur l'atome de nickel. Le ligand exogène de la forme oxydée inactive serait une espèce monoatomique oxo/hydroxo (Garcin *et al.*, 1999 ; Volbeda *et al.*, 1996) ou un atome de soufre (SO) (Higuchi *et al.*, 1997 ; Matias *et al.*, 2001) (Figure 15). Volbeda *et al.*, (2005) ont montré récemment que les atomes de fer et de nickel du site actif de la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans* sont pontés par un ligand qui serait une espèce diatomique (hydro-) peroxyde dans la forme oxydée « unready » et monoatomique hydroxyde dans la forme oxydée « ready ».

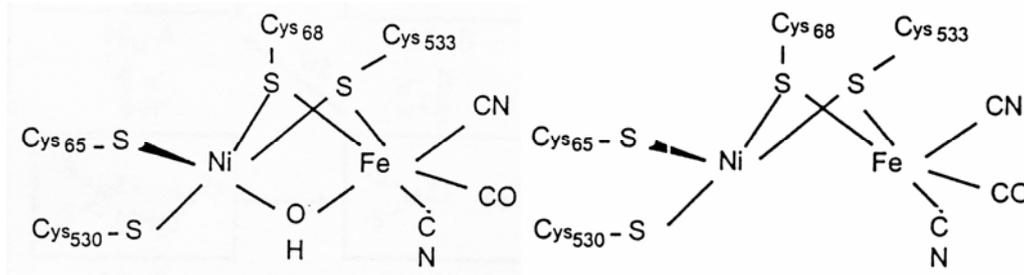


Figure 15 : Structure schématique du site actif des [NiFe]-hydrogénases; à gauche, forme oxydée inactive « ready » correspondant à l'état Ni-B ; à droite, forme réduite active correspondant à l'état Ni-S et Ni-R.

De nombreuses études utilisant des approches biophysiques telles que la spectroscopie Mössbauer, la résonance paramagnétique électronique, et la spectroscopie infrarouge de transformée de Fourier (FTIR) couplée à des mesures potentiométriques ont été réalisées pour identifier les intermédiaires d'oxydo-réduction du site actif (Revue Albracht, 1994, 2001 ; Cammack, 2001).

L'hydrogénase nickel-fer isolée en condition aérobie présente un signal RPE relié à l'atome de nickel, appelé **Ni-A**. En condition anaérobie, elle présente deux signaux, appelés **Ni-B** et **Ni-C** (Fernandez *et al.*, 1986 ; Cammack *et al.*, 1987) (Figure 16). Le signal **Ni-A** correspond à un état oxydé inactif appelé « unready » de la protéine dont l'activation peut prendre quelques heures. Le signal **Ni-B** correspond à l'état « ready » qui peut être rapidement réduit en forme active par l'H₂ sous condition anaérobie permettant de développer une activité consommatrice d'hydrogène en présence d'accepteurs d'électrons.

Pendant la réduction de l'enzyme en présence d'hydrogène, elle présente un signal RPE sensible à la lumière appelé **Ni-C**, cet état est actif et impliqué dans le cycle catalytique. Il se dégrade par photolyse à une température de 77K, générant un autre signal RPE, **Ni-L** ou **Ni-C***. Deux états redox RPE-silencieux résultent de la réduction d'un électron de **Ni-B** et **Ni-C**. Ce sont les états **Ni-S** et **Ni-R**.

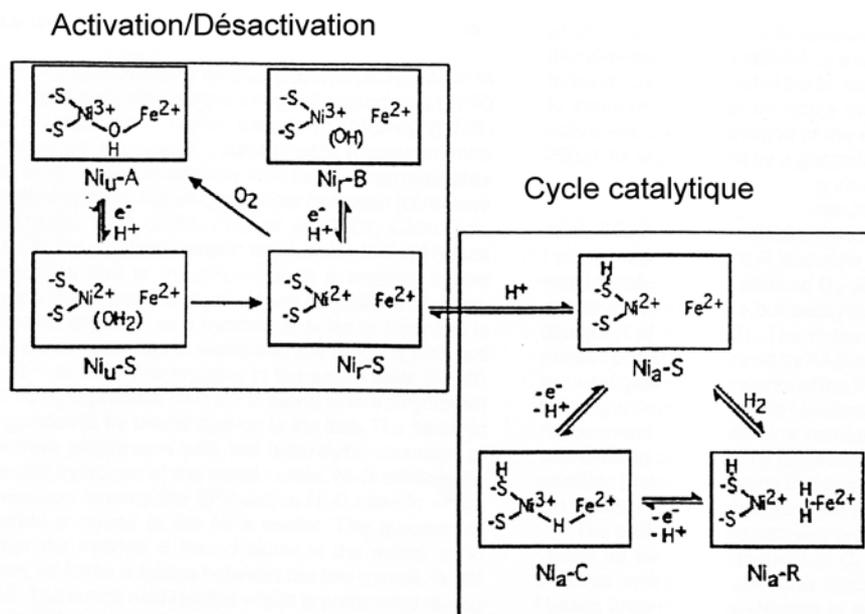


Figure 16 : Mécanisme enzymatique proposé des hydrogénases nickel-fer. Ce schéma représente les différents états d'oxydo-réduction caractérisés spectroscopiquement de l'hydrogénase nickel-fer et la coordination entre les atomes de Ni et de Fe du site actif. (u : unready ; r : ready ; a : active) (Vignais et Colbeau, 2004)

L'inhibiteur compétitif CO bloque le transfert d'électrons et de protons au niveau du site actif en se fixant sur l'atome de nickel. Il déplace l'hydrogène et stabilise l'état réduit Ni-S(CO) (Vignais et Colbeau, 2004).

3.3.2.3.8 La petite sous-unité β

La petite sous-unité β contient trois centres fer-soufre. Ils sont de types différents. Deux centres sont de type [4Fe-4S], l'un d'entre eux est coordonné par quatre résidus cystéine (typique), et l'autre est coordonné par une histidine et trois cystéines (atypique). Le dernier centre est original, de type [3Fe-4S], il est coordonné par trois cystéines, le dernier ligand étant remplacé par une proline (Figure 17).

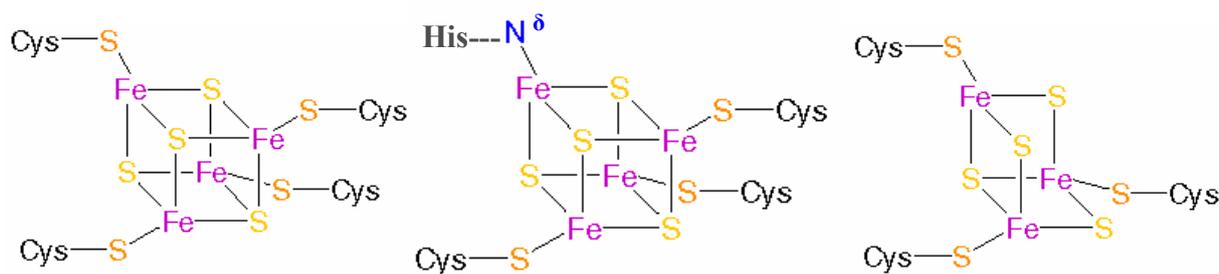


Figure 127 : Représentation schématique d'un centre [4Fe-4S] typique (à gauche), d'un centre [4Fe-4S] atypique lié au N^δ d'une histidine (au milieu) et d'un centre [3Fe-4S] original (à droite).

Le transfert d'électrons intra-moléculaire s'effectue du site actif [NiFe] enfoui dans la protéine vers le centre [4Fe-4S] proximal (car le plus proche du site actif) (coordonné à 4 cystéines), via le centre [3Fe-4S] médian, au centre [4Fe-4S] distal (coordonné à 1 histidine) (Figure 18). Ce dernier est le plus proche de la surface de la molécule et est capable de transférer les électrons inter-moléculairement à l'accepteur d'électrons artificiel ou physiologique externe. Ces trois centres fer-soufre sont situés en ligne et distants de 12Å.

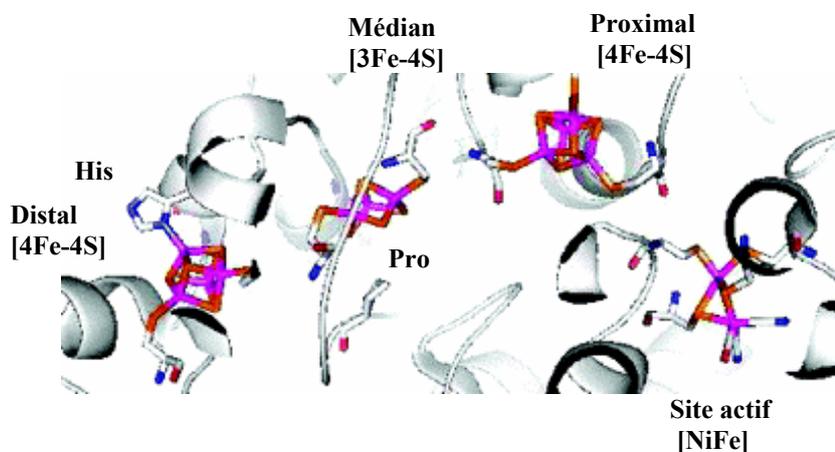


Figure 18 : Chemin de transfert intra-moléculaire des électrons entre le site actif de la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans* et la surface de la protéine (PDB : 1YQW) (Dementin *et al.*, 2006).

Chez les [NiFe]-hydrogénases, le centre [4Fe-4S] proximal est essentiel à l'activation de l'hydrogène (Volbeda *et al.*, 1995 ; Fontecilla-Camps *et al.*, 1997). Par ailleurs, Dementin *et al.*, 2006 ont démontré la fonction essentielle de l'histidine liée au centre [4Fe-4S] distal dans l'activité catalytique de la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans*.

Les potentiels d'oxydo-réduction de ces centres fer-soufre sont différents. Dans la [NiFe]-hydrogénase de *D. gigas*, les potentiels d'oxydo-réduction des deux centres [4Fe-4S] sont faibles : -290 mV et -340 mV, et celui du centre [3Fe-4S] médian est élevé -70 mV. Ce dernier est thermodynamiquement non favorable et pose des questions sur l'implication de ce centre dans le transfert des électrons. Chez la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans*, Rousset *et al.*, (1998) ont montré qu'en reconstituant un centre [4Fe-4S] à partir d'un centre [3Fe-4S], le potentiel d'oxydo-réduction est diminué de +65 mV à -250 mV alors que l'activité catalytique de l'enzyme n'est que faiblement modifiée. Il semblerait ainsi que si ce centre [3Fe-4S] médian est effectivement impliqué dans le transfert d'électrons, ce ne soit pas le transfert d'électrons qui est une étape limitante dans la réaction catalytique mais un transfert de protons couplé à celui-ci. Il est également possible que le potentiel d'oxydo-réduction apparent mesuré soit supérieur à celui microscopique si l'état d'oxydo-réduction impliqué dans le cycle catalytique était le résultat d'une coopérativité entre les centres fer-soufre de la protéine.

Chez les [NiFe]-hydrogénases, un canal hydrophobe liant le site actif à la surface de la molécule a été mis en évidence. Il permet la diffusion du gaz et le transfert de protons (Fontecilla-Camps *et al.*, 1997 ; Montet *et al.*, 1997).

3.3.2.4. Génétique

Chez les protéobactéries, les hydrogénases consommatrices d'H₂ sont codées par des opérons multicistroniques. Les gènes de structure, qui codent pour les petite et grande sous-unités, sont habituellement présents au début de l'opéron, suivis par un jeu de gènes accessoires codant pour des protéines de maturation et de régulation.

Le gène de structure codant pour la petite sous-unité est appelé S ou K (*hupS*, *hoxK*, *hydS*), celui codant pour la grande sous-unité est appelé L ou G (*hupL*, *hoxG*, *hydL*). Les gènes codant pour les protéines de maturation sont nommés *hup* ou *hox*. Un autre jeu de protéines, codées par les gènes *hyp* (p pour pléiotropique), est impliqué dans l'insertion des atomes de Ni, Fe, CO et CN dans le site actif. Finalement, cet opéron hydrogénase comprend également des gènes de régulation qui contrôlent l'expression des gènes de structure.

D'autres gènes, qui ne font pas partie de cet opéron, sont impliqués. Il s'agit des gènes dont les produits peuvent transporter des protéines repliées, matures, à travers la membrane cytoplasmique bactérienne grâce à la voie de translocation de la protéine spécifique Tat (Berks *et al.*, 2000 ; 2003).

3.3.2.5. Maturation

La synthèse d'une [NiFe]-hydrogénase dimérique fonctionnelle requiert une énorme machinerie cellulaire impliquant différentes protéines de maturation. Cette maturation permet la biosynthèse du site actif. Sept gènes de maturation du site actif des [NiFe]-hydrogénases fonctionnelles chez *E. coli* ont été découverts. Six d'entre eux sont des gènes *hyp* (*hypA*, *hypB*, *hypC*, *hypD*, *hypE*, et *hypF*) et le dernier code une endopeptidase. L'analyse de la séquence en acides aminés des produits de ces gènes chez les archa et les bactéries a permis de mettre en évidence leur haute conservation. Des fonctions ont été assignées à la plupart des produits issus de ces gènes de maturation (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés des protéines auxiliaires impliquées dans la maturation des [NiFe]-hydrogénases 1, 2 et 3 d'*E. coli* (Blokesch *et al.*, 2002).

<i>Protéines</i>	<i>Masse moléculaire (kDa)</i>	<i>Fonction</i>
HypA/HybF	13/12.6	insertion du Ni
HypB	31.4	GTPase, insertion du Ni
HypC/HybG	9.6/8.7	Chaperone, insertion du Fe
HypD	41.2	Protéine Fe-S, insertion du Fe
HypE	33.6	Synthèse de CO/CN, ATPase
HypF	81.9	Synthèse de CO/CN, Carbamoyl phosphate Phosphatase, ATP pyrophosphorylase
Endopeptidases HyaD, HybD, HycI	21.4/17.6/16.9	Clivage C-terminal
Carbamoyl phosphate synthétase (CarA/CarB)	41.3/117.6	Précurseur CO/CN

Par exemple, la maturation de la [NiFe]-hydrogénase 3 d'*E. coli* est initiée par la fixation du fer du site actif et de ses ligands diatomiques CO et CN⁻. Ensuite, l'atome de nickel est incorporé, et seulement après l'incorporation correcte du Fe(CO)(CN)₂ et du Ni, le clivage endoprotéolytique à l'extrémité C-terminale du précurseur de la grande sous-unité est effectué (Figure 19).

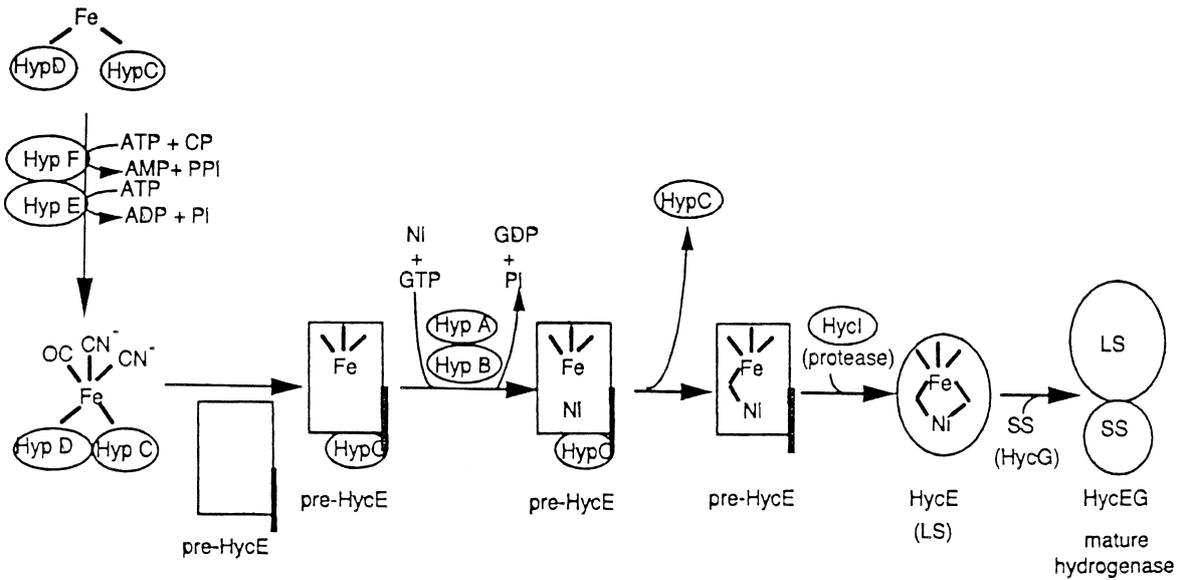


Figure 19 : Etapes potentielles de la maturation de l'hydrogénase 3 d'*E. coli* (Blokesch *et al.*, 2002 ; Vignais et Colbeau 2004).

L'insertion du fer et du nickel dans le centre métallique est un processus séquentiel dans lequel l'incorporation du fer précède celle du nickel. Le donneur du fer n'est pas identifié. Le fer serait incorporé dans un complexe formé par HypC et HypD (Blokesch *et al.*, 2002). La synthèse des ligands CN^- est accomplie par les protéines HypF et HypE. La protéine HypF contient le motif caractéristique VxHHxAH des O-carbamoyl transférase (Paschos *et al.*, 2002) et des acyl-phosphatases (Rosano *et al.*, 2002). La protéine HypF accepte le carbamoyl phosphate (CP) comme substrat, et catalyse une hydrolyse CP-dépendante de l'ATP en AMP et pyrophosphate inorganique (PPI) pour former un dérivé CP adénylé. Le CP est nécessaire à la synthèse du centre métallique.

En présence de HypE et HypF (CP et ATP), le groupe carbamoyl du CP est transféré à HypE. La carbamoylation de HypE par HypF est suivie de la déshydratation ATP-dépendante de HypE-thiocarboxamide pour donner HypE-thiocyanate. Le groupe CN^- est alors transféré au fer du complexe HypD-HypC (Blokesch *et al.*, 2004 ; Blokesch et Böck, 2006). Le ligand CO est synthétisé par une voie différente encore non caractérisée (Roseboom *et al.*, 2005), peut-être grâce au centre $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ contenu dans HydD.

La protéine HypC contient une cystéine N-terminale essentielle qui permet une liaison thiolate avec l'atome de fer et ses ligands. HypC est également assimilée à une protéine chaperonne qui maintiendrait la grande sous-unité dans une conformation accessible pour l'insertion du fer. Le complexe HypD-HypC interagit avec la forme précurseur de la grande sous-unité α (pré-HycE) (HycE étant la grande sous-unité de l'hydrogénase 3 d'*E. coli*) et

libère HypD formant le complexe pré-HycE-HypC-Fe(CO)(CN)₂. L'atome de fer lié aux trois ligands diatomiques est stabilisé par les acides aminés de la cavité du site actif dans le complexe pré-HycE (Blokesch *et al.*, 2004).

Le complexe pré-HycE-HypC est alors prêt pour l'incorporation du nickel dans la protéine.

Des analyses par mutations ont montré que l'activité des deux produits des gènes *hypA* et *hypB* est nécessaire *in vivo*. La protéine HypA intervient dans la maturation de l'hydrogénase 3 d'*E. coli* tandis qu'un homologue de HypF opère dans la maturation des hydrogénases 1 et 2 d'*E. coli* (Hube *et al.*, 2002).

HypB est une protéine dimérique capable de fixer le GDP/GTP, elle a une activité GTPase résiduelle qui a été montrée comme étant essentielle pour l'insertion du nickel (Olson et Maier, 2000). Cette protéine est capable de fixer les atomes de nickel à raison de 18 Ni par HypB. Dans certains organismes, HypB aurait un rôle de stockage des atomes de nickel grâce à un domaine riche en histidine situé à son extrémité N-terminale (Olson and Maier, 2000). Dans d'autres, elle n'a pas cette fonction de stockage du nickel, ce qui est compensé par une haute efficacité du système de transport du nickel (Eitinger et Mandrand-Berthelot, 2000). HypA et HypB-GTP interagiraient avec le complexe pré-HycE-HypC et lui transmettraient l'atome de nickel. Le centre bimétallique Ni-Fe lié aux ligands (CO)(CN)₂ est alors bien inséré dans la grande sous-unité α .

Le complexe pre-HycE-HypC se dissocie. L'extrémité C-terminale du précurseur de la grande sous-unité α est alors éliminée par une protéase spécifique HycI. L'atome de nickel sert de motif de reconnaissance dans l'interaction avec cette protéase. Cette étape protéolytique est suivie d'un changement conformationnel proche du centre métallique de la grande sous-unité, provoquant la fixation des atomes de fer et de nickel à des cystéines de la protéine via des liaisons thiolate (Theodoratou *et al.*, 2005).

Après la maturation complète du site actif dans la grande sous-unité α , la dernière étape de maturation de l'hydrogénase nickel-fer est la formation du complexe avec la petite sous-unité β .

La petite sous-unité β a subit elle-aussi une maturation pour former et incorporer tous les centres fer-soufre de la protéine. Il existe des systèmes de maturation et biosynthèse des centres fer-soufre communs à beaucoup de protéines à centres fer-soufre. Pour les protéines de bactéries, cyanobactéries, levures, et champignons, trois systèmes sont connus : (i) le système « nif » codé par les gènes de l'opéron *nif* (Frazzon *et al.*, 2002), pour l'assemblage

des centres fer-soufre dans les nitrogénases, (ii) le système « isc » (iron sulfur cluster formation) codé par les gènes de l'opéron *isc*, pour l'assemblage des centres fer-soufre de nombreuses protéines (Zheng *et al.*, 1998) et (iii) le système « suf » (sulfur mobilisation) (Patzner et Hantke, 1999) codé par les gènes de l'opéron *suf*, analogue au système *isc*, ce système alternatif est stimulé en cas de carence en fer ou en condition de stress oxydatif (Takahashi et Tokumoto, 2002). Les protéines essentielles impliquées dans l'assemblage des centres fer-soufre sont : NifS, IscS ou SufS, ce sont des cystéine désulfurases qui permettent de donner le soufre via une L-cystéine (Zheng *et al.*, 1998), et les NifU, IscU, protéines de conformation qui aident à la formation des centres fer-soufre médiée par les protéines NifS, IscS, ou SufS (Agar *et al.*, 2000). Les protéines IscA et SufA sont des protéines de conformation alternatives, IscA a également été montrée comme étant un donneur de fer pour l'assemblage de protéines à centres fer-soufre chez *E. coli* (Ding et Clark, 2004). Des protéines chaperones sont aussi impliquées dans cet assemblage comme les protéines HscA, et HscB (Hoff *et al.*, 2000).

Ces systèmes sont hautement régulés, IscR est un facteur de transcription qui permet de réguler négativement l'expression des gènes de l'opéron *isc* (Schwartz *et al.*, 2001). Des protéines de transport du fer peuvent également jouer un rôle dans la régulation de la formation des centres fer-soufre.

3.3.3. Les hydrogénases à fer

Les [FeFe]-hydrogénases contiennent seulement des atomes de fer au niveau du site actif de la protéine, et ne contiennent donc pas de nickel. *In vivo*, elles catalysent préférentiellement la réaction de production d'hydrogène. La ferrédoxine, la flavodoxine et le cytochrome réduits sont les donneurs d'électrons physiologiques des [FeFe]-hydrogénases.

Contrairement aux [NiFe]-hydrogénases, les [FeFe]-hydrogénases sont le plus souvent monomériques et leur poids moléculaire est approximativement de 60 kDa. Elles sont constituées seulement d'une unité catalytique mais contiennent souvent des domaines accessoires qui logent des centres fer-soufre. Elles sont extrêmement sensibles à l'oxygène.

3.3.3.1. Localisation

Les [FeFe]-hydrogénases sont beaucoup moins répandues que les [NiFe]-hydrogénases. Les [FeFe]-hydrogénases ont été découvertes chez quelques bactéries anaérobies et eucaryotes mais aucune n'a été identifiée chez les archa. Ces enzymes ont été purifiées chez des micro-organismes fermentatifs anaérobies stricts (*Clostridia*, *Megasphaera elsdenii*), chez certaines bactéries hyperthermophiles telles que *T. maritima*, chez des bactéries réductrices de sulfate telles que *Desulfovibrio*, chez des eucaryotes tels que les algues vertes (*C. reinhardtii*), et chez le protozoaire *Trichomonas vaginalis* (Adams *et al.*, 1990, 2000).

Les [FeFe]-hydrogénases d'eucaryotes sont localisées dans des organelles limitées par des membranes comme les chloroplastes ou les hydrogénosomes.

Les hydrogénases à fer des bactéries anaérobies (*C. acetobutylicum* (HydA et HydB), *C. pasteurianum* (CpI, CpII), *M. elsdenii*), et les algues vertes (*S. obliquus*, *C. reinhardtii* (HydA1, HydA2)) sont monomériques et cytoplasmiques. Par contre, celles des bactéries réductrices de sulfate *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough (DvH), *Desulfovibrio desulfuricans* (DdH), *D. fructosovorans* sont dimériques et périplasmiques.

3.3.3.2. Génétique

Les hydrogénases à fer monomériques de *C. acetobutylicum*, *C. pasteurianum*, *M. elsdenii*, *C. reinhardtii* ont été clonées respectivement par Gorwa *et al.*, 1996 ; King *et al.*, 2006 ; Meyer et Gagnon, 1991 ; Atta et Meyer, 2000 et Happe et Naber, 1993.

La séquence en acides aminés de la [FeFe]-hydrogénase HydA de *C. acetobutylicum* possède 71 % d'identité avec celle de la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* (Figure 20), et présente une très haute conservation des résidus cystéine liés au site actif et aux centres fer-soufre de la protéine.

L'hydrogénase à fer de *D. vulgaris* Hildenborough (DvH) a été clonée par Voordouw *et al.*, (1985) et séquencée par Voordouw et Brenner, (1985). Les autres séquences d'hydrogénases à fer du genre *Desulfovibrio* ont été étudiées par Voordouw, (1990 et 1992).

Les séquences protéiques des petite et grande sous-unités de la [FeFe]-hydrogénase *D. desulfuricans* ATCC 7757 sont exactement les mêmes que celles de la [FeFe]-hydrogénase de *D. vulgaris* Hildenborough (Hatchikian *et al.*, 1992, 1999).

Les gènes des hydrogénases à fer monomériques sont organisés en opéron monocistronique tandis que les gènes des hydrogénases à fer dimériques sont plutôt organisés en opéron multicistronique, constitué seulement des deux gènes qui codent pour les petite et grande sous-unités de l'enzyme.

3.3.3.3. Structure globale

Selon que les [FeFe]-hydrogénases sont monomériques ou dimériques, l'unité catalytique correspond au monomère ou à la grande sous-unité. L'unité catalytique est composée au moins d'un domaine très conservé d'environ 350 résidus contenant le site actif, appelé centre H.

Les plus petites [FeFe]-hydrogénases ne sont constituées que du domaine du centre H. Elles sont retrouvées chez les algues vertes telles que *S. obliquus* (44,5 kDa), *C. fusca* (45 kDa) et *C. reinhardtii* (53,1 kDa). Deux [FeFe]-hydrogénases fonctionnelles chez *C. reinhardtii* ont été rapportées : HydA1 et HydA2 (Happe *et al.*, 2002 ; Forestier *et al.*, 2003). Leur donneur d'électron physiologique est la ferrédoxine PetF, qui relie l'hydrogénase chloroplastique à la chaîne de transport d'électrons photosynthétique (Florin *et al.*, 2001 ; Happe *et al.*, 2002 ; Winkler *et al.*, 2002).

Le modèle structural de la [FeFe]-hydrogénase HydA1 de *C. reinhardtii* est représenté ci-dessous (Figure 21).

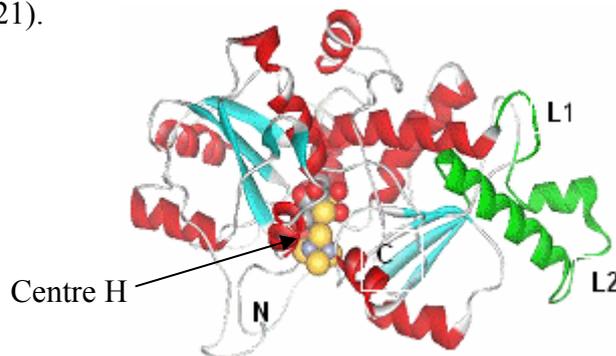


Figure 21 : Modèle de structure de l'hydrogénase à fer HydA1 de *C. reinhardtii* (Forestier *et al.*, 2003).

En plus du centre H, l'unité catalytique peut également contenir des domaines additionnels et accessoires comprenant des centres fer-soufre.

La [FeFe]-hydrogénase hétérodimérique (DdH) de *D. desulfuricans* ATCC 7757 contient, en plus du centre H, un domaine additionnel comprenant deux centres [4Fe-4S] dans l'unité catalytique ou grande sous-unité (46 kDa). La petite sous-unité (13,5 kDa) ne contient pas de centre fer-soufre. Cette [FeFe]-hydrogénase périplasmique de *D. desulfuricans* ATCC 7757 a été caractérisée (Hatchikian *et al.*, 1992) et sa structure tridimensionnelle a été déterminée par cristallographie par Nicolet *et al.*, en 1999 à une résolution de 1,6Å (Figure 22).

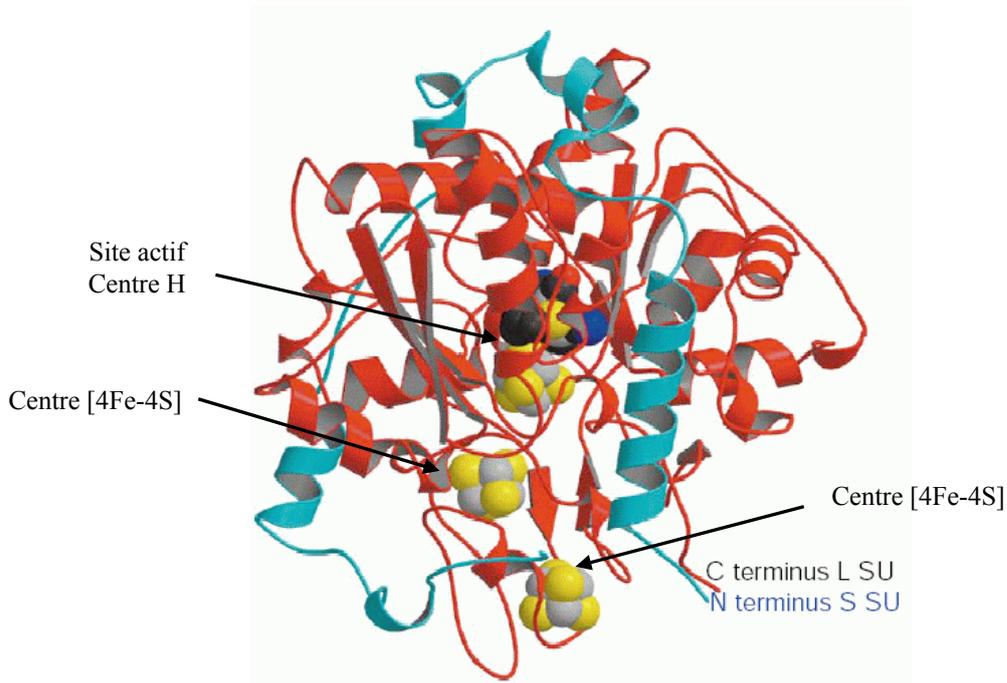


Figure 22 : La structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à fer de *D. desulfuricans* (Nicolet *et al.*, 1999). La grande sous-unité (L SU) est en rouge, et la petite sous-unité (S SU) est en bleu. Les atomes de fer, soufre, oxygène, azote, et carbone des centres fer-soufre sont représentés par des boules grises, jaunes, rouges, bleues foncé, et noires respectivement.

La [FeFe]-hydrogénase I monomérique de *C. pasteurianum* contient un domaine additionnel et deux domaines accessoires. Sa structure tridimensionnelle a été déterminée à une résolution de 1,8 Å par cristallographie par Peters *et al.*, en 1998 (Figure 23).

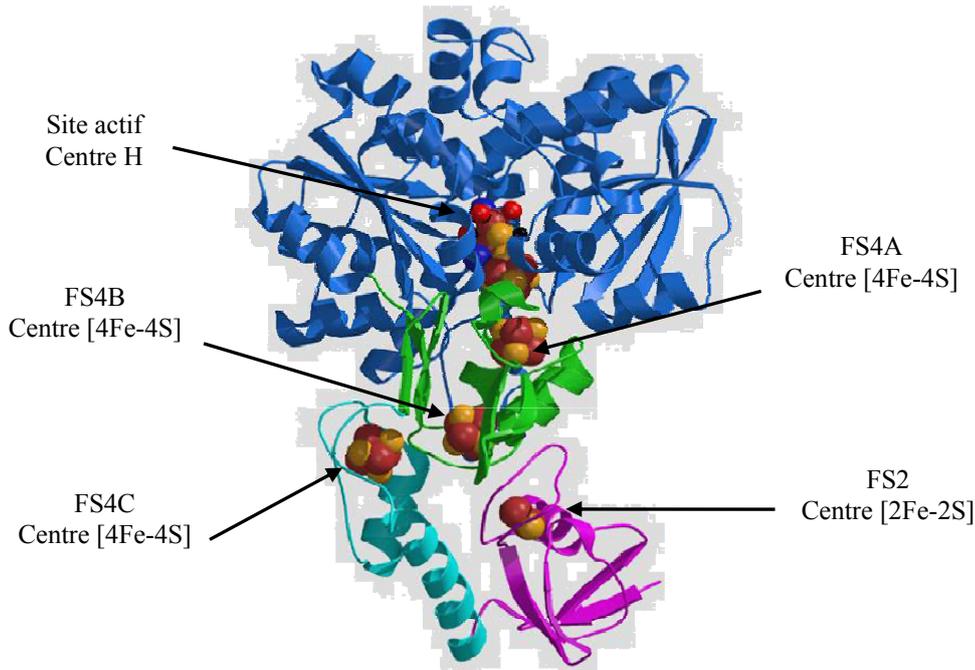


Figure 23 : Structure cristallographique de l'hydrogénase à fer I monomérique de *C. pasteurianum* à 1,8 Å de résolution (Peters *et al.*, 1998).

Elle possède le domaine contenant le site actif (centre H), le domaine additionnel (centre F) comprenant les deux centres [4Fe-4S] (FS4B et FS4A) profondément enfouis au cœur de la protéine, et les deux domaines accessoires, qui sont composés d'un centre [4Fe-4S] (FS4C) et d'un centre [2Fe-2S] (FS2) situés à la surface de la protéine. Cette structure est comparable à un champignon, où le chapeau correspondrait à la structure de l'hydrogénase à fer HydA1 de *C. reinhardtii*.

Chez les [FeFe]-hydrogénases hétérodimériques et hétérotétramériques, les structures sont composées de l'unité catalytique (la grande sous-unité) et une (la petite sous-unité) ou plusieurs sous-unités accessoires.

3.3.3.3.9 L'unité catalytique

3.3.3.3.9.1. Le domaine du site actif (centre H)

Les premières séquences des [FeFe]-hydrogénases ont mis en évidence une très bonne conservation de la partie C-terminale de l'unité catalytique où est situé le site actif.

Les deux structures tridimensionnelles des [FeFe]-hydrogénases de *C. pasteurianum* CpI et *D. desulfuricans* DdH ont révélé la structuration protéique unique du domaine du centre H (Figure 24). Le site actif est constitué d'un centre ferrique binucléaire [FeFe] relié à un centre

[4Fe-4S] fixé grâce à des liaisons thiolate aux cystéines de la protéine (Peters *et al.*, 1998 ; Nicolet *et al.*, 1999).

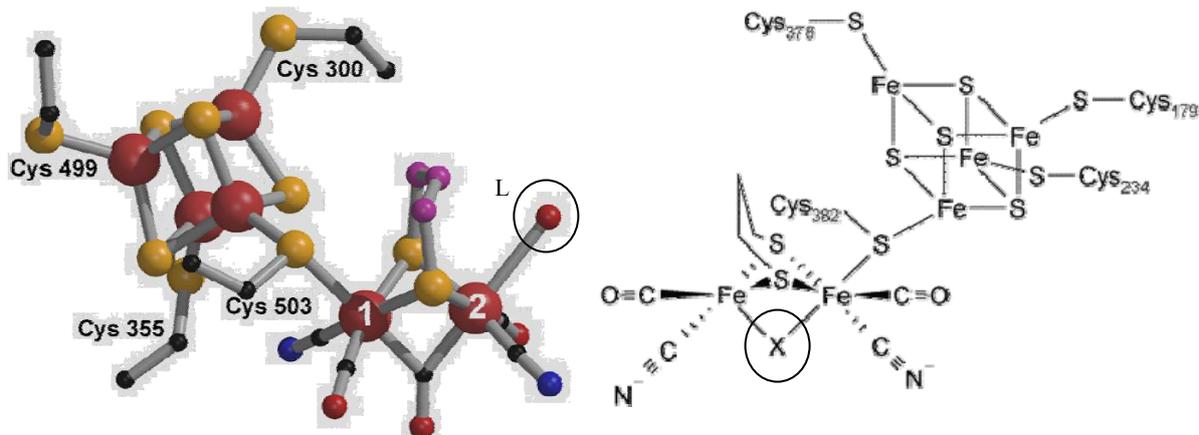


Figure 24 : Site actif des [FeFe]-hydrogénases CpI de *C. pasteurianum* où le troisième ligand (L) fixé à l'atome de fer Fe2 est une molécule d'eau (à gauche) et DdH de *D. desulfuricans* (à droite) le ligand pontant les deux atomes de fer (X) peut être H₂O, CO, H⁺ (Peters *et al.*, 1998 ; Nicolet *et al.*, 1999).

Dans le centre binucléaire [FeFe], l'atome de fer proximal formant une liaison thiolate avec une cystéine de la protéine est appelé Fe1, et l'autre atome de fer distal est noté Fe2. Les deux atomes de fer sont également pontés par un groupe organique qui semble être une molécule de 1-3 propanedithiol (PDT) (S-(CH₂)₃-S) (Nicolet *et al.*, 1999) ou plus probablement une molécule de di(thiométhyl)amine (DTN) (S-CH₂-NH-CH₂-S) (Nicolet *et al.*, 2001). Pour l'instant, des spectres infrarouges ont été obtenus pour quatre [FeFe]-hydrogénases différentes dans des états redox variés. Les enzymes de *D. vulgaris* Hildenborough (Pierik *et al.*, 1998), *M. elsdenii* (Van der Spek *et al.*, 1996), *D. fructosovorans* (De Lacey *et al.*, 2002), et de *C. pasteurianum* (Chen *et al.*, 2002) présentent des spectres IR hautement similaires, indiquant que leur site catalytique est basiquement le même.

La structure du site actif de l'hydrogénase I de *C. pasteurianum* suggère la présence de deux ligands diatomiques CO et deux ligands diatomiques CN⁻ liés aux deux atomes de fer et d'une molécule d'eau liée à l'atome de fer Fe2. Ce site catalytique apparaît être dans une forme aérobie oxydée « H-oxydé » (Pierik *et al.*, 1998). Le spectre IR de l'enzyme aérobie inactive de *D. vulgaris* suggère que le centre binucléaire contient les mêmes ligands diatomiques, deux CO et deux CN⁻, liés aux deux atomes de fer, et un ligand CO (ligand X) pontant les deux atomes de fer (Nicolet *et al.*, 2001 ; Pierik *et al.*, 1998). L'état redox de ce site catalytique est appelé « H-inactif ». Pour le site catalytique de l'hydrogénase de *D. desulfuricans*, la

molécule d'eau est remplacée par un site de coordination vacant (ligand L) au niveau de l'atome de fer Fe2 avec lequel l'hydrogène peut interagir. Cet état redox du site catalytique est la forme réduite, « H-réduit ». Les différences ainsi observées au niveau du site bimétallique peuvent être attribuées aux différences d'états d'oxydation des atomes de fer (seuls métaux de transition du site) et ceci pourrait être en accord avec un mécanisme d'oxydation réversible de l'hydrogène impliquant un déplacement de la molécule d'eau liée à l'atome de fer Fe2 de l'enzyme.

Plusieurs réductions de l'enzyme aérobie inactive sont nécessaires pour produire une enzyme sous forme active. L'état « H-oxydé » prédomine dans les enzymes actives en absence d'hydrogène ou en présence d'un excès d'agents oxydants comme la thionine $E_m = +64\text{mV}$, ou indigo disulfonate (IDS) $E_m = -125\text{mV}$. La forme réduite, « H-réduit », est formée sous réduction en présence d'hydrogène. Le monoxyde de carbone peut réagir avec l'enzyme active, en se fixant sur l'atome de fer Fe2, pour former l'état « H-oxydé-CO ». Le monoxyde de carbone étant un inhibiteur compétitif fort de l'enzyme, l'état est inactif. Cet état « H-oxydé-CO » inactif est photosensible (Chen *et al.*, 2002).

Différentes études de spectroscopie FTIR et de DFT (density functional theory) sur des modèles chimiques des sites actifs des [FeFe]-hydrogénases ont permis de montrer que le ligand X pontant les deux atomes de fer et le ligand L fixé à l'atome de fer Fe2, sont les sites les plus favorables pour permettre la réaction de conversion des isomères de l'hydrogène et de transfert de protons, et pour jouer un rôle clef dans l'oxydation réversible de l'hydrogène au niveau du site bimétallique des [FeFe]-hydrogénases (Zhou *et al.*, 2004).

Les états de transition de l'atome de fer sont différents en fonction des états d'oxydation du site actif (Figure 25). L'état complètement réduit est un mélange du complexe majoritaire protonné FeI-FeI (ligand X vacant) et du complexe FeII-FeII hydride. L'état oxydé inactif correspond au complexe FeII-FeII ayant un hydroxyl OH⁻ fixé à l'atome de fer Fe2 du site actif de l'enzyme. L'état oxydé actif est le complexe FeII-FeI où deux atomes d'hydrogène lient l'atome de fer Fe2.

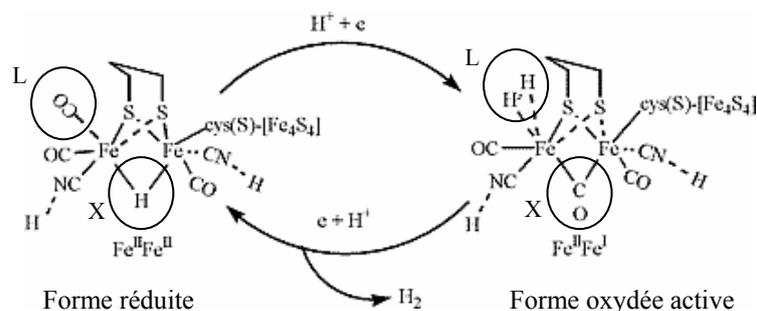


Figure 25 : Schéma possible de la réaction de formation/oxydation de l'hydrogène du site bimétallique des [FeFe]-hydrogénases : forme FeII-FeII réduite hydride et forme oxydée active FeII-FeI (H_2). Le ligand (L) fixé à l'atome de fer Fe2 du site actif peut être CO, H_2O , OH $^-$, H $^-$, H_2 , ou un site de coordination vacant (Zhou *et al.*, 2004).

Le monoxyde de carbone exogène (ligand L) peut se fixer fortement à l'espèce FeII-FeI mais ne peut pas sur le complexe FeI-FeI. Ces résultats sont en accord avec le fait que le monoxyde de carbone est capable d'inhiber l'état actif oxydé mais pas l'état complètement réduit (Liu et Hu, 2002).

Bien que les hydrogénases à fer et les hydrogénases à nickel-fer aient des structures complètement différentes et une évolution divergente, elles ont des caractéristiques communes. Elles portent des ligands diatomiques CO et CN liés à l'atome de fer de leur site actif, ainsi qu'un pontage thiolate entre les deux métaux du centre binucléaire. La présence de ces ligands stabilise le fer dans un état de spin de faible oxydation et le fait ressembler à des métaux de transition comme Ru, Pd, ou Pt, connus pour être de bons catalyseurs de l'hydrogène (Adams et Stiefel, 2000).

3.3.3.3.9.2. Les domaines additionnels (centre F) et accessoires

Dans l'unité catalytique, d'autres domaines contenant des centres fer-soufre peuvent s'ajouter au domaine du centre H.

3.3.3.3.9.2.1. *Le domaine additionnel (centre F)*

Le domaine additionnel, appelé le centre F, est homologue à celui des ferrédoxines bactériennes $2[4Fe-4S]$. Il a été mis en évidence dans la partie N-terminale du domaine du centre H. Il est présent dans l'unité catalytique des [FeFe]-hydrogénases monomériques de

M. elsdenii, *C. pasteurianum* et de *T. vaginalis*, et des [FeFe]-hydrogénases hétérodimériques DdH de *D. desulfuricans* (Figure 26) et DvH de *D. vulgaris* Hildenborough.

Organismes	Sous-unités catalytiques	Sous-unités accessoires
1. <i>S. obliquus</i> <i>C. fusca</i> <i>C. reinhardtii</i>	 48	Non
2. <i>M. elsdenii</i> <i>D. desulfuric.*</i> <i>D. vulgaris*</i>	 53	Non Oui*
3. <i>C. pasteurian.</i> <i>C. acetobuty.</i> <i>T. vaginalis</i>	 63	Non
4. <i>D. fructosov.</i>	 63	 19  14  52
5. <i>T. maritima</i>	 73	 19  68
6. <i>N. ovalis</i>	 130	Non

Code des domaines :



Figure 26 : Représentation schématique de la structure des [FeFe]-hydrogénases. La masse moléculaire (en kDa) est donnée en dessous de chaque sous-unité. * : La petite sous-unité ne contient pas de centre métallique. Les nombres à l'intérieur des symboles correspondent à l'ordre des gènes dans l'opéron (Vignais *et al.*, 2001).

Le centre F, qui interagit avec le domaine du site actif, contient deux centres fer-soufre de type [4Fe-4S] : annotés FS4A et FS4B dans la structure de CpI (Peters *et al.*, 1998). Comme le site actif, ils sont tous les deux enfouis profondément dans l'enzyme. Le centre FS4A est proximal à une distance de 9 Å du site actif. Le centre FS4B distal est situé à 10 Å du centre FS4A suggérant un passage possible des électrons de FS4B vers FS4A, puis vers le site actif. Les deux centres fer-soufre FS4A et FS4B sont coordonnés à la protéine grâce à quatre résidus cystéine chacun. Chaque cystéine se lie au centre fer-soufre par une liaison thiolate. Une analyse comparative des séquences protéiques de ce domaine a révélé un arrangement

spécifique très caractéristique des cystéines liées aux centres [4Fe-4S] : le motif C-X₂-C-X₂-C-X₃-C.

3.3.3.3.9.2.2. Les domaines accessoires

Deux domaines accessoires peuvent venir en contact avec le centre F. Les [FeFe]-hydrogénases clostridiales (*C. pasteurianum*, *C. acetobutylicum*), et celle de *T. vaginalis* font partie des hydrogénases contenant ces deux domaines (Figure 26). L'unité catalytique de l'hydrogénase à fer tétramérique de *D. fructosovorans* a exactement la même taille (63 kDa) et la même composition en domaines additionnel et accessoires que celle des hydrogénases clostridiales. Au total, elles sont composées du domaine du site actif : le centre H, du domaine additionnel : le centre F, et de deux domaines accessoires.

Un des deux domaines accessoires contient le centre fer-soufre FS4C de type [4Fe-4S]. Ce centre FS4C présente une structure particulière atypique, car il est coordonné à trois résidus cystéine par une liaison thiolate et au N^ε d'une histidine (Figure 27). Cette structure originale de centre distal [4Fe-4S] coordonné à une histidine est également retrouvée dans la structure des hydrogénases nickel-fer de *D. gigas* (Pryzbyla *et al.*, 1992), et de *D. fructosovorans* (Volbeda *et al.*, 2002), la différence étant que la liaison est réalisée par l'atome N^δ de l'histidine. Le rôle de cette histidine serait d'adapter le potentiel d'oxydo-réduction moyen du centre fer-soufre au donneur d'électrons approprié (Peters *et al.*, 1998).

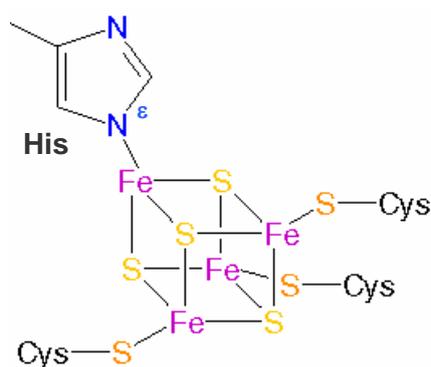


Figure 27 : Représentation du centre atypique [4Fe-4S] FS4C lié à 3 cystéines et au N^ε d'une histidine de l'hydrogénase à fer I de *C. pasteurianum*.

Le deuxième domaine accessoire contient le centre fer-soufre FS2 [2Fe-2S] de type plante (Peters *et al.*, 1998). Ce centre est coordonné à la protéine grâce à la liaison thiolate de quatre cystéines (Figure 28).

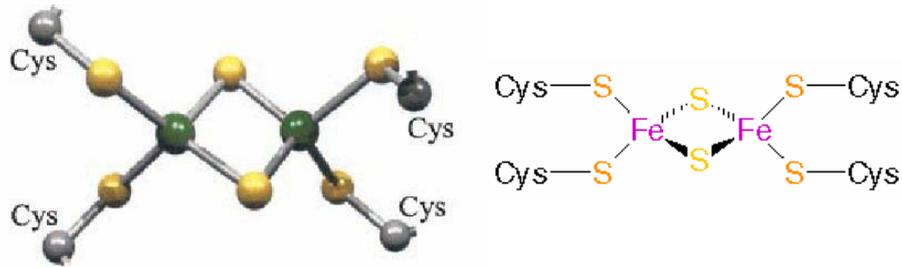


Figure 28 : Représentation schématique d'un centre [2Fe-2S] FS2 lié à 4 résidus cystéine l'hydrogénase à fer I de *C. pasteurianum*.

Atta *et al.*, 1998, ont exprimé de façon hétérologue ce domaine accessoire, 76 résidus N-terminaux de l'hydrogénase CpI, contenant le centre [2Fe-2S], dans *E. coli*. Ce domaine est structurellement auto-suffisant. Le potentiel d'oxydo-réduction de ce centre est de -400 mV alors que le potentiel d'oxydo-réduction moyen de tous les centres additionnels et accessoires de CpI est de -420 mV (Adams, 1987). Une augmentation de la taille de l'unité catalytique de l'hydrogénase à fer trimérique de *T. maritima* (73 kDa) est due à une extension en C-terminal homologue à la sous-unité NuoE des NADH-ubiquinone oxydoréductases (Complexe I) (Figure 26).

La plus grande unité catalytique connue à ce jour (130 kDa) est celle de l'hydrogénase à fer monomérique de l'eucaryote anaérobie *Nyctotherus ovalis*. Elle possède, en plus de l'extension homologue à la sous-unité NuoE des NADH-ubiquinone oxydoréductases, un domaine additionnel en C-terminal homologue à la sous-unité NuoF du Complexe I.

3.3.3.3.10 Les sous-unités accessoires

Pour l'hydrogénase tétramérique de *D. fructosovorans* et l'hydrogénase trimérique de *T. maritima*, la petite sous-unité de 19 kDa correspond au domaine [2Fe-2S] homologue à la sous-unité NuoE du complexe I (Figure 26). Elle est en double chez *D. fructosovorans* (19 kDa et 14 kDa). La moyenne sous-unité de *D. fructosovorans* (52 kDa) ressemble à la fusion du domaine homologue à NuoF et d'un domaine de type ferrédoxine 2[4Fe-4S]. La moyenne sous-unité de *T. maritima* (68 kDa) correspond à celle de *D. fructosovorans* plus un domaine [2Fe-2S] homologue à NuoE du complexe I (Figure 26). La petite sous-unité se lie à la grande

sous-unité en une structure globulaire. La petite sous-unité peut porter un peptide signal qui permet l'export de la protéine vers le périplasma comme pour le genre *Desulfovibrio*.

3.3.3.4. Phylogénie

Un arbre phylogénétique a été réalisé en fonction des alignements de séquences nucléotidiques des [FeFe]-hydrogénases (Vignais *et al.*, 2001) (Figure 29). Cet arbre dérive de deux jeux de séquences : la séquence entière de la sous-unité catalytique (centre H et centre F : 2[4Fe-4S]), et la séquence du centre H seulement.

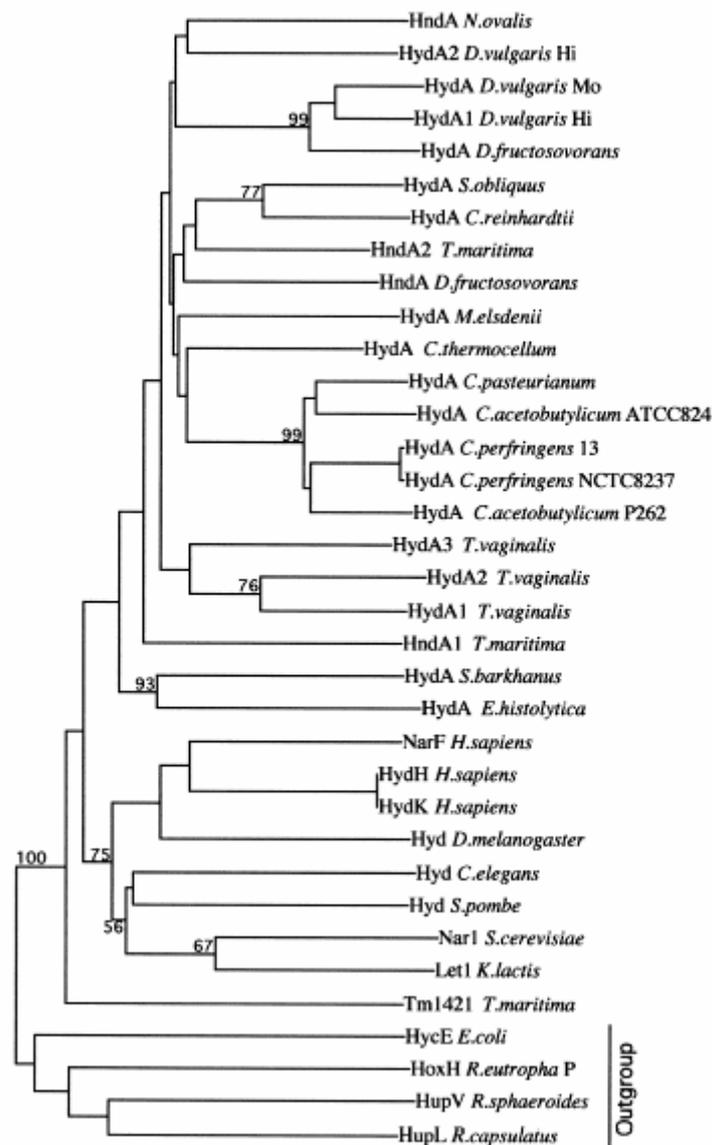


Figure 29 : Arbre phylogénétique de différentes [FeFe]-hydrogénases par alignements de séquences nucléotidiques du domaine centre H (Résidus 210 à 574 pour *C. pasteurianum*).

Les séquences des eucaryotes aérobies (*Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*) sont regroupées sur une seule branche. Par contre, les séquences des eucaryotes anaérobies (*T. vaginalis*, *N. ovalis*, *E. histolytica* et *Spironucleus barkhanus*) apparaissent dispersées. Pour ces dernières, ceci reflète l'histoire de l'évolution de ces micro-organismes ou le résultat d'évènements de transfert de gènes. Parmi les bactéries, les séquences du domaine du centre H des [FeFe]-hydrogénases ne sont pas diffuses, ce qui est sûrement dû à la présence de gènes paralogues chez plusieurs espèces (Vignais *et al.*, 2001).

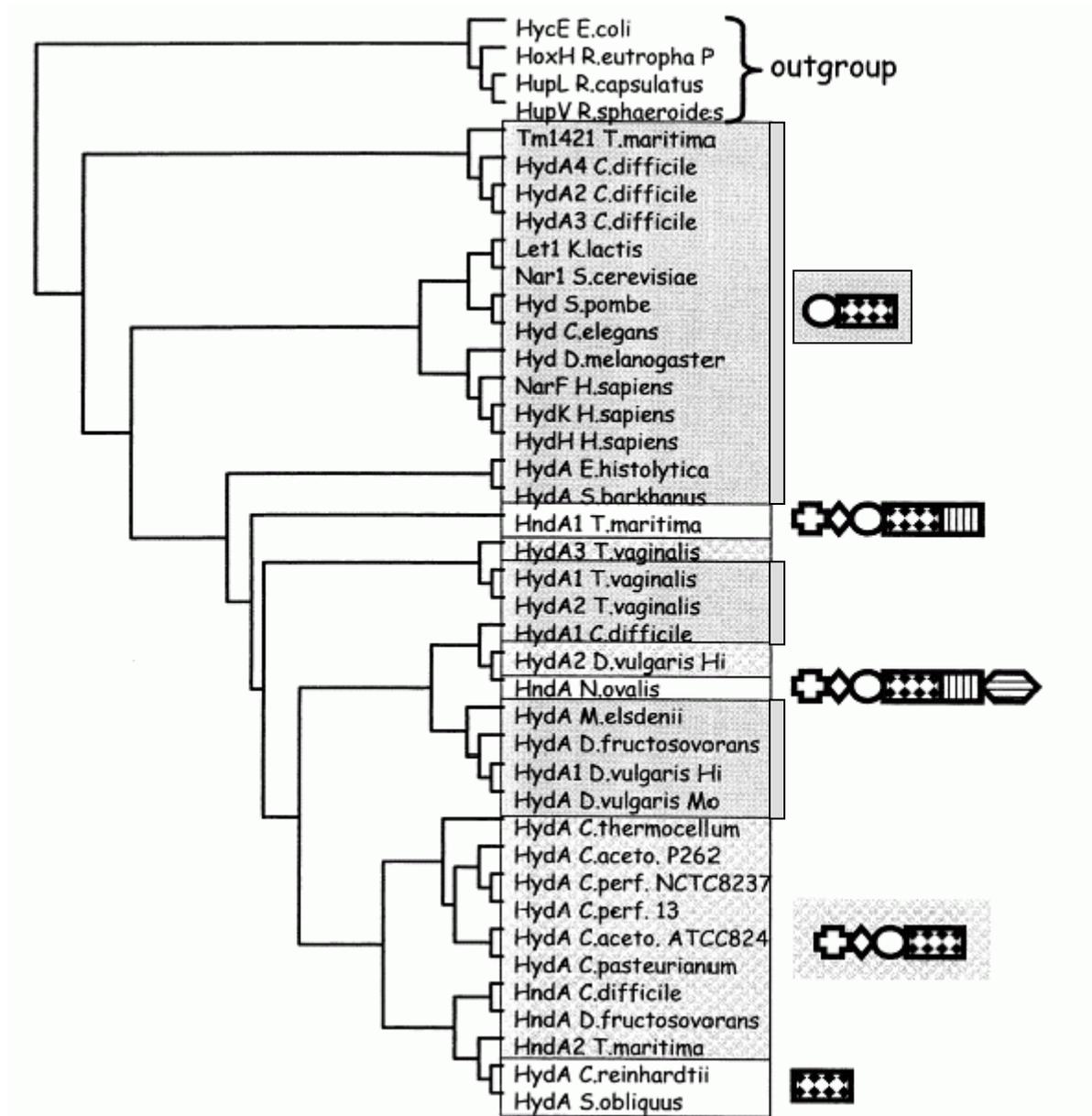


Figure 30 : Dendrogramme dérivé des alignements de séquences nucléotidiques du domaine centre H des [FeFe]-hydrogénases, en mettant l'accent sur la structure modulaire de la sous-unité catalytique (Vignais *et al.*, 2001). Les séquences constituées de deux domaines (2[4Fe-4S] et centre H) sont surlignées en gris. Les séquences de type clostridial (quatre domaines) sont quadrillées en gris.

La majorité des sous-unités catalytiques est composée de soit, deux domaines (centre H et centre F), ou soit, quatre domaines (de type clostridial) avec les domaines accessoires. Cet arbre phylogénétique ne reflète pas la structure modulaire de la sous-unité catalytique tandis que le dendrogramme ci-dessous met l'accent dessus (Figure 30).

Le dendrogramme (Figure 30) permet de souligner que les branches les plus nombreuses représentent des séquences constituées de deux domaines (centre H et centre F). Cette observation suggère que la structure des [FeFe]-hydrogénases à deux domaines serait un bon candidat pour la structure ancestrale des [FeFe]-hydrogénases dont les autres variétés de [FeFe]-hydrogénases seraient dérivées. Un schéma d'évolution potentielle des [FeFe]-hydrogénases a été avancé par Vignais *et al.*, 2001 et Meyer, 2007 (Figure 31).

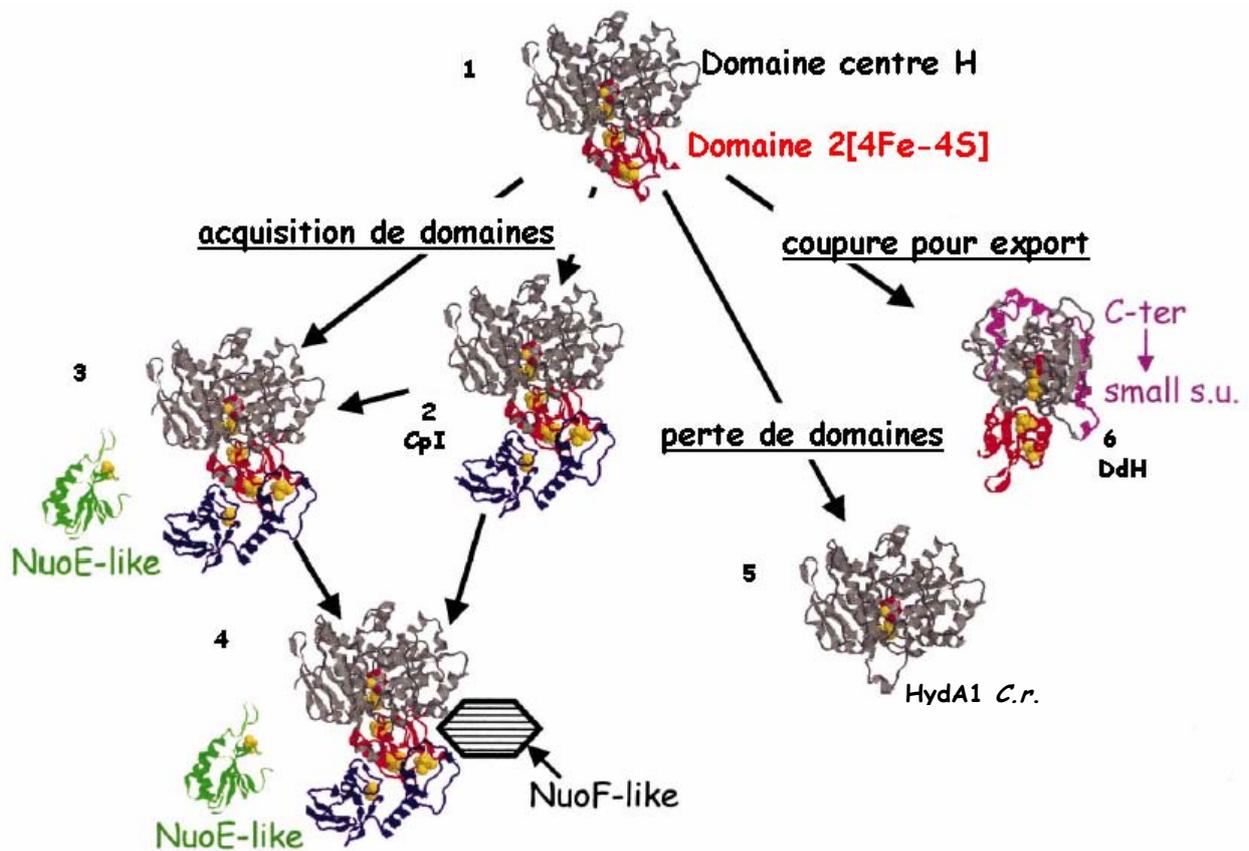


Figure 31 : Schéma de l'évolution potentielle des [FeFe]-hydrogénases (Vignais *et al.*, 2001) 1, structure ancestrale potentielle ; 2-4 acquisition de domaines de type NuoE et NuoF ; 4, pas de modèle structural disponible du domaine de type NuoF de l'hydrogénase de *N. ovalis* ; 5, perte du domaine 2[4Fe-4S], cette structure apparaît seulement chez les eucaryotes photosynthétiques (Figure 21) ; 6, structure d'une enzyme périplasmique de *Desulfovibrio* (Figure 22). Les structures ont été modélisées à partir de celle de l'hydrogénase à fer CpI de *C. pasteurianum* (1feh) (Figure 23) et de celles de la ferrédoxine de type NuoE et thiorédoxine de *A. aeolicus* (1f37).

La composition de la forme ancestrale potentielle des [FeFe]-hydrogénases (1) serait de deux domaines (centre H et centre F : 2[4Fe-4S]). Les enzymes plus grosses (2-4) semblent dériver de celle-ci grâce à l'acquisition de domaines. Par contre, les hydrogénases liées à la photosynthèse (5) auraient subi une perte du domaine du centre F : 2[4Fe-4S]. Les enzymes périplasmiques de *Desulfovibrio* (6) ont la même composition que la forme ancestrale potentielle, mais leur petite sous-unité correspond à l'extrémité C-terminale des enzymes monomériques.

3.3.3.5. Maturation des [FeFe]-hydrogénases

L'assemblage et l'insertion du centre bimétallique dans une métalloprotéine nécessitent souvent des protéines accessoires spécifiques (Casalot et Rousset, 2001 ; Vignais *et al.*, 2001 ; Vignais et Colbeau, 2004). La formation du site actif des [FeFe]-hydrogénases semble provenir d'un processus de maturation différent de celui des [NiFe]-hydrogénases.

Des expressions hétérologues de [FeFe]-hydrogénases ont été réalisées dans le passé chez *E. coli*. La [FeFe]-hydrogénase de *D. vulgaris*, exprimée chez *E. coli*, est une protéine inactive contenant le centre F mais sans le centre catalytique H (Voordouw *et al.*, 1987).

Il a également été montré que des [FeFe]-hydrogénases d'algues vertes telles que *C. reinhardtii* et *S. obliquus* peuvent être exprimées de façon recombinante sous forme active dans *C. acetobutylicum* (Girbal *et al.*, 2005). Ainsi, ces résultats montrent que l'expression de [FeFe]-hydrogénases fonctionnelles nécessite un système de maturation complet, non disponible chez *E. coli* (qui exprime naturellement des [NiFe]-hydrogénases), mais fonctionnel de manière croisée dans un hôte exprimant naturellement une [FeFe]-hydrogénase.

En 2004, des gènes ont été identifiés chez *C. reinhardtii* par Posewitz *et al.*, comme étant essentiels pour la formation du site actif des [FeFe]-hydrogénases : les gènes *hyDEF* et *hydG*.

- Le gène *hyDEF* code pour la protéine HydEF constituée de deux domaines. Le domaine N-terminal de HydEF est homologue à la superfamille des protéines à radical S-adénosylméthionine (enzymes à radical SAM) et contient le motif C-X₃-C-X₂-C qui est la signature de cette famille de protéines. Le domaine C-terminal contient un site de fixation du GTP, qui prédit une activité GTPase, et un motif de fixation des centres fer-soufre C-X-H-X₄₅-H-C-X₂-C.

- Le gène *hydG* est adjacent à *hydEF*. Il est arrangé de telle façon qu'il peut produire trois protéines différentes à partir du même promoteur. Ces trois protéines sont homologues aux protéines à radical SAM car elles contiennent le motif C-X₃-C-X₂-C, et elles contiennent aussi un motif de fixation des centres fer-soufre.

Ces gènes sont très conservés parmi les organismes séquencés possédant une [FeFe]-hydrogénase. Chez certains organismes tels que *C. acetobutylicum*, le gène *hydEF* est dissocié en deux gènes distincts *hydE* et *hydF* codant pour les deux protéines HydE et HydF. Cette association chez *C. reinhardtii* suggère que les deux protéines HydE et HydF fonctionneraient dans la biosynthèse des [FeFe]-hydrogénases sous forme de complexe. L'organisation des gènes peut varier selon les organismes en opéron multicistronique contenant ou non le gène structural de l'hydrogénase à fer (*hydA*).

L'expression hétérologue de la [FeFe]-hydrogénase HydA1 de *C. reinhardtii* chez *E. coli* cultivé en anaérobiose avec co-expression des gènes de maturation *hydEF* et *hydG* permet d'obtenir une hydrogénase active (Posewitz *et al.*, 2004). Ces résultats montrent que le système de maturation complet des [FeFe]-hydrogénases fonctionnelles nécessite simplement les trois protéines HydE, HydF, et HydG, chez un organisme qui ne contient pas d'hydrogénase à fer native. Cependant, la quantité d'hydrogénase HydA1 active obtenue dans ce cas chez *E. coli* était très faible probablement due à une instabilité des plasmides chez *E. coli* liée à la forte teneur en bases GC des gènes *hydEF* (70 %) et *hydG* (65 %) de *C. reinhardtii*. La coexpression de la [FeFe]-hydrogénase HydA1 de *C. reinhardtii* avec les gènes de maturation *hydE*, *hydF* et *hydG* de *C. acetobutylicum* (plus riches en bases AT) chez *E. coli*, a permis d'obtenir une hydrogénase active plus stable (King *et al.*, 2006). Les auteurs ont également coexprimé les trois protéines de maturation de *C. acetobutylicum* avec différentes [FeFe]-hydrogénases de bactéries *C. pasteurianum* et *C. acetobutylicum*, chez *E. coli*. De même, Nagy *et al.*, 2007 ont réalisé la coexpression de l'hydrogénase à fer HydA de *Clostridium saccharobutylicum* avec les trois protéines de maturation de *C. acetobutylicum* chez *E. coli*. Des activités spécifiques similaires aux activités des protéines purifiées dans l'organisme naturel ont été rapportées.

Pour essayer d'identifier le mécanisme de maturation des [FeFe]-hydrogénases, l'équipe du Pr. Fontecave a caractérisé chacune des trois protéines de maturation des [FeFe]-hydrogénases issues de la bactérie hyperthermophile *Thermotoga maritima* (Rubach *et al.*, 2005 ; Brazzolotto *et al.*, 2006). Rubach *et al.*, ont confirmé que HydE et HydG étaient des

enzymes à radical SAM. Ces enzymes contiennent dans leur site actif un centre [4Fe-4S] lié aux soufres de trois cystéines et à une S-adénylméthionine. Ce type d'enzyme est capable d'utiliser la SAM comme producteur de radical 5'désoxyadényl pendant la réduction du centre [4Fe-4S] du site actif de l'enzyme. Cette réaction permet de catalyser d'autres réactions impliquées dans la biosynthèse de cofacteurs, dans le métabolisme, et dans la production de désoxyribonucléotides (Sofia *et al.*, 2001).

Brazzolotto *et al.*, ont confirmé l'activité GTPase de la protéine HydF. Cette activité GTPasique nécessite du magnésium. Ils ont également découvert que HydF de *T. maritima* contient un centre [4Fe-4S] avec un ligand atypique qui peut être substitué par un groupement imidazole. Cela suggère que le quatrième ligand est peut-être un N_δ d'une histidine. Cependant, ils n'ont trouvé aucune interdépendance entre la présence du centre [4Fe-4S] et l'activité GTPase.

Un schéma mécanistique hypothétique de la biosynthèse probable du centre H des [FeFe]-hydrogénases a été proposé par Peters *et al.*, (2006). Les enzymes à radical SAM HydE et HydG permettraient de créer des espèces radicalaires très réactives capables d'interagir avec les atomes de soufre d'un centre fer-soufre. Le ligand dithiolate pontant (PDT ou DTN) proviendrait d'un groupe alkyl précurseur dérivé d'un intermédiaire de la glycolyse (pyruvate) ou d'un acide aminé (aspartate), qui serait substrat des protéines HydE et HydG. Les ligands diatomiques CO et CN seraient produits par la décomposition d'un radical glycine qui viendrait interagir avec l'atome de fer réduit du centre [2Fe-2S] ponté. La protéine HydF permettrait, grâce à sa fonction de GTPase, de fournir de l'énergie pour la translocation et l'insertion du centre bimétallique dans la cavité du site actif de l'apoenzyme, sous forme d'un complexe où HydE jouerait le rôle d'une chaperonne.

McGlynn *et al.*, 2007 ont observé que l'activation de l'hydrogénase HydA par les trois protéines de maturation HydEFG, en l'absence de substrat potentiel, est rapide. Ceci suggère que la chimie de la protéine SAM radical associée avec l'assemblage du centre H a déjà eu lieu pendant la coexpression des trois protéines, ainsi le précurseur du site actif est déjà formé et nécessite seulement d'être transféré à l'hydrogénase inactive pour l'activer.

En conclusion, la machinerie d'assemblage du site actif des [FeFe]-hydrogénases ne contient que 3 protéines, HydE, HydF et HydG, alors que celle des [NiFe]-hydrogénases en contient 7. Ceci est en accord avec le fait que les [FeFe]-hydrogénases nécessitent moins de protéines accessoires pour la maturation de leur site actif car il ne contient pas de nickel. Le fait que les

deux types d'hydrogénases ([FeFe] et [NiFe]) n'utilisent pas le même système de maturation confirme leur divergence phylogénétique.

3.3.3.6. *Transfert intra-moléculaire :*

Les [FeFe]-hydrogénases sont des catalyseurs très efficaces de la production d'hydrogène. Cette réaction de catalyse se situe au niveau du site actif de l'enzyme. Pour cela les électrons et les protons doivent entrer dans la molécule et interagir avec le site actif pour libérer de l'hydrogène. Des chemins préférentiels de ces différentes molécules ont été définis.

3.3.3.6.11 **Transfert de protons**

L'existence d'un chemin de transfert des protons qui relie le site actif profondément enfoui à la surface de la protéine a été mis en évidence. Les structures cristallographiques des [FeFe]-hydrogénases I de *C. pasteurianum* (CpI) et de *D. desulfuricans* (DdH) (Peters *et al.*, 1998 ; Nicolet *et al.*, 1999) ont révélé plusieurs groupes donneurs ou accepteurs de protons proches du site actif de l'enzyme. Les acides aminés, réalisant le plus probablement ce rôle, sont hautement conservés dans les deux structures :

- Le résidu lysine (K358 dans CpI, K237 dans DdH) forme une liaison hydrogène avec un des ligands CN⁻, et est à 4Å de l'atome de fer Fe² (site putatif de fixation de l'hydrogène et de réduction de protons).
- Le groupement thiol d'une cystéine libre (C299 dans CpI, C178 dans DdH) à 5Å de l'atome de fer Fe², est dans CpI à une distance d'une liaison hydrogène de la molécule d'eau coordonnée au site actif.

Lorsque l'hydrogénase à fer CpI est sous forme oxydée, les ligands CO et CN⁻ du site actif sont des ligands très forts, alors que le ligand H₂O est faiblement fixé. Un mécanisme plausible de réduction des protons au niveau du site actif peut être le déplacement du ligand terminal H₂O fixé au fer Fe² sous la réduction, avec la génération d'un hydride intermédiaire du fer. Le résidu C299 pourrait agir comme un donneur de protons pour la formation d'hydrogène. Un chemin potentiel de transfert de protons existerait de la cystéine C299 située à 12 Å de la surface de la protéine, impliquant deux glutamates, un résidu sérine et une molécule d'eau. Par contre, il n'existe pas de cystéine libre proche du site actif de la [NiFe]-hydrogénase de *D. gigas*, mais il apparaît de nombreuses histidines dans son environnement,

agissant probablement comme des accepteurs de protons (Volbeda *et al.*, 1995). Cette différence d'environnement du site actif confirmerait la préférence de la direction de la catalyse physiologique des hydrogénases.

3.3.3.6.12 Transfert d'hydrogène

Un canal hydrophobe dans lequel peut diffuser du gaz, relie la surface de la molécule au centre bimétallique du site actif de l'enzyme. Toutes les cystéines et quelques acides aminés entourant ce canal sont strictement conservés.

La molécule d'hydrogène est une petite molécule qui semble pouvoir diffuser à travers la protéine sous de multiples chemins dynamiques grâce aux fluctuations de la conformation de la protéine. Les analyses cristallographiques et les calculs de dynamique moléculaire ont fortement suggéré que l'hydrogène pourrait utiliser une cavité hydrophobe, de même, un réseau de canaux a été observé dans les [NiFe]-hydrogénases pour naviguer du site actif à la surface de la protéine (Montet *et al.*, 1997).

Par simulation de dynamique moléculaire, la diffusion d'hydrogène dans la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* a été étudiée par Cohen *et al.*, 2005a.

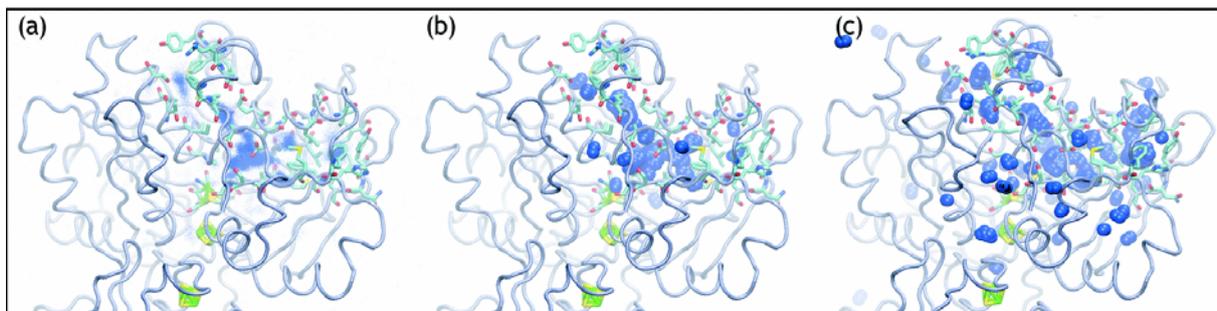


Figure 32 : Trajectoire de la diffusion moléculaire simultanée de 1000 copies de D₂ (H₂ lourd) à partir du site actif de l'hydrogénase CpI (a) une superposition de toutes les positions de D₂ et de leurs trajectoires sur 2.3 ns et (b) trajectoires instantanées de D₂ après 300 ps et (c) 2.2 ns. (Cohen *et al.*, 2005a).

Bien que la majorité des molécules d'hydrogène lourd migre vers une série de cavités hydrophobes conservées, ou canaux à hydrogène (Nicolet *et al.*, 2002), les molécules d'hydrogène sont capables de diffuser en même temps dans beaucoup de passages alternatifs (Figure 32).

3.3.3.6.13 Transfert d'électrons

Pour que le transfert d'électrons puisse se réaliser entre deux centres fer-soufre, la distance entre les centres doit être au maximum de 14Å (Dementin *et al.*, 2006).

La position relative de chacun des centres fer-soufre des [FeFe]-hydrogénases clostridiales et de celles de *Desulfovibrio* met en évidence un passage potentiel de transfert d'électrons intra-moléculaire. Par exemple, les centres H, FS4A, FS4B de la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* sont alignés et distants de 9 Å et 10 Å (Figure 33). Ils forment un chemin de transfert des électrons du site actif profondément enfoui vers la surface de la protéine (Peters *et al.*, 1998).

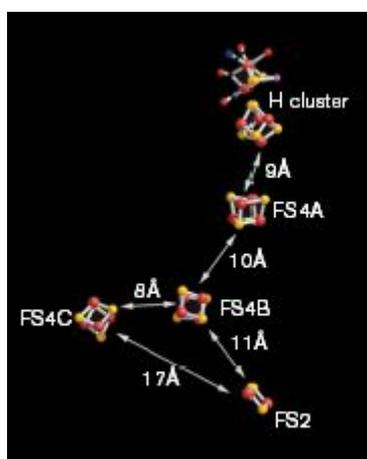


Figure 33 : Transfert d'électrons intra-moléculaire entre les centres fer-soufre de la [FeFe]-hydrogénase CpI de *C. pasteurianum* (Peters *et al.*, 1998).

Le centre FS2, ainsi que le centre FS4C, se situent près de la surface de la protéine. Ils peuvent tous deux transférer des électrons du centre FS4B vers un accepteur d'électrons, mais ne peuvent pas transférer des électrons de l'un à l'autre car ils sont trop éloignés (17 Å). Lorsque l'unité catalytique des hydrogénases n'est constituée que du domaine conservé du centre H comme chez les [FeFe]-hydrogénases des algues vertes (Figure 21), la distance entre le centre H et la surface de la protéine est significativement réduite, de même que le transfert intra-moléculaire des électrons.

3.3.3.6.14 Transfert d'oxygène

L'hydrogénase à fer connue pour être extrêmement sensible à l'oxygène est celle de *C. reinhardtii*. Dans le but de rendre les [FeFe]-hydrogénases plus tolérantes à l'oxygène, beaucoup d'études de diffusion de gaz et de mutagenèse dirigée ont été réalisées. La délétion de tous les domaines accessoires de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* a montré que les domaines accessoires servent de protection du site actif vis-à-vis de l'oxygène (Cohen *et al.*, 2005a). Une trajectoire de diffusion de l'oxygène plus définie que celle de diffusion de l'hydrogène a été déterminée par simulation de dynamique moléculaire (Figure 34).

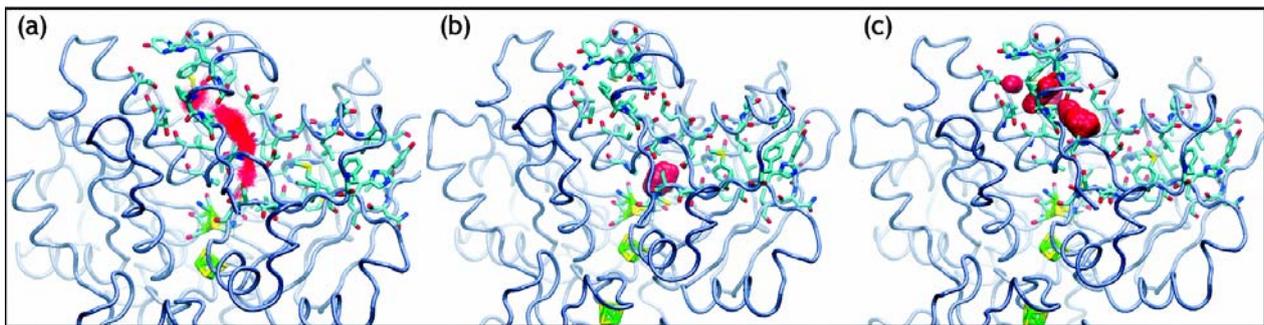


Figure 34 : Trajectoire de la diffusion moléculaire simultanée de 1000 copies de O₂ invisibles à partir du site actif de l'hydrogénase Cpl (a) une superposition de toutes les positions de O₂ et de leurs trajectoires sur 2.3 ns et (b) trajectoires instantanées de O₂ après 20 ps et (c) 2.3 ns. (Cohen *et al.*, 2005a).

Les molécules d'oxygène passent à travers les barrières de la protéine grâce à un nombre limité et précisément défini de canaux. Les molécules d'oxygène ne se dispersent pas, elles restent au niveau de ces deux canaux. Le degré de sensibilité des hydrogénases à fer d'algues vertes et de bactéries, est aussi caractérisé par la diversité des acides aminés qui sont présents dans ce chemin de diffusion.

Ainsi, Cohen *et al.*, 2005a et b ont montré que la diffusion des gaz d'hydrogène et d'oxygène à l'intérieur de la protéine, est gouvernée par les propriétés physiques même du gaz, et de la structure de la protéine.

3.3.3.7. Transfert inter-moléculaire des électrons

Le centre bimétallique des hydrogénases à fer est relié à la surface par une suite de centres fer-soufre pour échanger des électrons avec un partenaire d'oxydo-réduction de la protéine,

constituant un chemin de transfert intra- puis inter-moléculaire d'électrons. Les deux centres FS2 et FS4C des [FeFe]-hydrogénases clostridiales sont tous les deux des centres de transfert d'électrons potentiels dans le transfert inter-moléculaire d'électrons, mais aucune indication n'est apportée sur la préférence d'un centre par rapport à l'autre dans l'interaction avec différents partenaires (Peters *et al.*, 1998).

Les hydrogénases du genre *Desulfovibrio* catalysent les deux réactions de production et consommation de l'hydrogène avec les donneurs et accepteurs d'électrons physiologiques que sont les cytochromes multihémiques de faibles potentiels comme le cytochrome monohémique c553, le cytochrome c3 tétrahémique (13 kDa) (Brugna *et al.*, 1998) et le cytochrome c3 octahémique (26 kDa). Les partenaires d'oxydo-réduction physiologiques des [FeFe]-hydrogénases clostridiales sont les ferrédoxines de type 2[4Fe-4S] et les flavodoxines (Fitzgerald *et al.*, 1980), et ceux des [FeFe]-hydrogénases d'algues vertes sont des ferrédoxines [2Fe-2S] de type plantes (PetF) (Happe *et al.*, 1994). Tous ces partenaires sont capables de transférer des électrons à faibles potentiels. L'interaction de ces partenaires d'oxydo-réduction avec les [FeFe]-hydrogénases a été étudiée.

3.3.3.7.15 Interaction [FeFe]-hydrogénase - cytochrome

Le site d'interaction entre la [FeFe]-hydrogénase de *D. desulfuricans* ATCC 7757 et le cytochrome c553 a été étudié, et un modèle structural a été déterminé (Morelli *et al.*, 2000a et Morelli et Guerlesquin, 1999).

Pour modéliser l'interaction du domaine de type ferrédoxine de la [FeFe]-hydrogénase avec le cytochrome, un modèle structural du complexe ferrédoxine I de *D. desulfuricans* Norway-cytochrome c553 a été déterminé (Morelli *et al.*, 2000b ; Morelli et Guerlesquin, 1999).

Au premier abord, la formation du complexe hydrogénase - cytochrome semble se réaliser grâce aux interactions électrostatiques entre les deux protéines. Un moment dipolaire a déjà été observé pour les cytochromes de type c (c3 et c553) induit par une forte teneur en acides aminés basiques situés dans la cavité de l'hème (Sebban-Kreuzer *et al.*, 1998a). Ce sont des résidus lysine, ils sont hautement conservés dans ces classes de protéines. L'environnement de l'hème est donc chargé positivement. De plus, l'environnement du centre distal des [FeFe]-hydrogénases étant chargé négativement (Nicolet *et al.*, 1999), on s'attend à ce que l'interface du complexe avec les cytochromes se situe proche du centre distal.

Au sein du complexe, la surface d'interaction avec le cytochrome c553 est significativement plus grande avec l'hydrogénase (2284 Å²) qu'avec la ferrédoxine (1037 Å²). Ceci est dû au fait que l'hydrogénase hétérodimérique de *D. desulfuricans* n'est pas seulement formée du domaine de type ferrédoxine, mais aussi d'une petite sous-unité. Cette petite sous-unité de l'hydrogénase joue un rôle important dans la complexation. Elle est impliquée dans 50 % de la surface d'interaction, ce qui correspond à une surface de 900 Å².

Le contact le plus proche (3,8 Å) est observé entre la cystéine C38, ligand du centre distal de l'hydrogénase et la cystéine C10, ligand de l'hème du cytochrome (Figure 35). Ce contact cystéine-cystéine joue un rôle essentiel dans le transfert des électrons entre les deux protéines. La distance entre les atomes de fer de l'hème et ceux du centre fer-soufre distal est plus longue dans le complexe hydrogénase - cytochrome c553 (12,3 Å) que dans le complexe ferrédoxine I DdN – cytochrome c553 (10 Å). Cependant le réarrangement spatial des résidus sur l'interface des deux complexes est très similaire. Ceci montre que le modèle du complexe ferrédoxine I DdN- cytochrome c553 est un modèle représentatif du domaine d'interaction de type ferrédoxine des [FeFe]-hydrogénases.

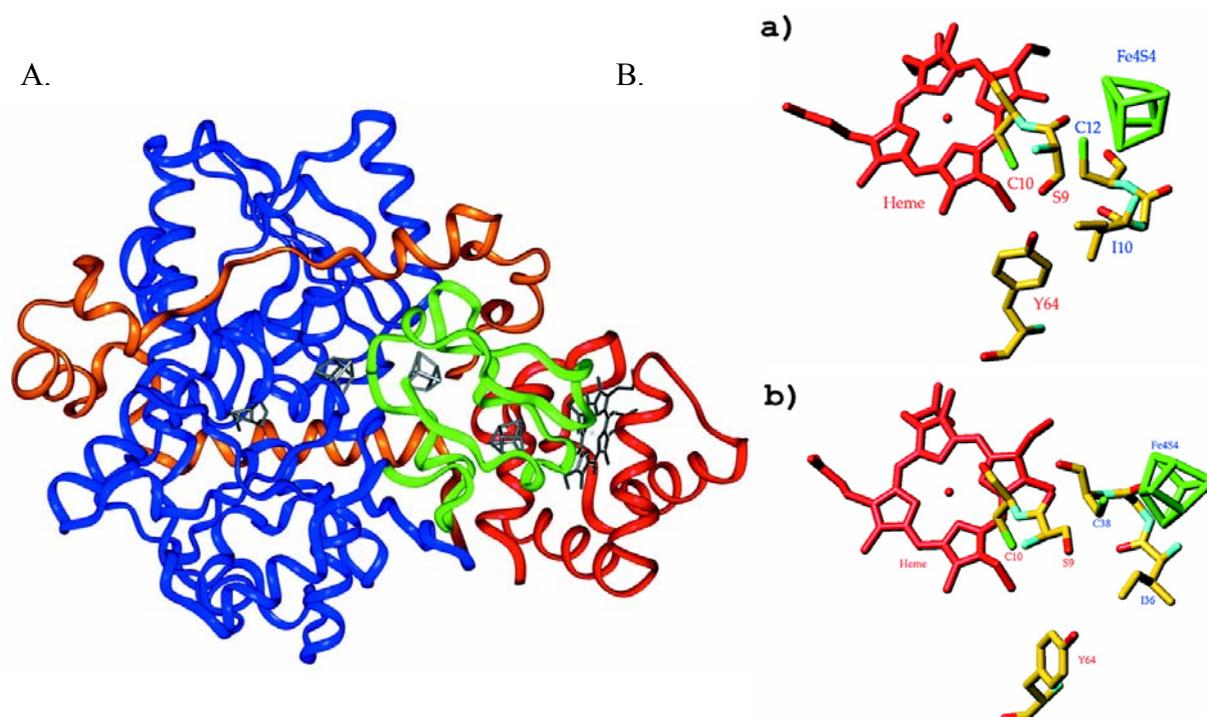


Figure 35: A Un modèle structural du complexe cytochrome c553-hydrogénase. Pour l'hydrogénase, le domaine de type ferrédoxine est en vert, la grande sous-unité est en bleu, et la petite sous-unité est en orange. Le cytochrome c₅₅₃ est en rouge B Vue de l'interface (a) du complexe cytochrome c553 - ferrédoxine et (b) du complexe cytochrome c553 – hydrogénase (Morelli *et al.*, 2000a).

Dans ce modèle ferrédoxine- cytochrome c553, la chaîne carboxylique de l'isoleucine I10 de la ferrédoxine (I36 pour le domaine de type ferrédoxine de l'hydrogénase) fait une liaison hydrogène avec la lysine K63 du cytochrome et la chaîne latérale de l'isoleucine I36 de l'hydrogénase effectue une liaison hydrophobe de Van der Waals avec la chaîne latérale de la tyrosine Y64 du cytochrome. Des études de mutagenèse dirigée, complémentaires à cette étude, réalisées par Sebban-Kreuzer *et al.*, (1998 a et b) ont montré que la lysine K63 et la tyrosine Y64 du cytochrome c553 sont essentielles dans le processus de transfert d'électrons.

Un modèle structural du complexe [FeFe]-hydrogénase de *D. desulfuricans* - cytochrome c3 de *D. vulgaris* Hildenborough a été déterminé (Figure 36) (ElAntak *et al.*, 2003). Le cytochrome c3 de 13 kDa est tétrahémique. De plus, le complexe ferrédoxine I de *D. desulfuricans* (Norway) - cytochrome c3 avait été étudié auparavant (Cambillau *et al.*, 1988) pour simplifier le domaine de type ferrédoxine de l'hydrogénase.

La surface d'interaction de l'hydrogénase est de 2236 Å², ce qui est similaire à celle du complexe hydrogénase-cytochrome c553 (2284 Å²). La surface d'interaction entre le cytochrome c3 et la [FeFe]-hydrogénase est hautement complémentaire, comme illustré ci-dessous par la chaîne latérale de l'isoleucine I36 de l'hydrogénase, qui remplit la cavité proche de l'hème 4 du cytochrome sur sa surface exposée (Figure 36B). Le résidu isoleucine I36 est hautement conservé. Les atomes de sa chaîne latérale sont situés à des distances de Van der Waals des atomes du cycle de l'hème 4. En dessous de cette I36 de l'hydrogénase, un résidu tyrosine Y66 du cytochrome c3, est au centre de l'interface, dirigé vers les résidus de l'hydrogénase entourant le centre [4F-4S] distal. Cette tyrosine Y66 est en contact rapproché avec la cystéine C38, ligand du centre [4Fe-4S] distal. Dans le complexe [FeFe]-hydrogénase - cytochrome c3, une courte distance est observée entre les atomes de soufre de la cystéine C100, liée de manière covalente à l'hème 4 du cytochrome, avec les cystéines C76 (4,52 Å) et C38 (5,5 Å), deux ligands du centre [4Fe-4S] distal de l'hydrogénase (Figure 36B).

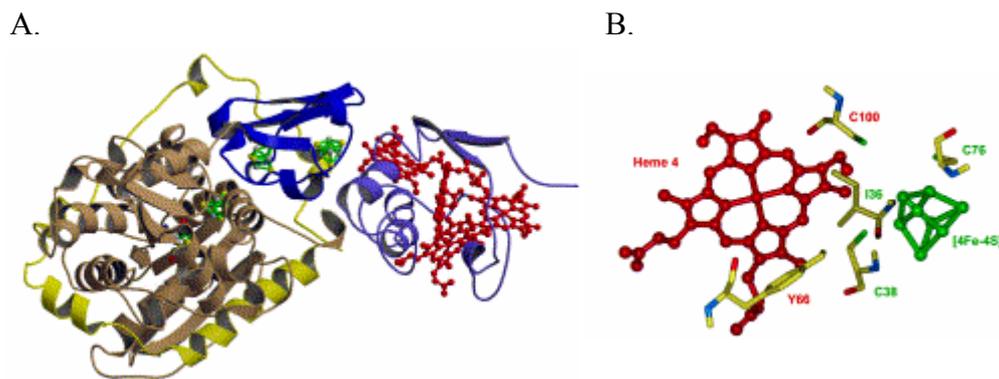


Figure 36 : Représentation structurale du complexe de la [FeFe]-hydrogénase et du cytochrome c_3 . A, la grande sous-unité de la [FeFe]-hydrogénase est colorée en beige; la petite sous-unité est colorée en jaune et le domaine de type ferrédoxine en bleu, les centres fer-soufre sont en vert, le cytochrome c_3 est coloré en bleu, l'hème est en rouge. B Vue de l'interface du complexe, mise en évidence des résidus impliqués dans le contact inter-atome dans le complexe cytochrome c_3 -[FeFe]-hydrogénase. L'hème 4 et les résidus du cytochrome c_3 sont en rouge, le centre distal [4Fe-4S] et les résidus de la [FeFe]-hydrogénase sont en vert (ElAntak *et al.*, 2003).

Dans le complexe cytochrome c_3 – hydrogénase, la distance entre l'hème 4 et le centre distal de 8,8 Å est très courte, comparée à 12,3 Å dans le complexe cytochrome c_{553} - hydrogénase. Cette différence est due à la plus grande surface d'exposition de l'hème 4 au solvant de 150 Å², par rapport à 50 Å² pour le cytochrome c_{553} , ceci permettant un contact inter-moléculaire direct possible des cycles porphyrines (A et B) de l'hème (distance de 4,1Å entre l'hème 4 et l'isoleucine I36). Ainsi, l'hème 4 du cytochrome c_3 joue un rôle essentiel dans l'entrée des électrons dans le transfert inter-moléculaire avec la [FeFe]-hydrogénase.

Apparemment, cette interaction mène à un chemin de transfert d'électrons favorable à travers la surface inter-moléculaire et donc, l'orientation relative de l'interface hème - centre fer-soufre semble être une caractéristique commune à de nombreux complexes de transfert d'électrons (Morelli *et al.*, 2000a et b) (complexes cytochrome c_{553} -hydrogénase, cytochrome c_{553} - ferrédoxine).

Les modèles des complexes réalisés mettent en évidence les résidus importants à l'interface du cytochrome c_3 . En plus des résidus hydrophobes (I36, Y66) et des cystéines, de nombreuses lysines sont impliquées dans les boucles entourant l'hème 4 (K15, K57, K58, K60, K72, K94, K95 et K101). La présence de ces résidus chargés entourant le site d'interaction est en accord avec l'idée que les interactions électrostatiques sont les forces permettant la formation des complexes impliquant le cytochrome c_3 . Ces résidus lysine sont

également présents dans tous les cytochromes de type c. Leur différence d'arrangements spatiaux a été proposée comme reflétant la différence de spécificité pour leurs partenaires physiologiques. Ces lysines sont impliquées dans des liaisons hydrogène ou des ponts salins à travers la surface. Ainsi, les forces électrostatiques ne semblent pas être seules à l'origine de l'interaction entre le cytochrome c3 et les [FeFe]-hydrogénases. Les forces qui conduisent le cytochrome c3 à interagir avec les [FeFe]-hydrogénases dépendent plus des états d'oxydo-réduction des cofacteurs présents, que de l'interaction avec des résidus spécifiques (ElAntak *et al.*, 2003).

3.3.3.7.16 Interaction [FeFe]-hydrogénase – ferrédoxine

Le rôle des forces électrostatiques dans l'interaction entre la ferrédoxine 2[4Fe-4S] et la [FeFe]-hydrogénase de *C. pasteurianum* a été étudiée par mutagenèse dirigée (Moulis et Davasse, 1995). Malgré la présence de plus de 6 acides carboxyliques (glutamate, aspartate) très conservés à la surface de cette ferrédoxine, leur implication dans l'interaction ferrédoxine – [FeFe]-hydrogénase semble mineure. La substitution de plus de 4 de ces acides aminés chargés négativement par des résidus neutres ou chargés positivement (glutamine, asparagine) induit un changement drastique des propriétés électrostatiques de la ferrédoxine, en changeant la charge globale et la distribution des charges en surface de la protéine ; cependant, la structure et le potentiel redox de la protéine sont très peu modifiés (Brereton *et al.*, 1999). Seuls les variants, dont l'environnement immédiat des centres fer-soufre est perturbé, montrent des variations de leur efficacité catalytique avec l'hydrogénase d'un facteur deux seulement (Moulis et Davasse, 1995). Ainsi, le transfert d'électrons n'apparaît pas être directement relié à la présence de un ou deux résidus spécifiques carboxylés à la surface de la ferrédoxine ou à des interactions électrostatiques. Il doit faire intervenir des sites multiples sur la surface avec un processus de reconnaissance contrôlée par le potentiel redox relatif, en plus de critères encore non identifiés.

La simple substitution de chacune des prolines P19 et P48 adjacentes à la dernière cystéine liée au motif de fixation des centres [4Fe-4S] (C-X₂-C-X₂-C-X₃-C-P), induit des modifications du potentiel redox des centres de la ferrédoxine et des changements des propriétés structurales de la ferrédoxine de *C. pasteurianum*, mais ne provoque pas de différences importantes du turnover enzymatique avec l'hydrogénase de *C. pasteurianum*,

excepté pour la substitution de la proline P19 en lysine (Quinkal *et al.*, 1994). Ainsi ces deux prolines stabilisent fortement les centres fer-soufre de la ferrédoxine, mais ne jouent pas de rôle essentiel dans le mécanisme de transfert d'électrons.

Toutes ces données suggèrent que le complexe ferrédoxine - [FeFe]-hydrogénase n'est pas lié à un nombre limité d'interactions localisées impliquant un petit nombre de résidus, mais plutôt utilise une forme de complémentarité géométrique entre l'ensemble des molécules associée à un processus de reconnaissance contrôlé par le potentiel redox des centres fer-soufre. Ainsi, un modèle d'interaction a été calculé en utilisant la structure atomique de la ferrédoxine de *C. acidurici* et la [FeFe]-hydrogénase de *C. pasteurianum* (Kümmerle *et al.*, 2000) (Figure 37).

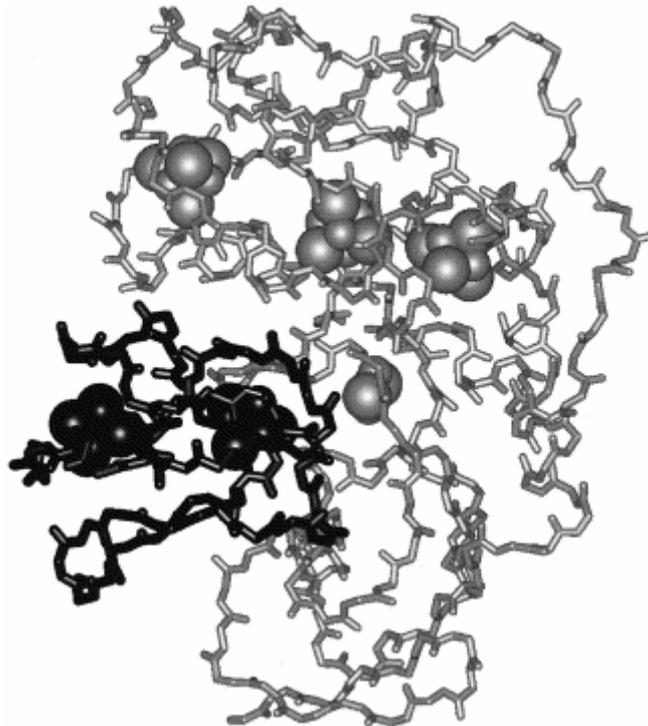


Figure 37 : Complexe d'interaction calculé avec les structures de la ferrédoxine de *C. acidurici* et l'hydrogénase à fer de *C. pasteurianum*. Le domaine N-terminal de l'hydrogénase est en gris avec les centres fer-soufre en sphères grises (de haut en bas et de gauche à droite, FS4A, FS4B, FS4C, et le centre fer-soufre [2Fe-2S] FS2). La ferrédoxine est en noir, avec ses centres fer-soufre en sphères noires (Kümmerle *et al.*, 2000).

Ce complexe a été généré en ne considérant que les 209 premiers résidus N-terminaux de l'hydrogénase (contenant les centres accessoires FS2, FS4C et additionnels FS4B, FS4A). La zone d'interaction a été confirmée par des calculs à haute résolution (2,5 Å). La région exposée de la ferrédoxine se situe au niveau des résidus 16-21 et 33-46, entourant un centre

fer-soufre. La zone d'interaction de l'hydrogénase est, elle, au niveau des résidus 20-25, 35-38, 103-111, 152-160, 195-200. Dans ce complexe, le centre fer-soufre de la ferrédoxine coordonné aux cystéines 18, 37, 40, 43, se trouve à moins de 15 Å des deux centres fer-soufre FS2 et FS4C et du centre FS4B, la plus grande distance étant celle avec le site catalytique. Cette géométrie est en accord avec un transfert d'électrons efficace à travers ces groupes prosthétiques.

Ainsi, la forme ovoïde des ferrédoxines 2[4Fe-4S] bactériennes semble déclencher une reconnaissance géométrique de ses partenaires. Les interactions électrostatiques apparaissent de faible importance dans ce type de réaction en comparaison des potentiels redox des centres fer-soufre.

3.3.3.8. *Caractérisation biochimique*

Les hydrogénases à fer peuvent catalyser quatre types de réactions :

- la réaction de conversion du para-H₂ en ortho-H₂ qui fait seulement intervenir le clivage hétérolytique de l'H₂.
- la réaction d'échange entre des isotopes de l'hydrogène : le protons et le deutérium qui fait intervenir le clivage hétérolytique de l'hydrogène, et le transfert de protons (mais pas de transfert d'électrons).
- la réaction d'oxydation de l'hydrogène couplée à la réduction d'un partenaire redox qui fait intervenir le transfert inter- et intra-moléculaire des électrons, le transfert de protons et le clivage hétérolytique de l'hydrogène.
- la réaction de réduction de protons (production d'hydrogène) couplée à l'oxydation d'un partenaire redox qui fait intervenir le transfert inter- et intra-moléculaire des électrons et le transfert de protons.

Les partenaires d'oxydo-réduction des [FeFe]-hydrogénases peuvent être des protéines (cytochromes, ferrédoxines, flavodoxines), des molécules chimiques (méthyl viologène, benzyl viologène), ou une électrode (graphite).

Les deux premières réactions permettent de mesurer l'activité du site actif en s'affranchissant de la composante de transfert d'électrons. Ce sont les activités de consommation et de production d'hydrogène qui sont les plus couramment mesurées et sur lesquelles nous avons le plus de données dans la littérature. Seulement quelques données sont rapportées sur les activités d'échange et de conversion, souvent en relatif.

Contrairement aux hydrogénases Hmd, les [NiFe]-hydrogénases et les [FeFe]-hydrogénases sont capables de catalyser les réactions d'échange H^+/D^+ et de conversion de l' H_2 sans la présence de leur substrat.

En général, les [NiFe]-hydrogénases catalysent *in vivo* préférentiellement la réaction d'oxydation de l'hydrogène alors que les [FeFe]-hydrogénases catalysent plutôt la production d'hydrogène. De plus, l'activité catalytique des [FeFe]-hydrogénases est 10 à 100 fois plus élevée que celle des [NiFe]-hydrogénases, (Albracht, 1994 ; Frey, 2002) (Tableau 2), et les [FeFe]-hydrogénases possèdent une affinité pour l'hydrogène deux fois plus élevée que celle des [NiFe]-hydrogénases.

Tableau 2 : Comparaison entre l'activité catalytique des [FeFe]-hydrogénases et des [NiFe]-hydrogénases (Frey, 2002). Activités mesurées en molécules d'hydrogène par seconde et par molécule d'hydrogénase à 30°C.

	<i>[NiFe]-hydrogénases</i>	<i>[FeFe]-hydrogénases</i>
Production d' H_2	700	6 000 - 9 000
Consommation d' H_2	700	28 000

Les [FeFe]-hydrogénases sont donc les catalyseurs de la production d'hydrogène les plus efficaces que l'on connaisse.

La bactérie anaérobie *C. pasteurianum* contient deux [FeFe]-hydrogénases (I et II) monomériques et cytoplasmiques. La [FeFe]-hydrogénase I est bidirectionnelle, elle catalyse *in vitro* les deux réactions de production et de consommation de l'hydrogène à des taux extrêmement élevés. La [FeFe]-hydrogénase II catalyse préférentiellement *in vitro* la réaction d'oxydation de l'hydrogène (Adams *et al.*, 1989 ; Adams et Mortenson, 1984). Les activités obtenues sont détaillées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Activités spécifiques des hydrogénases à fer I et II de *C. pasteurianum*. Les valeurs de V_{max} sont exprimées en $\mu\text{mole d'H}_2 \text{ produit ou consommé} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines (Adams et Mortenson, 1984 ;* : Quinkal *et al.*, 1994).

		<i>Production d'H₂</i>		<i>Consommation d'H₂</i>
		Méthyl Viologène	Ferrédoxine	Méthyl Viologène
I	Km (M)	6,25 10 ⁻³	50 10 ⁻⁶ ; * 19 10 ⁻⁶ - 14 10 ⁻⁶	5 10 ⁻³
	Vmax	4 000 - 5 500	1 480 ; * 720 - 300	14 000 - 24 000
II	Km (M)	0,31 10 ⁻³	130 10 ⁻⁶	5,7 10 ⁻³
	Vmax	7,6-10	28	120 - 34 000

La bactérie anaérobie *C. acetobutylicum* ATCC 824 contient deux [FeFe]-hydrogénases (HydA et HydB) monomériques et cytoplasmiques. La purification de la [FeFe]-hydrogénase HydA de *C. acetobutylicum* ATCC 824 sous forme de protéine de fusion avec l'étiquette Strep-tag a déjà été effectuée et les activités spécifiques correspondantes (Tableau 4) ont été rapportées par deux groupes, après une expression homologue (Girbal *et al.*, 2005) et après une expression hétérologue chez *E. coli* (co-exprimée avec les trois protéines de maturation) (King *et al.*, 2006). Dans les deux cas, les résultats montrent de faibles activités *in vitro* de production de l'hydrogène aussi bien avec la ferrédoxine que le méthyl viologène. En présence de méthyl viologène, l'activité de production de l'hydrogénase est plus de 50 fois inférieure à celle rapportée pour la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* qui est de 4 000 $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ (Tableau 3).

Tableau 4 : Activités spécifiques de la [FeFe]-hydrogénase HydA de *C. acetobutylicum* ATCC 824 (V_{max} exprimés en $\mu\text{mole d'H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, Km exprimés en M) 1 : Girbal *et al.*, 2005, 2 : King *et al.*, 2006.

<i>[FeFe]-hydrogénase HydA de C. acetobutylicum</i>		<i>Production d'H₂</i>	<i>Consommation d'H₂</i>
Ferrédoxine	Vmax ¹	51	160
	Km ¹	6 10 ⁻⁶	23 10 ⁻⁶
Méthyl viologène	Vmax ¹	10	10 057
	Km ¹	0,3 10 ⁻³	128 10 ⁻³
	Vmax ²	75,2	-

King *et al.*, 2006 ont également rapporté une valeur de vitesse maximale de production d'hydrogène pour l'hydrogénase à fer HydB de *C. acetobutylicum* de 8,6 $\mu\text{mole}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$.

Les [FeFe]-hydrogénases des bactéries réductrices de sulfate du genre *Desulfovibrio* telles que *D. desulfuricans* ATCC 7757 (DdH), *D. vulgaris* (Hildenborough) (DvH), sont dimériques (45 kDa et 10 kDa) et périplasmiques, et catalysent préférentiellement *in vitro* la réaction d'oxydation de l'hydrogène (Tableau 5). La [FeFe]-hydrogénase de *M. elsdenii* est monomérique et cytoplasmique, son unité catalytique présente la même composition (centre H et centre F) que celle des [FeFe]-hydrogénases du genre *Desulfovibrio*.

Tableau 5 : Activités spécifiques des [FeFe]-hydrogénases de *D. vulgaris* (Hildenborough), de *D. desulfuricans* ATCC 7757 et de *M. elsdenii* (V_{max} exprimés en $\mu\text{mole d'H}_2\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, et mesurés avec le méthyl viologène comme partenaire redox) (Adams, 1990 ; Hatchikian *et al.*, 1992).

<i>Organismes</i>	<i>D. vulgaris</i> (Hildenborough)	<i>D. desulfuricans</i> (ATCC 7757)	<i>M. elsdenii</i>
[FeFe]-hydrogénases	DvH	DdH	Me
V_{max} , Production d'H ₂	10 400 - 4 600	8 200	7 000
V_{max} , Consommation d'H ₂	50 000	62 000	9 000

Les activités de consommation et de production des [FeFe]-hydrogénases du genre *Desulfovibrio* sont les plus fortes rapportées à ce jour dans la littérature.

Les hydrogénases à fer de *C. reinhardtii* (HydA1, HydA2), *S. obliquus* sont monomériques et cytoplasmiques, elles ont été caractérisées biochimiquement dans le sens de production de l'hydrogène avec le méthyl viologène (Tableau 6) (Adams, 1990 ; Happe et Naber 1993 ; Florin *et al.*, 2001).

Tableau 6 : Activités spécifiques des [FeFe]-hydrogénases de *C. reinhardtii*, et de *S. obliquus* (Les activités Vmax sont exprimées en $\mu\text{mole d'H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ avec le méthyl viologène comme donneur d'électrons, et les Km sont exprimés en M (Adams, 1990 ; Florin *et al.*, 2001)).

<i>Organismes</i>		<i>C. reinhardtii</i>	<i>S. obliquus</i>
		HydA1	HydA
Vmax, Production d'H ₂		935	700
Km (M)	MV	830 10 ⁻⁶	800 10 ⁻⁶
	Fd	35 10 ⁻⁶	

Les [FeFe]-hydrogénases des algues vertes ont une activité spécifique de production de l'ordre de 800 $\mu\text{mole d'H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Il est intéressant de remarquer que, malgré leur structure minimale, cette valeur n'est pas supérieure aux activités de production des [FeFe]-hydrogénases clostridiales ou du genre *Desulfovibrio*.

Les hydrogénases à fer peuvent interagir avec un large spectre de substrats. *In vitro*, Fitzgerald *et al.*, 1980, ont démontré que l'hydrogénase à fer I de *C. pasteurianum* pouvait interagir aussi bien avec des ferrédoxines de type bactérien 2[4Fe-4S], que des ferrédoxines de type plante [2Fe-2S] (ayant un potentiel redox compris entre - 340 mV à - 455 mV) et que des flavodoxines d'origine bactérienne ou issues d'algues.

Les [FeFe]-hydrogénases sont extrêmement plus sensibles à l'oxygène que les [NiFe]-hydrogénases (Frey, 2002). Dans la littérature des points déterminants pour la sensibilité à l'oxygène des hydrogénases ont été mis en évidence : la structure du site catalytique (Bleijlevens *et al.*, 2004), et l'accessibilité du site actif au gaz d'O₂ (Nicolet *et al.*, 1999). Ainsi les domaines accessoires contribuent à protéger l'unité catalytique et le site actif de l'oxygène. En effet, la protéine modifiée HydA Δ N de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* (Posewitz *et al.*, 2004 ; Cohen *et al.*, 2005a et King *et al.*, 2006) délétée de ses domaines accessoires est trois fois moins tolérante à l'oxygène que HydA native.

Des études d'électrochimie par voltammétrie de film de protéine (Protein Film Voltammetry) réalisées par Vincent *et al.*, 2005 ont montré que la [FeFe]-hydrogénase de *D. desulfuricans* présente différents états d'oxydation et d'activation qui réagissent différemment avec l'oxygène. La [FeFe]-hydrogénase de *D. desulfuricans* est irréversiblement endommagée par

l'oxygène sous sa forme active anaérobie, alors qu'elle ne réagit pas à l'oxygène lorsqu'elle est sous son état oxydé inactif obtenu par oxydation anaérobie à hauts potentiels.

En prenant en compte les données bibliographiques ci-dessus exposées sur l'état actuel des connaissances au niveau moléculaire des hydrogénases à fer, les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés dans le but de caractériser les relations structure-fonctions de la [FeFe]-hydrogénase HydA de *C. acetobutylicum* avec ses partenaires d'oxydo-réduction physiologiques (ferrédoxine et flavodoxine) et artificiel (méthyl viologène), afin de déterminer l'implication de chacun des centres fer-soufre de surface FS4C et FS2 dans le transfert inter-moléculaire des électrons.

CHAPITRE 2 :
MATERIEL ET METHODES

1. SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES

1.1. Souches et plasmides

Les différentes caractéristiques des souches et plasmides utilisées au cours de cette étude sont décrites dans le tableau ci-dessous :

Tableau 7 : Souches et plasmides utilisés.

<i>Souches</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Références</i>
<i>C. acetobutylicum</i>		
ATCC 824	Souche sauvage	ATCC
<i>E. coli</i>		
DH5α	[<i>supE44 Δlac U169 (Φ80 lacZ ΔM15) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1</i>]	(GIBCO)
BL21 (DE3)	<i>F ompT gal [dcm] [lon] hsdS_B (r_B-m_B-)</i> Souche <i>E. coli</i> B avec DE3, prophage λ portant le gène de la T7 ARN polymérase	(Novagen)
ER2275	[<i>trp31 his1 tonA2 rpsL104 supE44 xyl-7 mtl-2 metB1 e14* Δ(lac) U169 endA1 recA1 R (zgb-210::Tn10) Tet^r Δ(mcr-hsd-mrr)114::1510/F' proAB lacI^rZΔM15 zz::min-Tn10 (Km^r)</i>]	(NEB)
<i>Plasmides</i>		
pAN1	<i>Cm^r, Φ 3ϕ1 ; origine p15 A (7 kpb)</i>	(Mermelstein et Papoutsakis, 1993)
pET-21c	<i>Ap^r, ColE1 ori, f1 origin, lacI, cassette T7 (5441pb)</i>	(Novagen)
PET-21c-flavo587	Insertion du gène CAC0587 de <i>C. acetobutylicum</i> dans la cassette T7 du plasmide pET-21c (5856pb)	Cette étude
pTSH-C-Tag	<i>Ap^r, MLS(Ery^r), promoteur thIA, gène hydA fusionné au Strep-tag II en C-term, gène rep L, origine ColE1 (6772pb)</i>	(Girbal et al., 2005)
pPHhydA-C-Tag	Le promoteur <i>thIA</i> du plasmide pTSH-C-Tag a été remplacé par le promoteur <i>hydA</i> (6808pb)	(Girbal et al., 2005)
pPHhydA-C-Tag	Le promoteur <i>thIA</i> du plasmide pTSH-C-Tag C48A a	Cette étude

C48A	été remplacé par le promoteur <i>hydA</i> (6808pb)	
pPHhydA-C-Tag C100A	Le promoteur <i>thlA</i> du plasmide pTSH-C-Tag C100A a été remplacé par le promoteur <i>hydA</i>	Cette étude
pPHhydA-C-Tag C48AC100A	Double mutation de HydA (6808pb)	Cette étude
pPHhydA-C-Tag H93C	Le promoteur <i>thlA</i> du plasmide pTSH-C-Tag H93C a été remplacé par le promoteur <i>hydA</i> (6808pb)	Cette étude
pPHhydA-C-Tag Δ FS2	Délétion 41 aa en N-term de HydA (6685pb)	Cette étude
pPHhydA-C-Tag Δ DA	Délétion 197 aa en N-term de HydA (6217pb)	Cette étude

Abréviations : ATCC : American Type Culture Collection ; *rep L* : origine de répllication gram-positive de pIM13 ; *thlA* : gène de la thiolase ; *hydA* : gène de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* ; *ColE1* : origine de répllication dans *E. coli* ; Km^R : kanamycine résistant ; MLS : macrolides-lincosamides-stéptogramines ; Ery^R : érythromycine résistant ; Tet^S : Tétracycline sensible ; Cm^R : Chloramphénicol résistant.

Les plasmides pTSH-C-Tag et pPHhydA-C-Tag sont des plasmides navettes *E. coli*/*C. acetobutylicum*. Le gène de l'hydrogénase *hydA* est placé sous le contrôle du promoteur d'origine clostridiale et constitutif de la thiolase ou celui régulé de l'hydrogénase à fer (Girbal *et al.*, 2003), et en fusion avec l'étiquette Strep-tag, constituée de 8 acides aminés (WSHPQFEK) en position C-terminale. Le vecteur pPHhydA-C-Tag sera utilisé comme matrice pour la mutagenèse dirigée par PCR inverse du gène *hydA*, de plus il permet d'exprimer et de purifier des mutants d'intérêt de la protéine de fusion [FeFe]-hydrogénase-Strep-tag.

1.2. Conservation des souches :

L'ensemble des souches d'*E. coli* est conservé à -80°C dans une solution de glycérol à 20% (concentration finale v/v). Les souches de *C. acetobutylicum* ATCC 824 sont conservées sous forme de spores à -20°C. La sporulation est obtenue après une culture de 4 à 5 jours à 37°C, en milieu synthétique liquide (MS).

2. MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CROISSANCE

2.1. Milieux de culture et conditions de croissance de *C. acetobutylicum*

2.1.1. Conditions de croissance

Toutes les souches de *C. acetobutylicum* sont cultivées dans des fioles serties en anaérobiose sur milieu synthétique (Vasconcelos *et al.*, 1994).

Pour les souches recombinantes, une pression de sélection est appliquée par ajout d'érythromycine au milieu ($40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Les inocula sont obtenus en ensemençant à 10 % (v/v) des fioles de milieu synthétique, à partir de suspensions stocks de spores, conservées à -80°C . Un choc thermique à 80°C est appliqué 20 minutes à la culture afin d'éliminer les formes végétatives et d'accélérer la germination des spores. La culture est ensuite placée à 37°C .

Le maintien des conditions anaérobies est indispensable à la croissance de *C. acetobutylicum*. Les cultures en milieu liquide sont réalisées dans des fioles serties dont le milieu a préalablement été dégazé à chaud sous un flux d'azote (de 15 à 30 minutes selon le volume). Afin de vérifier qu'il n'y a pas de traces d'oxygène, un indicateur coloré d'oxydo-réduction : la résazurine ($1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) est ajoutée au milieu de culture. Les fioles sont autoclavées 20 minutes à 120°C puis de la cystéine ($0,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) est rajoutée en conditions anaérobies afin de réduire le milieu.

Les cultures sur boîtes de Pétri sont réalisées dans une boîte à gants (hotte) anaérobie (La Calhène) remplie d'un mélange gazeux constitué de 85% d'azote, 5% de dioxyde de carbone et 10% d'hydrogène. Les traces d'oxygène sont éliminées par un catalyseur en palladium qui transforme l'hydrogène et l'oxygène en eau, qui est ensuite piégée dans un gel de silice. Les boîtes de Pétri doivent être équilibrées 24 h à l'atmosphère de la hotte anaérobie avant étalement des cellules.

2.1.2. Milieux de culture

- Le milieu synthétique (MS) à base de glucose est utilisé pour les cultures en fioles serties (préparation d'inoculum ou sporulation des souches).

Composition :

Glucose	60 g.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,55 g.l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,55 g.l ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,22 g.l ⁻¹
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,011 g.l ⁻¹
CH ₃ COOH	2,3 g.l ⁻¹
Acide para-aminobenzoïque	8 mg.l ⁻¹
Biotine	0,08 mg.l ⁻¹
Carbonate de calcium	2 g.l ⁻¹

Le pH du milieu est ajusté à 6,5 avec une solution d'ammoniaque concentrée.

Pour les souches recombinantes exprimant l'hydrogénase à fer, un mélange composé de sulfate de fer à 100 mg.l⁻¹, de chlorure de nickel II à 6 mg.l⁻¹, de sulfate de zinc à 120 mg.l⁻¹, d'acide nitriloacétique à 400 mg.l⁻¹, ajusté à pH 6 avec du NaOH 2N est additionné au milieu MS des pré-cultures et cultures .

- Le milieu **RCA**, ou milieu commercial RCM (Reinforced Clostridial Medium), avec de l'agar à 15 g.l⁻¹, est utilisé pour la sélection des clones de *C. acetobutylicum* après électrotransformation. Le pH est ajusté à 5,8 avec une solution d'acide chlorhydrique diluée.

- Le milieu **2YTG** est utilisé pour la préparation d'ADN chromosomique, ainsi que pour la croissance de la souche avant et après électroporation.

Composition :

Bactotryptone	16 g.l ⁻¹
Extrait de levure	10 g.l ⁻¹
NaCl	4 g.l ⁻¹
Glucose	5 g.l ⁻¹

Le pH est ajusté à 5,2 avec une solution d'acide chlorhydrique.

- Le milieu **CGM** (Clostridial Growth Medium) est utilisé pour les pré-cultures avant transformation ainsi que pour la culture des souches recombinantes pour la préparation d'ADN plasmidique.

Composition :

Extrait de levure	6,25 g.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,94 g.l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,94 g.l ⁻¹
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,5 g.l ⁻¹
MnSO ₄ , H ₂ O	12,5 mg.l ⁻¹

FeSO ₄ , 7H ₂ O	12,5 mg.l ⁻¹
NaCl	1,25 g.l ⁻¹
Asparagine	2,5 g.l ⁻¹
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 g.l ⁻¹

Le pH du milieu, qui n'est pas ajusté, avoisine 6,6. Le glucose 50 g.l⁻¹ final est rajouté en solution stock de 250 g.l⁻¹ après dégazage et stérilisation du milieu.

2.1.3. Culture en fermenteur

Les cultures discontinues de *C. acetobutylicum* sont réalisées en milieu synthétique (Soni *et al*, 1987).

Composition du milieu :

Glucose	60 g.l ⁻¹
NH ₄ Cl	1,5 g.l ⁻¹
KH ₂ PO ₄	0,5 g.l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	0,5 g.l ⁻¹
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2 g.l ⁻¹

Elles sont réalisées dans des fermenteurs de 2 litres (Setric), pour un volume final de culture de 1,5 l. Le milieu est stérilisé dans le fermenteur. Le milieu encore chaud est dégazé par un flux d'azote jusqu'à refroidissement à température ambiante et est maintenu sous pression d'azote.

Les produits suivants sont rajoutés par filtration à 0,2 µm :

FeSO ₄	100 mg.l ⁻¹
NiCl ₂	6 mg.l ⁻¹
ZnSO ₄	120 mg.l ⁻¹
Acide nitriloacétique	400 mg.l ⁻¹
Acide para-aminobenzoïque	8 mg.l ⁻¹
Biotine	0,08 mg.l ⁻¹
Erythromycine	40 µg.ml ⁻¹ (souches recombinantes)

Le réacteur est inoculé avec 150 ml de pré-culture. Au cours de la culture, le pH est régulé automatiquement par addition de NH₄OH soit à 6,3 (pour rester en acidogénèse pour l'expression plasmidique de l'hydrogénase à fer), soit à 4,8 (pour l'expression des ferrédoxines endogènes de *C. acetobutylicum*). La température est maintenue à 37°C, l'agitation est de 300 rpm.

Récolte et stockage des cellules exprimant l'hydrogénase à fer :

Sous flux d'hydrogène et en condition anaérobie, les cellules sont récoltées quand la DO_{620} avoisine 2-3 en présence de 10 mM de dithionite. Elles sont lavées dans le tampon A (Tris-HCl 100 mM pH 7,6 ; glycérol 10 % ; dithionite 10 mM) et concentrées 30 fois par centrifugation (20 minutes à 8000 rpm à 4°C). Les cellules sont reprises dans 40 ml de tampon A à 2 mM de dithionite, aliquotées dans deux fioles anaérobies serties (25 ml) et conservées à -20 % ou utilisées de suite.

Récolte et stockage des cellules exprimant les ferrédoxines :

Les cellules sont récoltées comme décrit dans le paragraphe précédent à DO_{620} proche de 5-6. Elles sont également lavées et concentrées.

2.2. Milieux de culture et conditions de croissance d'*E. coli*

Le milieu LB est couramment utilisé pour la culture des souches d'*E. coli*. Il est complémenté avec des antibiotiques (ampicilline à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, chloramphénicol à 300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, carbénicilline à 100 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) lors de cultures de souches transformées par des plasmides portant le gène de résistance à ces antibiotiques.

Le milieu LB (Sambrook *et al.*, 1989) :

Bactotryptone	10 g.l^{-1}
Extrait de levure	5 g.l^{-1}
NaCl	10 g.l^{-1}

Le milieu liquide SOC est utilisé pour la culture des cellules d'*E. coli* lors de la préparation de cellules compétentes et au cours de leur transformation par de l'ADN plasmidique.

Le milieu SOC :

Bactotryptone	20 g.l^{-1}
Extrait de levure	5 g.l^{-1}
NaCl	10 mM
Glucose	20 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ (6H ₂ O)	10 mM
MgSO ₄ (7H ₂ O)	10 mM

2.2.1. Cultures en fermenteur

La souche recombinante d'*E. coli* BL21 (DE3) transformée avec le plasmide pET-21c-flavo587 et exprimant la flavodoxine CAC0587 de *C. acetobutylicum* est cultivée de façon aérobie en fermenteur de 2 litres sur le milieu suivant :

Tryptone	10 g.l ⁻¹
Extrait de levure	5 g.l ⁻¹
HEPES	2,6 g.l ⁻¹
FeSO ₄	50 mg.l ⁻¹
Acide nitrilotriacétique	200 m g.l ⁻¹
K ₂ HPO ₄	500 m g.l ⁻¹
NaCl	2 g.l ⁻¹

Le glucose 20 g.l⁻¹ est rajouté en solution stock de 250 g.l⁻¹ après stérilisation du milieu dans le fermenteur. De la riboflavine 5 mg.l⁻¹ est rajoutée par filtration à 0,2 µm. L'antibiotique carbénicilline (100 µg.ml⁻¹) est également incorporé au milieu. La température est maintenue à 30°C et le pH est régulé à 6,8.

Le milieu est inoculé avec 150 ml de pré-culture. A DO₆₀₀ égale à 0,5, l'IPTG est ajouté à 20 µM final induisant l'expression du gène de la T7 ARN polymérase sous contrôle du promoteur *lac*. L'expression de la flavodoxine est alors induite. A DO₆₀₀ proche de 2-3, les cellules sont récoltées de façon aérobie, lavées avec du tampon A (Tris-HCl 0,1M, pH7,6, 10% glycérol) et concentrées par centrifugations successives de 20 minutes à 8000 rpm à 4°C. Les cellules sont reprises dans 40 ml de tampon A, divisées dans deux fioles (25 ml) et sont conservées à -20% ou utilisées de suite.

2.3. Evaluation de la concentration cellulaire

La croissance cellulaire est suivie par la mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (U1100, Hitachi, Tokyo, Japon) à 620 nm pour *C. acetobutylicum* et 600 nm pour *E. coli*.

3. TECHNIQUES DE GENIE GENETIQUE

3.1. Isolement et manipulation des acides nucléiques

3.1.1. Transformation d'*E. coli*

La préparation et la transformation de cellules compétentes d'*E. coli* au chlorure de calcium sont réalisées selon le protocole de Sambrook et Russell (1989). Les cellules compétentes préparées avec ce protocole sont utilisées aussitôt. Pour préparer des cellules compétentes d'*E. coli* afin de les garder congelées à -80°C , le protocole utilisé est celui au chlorure de rubidium (RbCl).

Protocole :

- Inoculer 200 μl à 1 ml d'une culture de nuit dans 100 à 500 ml de milieu psi. Incuber à 37°C dans un erlen bafflé jusqu'à $A_{600} = 0,6 - 0,7$
- Laisser dans la glace pendant 15 min. A partir de cette étape, les cellules doivent rester dans la chaîne du froid (4°C ou dans la glace)
- Culotter les cellules par centrifugation de 3 000 à 5 000 g pendant 5 min (5000 rpm)
- Eliminer le surnageant et ajouter 0,4 volume (40 à 400 ml) de tampon I, resuspendre le culot et laisser 15 min dans la glace.
- Culotter à nouveau les cellules
- Eliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 0,04 volume de tampon II, laisser 15 min dans la glace
- Aliquoter les cellules en échantillons de 100 ou 200 μl .
- Utiliser les cellules compétentes, soit immédiatement, soit les congeler et stocker rapidement à -80°C

Ce protocole de préparation des cellules compétentes d'*E. coli* permet d'obtenir 10^6 à 10^7 cfu. μg^{-1} d'ADN.

Milieu psi :

Bacto yeast extract	5 g
Bacto Tryptone	20 g
Sulfate de magnésium	5 g

Ajuster à pH 7,6 avec une solution d'hydroxyde de potassium puis stériliser 40 min.

Tampons I (200 ml) :

Acétate de potassium	30 mM
Chlorure de rubidium	100 mM
Chlorure de calcium	10 mM
Chlorure de manganèse	50 mM
glycérol	15 % v/v

Ajuster à pH 5,8 avec de l'acide acétique dilué, filtrer et stériliser.

Tampon II (100 ml) :

MOPS	10 mM
calcium chloride	75 mM
rubidium chloride	10 mM
glycerol	15 % v/v

Ajuster à pH 6,5 avec une solution de NaOH diluée, filtrer et stériliser.

En général, 2 à 10 µl de produit de ligation, ou de préparation plasmidique sont utilisés pour transformer 200 µl de cellules.

Transformation par choc thermique :

- Ajouter l'ADN à 100 µl de cellules compétentes
- Incuber 20 minutes dans la glace
- Choc thermique à 42°C pendant 45 secondes
- Remettre immédiatement les cellules dans la glace pendant 5 minutes
- Ajouter 900 µl de LB ou de SOC
- Incuber 1 h à 37°C
- Etaler les cellules sur milieu de sélection

3.1.2. Mini-préparations d'ADN plasmidique d'*E. coli*

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées sur 1 à 2 ml d'une culture sur la nuit en milieu LB additionné d'antibiotique(s) par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989) ou à l'aide de mini-colonnes du kit QIAprep (QIAGEN). Les mini-colonnes sont utilisées pour obtenir une préparation d'ADN très propre, destinée à être manipulée (digestion, ligation, ...) ou introduite dans *E. coli*.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide de midi-colonnes QIAGEN à partir de 50 ml de culture. Elles sont utilisées pour obtenir une grande quantité de matériel

plasmidique destiné à être stocké ou employé pour la transformation ultérieure de *C. acetobutylicum*.

3.1.3. Transformation de *C. acetobutylicum*

C. acetobutylicum possède le système de restriction Cac824I (Mermelstein *et al.*, 1992). Par conséquent, avant transformation dans les souches de *C. acetobutylicum*, les plasmides doivent être méthylés sur les sites de reconnaissance de Cac824I pour ne pas être digérés. Cette méthylation se fait *in vivo* dans *E. coli* ER2275 (pAN1) puis les plasmides sont ensuite concentrés et dessalés sur des colonnes de type microconcentrator, Microcon 100 (Amicon). L'ADN plasmidique ainsi préparé est introduit dans *C. acetobutylicum* par électroporation (Mermelstein et Papoutsakis, 1993).

Tampons : Tampon d'électroporation composé de 10 ml de saccharose 270 mM et de 150 µl de tampon phosphate de sodium (pH 7,4) à 200 mM

Protocole :

A partir d'une pré-culture en milieu CGM (30 ml), sur la nuit :

- Inoculer, à 10%, 50 ml de milieu 2YTG (la DO₆₂₀ doit avoisiner 0,2)
- Culture à 37°C
- La culture est arrêtée à DO₆₂₀ de 0,8 à 1,2, et refroidie dans la glace

Dans l'enceinte anaérobie :

- Centrifuger les cellules, 10 minutes à 6000 rpm
- Laver le culot dans 10 ml de tampon d'électroporation glacé
- Centrifuger les cellules, 10 minutes à 6000 rpm
- Resuspendre le culot dans 500 µl de tampon d'électroporation glacé
- Mettre en contact la suspension de cellules et la préparation plasmidique (20 à 40 µl de préparation d'ADN plasmidique concentrée et dessalée) dans la cuvette d'électroporation placée dans la glace.
- Le mélange est immédiatement soumis à une décharge électrique avec les paramètres du Gene Zapper suivants :

Voltage = 1800 V
C = 50 µF
R = 600 ohms

- Transférer les cellules dans 10 ml de milieu 2YTG et les incubent à 37°C pendant 4 heures
- Centrifuger 15 minutes à 6000 rpm
- Reprendre le culot dans 250 µl de surnageant
- Etaler les cellules sur milieu de sélection (boîtes RCA pH 5,8 + antibiotique Ery 40 µg.ml⁻¹)
- Incuber 48h à 37°C

3.1.4. Mini-préparations d'ADN plasmidique de *C. acetobutylicum*

Tampons :

KCl	0,5 M KCl	SET	25% sucrose
	0,1 M EDTA		10 mM EDTA
	0,05 M Tris-HCl pH 8		25 mM Tris-HCl pH 8
SES	200 mM NaOH (solution « fraîche »)		
	10 mM EDTA		
	1% SDS		
KAc	5 M Kacétate	60 ml	
	Acide acétique glacial	11,5 ml	
	H ₂ O	28,5 ml	

Protocole :

La culture et le début de la lyse cellulaire sont effectués dans l'enceinte anaérobie :

A partir d'un clone isolé sur boîte RCA + érythromycine :

- Culture dans 6 ml CGM + Ery 40 µg.ml⁻¹ (culture sur la nuit) à 37°C
- Centrifugation des cellules 10 minutes, à 6000 rpm
- Culot lavé avec 5 ml tampon KCl
- Centrifugation 10 minutes, à 6000 rpm
- Culot lavé avec 5 ml de tampon SET
- Centrifugation 10 minutes à 6000 g
- Culot repris dans 450 µl tampon SET + lysosyme 20 mg.ml⁻¹
- Incubation 45 minutes à 37°C
- Mettre le tube immédiatement dans la glace
- Congélation possible à -20°C

La suite de la lyse et de l'extraction cellulaire sont réalisées hors de l'enceinte anaérobie, à température ambiante :

- Culot décongelé si nécessaire
- Ajouter 350 µl tampon SES, mélanger par 10 inversions

- Ajouter 350 µl tampon KAc 5 M, mélanger par 10 inversions
- Incuber au moins 40 minutes dans la glace
- Centrifugation 10 minutes, à 12000 rpm, à 4°C
- Surnageant prélevé
- Effectuer 2 extractions phénol-chloroforme-IAA (v/v) et une extraction au chloroforme
- Précipitation isopropanol : + 0,1 v de Na acétate 3 M, pH 5,2
+ 0,7 v d'isopropanol,
- Mélanger par inversions
- Centrifugation immédiate 10 minutes à 13500 rpm
- Laver le culot avec 500 µl d'éthanol 70%
- Centrifugation 5 minutes à 13500 rpm
- Culot séché 5 minutes sur la paillasse puis repris dans 30 à 50 µl de TE 1X + 1µl de RNase

Remarque : Des digestions analytiques de l'ADN plasmidique peuvent être réalisées sur 10 µl de préparation. Si la quantité de matériel n'est pas suffisante pour cette analyse, une amplification est faite par transformation de cellules compétentes d'*E. coli* avec 10 à 20 µl de préparation d'ADN plasmidique.

3.1.5. Techniques de clonage

Les techniques de digestions et de clonages sont réalisées selon les procédures standards (Sambrook *et al.*, 1989) et selon les recommandations des fournisseurs (New England Biolabs ou GIBCO/BRL).

La séparation et l'analyse des tailles de fragments d'ADN sont réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (de 0,8 à 2 % d'agarose selon la taille des fragments, dans un tampon TAE 0,5X). Les fragments d'ADN sont purifiés à partir de gels d'agarose avec les kits de purification sur gel QIAquick (Qiagen). Du tampon de charge (1X final) est ajouté aux échantillons avant dépôt. Le marqueur de taille 1 kb (GIBCO/BRL) est couramment employé. L'ADN est visualisé aux ultraviolets ($\lambda = 254$ ou 312 nm) après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthydiuim (BET) à environ $0,5 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

TAE 0,5X :

Tris acétate	0,02 M
EDTA	0,5 mM

Composition du tampon de charge (6X) :

Bleu de bromophénol	0,25%
Xylène cyanol FF	0,25%
Glycérol dans l'eau	30%

3.1.6. Amplification de fragments d'ADN

L'amplification de fragments d'ADN est réalisée par la technique d'amplification en chaîne (PCR). La réaction est effectuée en utilisant des ADN polymérase fidèles et thermorésistantes (Pwo et Pfu).

Les amplifications PCR sont réalisées grâce aux kits Pwo ADN polymérase (Roche Molecular Biochemicals), et Pfu turbo ADN polymérase (Stratagène). Les volumes réactionnels sont de 50 µl.

PCR Pfu turbo :

ADN plasmidique	1 à 10 ng
chaque amorce	0,5 µM
dNTPs (Sigma)	200 µM
Tampon Pfu	10x
MgCl ₂	2,5 mM
Pfu turbo (Stratagène)	2 U

PCR Pwo :

Mix 1 :	ADN plasmidique	1 à 10 ng
	chaque amorce	0,5 µM
	dNTPs (Sigma)	200 µM
Mix 2 :	Tampon Pwo + MgSO ₄	10x
	Pwo (Roche)	2 U

L'ADN est amplifié pendant 20 cycles dans un DNA thermal cycler modèle 2400 (Perkin-Elmer Cetus) :

1 cycle à 95°C pendant 2 minutes] 20 cycles
95°C pendant 30 s	
60°C pendant 1 min	
68°C pendant 15 min	—
1 cycle final à 68 °C pendant 5 minutes	

Les amorces utilisées pour la construction des différentes mutations du gène *hydA* sont répertoriées dans le tableau suivant (Tableau 8).

Tableau 8 : Oligonucléotides utilisés pour effectuer du clonage et/ou de la mutagenèse dirigée.

<i>Nom</i>	<i>Séquence 5'-3'</i>	<i>Utilisation</i>
Directe C100A-2D	GCATGAATTTAAATGTGGACAGGCCTCTAGAAGAGAAAATTG	Insertion de la mutation C100A pour créer la double mutation C48A-C100A de HydA dans le plasmide pPHHydA-Ctag C48A
Indirecte C100A-2R	CGTACTTAAATTTACACCTGTCCGGAGATCTTCTCTTTTAAC	
Directe 1DFS2	CTTGAGCTAGCAGTTGAAGATGGAATGGTAATAAAC	Délétion du domaine FS2, mutation Δ FS2 du gène <i>hydA</i> dans le plasmide pPHHydA-Ctag
Indirecte 2DFS2	GCAGCTACGCATCTACCGCATAG	
Directe DDA1	CCAGTTGCTGCTTTAAAAGAAAAATCCCAT	Délétion des domaines accessoires, mutation Δ DA du gène <i>hydA</i> dans le plasmide pPHHydA-Ctag
Indirecte DDA2	CCACATGTTTATCCTCCCAAATGTAAAATA	
Directe Nde1587	GGATTTCCATATGGTGAAAATAAACATAATTTATTGCTC	Amplification/clonage du gène <i>flavodoxine CAC0587</i> dans le plasmide pET-21c
Indirecte Ecor1587	CGGAATTCCTTATTTTTTCAAATTGAGGATGTGACCAGCTATTT ATAAGAGCCTTACCAAACCTC	

4. TECHNIQUES ANALYTIQUES – PURIFICATION ET DOSAGES ENZYMATIQUES

4.1. Purification de la protéine de fusion HydA–Strep-tag

Toutes les manipulations de l'hydrogénase à fer sont réalisées dans la hotte anaérobie. Tous les tampons sont préparés de façon anaérobie, c'est-à-dire portés à ébullition et dégazés à chaud avec un flux d'azote, pendant 15 à 30 minutes, selon le volume et conservés sous atmosphère d'azote puis ils sont dégazés dans la hotte sous flux d'hydrogène et 2 mM de dithionite sont ajoutés avant utilisation. Les réactifs en poudre sont dissous dans le tampon adéquat dans la hotte anaérobie.

La suspension cellulaire de *C. acetobutylicum* recombinant est désintégrée par une sonde à ultrasons (Vibracell 71434), à 0°C, par 4 cycles de 30 secondes, avec 2 minutes d'intervalle entre chaque cycle. Les acides nucléiques sont précipités par l'addition de streptomycine sulfate à 3,2 g.l⁻¹. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 13 300 rpm pendant 2 minutes.

De l'avidine (0,16 g.l⁻¹) est ajoutée au surnageant pour bloquer la fixation ultérieure de la biotine et des protéines biotinylées sur la matrice d'affinité. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, l'extrait protéique est dilué 4 fois et filtré à 5 μ m (Sartorius). La préparation est ensuite

déposée sur une colonne Strep-Tactin Superflow (IBA, GmbH, Göttingen, Allemagne), colonne d'affinité du Strep-Tag, pré-équilibrée avec le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, 0,15M NaCl, 2 mM de dithionite. La colonne est lavée, puis l'hydrogénase à fer étiquetée est éluée avec ce même tampon contenant 2,5 mM de desthiobiotine.

4.2. Purification de la protéine de fusion flavodoxine–Strep-tag

4.2.1. Purification

La purification de la flavodoxine est réalisée de façon aérobie. La suspension cellulaire d'*E. coli* BL21(DE3) (pET21c-flavo5871-Strep-tag) est désintégrée par une sonde à ultrasons, à 0°C, par 4 cycles de 30 secondes, avec 2 minutes d'intervalle entre chaque cycle. Les acides nucléiques sont précipités par l'addition de streptomycine sulfate à 3,2 g.l⁻¹. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation à 4 800 rpm pendant 20 minutes à 4°C. De l'avidine (0,16 g.l⁻¹) est ajoutée au surnageant pour bloquer la fixation ultérieure de la biotine et des protéines biotinylées sur la Step-Tactin Superflow. Après 30 minutes d'incubation à 4°C, l'extrait protéique est dilué 4 fois et filtré à 5 µm (Sartorius). La préparation est ensuite déposée sur la colonne Strep-Tactin Superflow, pré-équilibrée avec le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, 0,15 M NaCl. La colonne est lavée, puis la flavodoxine Strep-tag est éluée par 2,5 mM de desthiobiotine.

4.2.2. Libération du FMN de la flavodoxine et reconstitution *in vitro*

La flavodoxine contient un cofacteur FMN. Ce cofacteur est libéré de l'holoprotéine par incubation dans 5 % (v/v) d'acide trichloroacétique (TCA) pendant 5 minutes à température ambiante suivie d'une centrifugation d'une minute à 13000 rpm à 4°C (Protocole d'après Swenson et Krey, 1994). Le pH du surnageant est neutralisé avec du K₂HPO₄ 2 M. Le FMN libéré est quantifié par fluorescence (longueur d'onde d'excitation : 445 nm, longueur d'onde d'émission : 525 nm) en utilisant du FMN (FMN commercial Sigma, pureté 98 % HPLC) traité à l'acide trichloroacétique comme témoin. Une reconstitution *in vitro* de l'holoprotéine est réalisée selon le protocole de Rogers et Sykes, (1990) en ajoutant du FMN libre à l'apoflavodoxine. Dans 1,5 ml de Tampon Tris-HCl 0,1 M, EDTA 0,1 mM contenant de l'apoflavodoxine (200 µg.ml⁻¹), 500 µl de FMN à 441 µM sont ajoutés. Après 2 heures

d'incubation à 4°C, la solution est centrifugée à 7500 g à 4°C, et lavée plusieurs fois sur une membrane de séparation Microsep 3K omega (Pall) pour éliminer le FMN non fixé.

4.3. Purification de la protéine ferrédoxine

Toutes les manipulations sont réalisées dans la hotte anaérobie. Le protocole de purification de la ferrédoxine a été adapté de la publication de Moulis et Meyer, (1982). La culture discontinue de *C. acetobutylicum* est arrêtée lorsque les cellules sont encore en phase exponentielle de croissance ($DO_{620} = 5 - 6$). Les cellules sont transférées à 4°C dans la hotte anaérobie, lavées et concentrées 30 fois dans le tampon A (Tris-HCl 100 mM pH 7,6, 2 mM de dithionite, 10 % de glycérol). Les cellules concentrées sont congelées à -20°C. La suspension cellulaire de *C. acetobutylicum* est désintégrée par une sonde à ultrasons, à 0°C, par 4 cycles de 30 secondes, avec 2 minutes d'intervalle entre chaque cycle. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation de 30 minutes à 6000 rpm à 4°C. Une dénaturation thermique du surnageant est effectuée à 55°C pendant 15 minutes, puis une centrifugation de 30 minutes à 6000 rpm à 4°C est réalisée pour éliminer le matériel précipité.

Le surnageant est dilué 2 fois avec de l'eau distillée, et le pH est ajusté à 7,4 par ajout de Tris-base en poudre.

Ce surnageant est alors déposé sur une colonne de DEAE-cellulose (Sigma 20 x 2 cm) équilibrée avec 5 volumes de tampon Tris-HCl 0,02 M pH 7,4 0,1 M NaCl. Après lavage de la colonne avec 5 volumes de tampon, l'élution est effectuée selon un gradient linéaire de NaCl de 0,1 M à 1 M à un débit de 0,6 ml.min⁻¹. Les fractions brunes ayant un ratio élevé A_{390}/A_{280} sont mélangées. Cette solution protéique est déposée sur une seconde colonne Hiprep Sephacryl S-100HR (Amersham Biosciences) équilibrée avec le tampon Tris-HCl 0,05M pH8. Les fractions d'élution brunes sont mélangées et conservées à -20°C. Un microséquençage N-terminal de la protéine a été réalisé à « La plate-forme d'analyse et de microséquençage des protéines » de l'Institut Pasteur, à Paris.

4.4. Dosages des protéines

4.4.1. Méthode de Bradford :

La concentration en protéines purifiées est déterminée par la méthode de Bradford (1976). Cette méthode évite les interférences avec les acides nucléiques et avec les réactifs possédant

des groupements thiols. La courbe étalon est réalisée avec une solution de sérum albumine bovine (BSA). Dans le cas de la détermination de la concentration en ferrédoxine, la courbe étalon a été réalisée avec une solution de ferrédoxine commerciale de *C. pasteurianum* (Sigma).

4.4.2. Analyse des acides aminés :

La concentration en protéine purifiée a été déterminée par dosage des acides aminés après hydrolyse acide par une méthode HPLC. Après une dérivation en ligne des acides aminés dans la pré-colonne, les dérivés sont séparés sur une colonne C₁₈ en phase inverse et mesurés par un détecteur à barrette de diodes.

4.5. Dosage des atomes de fer :

Le dosage des atomes de fer contenus dans les différentes hydrogénases à fer purifiées de *C. acetobutylicum* a été réalisé dans le laboratoire d'écophysiologie de la photosynthèse au CEA de Cadarache en collaboration avec le Dr Laurent Cournac par ICP-AES (Torche à plasma couplée à une détection par spectroscopie d'émission optique)

Pour le principe, un plasma d'argon (environ 10 000 °K) échange son énergie avec les atomes présents dans la solution. En retournant à un état moins énergétique (désexcitation) ces atomes émettent des radiations dont la longueur d'onde est caractéristique. Les raies obtenues sont de deux types: atomiques et ioniques. L'intensité des raies émises par l'échantillon est proportionnelle à la concentration des éléments qu'il contient. Cette méthode de dosage par ICP-AES possède une très grande sensibilité. Pour la majorité des métaux, les limites de détection de la mesure sont inférieures à 10 µg.l⁻¹, pour l'atome de fer la limite de détection est de 0,12 µg.l⁻¹.

4.6. Dosage des activités enzymatiques de l'hydrogénase à fer

4.6.1. Activité de consommation de l'hydrogène

Les dosages enzymatiques *in vitro* de consommation d'hydrogène qui suivent la réduction directe du méthyl viologène, ou la réduction de la ferrédoxine / flavodoxine couplée à celle du

métronidazole, sont adaptés respectivement des publications de Vasconcelos *et al.*, (1994) et Chen et Blanchard, (1979).

Les réactifs utilisés pour les dosages enzymatiques sont pesés et dissous dans la hotte anaérobie dans des tampons anaérobies. Du dithiothréitol (DTT) à 2 mM est ensuite incorporé pour éliminer toute trace d'oxygène.

Les réactions enzymatiques sont effectuées dans la hotte anaérobie, dans une cuve en quartz thermostatée à 37°C. Le milieu réactionnel de 1 ml est soumis à un bullage à l'hydrogène (avant addition de l'extrait enzymatique).

Le spectrophotomètre employé pour ces dosages enzymatiques est un SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation), placé dans l'enceinte anaérobie. Les activités spécifiques sont déterminées dans une gamme où la linéarité avec la concentration protéique a été établie. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion de 1 μ mole de substrat par minute.

Réduction du méthyl viologène :

Tampon phosphate de potassium (pH 7,2)	100 mM
Méthyl viologène	20 mM / Variable
DTT	20 mM
Bullage d'hydrogène	1 atm
Extrait protéique purifié	quantité variable

La réduction du méthyl viologène est suivie via l'augmentation de l'absorbance à 560 nm ($\epsilon = 7,71 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La réduction de deux molécules de méthyl viologène est couplée à la consommation d'une molécule d'hydrogène.

Réduction du métronidazole :

Tampon phosphate de potassium (pH 7,2)	100 mM
Ferrédoxine/Flavodoxine	quantité variable
Métronidazole	0,1 mM
DTT	20 mM
Bullage d'hydrogène	1 atm
Extrait protéique purifié	quantité variable

La réduction de la ferrédoxine ou flavodoxine est couplée à la réduction chimique du métronidazole, et est suivie par la diminution de l'absorbance à 320 nm ($\epsilon = 9,31 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

4.6.2. Activité de production de l'hydrogène :

Les dosages enzymatiques *in vitro* de production d'hydrogène sont effectués à 30°C sous agitation. La méthode a été adaptée de la publication de Jungermann *et al.*, (1969). Une fiole sortie de 10 ml est dégazée à l'argon. Le mélange réactionnel est de 2 ml.

Composition de la fiole :

Tampon Tris HCl pH8	50 mM
Dithionite de sodium	50 mM
Méthyl viologène 20 mM/ Ferrédoxine /Flavodoxine	1 mM / variable
Extrait protéique purifié	quantité variable

Paramètres CPG :

Température du four	35°C
Température du détecteur	35°C
Température de l'injecteur	50°C

La réaction est initiée par l'addition de l'enzyme, puis un aliquot de 200 µl de phase gazeuse est prélevé de l'échantillon toutes les 8 minutes et analysé par chromatographie phase gaz (GIRA CPG C12). Une séparation des gaz est obtenue grâce à un tamis moléculaire (5 Å, 3 m de long). Le gaz porteur est l'argon à 0,6 bar. L'hydrogène est quantifié selon la hauteur du pic obtenu.

4.6.3. Détermination des paramètres cinétiques

Pour déterminer les paramètres cinétiques K_M et V_{max} , la quantité d'hydrogénase est fixée et les mesures de vitesse initiale de catalyse sont réalisées en faisant varier la quantité de substrat (méthyl viologène ou ferrédoxine/flavodoxine). La constante de Michaelis K_M et la vitesse maximale V_{max} sont alors obtenues par la représentation graphique de Lineweaver & Burk, selon l'équation :

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S_0]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Les valeurs de vitesse initiale de catalyse retenues comme significatives sont celles qui sont supérieures à 10 fois la valeur du témoin sans substrat.

4.6.4. Activité d'échange proton/deutérium

Ces mesures d'activité ont été réalisées dans le laboratoire d'écophysologie de la photosynthèse au CEA de Cadarache en collaboration avec le Dr Laurent Cournac. La méthode a été publiée par Jouanneau *et al.*, (1980). La réaction d'échange proton/deutérium est suivie à 37°C, sous agitation dans une phase aqueuse dégazée à l'argon puis au deutérium. La phase aqueuse de 1,5 ml est composée de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7, et 1 mM de dithionite de sodium. La réaction d'échange est initiée par l'addition de l'enzyme. Les évolutions des concentrations en D₂ et en HD sont suivies en ligne par spectrométrie de masse. Les activités d'échange sont ensuite calculées à partir de ces évolutions.

4.6.5. Activité de conversion para-H₂/ ortho-H₂

Ces mesures d'activité ont aussi été réalisées en collaboration avec le Dr Laurent Cournac. La méthode a été publiée par Berlier *et al.*, (1990). Les activités de conversion para-H₂/ortho-H₂ sont mesurées à 25°C, dans des fioles anaérobies de 15 ml, dégazées à l'argon, et agitées. Elles contiennent 5 ml de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7, 2 mM de dithionite de sodium, et 10 ml de phase gaz dans laquelle ont été injectés 2 ml d'hydrogène fraîchement enrichi en para (50/50 para/ortho). La réaction commence par l'ajout de l'enzyme. Des aliquots de phase gazeuse sont prélevés au cours du temps, les isomères d'hydrogène sont séparés par chromatographie phase gaz sur une colonne d'alumine avec l'hélium comme gaz vecteur. Les isomères sont ensuite détectés par spectrométrie de masse. La diminution de la quantité de l'isomère para-H₂ vers l'équilibre est quantifiée au cours du temps. La réaction de conversion para-H₂/ortho-H₂ obéit à une équation cinétique de premier ordre. La vitesse de réaction (v_o en $\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}$) et la constante de vitesse (k_o en min^{-1}) sont exprimées selon l'équation suivante :

$$k_o = \frac{1}{t} \ln \frac{c_o - c_{eq}}{c_t - c_{eq}} \quad \text{et} \quad v_o = n_o k_o$$

c_o , c_t et c_{eq} correspondent respectivement à la concentration en para-H₂ au temps 0, au temps t , et pour H₂ normal, et n_o à la quantité de H₂ (en μmoles) dans la phase gazeuse au temps 0 (Yagi *et al.*, 1973).

4.7. Analyse en gel de polyacrylamide des protéines

4.7.1. En conditions dénaturantes

4.7.1.1. Préparation du gel SDS-PAGE

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide contenant du SDS (SDS-PAGE). Un gel d'alignement (à 4 %) précède le gel de séparation (à 12 ou 15 %).

Composition du gel d'alignement :

Mélange acrylamide/bisacrylamide, 40 % (37,5:1)	4 %
Tampon Tris-HCl, 1M (pH 6,8)	0,25 M
SDS (20 %)	0,1 %
Colorant Phenol Red (Sigma)	0,005 %
APS (10 %)	0,05 %
TEMED	0,05 %

Composition du gel de séparation :

Mélange acrylamide/bisacrylamide 40 % (37,5 :1)	12 % ou 15 %
Tampon Tris-HCl, 1,5 M (pH 8,8)	0,375 M
SDS (20 %)	0,1 %
APS (10 %)	0,05 %
TEMED	0,05 %

L'ammonium persulfate (APS) et le TEMED (N-N-N'-N'-tétraméthylènediamine) sont ajoutés juste avant de couler les gels.

4.7.1.2. Préparation des échantillons

Les échantillons mélangés au tampon de dénaturation 1x sont incubés à 100°C, pendant 20 minutes avant le dépôt sur gel. 25 µl d'échantillons protéiques sont déposés par puits. Le marqueur de taille utilisé est le marqueur (précoloré ou non) SDS-PAGE Standards Low-Range de Bio-Rad pour les gels à 12 % et précoloré Page Ruler de Fermentas pour les gels à 15 %.

Composition du tampon de dénaturation (5x) :

Tampon Tris-HCl 1M (pH 6,8)	0,0625 M
Glycérol	10 %
SDS 20 %	10 %
β-mercaptoéthanol	5 %
Bleu de bromophénol	0,05 %

4.7.1.3. Migration et coloration

La migration des gels est réalisée à 150 V, 20 - 30 mA.

Composition du tampon de migration 1x :

Tris base pH 8,3	3 g.l ⁻¹
Glycine	14,4 g.l ⁻¹
SDS	1 g.l ⁻¹ (5 ml de SDS 20 %)

Après migration le gel est coloré (2h) dans une solution de coloration au bleu de Coomassie.

Composition de la solution de coloration au bleu de Coomassie:

50 % (v/v) méthanol
10 % (v/v) acide acétique
0,25 % (w/v) Coomassie blue R250 (Bio-Rad)

La décoloration est réalisée par plusieurs lavages dans une solution de décoloration.

Composition de la solution de décoloration :

10 % acide acétique
30 % éthanol

Pour les colorations au nitrate d'argent, le kit Silver Stain Plus (Bio-Rad) a été utilisé.

4.7.2. En conditions natives

4.7.2.1. Préparation du gel de polyacrylamide

Afin de ne pas dénaturer les protéines déposées sur le gel, le SDS est exclu de ce protocole.

La manipulation des protéines de *C. acetobutylicum* nécessite de plus des conditions anaérobies strictes.

Composition du gel de séparation (7 %) :

	/~ 30 ml
H ₂ O	17,1 ml
Tris-HCl, 1,5 M (pH 8,8)	7,5 ml
Mélange acrylamide/bisacrylamide 40 % (37,5 :1)	5,25 ml
APS 10 %	150 µl
TEMED	15 µl

Composition du tampon de migration 1x :

Tris base pH 8,3	3 g.l ⁻¹
Glycine	14,4 g.l ⁻¹

Les gels, le système d'électrophorèse, et le tampon de migration sont rentrés dans l'enceinte anaérobie 24 h avant la manipulation. Une pré-migration de 2 heures à 0,02 - 0,03 A (75 V) est effectuée afin d'éliminer l'oxygène pris dans le gel.

4.7.2.2. *Préparation des échantillon*

Dans l'enceinte anaérobie le tampon de charge non dénaturant (1x au final) est ajouté aux extraits protéiques puis 25 à 40 µl du mélange sont déposés dans le gel.

Composition du tampon de charge non dénaturant 5x :

Glycérol	10 %
Tris-HCl, 1 M (pH 6,8)	0,0625 M
Bleu de bromophénol	0,05 %

Le tampon est dégazé sous un flux d'azote.

4.7.2.3. *Migration et coloration*

Après dépôt sur gel, les échantillons sont mis à migrer pendant 5 h à 0,02 - 0,03 A (75 V).

Les gels peuvent être colorés au bleu de Coomassie, comme décrit pour les gels dénaturants.

4.8. Analyse en Western-blot des protéines

Les protéines de fusion possédant l'étiquette Strep-tag peuvent être spécifiquement observées sur membrane en réalisant un Western-Blot.

Après séparation sur gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose par application d'un champ électrique. L'électrotransfert s'effectue pendant 1 heure à 100 V dans du tampon de transfert réfrigéré. Pour être visible sur membrane, le marqueur de taille déposé sur le gel polyacrylamide doit être précoloré.

Composition du tampon de transfert :

Tris Base	3 g.l ⁻¹
Glycine	14,4 g.l ⁻¹
Méthanol	20 %

Après l'électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est bloquée avec 20 ml d'une solution de BSA 3 % - PBS/Tween 0,5 % pendant 1 heure à température ambiante. Trois lavages sont

ensuite effectués pendant 5 minutes avec une solution PBS/Tween 0,1 %, puis la membrane est incubée 10 minutes dans 10 ml de solution de PBS/Tween 0,1% - avidine $2 \mu\text{g.ml}^{-1}$ pour empêcher ultérieurement les protéines biotinylées de se lier à la Strep-Tactin. Après lavage, la membrane est incubée durant 1 heure avec 10 μl de solution de Strep-Tactin conjuguée à la peroxydase (Strep-Tactin HPR) (IBA, GmbH, Göttingen, Allemagne) à la dilution 1:830. La Strep-Tactin est une protéine synthétique se liant à l'étiquette Strep-tag. Trois lavages de 5 minutes sont effectués avec une solution de PBS/Tween 0,1 %, suivis de 2 lavages de 5 minutes avec une solution de PBS.

La membrane est révélée avec une solution de révélation, contenant du 4-chloro-1-naphtol et du peroxyde d'hydrogène, qui permet de visualiser les bandes protéiques en violet-bleu.

Solution de révélation :

2 ml d'une tablette de 4-chloro-1-naphtol (Sigma) dissoute dans 10 ml de méthanol
10 ml de tampon Triéthanolamine pH 7,5
5 μl de peroxyde d'hydrogène 30 %.

CHAPITRE 3 :
RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude bibliographique rend compte de l'état des connaissances actuelles sur l'intérêt de produire du biohydrogène, les caractéristiques de la bactérie *C. acetobutylicum* et sur la diversité des hydrogénases.

Afin de mieux comprendre et d'améliorer les capacités de la bactérie *C. acetobutylicum* pour la production d'hydrogène, nous avons effectué la caractérisation des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* avec ses partenaires d'oxydo-réduction.

Par homologie de structure avec l'hydrogénase à fer de *C. pasteurianum*, les deux centres fer-soufre de surface FS4C et FS2 de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum*, sont potentiellement impliqués dans le transfert d'électrons entre les partenaires d'oxydo-réduction et le site actif de l'enzyme (Peters *et al.*, 1998). Notre objectif a été d'étudier le transfert intermoléculaire des électrons entre l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* et ses partenaires d'oxydo-réduction physiologiques : ferrédoxine et flavodoxine, et artificiel : méthyl viologène, afin de déterminer l'implication de chacun de ces centres dans le transfert intermoléculaire d'électrons.

Les résultats obtenus sont présentés et discutés dans ce troisième chapitre qui est divisé en cinq parties différentes :

- Partie 1 Le choix des cibles à muter et la construction des hydrogénases modifiées au niveau de ces centres sont détaillés.
 - Partie 2 Des problèmes d'instabilité des hydrogénases à fer native et modifiées ont été mis en évidence et le protocole de purification a été optimisé.
 - Partie 3 Les partenaires physiologiques d'oxydo-réduction de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum*, la ferrédoxine et la flavodoxine ont été exprimés et purifiés.
 - Partie 4 Un profil catalytique complet et les paramètres cinétiques des activités de consommation et de production d'hydrogène de l'hydrogénase à fer native avec différents substrats (ferrédoxine, flavodoxine, méthyl viologène) ont été déterminés.
 - Partie 5 Les activités catalytiques des hydrogénases à fer modifiées ont été analysées.
- Pour finir, une conclusion générale reprend les principaux apports scientifiques de ce travail, elle est complétée de perspectives à poursuivre.

PARTIE 1 :
SYNTHESE DES HYDROGENASES A FER
NATIVE ET MODIFIEES

1. INTRODUCTION

Afin d'étudier le transfert inter-moléculaire des électrons entre l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* et ses partenaires d'oxydo-réduction, des hydrogénases à fer modifiées ont été construites. Etant donné que la séquence en acides aminés de l'hydrogénase à fer de *C. pasteurianum* présente 71% d'identité avec celle de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* et que d'après Peters *et al.*, (1998), l'interaction de l'hydrogénase à fer de *C. pasteurianum* avec ses partenaires semblerait se produire au niveau des domaines accessoires contenant les centres fer-soufre FS4C et FS2 (Figure 38), nous nous sommes focalisés sur le rôle des centres fer-soufre des domaines accessoires de surface FS4C et FS2 de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum*.

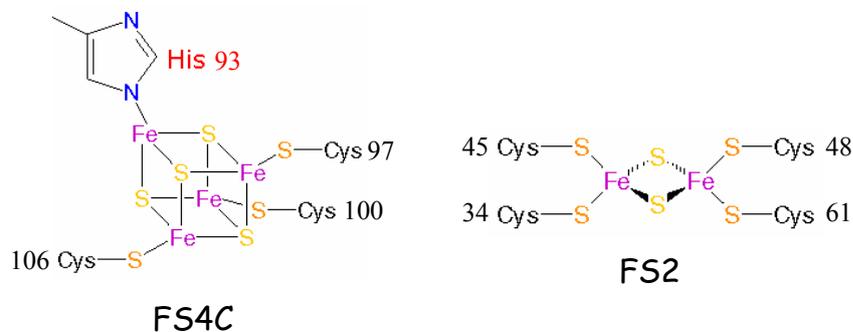


Figure 38 : Représentation des centres métalliques présents dans les domaines accessoires situés en surface de la [FeFe]-hydrogénase HydA de *C. acetobutylicum* et de leurs cystéines et histidine ligands.

Nous avons construit des mutants de ces centres fer-soufre FS4C et FS2. Les mutations ont été choisies dans le but :

- D'éviter la formation du centre FS2 : par substitution de la cystéine 48 en alanine (mutant C48A) et par délétion du domaine entier contenant le centre FS2 (mutant ΔFS2).
- D'éviter la formation du centre FS4C : par substitution de la cystéine 100 en alanine (mutant C100A)

- D'éviter la formation des deux centres FS2 et FS4C : par double substitution des cystéines 48 et 100 en alanine (mutant C48A-C100A), et par délétion de tous les domaines additionnel (centre F) et accessoires (FS2 et FS4C) de l'enzyme (mutant Δ Da). Pour ce dernier mutant, la structure est alors ramenée au modèle de structure le plus simple obtenu par exemple pour l'hydrogénase à fer de *C. reinhardtii*.
- De reconstituer un centre [4Fe-4S] typique, lié à quatre ligands cystéine : par substitution de l'histidine 93, ligand atypique du centre FS4C, en cystéine (mutant H93C). Ceci va permettre d'étudier l'impact sur le transfert d'électrons d'un ligand histidine dans un centre fer-soufre.

Après la construction de ces différentes hydrogénases modifiées, les protéines résultantes ont ensuite été exprimées, purifiées et caractérisées au niveau de leur fonction catalytique.

Un vecteur d'expression pTSH-C-Tag navette entre *E. coli* et *C. acetobutylicum* a été construit dans le passé, dans le laboratoire. Il permet l'expression de l'hydrogénase à fer native fusionnée à l'étiquette Strep-tag II en position C-terminale sous le contrôle du promoteur d'origine clostridiale de la thiolase (*PthIA*) (Girbal *et al.*, 2005).

Au début de mes travaux, les différents vecteurs pTSH-C-Tag C48A, pTSH-C-Tag C100A et pTSH-C-Tag H93C étaient déjà disponibles, ils correspondent à l'introduction de mutations dans la séquence du gène *hydA* générant respectivement les hydrogénases modifiées C48A, C100A, H93C. Ils ont été obtenus par PCR inverse et pour chacun d'entre eux un site de restriction a été introduit au niveau de la mutation (MscI pour C48A et H93C, et XhoI pour C100A).

La force du promoteur de la thiolase (*PthIA*) a été analysée et comparée à celle du promoteur naturel de l'hydrogénase (*PhyDA*) par Girbal *et al.*, en 2003, par un système de gène rapporteur utilisant le gène *gusA* codant pour une β -glucuronidase chez *E. coli*. En cultures discontinues, à pH 4,8, l'expression de la β -glucuronidase a été révélée comme étant 14 fois supérieure sous le contrôle du promoteur *PhyDA* par rapport à celle mesurée sous le contrôle du promoteur *PthIA*. Ceci démontre que le promoteur *PhyDA* est un promoteur très fort pour l'expression génétique chez *C. acetobutylicum*. Aussi, le promoteur *PthIA* a été remplacé par le promoteur *PhyDA* dans pTSH-C-Tag pour créer le vecteur pPH_{hydA}-C-Tag permettant l'expression de l'hydrogénase à fer native fusionnée à l'étiquette Strep-tag II en position C-terminale sous contrôle du promoteur *PhyDA* (Girbal *et al.*, 2005).

Concernant la présence de l'étiquette Strep-tag II, des travaux de RPE sur la [FeFe]-hydrogénase HydA native de *C. acetobutylicum* fusionnée à cette étiquette ont montré que la

présence de l'étiquette en position C-terminale n'affecte pas les propriétés électroniques du centre H de l'enzyme (Girbal *et al.*, 2005). Nous avons donc choisi de garder l'étiquette Strep-tag II en position C-terminale pour les différentes hydrogénases native et modifiées de *C. acetobutylicum*.

Au cours de mes travaux, nous avons généré les plasmides pPHhydA-C-Tag C48A, pPHhydA-C-Tag C100A et pPHhydA-C-Tag H93C afin d'exprimer les hydrogénases modifiées C48A, C100A et H93C sous le contrôle du promoteur *Phyda* (au lieu du promoteur *PthlA* dans les constructions pTSH-C-Tag C48A, pTSH-C-Tag C100A et pTSH-C-Tag H93C). Les mutations C48A-C100A, Δ FS2, Δ Da ont été introduites dans le vecteur pPHhydA-C-Tag possédant la séquence de HydA native pour générer les vecteurs d'expression des hydrogénases modifiées : pPHhydA-C-Tag C48A-C100A, pPHhydA-C-Tag Δ FS2, et pPHhydA-C-Tag Δ Da. Après la construction de ces vecteurs, les hydrogénases native et modifiées ont été exprimées dans *C. acetobutylicum*, puis purifiées afin d'effectuer leur caractérisation biochimique.

2. CONSTRUCTION DES PLASMIDES pPHhydA-C-Tag C48A, pPHhydA-C-Tag C100A ET pPHhydA-C-Tag H93C

Les constructions des plasmides pPHhydA-C-Tag C48A, pPHhydA-C-Tag C100A et pPHhydA-C-Tag H93C ont été réalisées pour provoquer la déstructuration du centre FS2, la déstructuration du centre FS4C, et la reconstruction d'un centre [4Fe4S] classique respectivement dans les hydrogénases modifiées C48A, C100A et H93C, exprimées sous le contrôle du promoteur fort *Phyda*.

La mutation présente dans le gène *hydA* des plasmides pTSH-C-Tag C48A, pTSH-C-Tag C100A et pTSH-C-Tag H93C a été transférée dans le plasmide pPHhydA-C-Tag possédant le promoteur *Phyda* par remplacement du fragment EcoRV-XmaI, pour créer les plasmides pPHhydA-C-Tag C48A, pPHhydA-C-Tag C100A et pPHhydA-C-Tag H93C.

Des digestions enzymatiques ont été effectuées pour vérifier la présence du site de restriction spécifique du promoteur *Phyda* (SnaBI) et des sites de restriction introduits au niveau des mutations : MscI (mutations C48A et H93C), et XhoI (mutation C100A).

3. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pPHhydA-C-Tag C48A-C100A

La construction du plasmide pPHhydA-C-Tag C48A-C100A est effectuée pour réaliser les déstructurations simultanées des deux centres FS2 et FS4C de l'hydrogénase à fer.

L'hydrogénase modifiée C48A-C100A a été créée par mutagenèse dirigée par PCR inverse en utilisant le plasmide pPHhydA-C-Tag C48A comme matrice. Une PCR est réalisée grâce à l'ADN polymérase Pwo en utilisant les amorces C100A-2D et C100A-2R permettant d'insérer la mutation C100A et le site de restriction XhoI (Figure 39).

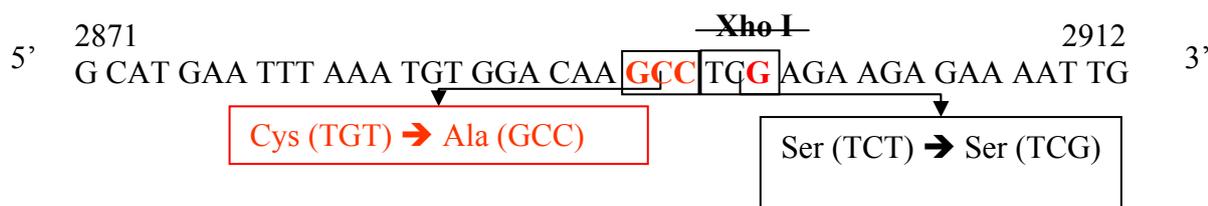


Figure 39 : Schéma de la mutation C100A introduite dans le gène *hydA* de *C. acetobutylicum* dans le vecteur pPHhydA-C-Tag C48A.

Après élimination des brins parentaux par digestion par DpnI, les cellules d'*E.coli* DH5 α ont été transformées par le produit PCR. Des mini-préparations plasmidiques ont été réalisées à partir des clones obtenus et analysées par digestions par les enzymes SnaBI-XhoI (spécifique du promoteur *PhydA* et de la mutation C100A) et ClaI-MscI (spécifique de la mutation C48A). Les profils de restriction ont permis de confirmer la présence du plasmide pPHhydA-C-Tag C48A-C100A.

4. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pPHhydA-C-Tag Δ DA

Pour éliminer complètement les deux centres FS4C et FS2 afin d'étudier plus particulièrement leur implication dans l'interaction de l'hydrogénase à fer avec ses partenaires, et revenir à une structure de protéine comparable à celle modélisée pour l'hydrogénase à fer HydA1 de *C. reinhardtii*, nous avons construit un mutant de l'hydrogénase déléetée de ses domaines additionnel (centre F) et accessoires (FS4C et FS2) : mutant Δ Da (Figure 40).

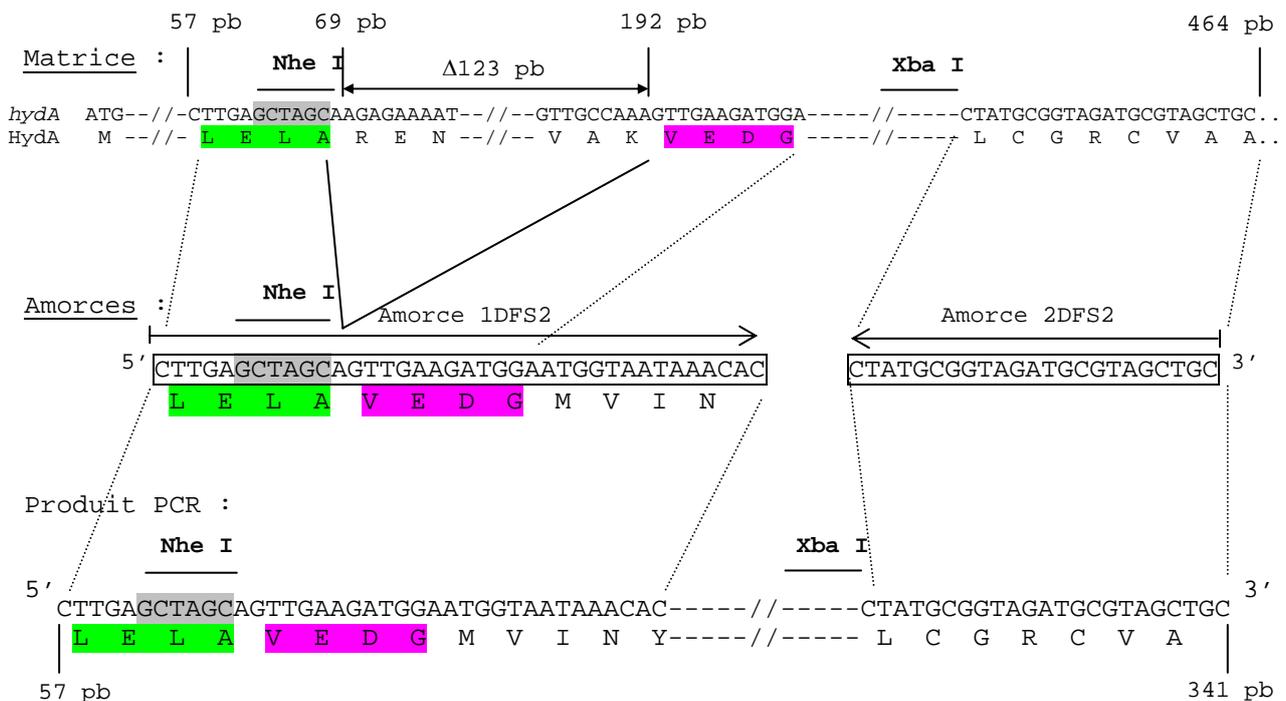
				34		45	48		
WT	1	MKTIILNGNE	VHTDKDITILELARENNVDIPTLC	FLKDCGNFGK	GV	CMVEVEGKGFRA			59
Δ Da	1	-----	-----						
Δ FS2	1	MKTIILNGNE	VHTDKDITILELA	-----					23
					FS2				

Des mini-préparations plasmidiques ont été réalisées à partir des clones obtenus et analysées par digestions par les enzymes *Sna*BI-*Xma*I (spécifique du promoteur *PhydA*) et *Msc*I-*Cla*I (spécifique de la délétion Δ Da). Les profils de restriction ont permis de confirmer la présence du plasmide pPHhydA-C-Tag Δ Da.

5. CONSTRUCTION DU PLASMIDE pPHhydA-C-Tag Δ FS2

Pour étudier plus particulièrement l'implication du domaine contenant le centre FS2 dans l'interaction de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* avec ses partenaires, et être sûrs d'éliminer complètement le centre FS2, nous avons construit un mutant de l'hydrogénase délété de ce domaine : mutant Δ FS2 (Figure 42).

La séquence nucléotidique comprise entre les positions 57 pb et 464 pb du gène *hydA* est amplifiée par PCR par l'ADN polymérase Pfu, grâce aux amorces : 1DFS2 et 2DFS2 à partir du plasmide matrice pPHhydA-C-Tag contenant le gène *hydA* natif (6808 pb). L'amorce 1DFS2 permet de déléter 123 pb (soit 41 acides aminés) correspondant au domaine FS2 et de raccorder les 69 premiers nucléotides de la séquence du gène *hydA* au début de la séquence du domaine FS4C juste en aval du site de restriction *Nhe*I. Le produit PCR obtenu est un fragment de 284 pb (Figure 42).



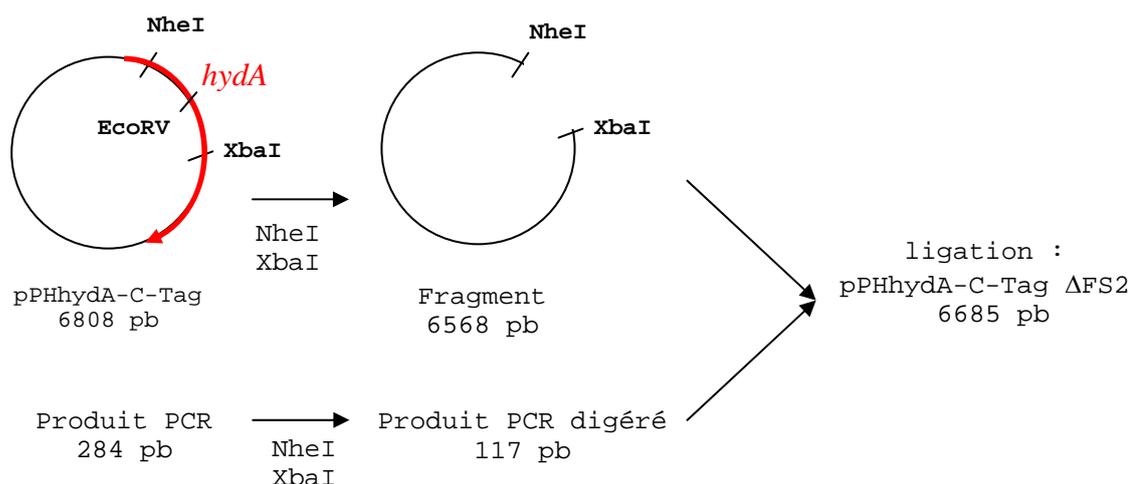


Figure 42 : Schéma de construction du plasmide pPHhydA-C-Tag ΔFS2 contenant l'hydrogénase modifiée ΔFS2 à partir du plasmide pPHhydA-C-Tag contenant le gène *hydA* natif de *C. acetobutylicum*. La délétion du domaine FS2 de 41 acides aminés correspond aux 123 pb éliminées par l'amorce 1DFS2.

Le fragment NheI-XbaI a été extrait du plasmide pPHhydA-C-Tag contenant le gène *hydA* natif (6808 pb) par digestion enzymatique. Le fragment de 6568 pb est gardé. Le produit PCR est digéré par NheI-XbaI (117 pb). Le plasmide pPHhydA-C-Tag ΔFS2 est formé par ligation du fragment de 6568 pb avec le fragment de 117 pb contenant la délétion ΔFS2.

Le plasmide pPHhydA-C-Tag ΔFS2 correspond à 6685 pb et ne contient plus le site de restriction EcoRV. Les brins parentaux sont digérés par DpnI puis par EcoRV pour les linéariser et favoriser la transformation des bactéries *E. coli* DH5α par le plasmide pPHhydA-C-Tag ΔFS2 circulaire.

Des mini-préparations plasmidiques ont été réalisées à partir des clones obtenus et analysées par digestions par les enzymes SnaBI-ClaI (spécifique du promoteur *PhydA*) et NheI-XbaI (spécifique de la délétion ΔFS2). Les profils de restriction ont permis de confirmer la présence du plasmide pPHhydA-C-Tag ΔFS2.

Toutes les mutations et délétions introduites ont été vérifiées par séquençage par la société Genome Express.

6. EXPRESSION DES HYDROGENASES MODIFIEES DANS *E. coli* PUIS DANS *C. acetobutylicum*

Le génome de *C. acetobutylicum* ATCC 824 possède une teneur en bases GC très faible : 30,9 %. Cette bactérie présente la particularité de contenir des systèmes de restriction-modification de l'ADN exogène lorsque celui-ci est riche en bases GC (comme l'ADN d'*E. coli*). Le système de restriction-modification majeur chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 est Cac824I (Lee *et al.*, 1992). L'endonucléase de restriction reconnaît la séquence 5'- GCNGC-3' et coupe l'ADN non méthylé sur la cytosine interne. Une technique de méthylation préalable des vecteurs navettes a été mise au point pour protéger l'ADN de la digestion par ce système (Mermelstein *et al.*, 1993). La méthylase du phage Φ 3T1 de *Bacillus subtilis* qui reconnaît les séquences 5'- GCNGC -3' et 5'- GGCC -3' et méthyle la cytosine interne, a été clonée dans le vecteur pAN1. Ainsi, les plasmides navettes pPHHydA-C-Tag comprenant les gènes *hydA* natif ou modifiés ont été méthylés *in vivo* dans la souche *E. coli* ER2275 contenant le plasmide pAN1.

Après extraction, concentration des plasmides méthylés, ces plasmides sont introduits dans la bactérie *C. acetobutylicum* par électro-transformation. Des mini-préparations d'ADN plasmidique de *C. acetobutylicum* ont été effectuées pour vérifier le profil correct de restriction des plasmides.

7. CONCLUSION

Les vecteurs d'expression contenant les hydrogénases à fer native et modifiées C48A, C100A, C48A-C100A, H93C, Δ FS2 et Δ Da étant construits, et méthylés dans *E. coli*, puis introduits dans *C. acetobutylicum*, les hydrogénases à fer native et modifiées sont exprimées en anaérobiose dans *C. acetobutylicum* ATCC 824 en batch de 1,5 l, en vue de leur purification et caractérisation cinétique.

En parallèle de mes recherches, lors d'études visant à rendre les hydrogénases à fer plus tolérantes à l'oxygène, Cohen *et al.*, 2005a et King *et al.*, 2006 ont eux aussi été amenés à construire une hydrogénase à fer modifiée chez *C. acetobutylicum* déletée de ses domaines additionnel et accessoires (délétion de 198 acides aminés) qu'ils ont appelé HydA Δ N. Ce mutant HydA Δ N correspond à une base près au mutant HydA Δ Da (délétion de 197 résidus) de mes travaux.

Un mutant de conversion d'un ligand histidine d'un centre fer-soufre en ligand cystéine a également été construit pour la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans* par Dementin *et al.*, 2006. Ce mutant vise, comme HydA H93C, à reconstituer un centre [4Fe-4S] typique en substituant l'histidine 184 ligand atypique par une cystéine au niveau du centre [4Fe-4S] distal de cette [NiFe]-hydrogénase.

PARTIE 2 :

OPTIMISATION DE LA METHODE DE PURIFICATION

1. INTRODUCTION

Les vecteurs d'expression navettes pPHhydA-C-Tag C48A, pPHhydA-C-Tag C100A, pPHhydA-C-Tag C48A-C100A, pPHhydA-C-Tag H93C, pPHhydA-C-Tag ΔFS2 et pPHhydA-C-Tag ΔDa contenant les hydrogénases à fer native et modifiées C48A, C100A, C48A-C100A, H93C, ΔFS2 et ΔDa ont été construits et méthylés dans *E. coli*. La bactérie anaérobie *C. acetobutylicum* ATCC 824 est ensuite transformée avec ces différents plasmides. Puis les hydrogénases à fer native et modifiées sont exprimées de façon anaérobie dans *C. acetobutylicum* en culture discontinue de 1,5 l à pH régulé à 6,3.

Les cellules sont récoltées et les hydrogénases étiquetées sont purifiées. Des mesures d'activité enzymatique sont ensuite réalisées pour chacune des hydrogénases.

La purification de la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* sous forme de protéine de fusion avec le Strep-tag a déjà été rapportée dans la littérature lors d'une expression homologue de la protéine (Girbal *et al.*, 2005) et lors d'une expression hétérologue dans *E. coli* coexprimée avec les trois protéines de maturation des [FeFe]-hydrogénases (King *et al.*, 2006). Dans les deux cas, la purification de la protéine de fusion est réalisée dans des conditions anaérobies strictes par chromatographie d'affinité Strep-tactin (IBA, Gottingen, Germany). Les activités de consommation et de production d'hydrogène rapportées dans ces deux publications, montrent une préférence de la protéine à réaliser *in vitro* la réaction de consommation de l'hydrogène, et des activités de production de l'hydrogène sont 50 fois moins élevées que les valeurs rapportées par Adams et Mortenson, 1984 pour l'hydrogénase à fer CpI de *C. pasteurianum*. Nous avons émis l'hypothèse que ces faibles valeurs d'activité de production étaient peut-être dues à une perte d'activité au cours du procédé de production, de purification, et de stockage de l'enzyme. Partant du protocole classique de production de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* recombinante en expression homologue, des

modifications aux protocoles de récolte des cellules, de purification, de stockage et de dosage ont été apportées.

2. QUALITE DES HYDROGENASES PURIFIEES AVEC LE PROTOCOLE CLASSIQUE

Les premiers résultats d'activité spécifique ont été obtenus avec les hydrogénases native et modifiées purifiées selon le protocole classique utilisé au laboratoire.

2.1. Protocole de purification classique de l'hydrogénase à fer

Toutes les manipulations de l'hydrogénase à fer sont réalisées dans l'enceinte anaérobie. Tous les tampons sont préparés de façon anaérobie, c'est-à-dire portés à ébullition et dégazés à chaud avec un flux d'azote, pendant 15 à 30 minutes, selon le volume et conservés sous atmosphère d'azote. Les réactifs en poudre sont dissous dans le tampon adéquat dans la hotte anaérobie. Toujours dans la hotte, la dithionite à 2 mM est rajoutée dans tous les tampons et réactifs à partir d'une solution à 200 mM préparée le jour même dans de l'eau bouillie et dégazée.

Les cellules de *C. acetobutylicum* sont récoltées des cultures discontinues de façon anaérobie (sous azote) et concentrées 30 fois dans le tampon A, puis congelées à -20°C sous azote.

La suspension cellulaire est désintégrée par une sonde à ultrasons puis centrifugée. Les acides nucléiques sont précipités par l'addition de streptomycine sulfate. Les précipités sont éliminés par centrifugation. La préparation protéique est diluée 5 fois avec du tampon B (Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, 2 mM de dithionite). La purification s'effectue ensuite en deux étapes :

(i) une première étape de séparation grossière par chromatographie Q-sépharose (échangeuse d'anions). La protéine est éluée avec 0.3 M de NaCl puis diluée au demi avec du tampon C (Tris-HCl 200 mM, pH 8, 2 mM de dithionite).

De l'avidine y est ajoutée pour bloquer la fixation ultérieure de la biotine et des protéines biotinylées sur la matrice d'affinité. Après incubation à 4°C , l'extrait protéique est centrifugé et filtré.

(ii) La préparation est ensuite chargée sur une colonne d'affinité du Strep-tag, colonne Strep-Tactin Superflow.

La colonne est lavée, puis l'hydrogénase à fer native ou modifiée étiquetée est éluée avec ce même tampon contenant 2,5 mM de desthiobiotine. Les protéines sont stockées sous atmosphère de la hotte anaérobie, à -80°C .

2.2. Analyse des hydrogénases purifiées

Les premières purifications de l'hydrogénase à fer native et de ses mutants ont été analysées par gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie et par western-blot. Ces expériences ont révélé la présence de deux bandes parasites correspondant à des protéines étiquetées Strep-tag de 50 et 47 kDa en plus de l'hydrogénase dans les fractions d'éluion finales, comme on peut le voir sur la figure 43.

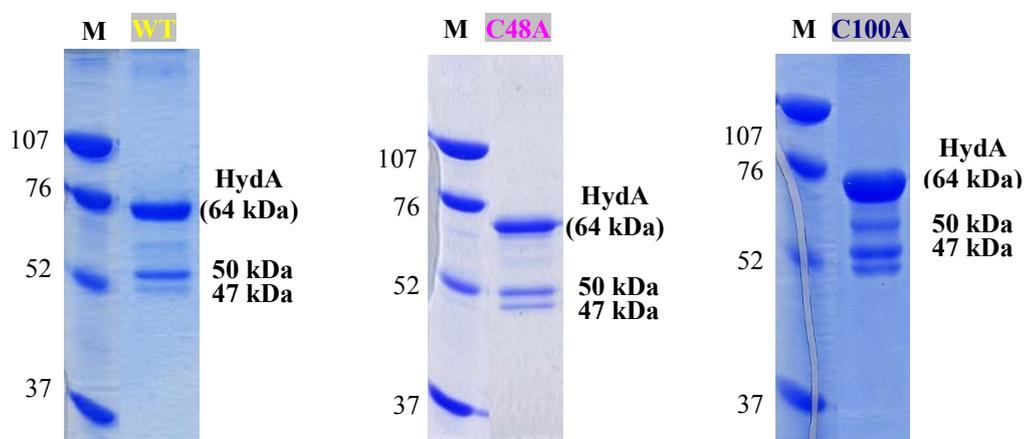


Figure 43 : Gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie des hydrogénases à fer de *C. acetobutylicum* native et modifiées C48A, C100A purifiées. Mise en évidence de deux bandes parasites majeures à 50 kDa et 47 kDa.

Ces deux bandes ont été séquencées en N-terminal.

(i) La première bande de 50 kDa correspond à l'hydrogénase à fer tronquée à l'extrémité N-terminale. Elle serait due à une coupure protéolytique de HydA par une protéase de *C. acetobutylicum*. *C. acetobutylicum* ATCC 824 possède des autolysines capables de dégrader la paroi bactérienne et des protéases extracellulaires comme l'acidolysine. Cette acidolysine est une métalloprotéase contenant du zinc et du calcium, très sensible aux agents chélatant de métaux tels que l'EDTA et au phosphoramidon (Croux *et al.*, 1990).

(ii) La deuxième bande migre à 47 kDa et correspond à l'hydrogénase à fer intacte car elle contient la séquence N-terminale de l'hydrogénase et le Strep-tag (mis en évidence par le western-blot), mais elle peut-être partiellement dénaturée.

2.3. Activités spécifiques des hydrogénases native et modifiées

L'obtention des hydrogénases native et modifiées, purifiées sous forme active à l'aide du protocole ci-dessus en deux étapes, a permis d'initier leur caractérisation biochimique. Des premières mesures de l'activité spécifique de l'enzyme sauvage et des mutants HydA C48A, HydA C100A, HydA C48A-C100A, HydA H93C ont été réalisées dans le sens de consommation de l'hydrogène, avec le méthyl viologène comme accepteur d'électrons (Figure 44).

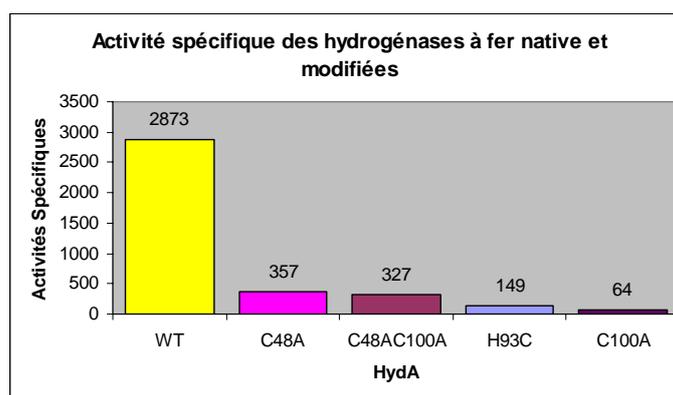


Figure 44 : Premiers résultats d'activité spécifique des hydrogénases à fer native et modifiées. Les activités spécifiques sont exprimées en µmole d'H₂.min⁻¹.mg⁻¹.

Les résultats montrent une diminution considérable de 88 % à 98 % de l'activité spécifique des hydrogénases modifiées par rapport à l'activité spécifique de l'enzyme native.

De nombreuses mesures de l'activité spécifique de l'enzyme sauvage et du mutant C48A ont été effectuées et les paramètres cinétiques Km et Vmax de ces deux enzymes ont été déterminés dans le sens de consommation de l'hydrogène, avec le méthyl viologène comme accepteur d'électrons (Tableau 9).

Tableau 9 : Activités spécifiques et paramètres cinétiques Km et Vmax mesurés pour l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* native et de son mutant HydA C48A avec le méthyl viologène dans le sens de consommation de l'hydrogène. Activités spécifiques et Vmax exprimés en µmole d'H₂.min⁻¹.mg⁻¹.

	<i>Activité spécifique</i>	<i>Vmax</i>	<i>Km (mM)</i>
WT	2299 ± 798	2000	40
C48A	261 ± 96	322 ± 235	54 ± 31

Ces nombreuses mesures ont mis en évidence des variabilités importantes des résultats obtenus pour l'hydrogénase native et l'hydrogénase modifiée C48A.

La chute importante d'activité spécifique entre l'hydrogénase à fer native et ses mutants, les variabilités des mesures obtenues et la présence d'une bande de dégradation des enzymes purifiées nous ont conduit à émettre l'hypothèse que des facteurs déstabilisants pouvaient être présents lors des étapes de récolte des cellules, de purification et de stockage des protéines, avec des effets plus marqués sur les hydrogénases modifiées.

Pour optimiser la méthode de purification, nous avons seulement utilisé les hydrogénases à fer native et modifiées C48A et Δ FS2 (ces deux dernières affectant le centre Δ FS2 par mutation ponctuelle et délétion).

2.4. Mise en évidence de l'instabilité

Des expériences de suivi de l'activité enzymatique des hydrogénases à fer native et modifiées à 4°C ont été réalisées pour suivre la stabilité des enzymes purifiées avec le protocole classique (Figure 45).

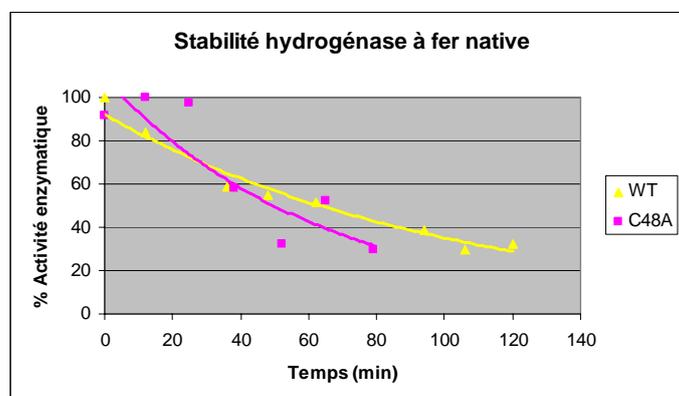


Figure 45 : Stabilité des hydrogénases à fer native et modifiée C48A, purifiées selon le protocole classique, au cours d'une série de dosage à 4°C.

Une chute de 70 % d'activité enzymatique des hydrogénases à fer native et modifiée C48A, purifiées avec le protocole classique, a été mesurée respectivement en deux heures et en 1 heure 20.

Nous avons émis l'hypothèse que le problème de stabilité des hydrogénases pouvait être dû à une oxydation des protéines lors de leur préparation avec une sensibilité accrue pour l'hydrogénase C48A.

3. MODIFICATIONS DU PROTOCOLE

3.1. Lavages des cellules

Afin d'éviter toute coupure protéolytique de l'enzyme, des traitements avec des inhibiteurs de protéases : EDTA et antiprotéases (Leupeptine, pepstatine, PMSF) ont été tentés sans succès, puisque la bande de dégradation de la protéine était toujours présente et l'activité spécifique de l'enzyme purifiée était affectée. Un traitement dénaturant au iodoacétate (ICH_2COOH) a été réalisé sur les fractions d'élution pour tenter de dénaturer totalement la protéine correspondant à la bande à 47 kDa. Ce traitement ne modifiait que l'aspect des bandes sur les gels SDS-PAGE, qui apparaissaient plus hautes et plus diffuses. Seul un lavage des cellules récoltées, a permis de diminuer le pourcentage de bandes parasites de 30 % à 15 % (quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ). Ainsi, une étape de lavage a été ajoutée lors de la récolte des cellules afin d'éliminer l'action des protéases extracellulaires de *C. acetobutylicum*.

3.2. Purification en une étape

La purification de l'enzyme est limitée à une étape : la chromatographie d'affinité du Strep-tag, dans le but de diminuer le temps de purification pour limiter le temps d'éventuelles oxydation et protéolyse de l'enzyme.

3.3. Réduction des échantillons

Nous avons augmenté et maintenu l'état de réduction des échantillons protéiques en effectuant la récolte des cellules et la purification des protéines dans des conditions de réduction encore plus strictes.

- Lors de la récolte des cellules :

La récolte des cellules après fermentation est effectuée sous un flux constant d'hydrogène. Le lavage des cellules est réalisé en présence de 10 mM de dithionite. Les cellules concentrées 30 fois sont stockées sous hydrogène.

- Lors de la purification :

Les tampons de purification sont dégazés à l'hydrogène dans la hotte anaérobie en plus de l'azote et utilisés avec 2 mM de dithionite. Les fractions d'éluion de purification sont conditionnées dans des fioles serties sous hydrogène. Du méthyl viologène à 0,02 mM final est ajouté aux tampons de purification juste avant leur utilisation pour avoir un contrôle visuel de l'état de réduction.

- Lors des dosages enzymatiques :

Des précautions sont également prises lors des dosages enzymatiques. Les échantillons protéiques restent dans les fioles serties sous atmosphère d'hydrogène pendant toute la durée du dosage, les prélèvements d'enzymes sont réalisés avec une seringue adaptée au volume de prélèvement. Le tampon du dosage (phosphate de potassium 100 mM, pH 7,2) contient 2 mM de dithiothréitol et est dégazé à l'hydrogène. Les dilutions de la protéine sont effectuées juste avant la mesure dans le tampon tout juste dégazé. Le tableau 10 permet de comparer les activités enzymatiques obtenues lors d'une mesure effectuée avec un échantillon protéique pipeté dans une fiole ouverte dans la hotte anaérobie, avec un échantillon protéique prélevé à la seringue dans une fiole sertie sous hydrogène.

Tableau 10 : Comparaison des activités enzymatiques mesurées lors d'un dosage où l'enzyme est pipetée dans la fiole ouverte sous la hotte anaérobie, et lors d'un dosage où l'enzyme est prélevée avec une seringue dans une fiole sertie sous H₂.

	<i>Fiole ouverte dans la hotte (pipette)</i>	<i>Fiole sertie sous H₂ (seringue)</i>
% AE Δ FS2	76,6 \pm 0,2	93,3 \pm 4,9

En utilisant ces précautions, les activités enzymatiques de l'hydrogénase à fer modifiée Δ FS2 ont été améliorées de 17 % (Tableau 10).

4. AMELIORATION DE LA QUALITE DES HYDROGENASES PURIFIEES GRACE AU PROTOCOLE MODIFIE

4.1. Analyse de la pureté des hydrogénases

Afin de comparer le protocole classique et le protocole modifié, les fractions d'éluions des hydrogénases à fer native et modifiées ont été analysées par gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie (Figure 46). Avec le protocole classique, deux bandes parasites, liées respectivement à une dégradation et à une dénaturation partielle probable de l'enzyme, étaient observées pour chacune des hydrogénases représentant 30 % de la fraction protéique.

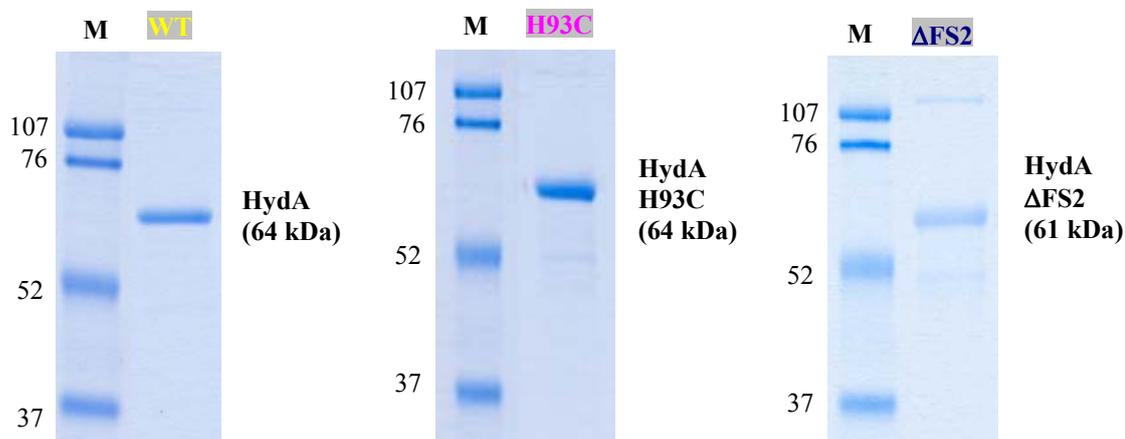


Figure 46 : Gels SDS-PAGE colorés au bleu de Coomassie des hydrogénases à fer de *C. acetobutylicum* native et modifiées H93C et Δ FS2. Mise en évidence de la disparition des deux bandes de dégradation et de dénaturation de l'enzyme à 50 kDa et 47 kDa.

Avec le protocole modifié, la figure 46 montre que les deux bandes parasites de dégradation et d'une possible dénaturation partielle ont quasiment été éliminées chez l'hydrogénase à fer native, où elles ne représentent plus que 2,5 % des protéines totales. Ce résultat prouve une réelle amélioration de la pureté de l'enzyme native par l'utilisation du protocole modifié. En revanche, les deux bandes de dégradation et de dénaturation de l'enzyme purifiée ne sont éliminées que partiellement chez les hydrogénases à fer modifiées, qui sont observées à hauteur de 6 % et 25 % respectivement pour H93C et Δ FS2.

4.2. Effet sur les paramètres cinétiques

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} obtenus entre le protocole classique et le protocole modifié comprenant un lavage des cellules récoltées, une étape de purification, et en prenant soin d'une meilleure réduction des échantillons en utilisant de l'hydrogène pendant la purification, le stockage des échantillons, et le dosage de l'activité, ont été comparés pour l'hydrogénase à fer native et son mutant Δ FS2 avec le méthyl viologène (Tableau 11).

Tableau 11 : Paramètres cinétiques Km et Vmax de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* native et de son mutant HydA Δ FS2 avec le méthyl viologène dans le sens de consommation de l'H₂ avec le protocole classique et le protocole modifié. Vmax exprimés en $\mu\text{mole d'H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

	<i>Paramètres cinétiques de l'hydrogénase à fer</i>			
	Protocole classique		Protocole modifié	
	Km (mM)	Vmax	Km (mM)	Vmax
WT	32	1 991	45,8	340 948
Δ FS2	59,6	276	36,4	20 661

Les vitesses maximales de consommation de l'H₂ en présence de méthyl viologène de l'hydrogénase à fer native et de son mutant HydA Δ FS2 sont augmentées respectivement d'un facteur de 171 et 75 grâce aux modifications apportées au protocole au niveau de la récolte des cellules, de la purification, du dosage enzymatique et du stockage des protéines sous hydrogène. Les valeurs de Km ne sont que peu modifiées.

4.3. Vérification de l'amélioration de la stabilité

Une comparaison de la stabilité de l'activité spécifique des hydrogénases à fer native et modifiées a été réalisée avant et après amélioration de la méthode de récolte-purification-dosage-stockage par :

- un suivi de l'activité spécifique à 4°C
- un suivi de l'activité spécifique de l'enzyme stockée à -80°C.

4.3.1. Stabilité à 4°C

Avant l'optimisation de la méthode, une chute de 70 % d'activité enzymatique des hydrogénases à fer native et modifiée C48A avait été mesurée respectivement en deux heures et en 1 heure 20 (Figure 45).

Après modification du protocole de récolte des cellules, de la purification et du stockage, l'activité enzymatique des hydrogénases à fer native et modifiées C48A et Δ FS2 a été suivie à 4°C sur quelques heures (durée qui correspond à la réalisation d'une série de dosages) (Figure 47) et pour l'hydrogénase à fer native au cours d'un stockage plus prolongé à 4°C sur plusieurs jours (Figure 48).

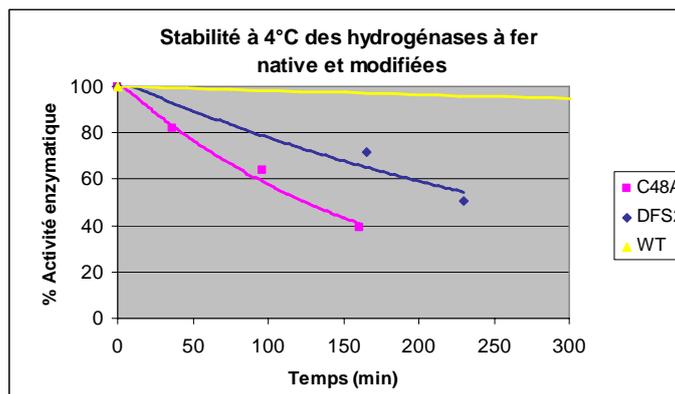


Figure 47 : Stabilité à 4°C des hydrogénases à fer native et modifiées C48A et Δ FS2 sur quelques heures avec le protocole modifié.

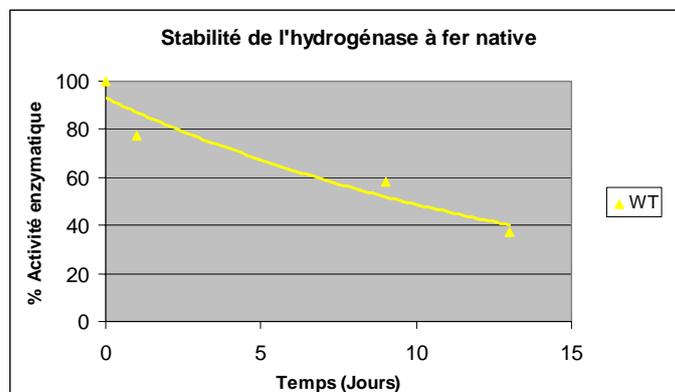


Figure 48 : Stabilité de l'hydrogénase à fer native au cours d'un stockage prolongé sur quelques jours à 4°C.

Après modification du protocole, quasiment aucune perte d'activité enzymatique de l'hydrogénase à fer native n'a été observée en 3 heures (Figure 47), et la figure 48 indique une perte de l'activité enzymatique de l'hydrogénase à fer native de seulement 20 % en 1 jour et de 60 % en 13 jours.

Les modifications apportées au protocole de purification permettent bien une meilleure stabilité de l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* à 4°C le temps de la réalisation d'une série de dosages, mais une stabilité plus partielle lors d'une incubation à 4°C prolongée. La perte d'activité enzymatique mesurée pour l'hydrogénase à fer modifiée C48A passe de 70 % en 1 heure 20 avec le protocole classique (Figure 45) à environ 60 % en 3 heures avec le protocole modifié (Figure 48).

La chute d'activité enzymatique mesurée pour l'hydrogénase à fer modifiée Δ FS2 est de 40 % en 3 heures avec le protocole modifié. Pour le mutant HydA H93C, une perte de 56 % de l'activité enzymatique a été mesurée à 4°C en 24 heures.

Les résultats obtenus montrent que l'hydrogénase à fer native a été stabilisée à 4°C grâce aux modifications du protocole pour une durée de quelques heures. Cependant les améliorations des activités enzymatiques obtenues avec les hydrogénases à fer modifiées sont beaucoup plus minimales. Ce protocole ne permet pas une stabilisation des hydrogénases à fer modifiées même sur quelques heures.

4.3.2. Stabilité à -80°C

Au début de mes travaux, avant l'optimisation du protocole, l'activité enzymatique de l'hydrogénase à fer native a été mesurée pour deux même échantillons conservés à -80°C mais décongelés à un mois d'intervalle. Une chute de 88 % de l'activité enzymatique de l'hydrogénase à fer native a été mesurée en un mois de stockage à -80°C.

Cette expérience a été effectuée après les modifications du protocole pour différentes fractions d'hydrogénase à fer native et d'hydrogénase à fer modifiée Δ FS2 (Figure 49).

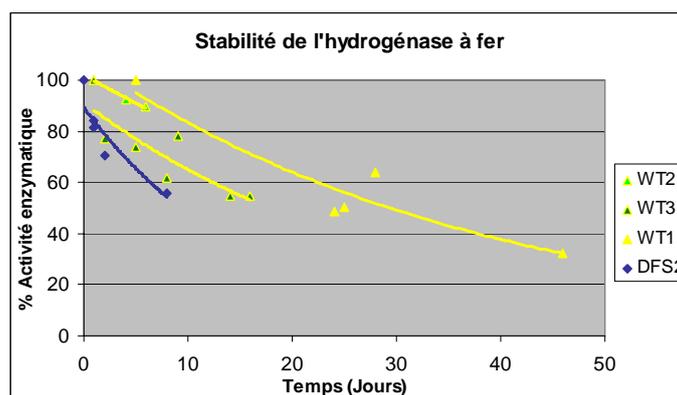


Figure 49 : Stabilité des l'hydrogénases à fer native et modifiées Δ FS2 de *C. acetobutylicum* pendant la durée de congélation à -80 °C.

Une perte de 50 % de l'activité enzymatique a été mesurée respectivement en 1 mois pour l'hydrogénase à fer native, et en 8 jours pour l'hydrogénase à fer modifiée Δ FS2 après les modifications du protocole.

Ces modifications des protocoles de récoltes des cellules, de purification, permettent bien d'améliorer la stabilité tout au long de la durée de congélation de l'hydrogénase à fer native. Malgré les pertes d'activité enzymatique occasionnées par la congélation des protéines (voir paragraphe 4.4.2. Effet de la congélation des cellules ou/et des protéines), la congélation reste le meilleur moyen de garder la protéine active au moins à 50 %, jusqu'à 1 mois pour l'hydrogénase à fer native et 8 jours pour les hydrogénases à fer modifiées, comparé à 4°C à

seulement 13 jours pour l'hydrogénase native et 2 à 3 heures pour les hydrogénases modifiées.

4.4. Protocole final

A partir du protocole modifié, d'autres essais ont été tentés pour stabiliser (ajouts d'additifs) ou éviter la perte d'activité (aucune congélation) des hydrogénases à fer native et modifiées.

4.4.1. Ajout d'additifs pour augmenter la stabilité

Différents additifs ont été testés pour tenter d'augmenter la stabilité de l'hydrogénase à fer purifiée au cours du temps. Les ajouts de sorbitol à 2 M, de saccharose à 1 M ou de NaCl à 1 M dans les fractions d'hydrogénase à fer native purifiée ont été réalisés (Figure 50).

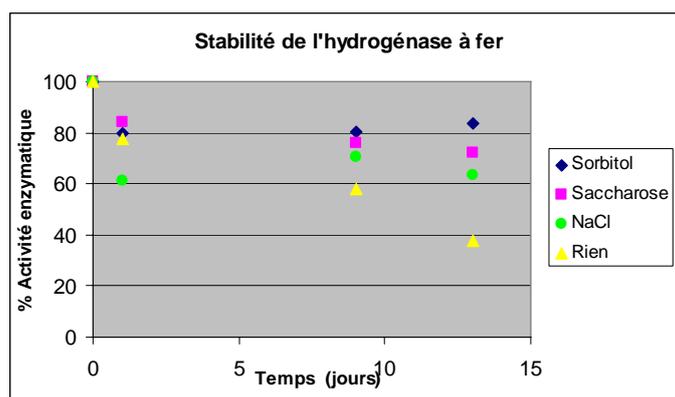


Figure 50 : Stabilité de l'hydrogénase à fer native à 4°C avec les différents additifs : sorbitol, saccharose, chlorure de sodium.

Pour l'hydrogénase à fer native en l'absence d'additif, la perte d'activité enzymatique à 4°C correspond à 20 % en 1 jour et 60 % en 13 jours. Le sorbitol est l'additif qui permet la meilleure conservation de l'activité de l'hydrogénase à fer native par rapport aux autres additifs, la perte d'activité étant stabilisée à 20 % du premier au 13^{ème} jour.

D'autres additifs ont été testés comme l'ajout de DTT à 2 mM et de BSA à 1 mg.ml⁻¹ à des fractions d'hydrogénases à fer native ou modifiée Δ FS2 purifiées (Figure 51).

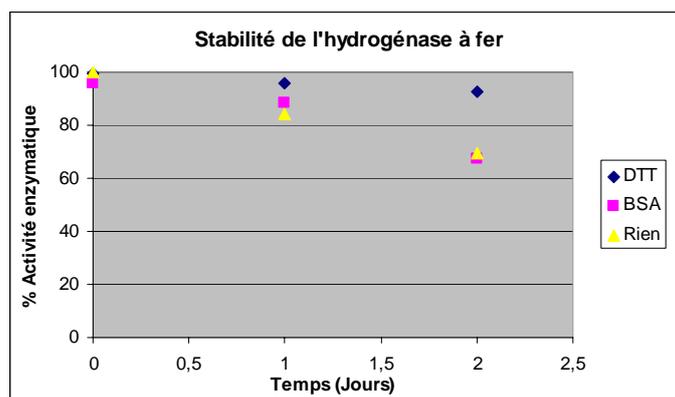


Figure 51 : Stabilité de l'hydrogénase à fer Δ FS2 à 4°C avec les différents additifs : DTT (2 mM), BSA (1mg.ml⁻¹).

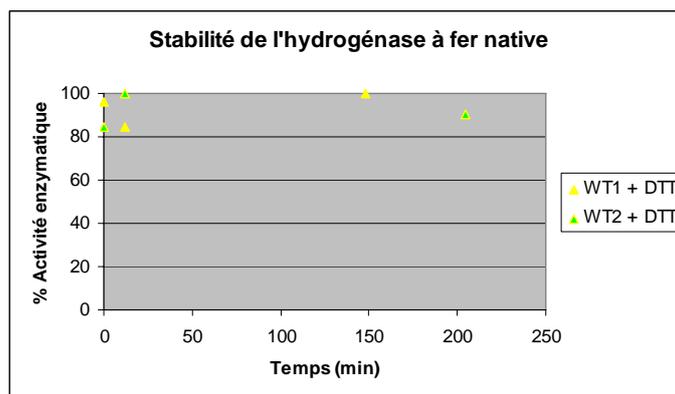


Figure 52 : Stabilité de l'hydrogénase à fer native au cours d'une série de dosage à 4°C avec 2 mM de DTT.

Les figures 51 et 52 montrent que le DTT améliore la stabilité de l'activité enzymatique des hydrogénases à fer native et Δ FS2, ceci prouve que le problème de stabilité lors du stockage provient bien d'une oxydation lente de la protéine. Le meilleur moyen de conserver l'activité de l'hydrogénase à fer est de conditionner la protéine purifiée dans une fiole sertie sous hydrogène avec du sorbitol à 2 M et du DTT à 2 mM.

Cependant, des mesures des paramètres cinétiques de l'hydrogénase à fer Δ FS2 conditionnée avec ou sans sorbitol à 2 M, ont montré que le sorbitol affectait le paramètre K_m en la divisant par deux (Tableau 12).

Tableau 12 : Paramètres cinétiques de l'hydrogénase à fer Δ FS2 avec ou sans sorbitol à 2 M avec le méthyl viologène comme accepteur d'électrons. V_{max} est exprimé en $\mu\text{mole d'H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. (les cellules et les protéines n'ont pas été congelées)

<i>Paramètres cinétiques de l'hydrogénase à fer ΔFS2</i>		
	Km (mM)	V_{max}
+ sorbitol	16,7	21 787
- sorbitol	36,4	20 661

Pour ne pas perturber l'affinité de l'enzyme pour ses substrats, nous avons choisi de conditionner les hydrogénases à fer native et modifiées dans des fioles serties sous hydrogène seulement en présence de 2 mM de DTT.

4.4.2. Effet de la congélation des cellules et/ou des protéines

Dans le protocole classique, les cellules et les protéines sont respectivement congelées à -20°C et -80°C . Au fur et à mesure des modifications du protocole, nous nous sommes aperçus que la congélation avait un effet sur l'activité spécifique des hydrogénases à fer native et modifiées de *C. acetobutylicum*.

Nous avons comparé les activités spécifiques obtenues avec ou sans congélation des cellules, (Tableau 13), et avec ou sans congélation des protéines purifiées (Tableau 14).

Tableau 13 : Effet de la congélation des cellules bactériennes sur l'activité spécifique de l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* purifiée avec le protocole modifié. Activité spécifique exprimée en $\mu\text{mole d'H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, en présence de méthyl viologène

	<i>Non congélation des cellules</i>	<i>Congélation des cellules</i>
WT	709 003	467 953

L'activité spécifique obtenue à partir de cellules bactériennes non congelées est 2 fois plus élevée que celle obtenue à partir de cellules congelées à -20°C . L'effet de la congélation des protéines purifiées à -80°C a été mesuré pour les hydrogénases native et modifiées Δ FS2 et C48A (Tableau 14).

Tableau 14 : Pourcentage de perte d'activité enzymatique due à la congélation des protéines purifiées pour les hydrogénases à fer de *C. acetobutylicum* native et modifiées Δ FS2 et C48A, à partir de cellules bactériennes non congelées.

	<i>Perte d'activité enzymatique (%) due à la congélation des protéines</i>
WT	29 ± 4,7
Δ FS2	46
C48A	79

Une congélation des fractions d'hydrogénases tout juste purifiées et aliquotées diminue de 29 % l'activité enzymatique de l'hydrogénase à fer native et de 45 % et 79 % respectivement pour les hydrogénases à fer modifiées Δ FS2 et C48A. Une recongélation /décongélation de l'hydrogénase à fer native provoque une perte de 95 % de l'activité enzymatique.

En conclusion, les activités enzymatiques des hydrogénases native et modifiées sont nettement améliorées lorsque les cellules et les protéines ne sont pas congelées.

Malgré l'amélioration flagrante de l'activité spécifique des hydrogénases native et modifiées en l'absence d'étape de congélation dans le protocole de préparation et de stockage, les activités mesurées par la suite proviennent, pour des raisons pratiques, de cellules bactériennes non congelées et d'échantillons protéiques congelés.

4.4.3. Protocole final

Les modifications du protocole classique ont été apportées au niveau de quatre points :

- le lavage des cellules récoltées pour éliminer les protéases de *C. acetobutylicum*,
- la purification en une seule étape afin de diminuer le temps de purification et les effets néfastes d'oxydation et de protéolyse,
- la réduction (H_2 et DTT) des tampons et des échantillons pour éviter toute altération oxydative de la protéine,
- l'absence d'étape de congélation des cellules bactériennes.

Le protocole final utilisé pour toutes les purifications suivantes d'hydrogénases à fer est le suivant. Toutes les modifications apportées au protocole classique sont indiquées en italique. Toutes les manipulations de l'hydrogénase à fer sont réalisées dans la hotte anaérobie. Tous

les tampons sont préparés de façon anaérobie, c'est-à-dire portés à ébullition et dégazés à chaud avec un flux d'azote, pendant 15 à 30 minutes, selon le volume et conservés sous atmosphère d'azote *puis ils sont dégazés dans la hotte sous flux hydrogène* (alors qu'ils restaient sous azote lors du protocole classique) et 2 mM de dithionite *en poudre* sont ajoutés avant utilisation (au départ, ils étaient rajoutés sous forme de solution). Du *méthyl viologène à 0,02 mM final*, qui est un indicateur coloré de l'état de réduction, est ajouté aux tampons de purification juste avant leur utilisation (aucun indicateur de l'état de réduction n'était utilisé auparavant). Les réactifs en poudre sont dissous dans le tampon adéquat dans la hotte anaérobie.

Les cellules de *C. acetobutylicum* sont récoltées après fermentation de façon anaérobie *sous flux d'hydrogène* (auparavant de l'azote) *avec 10 mM de dithionite rajoutés en poudre dans la bouteille de récolte, lavées une fois* (elles n'étaient pas lavées avant) avec du tampon A contenant *10 mM de dithionite* (à la place de 2 mM), et concentrées 30 fois dans le tampon A contenant 2 mM de dithionite, puis *utilisées directement* (pour éviter la congélation des cellules).

La suspension cellulaire est désintégrée aux ultrasons. Les acides nucléiques sont précipités par l'addition de streptomycine sulfate. Les débris cellulaires sont éliminés par *centrifugation à 13 300 rpm pendant 2 minutes* (à la place de centrifugations plus longues qui chauffaient les culots).

De l'avidine est ajoutée au surnageant et après une incubation à 4°C, l'extrait protéique est dilué 4 fois avec le tampon Tris-HCl 100 mM pH 8, 0,15 M NaCl, contenant 2 mM de dithionite et *filtré sur filtre de 5 µm*. La préparation est ensuite déposée sur la colonne Strep-Tactin Superflow. . La colonne est lavée, puis l'hydrogénase à fer étiquetée est éluée avec ce même tampon contenant 2,5 mM de desthiobiotine. Les fractions d'éluion de purification sont conditionnées dans des fioles serties *sous hydrogène avec 2 mM de DTT* (au lieu de l'atmosphère de la hotte anaérobie sans additif dans le protocole classique) et conservées à –80°C.

Lors des dosages enzymatiques dans la hotte anaérobie, les échantillons protéiques restent dans des fioles serties *sous atmosphère d'hydrogène pendant toute la durée du dosage*, les prélèvements d'enzyme sont réalisés avec *une seringue adaptée au volume de prélèvement* (auparavant, les fioles serties étaient ouvertes et l'échantillon protéique était prélevé à la pipette). Le tampon du dosage contient 2 mM de dithiothréitol et est *dégazé à l'hydrogène* (à la place de l'azote), et les réactifs du dosage sont introduits en poudre dans la hotte anaérobie et

dilués avec le tampon dégazé. Les dilutions de la protéine sont effectuées juste avant la mesure dans le tampon tout juste dégazé.

5. CONCLUSION

Seulement 150 µg de protéines sont purifiés par fermenteur (1,4L) avec un rendement de purification de 0,13 %. De nombreuses tentatives ont été menées dans le but d'augmenter le rendement de purification afin de pouvoir effectuer une analyse biophysique des mutants de l'hydrogénase. Une grande quantité de protéines n'était pas retenue sur la chromatographie de séparation Q-sépharose. Pour palier à cette perte importante de protéines, nous avons apporté quelques modifications au niveau de la Q-Sépharose. Nous avons donc tenté d'augmenter l'interaction des protéines sur la colonne Q-sépharose en ajustant le pH de 7,9 - 8 à 8,5 et 9. Les résultats n'étant pas concluant, nous avons essayé un changement de format de la colonne Q-Sépharose, de 2 ml de gel à une colonne de 30 ml pour augmenter la capacité de fixation du support. Nous avons tenté d'ajouter de la DNase dans le surnageant protéique pour éliminer toute interférence de l'ADN dans la fixation de l'enzyme sur le support. Nous avons tenté de réaliser une purification en ajoutant une pompe aux deux colonnes de purification (Q-sépharose et Strep-tactin). Puis nous avons éliminé l'étape de purification sur colonne Q-Sépharose, en passant le surnageant cellulaire d'une culture de 1,4L directement sur la colonne de Strep-tactin à l'aide d'une pompe. Cependant toutes ces modifications n'ont pas amélioré le rendement de purification des hydrogénases. Les analyses biophysiques des hydrogénases native et modifiées, nécessitant une quantité importante de protéines (de l'ordre de 1 mg) sont donc difficilement réalisables.

Dans notre laboratoire, nous ne disposons pas du matériel nécessaire pour effectuer la récolte d'une fermentation en gros volume (45L et plus) et la mise en place du protocole de purification à grande échelle en totale anaérobiose. Ce changement d'échelle nous permettrait d'obtenir une quantité d'enzyme suffisante pour réaliser les analyses biophysiques, mais l'activité de l'hydrogénase pourrait être affectée par la présence de traces d'oxygène. C'est pourquoi, nous avons privilégié la qualité de la protéine à sa quantité.

Grâce aux modifications apportées aux protocoles de récolte des cellules, de purification, et de stockage des protéines, la pureté des hydrogénases et la stabilité des activités enzymatiques ont bien été améliorées et les vitesses maximales et les activités spécifiques des hydrogénases

à fer native et modifiées ont été augmentées. La stabilisation est clairement visible pour l'hydrogénase à fer native alors qu'elle n'est que minime pour les hydrogénases à fer modifiées. Il semblerait que les mutations introduites dans la protéine puissent induire un changement de conformation globale de la protéine affectant l'activité du site catalytique de l'enzyme et/ou que les hydrogénases modifiées présenteraient une hyper-sensibilité à l'oxygène augmentant leur instabilité. Une étude de stabilité de l'hydrogénase à fer de *D. vulgaris* Hildenborough réversiblement inactivée par l'oxygène menée par Van Dijk *et al.*, 1983, a montré, qu'après réduction, l'enzyme oxydée dans son état stable à l'oxygène est convertie en enzyme réduite dans un état sensible à l'oxygène, et suggère que cette réduction est probablement associée à un changement conformationnel de l'enzyme au niveau d'un ou des centres fer-soufre de l'enzyme avec un ou des centres irréversiblement réduits.

Pour la suite de mes travaux, le protocole final a été utilisé pour la purification de toutes les hydrogénases à fer native et modifiées, dans le but de réaliser leurs caractérisations catalytique et cinétique.

PARTIE 3 :
**PURIFICATION DES PARTENAIRES D'OXYDO-
REDUCTION : FERREDOXINE ET FLAVODOXINE**
DE *C. acetobutylicum*

1. INTRODUCTION

Afin d'étudier l'implication des centres fer-soufre dans l'interaction de l'hydrogénase avec ses partenaires d'oxydo-réduction, nous devons mesurer les activités enzymatiques des différentes hydrogénases native et modifiées avec différents partenaires d'oxydo-réduction de l'enzyme. Le partenaire d'oxydo-réduction le plus utilisé dans la littérature est artificiel, il s'agit de la molécule de méthyl viologène. Cette molécule étant petite, elle pourrait se frayer un chemin dans la protéine pour ensuite échanger ses électrons directement avec le centre H enfoui dans la protéine sans faire intervenir les domaines additionnel et accessoires. Ce substrat n'est donc peut-être pas le plus adéquat pour étudier l'implication des centres fer-soufre de surface dans le transfert d'électrons. Les deux partenaires de transfert d'électrons physiologiques de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* sont la ferrédoxine et la flavodoxine. Chez les clostridies, pendant une culture en condition de carence en fer, la ferrédoxine est substituée *in vivo* par la flavodoxine dans de nombreuses réactions d'oxydo-réduction (Knight et Hardy, 1966 ; Ragsdale et Ljungdahl, 1984). Ceci a été confirmé *in vitro* avec l'hydrogénase à fer de *C. pasteurianum* par Chen et Blanchard, en 1979, et Fitzgerald *et al.*, en 1980. Ces deux protéines de 6 et 16 kDa ne doivent en théorie pas pouvoir interagir directement avec le centre H, mais plutôt transférer leurs électrons via les centres fer-soufre de surface. Les ferrédoxine et flavodoxine endogènes de *C. acetobutylicum* ATCC 824 n'ont à ce jour, pas été caractérisées. Les ferrédoxines [2Fe-2S], 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum* (Meyer, 2001), et la polyferrédoxine (CAC2657) de *C. acetobutylicum* (Kutty et Bennett, 2007), et les flavodoxines de *C. pasteurianum* (Knight et Hardy, 1966 ; Knight *et al.*, 1966), *C. beijerinckii* (Burnett *et al.*, 1974 ; Bradley et Swenson, 1999), *D. desulfuricans* (Muralidhara *et al.*, 2005 ; Muralidhara et Wittung-Stafshede, 2005), *M. elsdenii* (Geoghegan *et al.*, 2000) et de *D. vulgaris* (Walsh *et al.*, 1998) ont, elles, été caractérisées.

Cependant, le séquençage du génome de *C. acetobutylicum* ATCC 824 a permis de savoir qu'il existe cinq ferrédoxines putatives et quatre flavodoxines putatives chez *C. acetobutylicum* (Nolling *et al.*, 2001).

Dans cette partie, les approches utilisées pour la purification des ferrédoxine et flavodoxine de *C. acetobutylicum* sont détaillées. Ces ferrédoxine et flavodoxine purifiées seront ainsi disponibles pour être utilisées ultérieurement comme partenaires d'oxydo-réduction dans les dosages d'activités avec les hydrogénases à fer native et modifiées.

2. FERREDOXINE DE *C. acetobutylicum*

2.1. Choix de l'approche de purification

La surexpression hétérologue des ferrédoxines 2[4Fe-4S] d'origine clostridiale chez *E. coli* permet de produire une quantité importante de ferrédoxine dépourvue de ses centres fer-soufre. Des approches de surexpression des ferrédoxines 2[4Fe-4S] sous le contrôle d'un promoteur T7 ont été réalisées. Armengaud et Jouanneau (1995), montrent pour la ferrédoxine de *Rhodobacter capsulatus*, que la protéine soluble est alors exprimée en abondance, allant jusqu'à plus de 20 % des protéines totales, mais principalement sous forme d'apo-ferrédoxine. Le processus de synthèse et d'insertion des centres fer-soufre apparaît être une étape limitante au cours d'une surproduction de la ferrédoxine chez *E. coli*. La surproduction de la ferrédoxine 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum* chez *E. coli* sous le contrôle d'un promoteur T7, a échoué à cause de l'instabilité de la protéine recombinante, le temps de demi-vie de cette ferrédoxine de *C. pasteurianum* chez *E. coli* a été rapporté ne pas excéder 5 min (Moulis *et al.*, 1994). Pour synthétiser de l'holo-ferrédoxine, une étape *in vitro* de dénaturation de la protéine et reconstitution de ses centres fer-soufre par ajout de FeCl₃ et Na₂S en anaérobiose, est effectuée en présence de fortes concentrations d'agents chaotropiques (Armengaud *et al.*, 1995). Cette expérience de reconstitution étant assez lourde et délicate, nous avons choisi de purifier les ferrédoxines endogènes de *C. acetobutylicum* exprimées naturellement lors d'une culture discontinue de *C. acetobutylicum* régulée à 4,8.

Les ferrédoxines fonctionnelles (acceptrices d'électrons de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum*), endogènes à *C. acetobutylicum* sont ensuite purifiées de façon anaérobie par approche de purification classique.

2.2. Purification de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*

Le protocole de purification de la ferrédoxine a été adapté de la publication de Moulis et Meyer, (1982). Il est détaillé dans le matériel et méthode (4.5. Purification de la protéine ferrédoxine). Une dénaturation thermique suivie d'une chromatographie échangeuse d'anions (DEAE-cellulose) sont effectuées, puis une filtration sur gel (Hiprep Sephacryl S-100HR) est réalisée. La présence de protéines acceptrices d'électrons de l'hydrogénase dans la fraction non retenue de la chromatographie échangeuse d'anions a été vérifiée par test enzymatique avec l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* purifiée. Aucune activité significative n'a été décelée, la fraction non retenue ne contient donc pas de ferrédoxines en quantité significative. A la fin de la purification les fractions d'élution brunes sont mélangées. La préparation résultante a une concentration en protéines de $560 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ et présente un ratio $\text{Abs}_{390}/\text{Abs}_{280}$ de 0,86.

2.3. Analyse de la fraction purifiée

Un échantillon de cette préparation brune ayant un ratio $\text{Abs}_{390}/\text{Abs}_{280}$ de 0,86 a été déposé sur un gel SDS-PAGE 15% coloré au nitrate d'argent pour vérifier la pureté protéique. L'échantillon protéique est dénaturé en présence ou non de 20 mM de DTT, 10 min à 100°C. Après traitement avec du DTT, la préparation protéique entre mieux dans le gel, car probablement mieux dénaturée. Cela permet de montrer que cette préparation contient une protéine apparemment pure de petite taille (Figure 53).

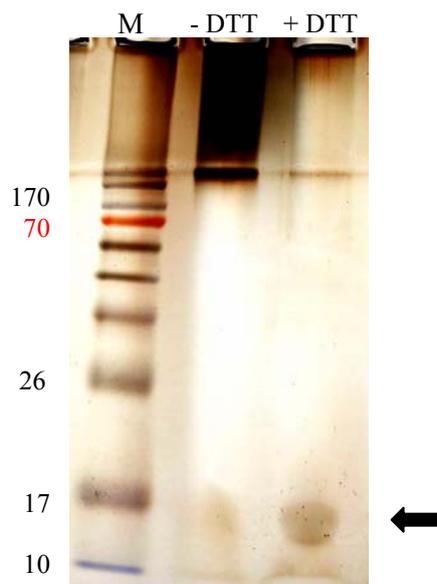


Figure 53 : Gel SDS-PAGE 15% coloré au nitrate d'argent de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*. Echantillon avec ou sans traitement au DTT ; M : Marqueur de taille en kDa.

Des microséquençages N-terminaux d'échantillons de deux préparations indépendantes ayant un ratio Abs_{390}/Abs_{280} de 0,86 ont été réalisés par « La plate-forme d'analyse et de microséquençage des protéines » de l'Institut Pasteur, à Paris. Les séquences obtenues sont les mêmes : AYKIT (la méthionine N-terminale étant absente). Cette séquence correspond à une protéine de 56 acides aminés codée par l'ORF CAC0303 du génome de *C. acetobutylicum* (Nölling *et al.*, 2001). Cette séquence en acides aminés possède 87 % d'identité avec la ferrédoxine 1CLF de *C. pasteurianum* (Graves *et al.*, 1985).

Ce résultat montre que l'ORF CAC0303 code pour la ferrédoxine fonctionnelle endogène majoritairement exprimée en solvantogenèse lors d'une culture discontinue de *C. acetobutylicum* régulée à pH 4,8.

Tomas *et al.*, 2003 ont démontré lors d'une analyse transcriptionnelle par puces à ADN, que l'expression de l'ORF CAC0303 est contrôlée positivement par le régulateur Spo0A et est réalisée pendant la phase stationnaire de croissance d'une culture de *C. acetobutylicum*. L'analyse du promoteur de CAC0303 a effectivement révélé une séquence putative de reconnaissance de Spo0A (TATCGAA) et la présence de séries de A en phase (en amont et dans la région promotrice). Il a été suggéré que les séries de A en phase pouvaient être impliquées dans la stimulation de l'activité du promoteur de la ferrédoxine de *C. pasteurianum* et de la ferrédoxine putative de *C. perfringens* (Kaji *et al.*, 2003).

Le génome de la bactérie *C. acetobutylicum* contient quatre ORFs annotées comme étant des ferrédoxines putatives (autres que l'ORF CAC0303) : CAC0075, CAC0105, CAC3527 et CAC3621 (Nölling *et al.*, 2001). Un alignement des séquences en acides aminés des ferrédoxines putatives de *C. acetobutylicum* ATCC 824 déduites de ces ORFs, avec celle de l'ORF CAC0303 et celles des ferrédoxines 2[4Fe-4S] caractérisées de *C. pasteurianum* et de *C. beijerinckii* est réalisé ci-dessous (Figure 54).

Cet alignement met en évidence que deux motifs de fixation de centre [4Fe-4S] hautement conservés chez les ferrédoxines 2[4Fe-4S] sont bien présents dans la séquence de la CAC0303, que nous avons identifiée comme la ferrédoxine majoritaire fonctionnelle chez *C. acetobutylicum*. Cette ferrédoxine est donc une ferrédoxine 2[4Fe-4S].

Concernant les quatre séquences de ferrédoxines putatives de *C. acetobutylicum*, nous pouvons observer que :

- Les séquences des ferrédoxines putatives CAC3621 et CAC0075 ne contiennent qu'un motif de fixation de centre [4Fe-4S] : C-X₂-C-X₂-C-X₃-C-P. Il est donc très peu probable que ces ORFs codent pour des ferrédoxines 2[4Fe-4S].

- Les séquences CAC3527 et CAC0105 contiennent un motif de fixation d'un centre [4Fe-4S] complet et un second incomplet avec une proline substituée respectivement en isoleucine et en lysine. Les travaux de Quinkal *et al.*, (1994), ont montré que pour la ferrédoxine 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum*, ces prolines conservées au sein du motif de fixation d'un centre [4Fe-4S] stabilisent fortement le site actif mais ne jouent pas un rôle essentiel dans le mécanisme de transfert d'électrons. Toutefois, dans le cas spécifique de la substitution d'une proline en lysine, pour le premier centre et non pour le second, une modification dans l'interaction ferrédoxine / hydrogénase de *C. pasteurianum* a été mise en évidence.

- Par ailleurs, les séquences putatives de ferrédoxines CAC0075 et CAC0105 possèdent une extrémité C-terminale beaucoup plus longue (en vert sur la Figure 54) que les autres ferrédoxines augmentant leur masse moléculaire respectivement à 12,8 et 11,7 kDa, alors que les ferrédoxines 2[4Fe-4S] connues de *C. pasteurianum* et *C. beijerinckii* n'ont pas cette extension et leur taille moyenne est de 5,5 kDa.

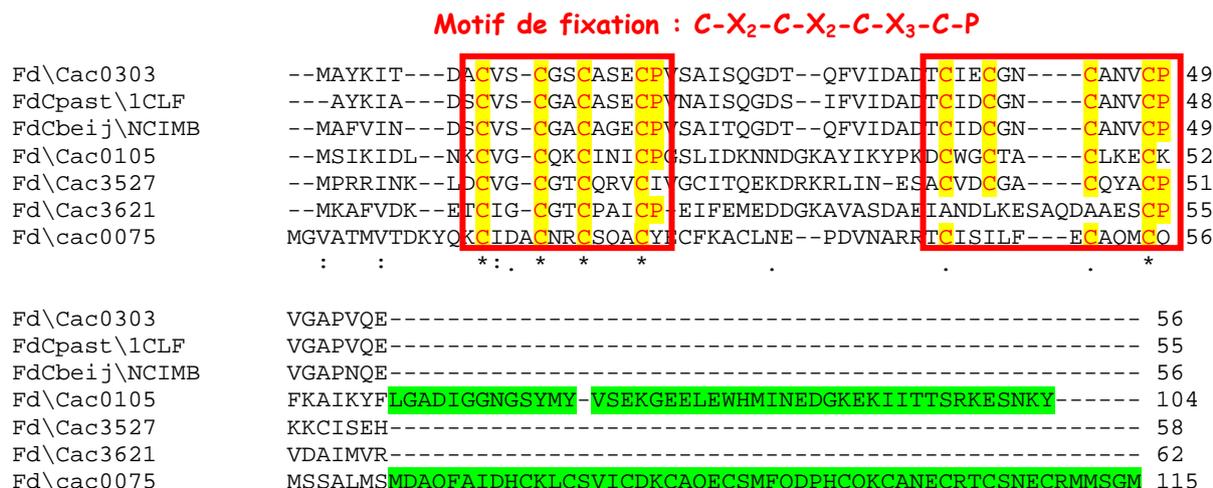


Figure 54 : Alignement des séquences en acides aminés des quatre ferrédoxines putatives CAC0105, CAC3527, CAC3621 et CAC0075 de *C. acetobutylicum*, de la ferrédoxine CAC0303 de *C. acetobutylicum*, de la ferrédoxine 1CLF de *C. pasteurianum* et de la ferrédoxine de *C. beijerinckii* (Alignement multiple de séquences réalisé grâce à CLUSTAL W (1.83)).

L’analyse de ces séquences nous permet donc de remarquer que deux séquences auraient été des séquences plausibles de ferrédoxines 2[4Fe-4S] endogènes de *C. acetobutylicum* : les séquences CAC0105, CAC3527. Une différence majeure de ces deux protéines est leur point isoélectrique théorique qui est respectivement de 8,39 et 8,60, alors que les points isoélectriques des ferrédoxines fonctionnelles, déduites de la séquence CAC0303 de *C. acetobutylicum*, de *C. pasteurianum* et *C. beijerinckii* sont respectivement de 3,62, 3,57 et 3,51. Ainsi la séquence de ferrédoxine la plus probable est bien en accord avec nos résultats qui montrent que la ferrédoxine fonctionnelle majoritaire exprimée chez *C. acetobutylicum* en batch régulé à 4,8 est la ferrédoxine correspondant à la séquence CAC0303.

Pour vérifier si la séquence CAC3527, par exemple, peut produire une ferrédoxine fonctionnelle, un travail d’expression recombinante chez *E. coli* de cette protéine sous forme de protéine fusionnée au Strep-tag II, est en train d’être réalisé en parallèle au laboratoire au cours de la thèse de O. Guerrini, en intégrant une étape de reconstitution *in vitro* des centres fer-soufre.

3. FLAVODOXINE DE *C. acetobutylicum*

3.1. Choix de la flavodoxine

Plusieurs expressions hétérologues dans *E. coli* de flavodoxines clostridiales sous forme d'holoprotéines ont déjà été rapportées dans la littérature (Eren et Swenson, 1989 ; Bradley et Swenson, 1999). Nous avons choisi de sur-exprimer une flavodoxine de *C. acetobutylicum* dans *E. coli* sous forme de protéine de fusion avec l'étiquette Strep-tag en position C-terminale.

Le génome de *C. acetobutylicum* ATCC 824 contient quatre ORFs annotées comme codant pour des flavodoxines putatives : CAC0203, CAC0587, CAC2452 et CAC3417 (Nölling *et al.*, 2001). Un alignement des séquences en acides aminés de ces quatre protéines est réalisé figure 55. Quatre critères nous ont permis de choisir d'exprimer l'ORF CAC0587 et de purifier la protéine correspondante :

- (i) La flavodoxine de *C. acetobutylicum* déduite de l'ORF CAC0587 présente le pourcentage d'identité de séquences le plus élevé avec la flavodoxine de *C. beijerinckii* (MP) (56 % comparé à 28 % pour CAC2452 et 17-18 % pour CAC0203 et CAC3417) (Tanaka *et al.*, 1974).
- (ii) Le glutamate E59 de la flavodoxine de *C. beijerinckii* (MP), qui permet une liaison hydrogène cruciale avec l'amine N(3)H du FMN (Bradley et Swenson, 1999) est conservé dans la flavodoxine CAC0587 alors qu'il ne l'est pas dans les 3 autres flavodoxines putatives.
- (iii) Le motif de fixation du phosphate Ser/Thr-X-Thr-Gly-X-Thr impliqué dans l'interaction avec le 5' phosphate du FMN, et en général très conservé dans les flavodoxines, est également présent dans la flavodoxine CAC0587 mais pas dans les autres flavodoxines putatives (Muralidhara et Wittung-Stafshede, 2005).
- (iv) Une analyse transcriptionnelle sur puces à ADN a montré que l'ORF CAC0587 était bien transcrite *in vivo* dans *C. acetobutylicum* (Tomas *et al.*, 2003) alors qu'aucune information n'était apportée sur la transcription des autres ORFs de flavodoxines putatives.

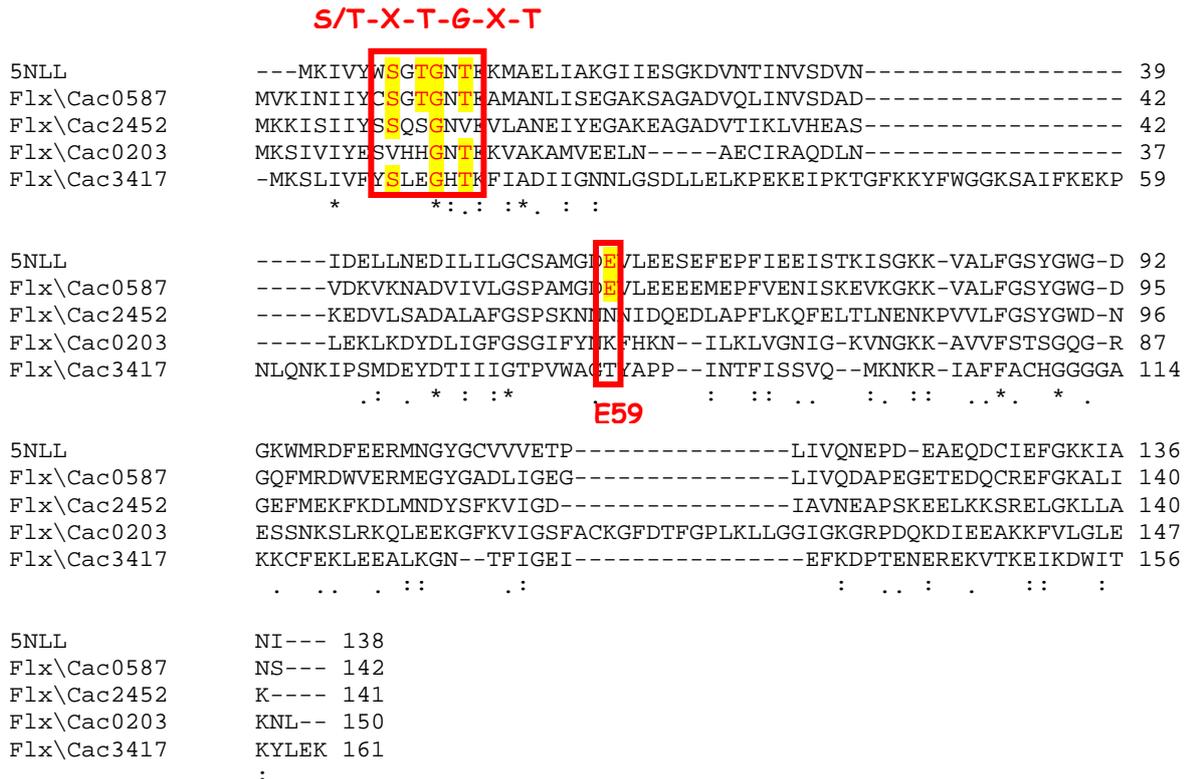


Figure 55 : Alignement des séquences en acides aminés des quatre flavodoxines putatives CAC0587, CAC2452, CAC0203, CAC3417 de *C. acetobutylicum*, et de la séquence de la flavodoxine oxydée 5NLL de *C. beijerinckii* (Alignement de séquences multiples réalisé en ligne avec CLUSTAL W (1.83)).

3.2. Construction du vecteur d'expression

Le gène CAC0587 (426 pb) a été amplifié à partir de l'ADN chromosomique de *C. acetobutylicum* ATCC 824 par PCR grâce aux amorces directe Nde1587, introduisant le site NdeI et indirecte Ecor1587 introduisant la séquence nucléotidique du Strep-tag (correspondant aux 8 acides aminés : WSHPQFEK) et le site de restriction EcoRI.

Le produit PCR (470 pb) et le vecteur d'expression commercial pET-21c (5441 pb) ont été digérés par NdeI/EcoRI, et les fragments de 456 pb provenant du produit PCR et de 5397 pb provenant du plasmide pET-21c ont été purifiés sur colonne QIAquick.

Une ligation des deux fragments à bords cohésifs a été ensuite effectuée.

Une digestion par NheI du produit de ligation a été réalisée pour linéariser les plasmides parentaux et favoriser l'introduction du plasmide pET21c-flavo587 circulaire dans les bactéries *E. coli* DH5α.

Des digestions par PstI-NheI et PstI-XbaI sur les préparations plasmidiques des transformants obtenus ont permis de confirmer la présence du plasmide pET21c-flavo587.

Pour finir, une transformation par la méthode au CaCl₂ de la souche d'expression *E. coli* BL21(DE3) contenant une polymérase T7 inductible sous le contrôle du promoteur *lac*, par une mini-préparation plasmidique de pET21c-flavo587 a été effectuée, afin d'obtenir la souche *E. coli* BL21 (DE3) (pET21c-flavo587).

3.3. Culture et purification

L'expression de la flavodoxine recombinante a été effectuée de façon aérobie avec la souche *E. coli* BL21 (DE3)(pET21c-flavo587) à 30°C, sur milieu MAC avec une induction à 20µM d'IPTG à une DO₆₀₀ égale à 0,5. Après plusieurs essais de milieux, de concentrations en IPTG et de températures, ces conditions de culture se sont avérées les plus adéquates pour l'incorporation du FMN dans la protéine.

La purification de la flavodoxine de *C. acetobutylicum* a ensuite été réalisée de manière aérobie selon le protocole type d'une protéine fusionnée avec le Strep-tag, c'est-à-dire par chromatographie d'affinité sur matrice Strep-tactin. Le protocole de purification est détaillé dans le matériel et méthode (4.2.1 Purification). La quantité de flavodoxine purifiée est de l'ordre de 500 µg, obtenue à partir de 750 ml de culture.

3.4. Analyse de la flavodoxine purifiée

Les gels SDS-PAGE et Western blot permettent respectivement de visualiser la pureté de la fraction d'élution protéique obtenue et d'identifier la flavodoxine étiquetée (Figure 56). Ainsi d'après nos gels, une seule protéine migre à 16kDa et correspond bien à la flavodoxine étiquetée avec le Strep-tag.

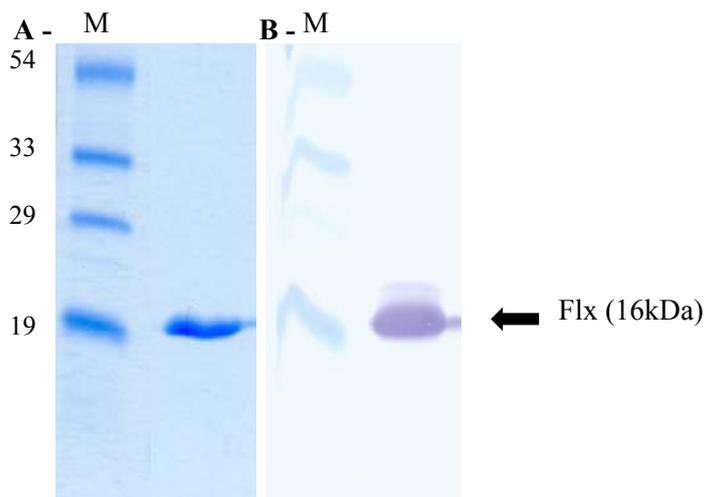


Figure 56 : Flavodoxine CAC0587 de *C. acetobutylicum* **A-** Gel SDS-PAGE 15% coloré au bleu de coomassie **B-** Western blot ; M : marqueur de taille en kDa.

Afin de quantifier le degré d'incorporation du cofacteur FMN au sein de la flavodoxine recombinante, nous avons mesuré la concentration en FMN incorporé grâce à la fluorescence du FMN (longueur d'onde d'excitation : 445 nm, longueur d'onde d'émission : 525 nm). Le FMN des holoflavodoxines est relargué par action de l'acide trichloroacétique. Le FMN ainsi libéré est quantifié par fluorescence en utilisant du FMN commercial (Sigma) (traité de la même façon) comme étalon. Le pourcentage de flavodoxine ayant incorporé du FMN peut être calculé à partir de la concentration en protéine flavodoxine et de la concentration correspondante en FMN libéré. Le pourcentage d'holoprotéine recombinante mesuré lors de notre expression hétérologue chez *E. coli* est de $56 \pm 13 \%$.

3.5. Reconstitution *in vitro* de la flavodoxine

Afin d'augmenter le pourcentage d'incorporation du FMN, une expérience de reconstitution *in vitro* de l'holoprotéine est réalisée selon le protocole de Rogers et Sykes, (1990) en mettant en contact du FMN libre (commercial Sigma) avec la préparation de protéine purifiée. La mesure par fluorescence de la quantité de FMN incorporé indique alors que $112 \pm 18 \%$ de la flavodoxine ont incorporé du FMN. Cette fraction de flavodoxine reconstituée sera utilisée ultérieurement pour effectuer les dosages enzymatiques de l'hydrogénases à fer de *C. acetobutylicum*.

4. CONCLUSION

Les deux partenaires physiologiques de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum*, la ferrédoxine et la flavodoxine, ont été produits respectivement au cours d'expressions naturelle chez *C. acetobutylicum* et hétérologue sous forme de protéine de fusion chez *E. coli*.

La purification de la ferrédoxine naturellement exprimée en solvantogénèse lors d'une culture discontinue de *C. acetobutylicum* régulée à pH 4,8, a permis de montrer que la ferrédoxine endogène majoritaire correspond à celle codée par la séquence CAC0303.

La flavodoxine CAC0587 a été purifiée via son étiquette Strep-Tag sous forme d'un mélange d'holo- et d'apo-flavodoxine. Une reconstitution *in vitro* a permis d'obtenir ~100 % d'holoprotéine.

Ces deux partenaires physiologiques purifiés sont alors disponibles pour effectuer les dosages enzymatiques avec les hydrogénases à fer native et modifiées de *C. acetobutylicum*.

PARTIE 4 :
CARACTERISATION CINETIQUE DE L'HYDROGENASE A
FER HydA NATIVE DE *C. acetobutylicum*

1. INTRODUCTION

Les activités spécifiques de consommation et de production de l'hydrogène, d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* ont été mesurées. L'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* est exprimée de façon homologue sous forme d'une protéine de fusion avec l'étiquette Strep-tag et purifiée selon le protocole final décrit précédemment. Cependant seule l'hydrogénase à fer native est stable à 4°C pour une durée correspondant à une série de dosages. C'est pourquoi seul le profil catalytique complet *in vitro* de l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* a été réalisé.

Les deux partenaires physiologiques de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* : la ferrédoxine et la flavodoxine, ont été produits respectivement au cours d'expressions homologue chez *C. acetobutylicum* et hétérologue chez *E. coli*, et purifiés. La ferrédoxine de *C. acetobutylicum* endogène fonctionnelle majeure exprimée lors d'une culture discontinue régulée à pH 4,8 est la ferrédoxine correspondant à la séquence CAC0303. La flavodoxine de *C. acetobutylicum* codée par la séquence CAC0587 a été surexprimée chez *E. coli* et ensuite reconstituée pour avoir ~100 % d'holoflavodoxine. Ces deux partenaires physiologiques étaient alors disponibles pour effectuer les dosages enzymatiques avec l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum*. Les paramètres cinétiques Km et Vmax pour l'activité de consommation et de production d'hydrogène ont été déterminés avec les différents transporteurs d'électrons : méthyl viologène, ferrédoxine et flavodoxine.

2. PROFIL CATALYTIQUE DE L'HYDROGENASE A FER NATIVE

Les activités spécifiques *in vitro* de consommation et de production de l'hydrogène ont été mesurées avec le méthyl viologène. Les activités spécifiques *in vitro* d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ de l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* ont été réalisées en collaboration avec Dr L. Cournac (CEA de Cadarache). Ces activités ont été comparées dans le tableau 15 pour l'enzyme purifiée avec le protocole classique et pour l'enzyme purifiée avec le protocole final de récolte des cellules, de purification, de stockage et de dosage des protéines.

Tableau 15 : Profil d'activités de la [FeFe]-hydrogénase native de *C. acetobutylicum* purifiée avec le protocole de purification classique et final en utilisant le méthyl viologène ^a à 20 mM comme accepteur d'électrons ^b à 1 mM comme donneur d'électrons. ^c D'après Girbal *et al.*, 2005. Activités spécifiques exprimées en $\mu\text{mole d'H}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

	<i>Consommation d'H₂^a</i>	<i>Production d'H₂^b</i>	<i>Echange H/deutérium</i>	<i>Conversion para-H₂/ortho-H₂</i>
Protocole classique	5 522 ± 789 ^c	10 ± 5 ^c	1 504 ± 96	224 ± 133
Protocole final	7,2 10 ⁵ ± 0,2 10 ⁵	162 ± 4	1 604 ± 39	340 ± 202

Grâce à toutes les précautions prises au cours du protocole de récolte des cellules, de purification, de stockage et de dosage des protéines, les activités *in vitro* de consommation et de production de l'hydrogène ont été améliorées respectivement de 130 fois et 16 fois. Seule une faible amélioration a été observée pour les activités d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂.

L'activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂ est 6 fois plus petite que l'activité d'échange proton / deutérium. Ceci est surprenant puisque l'activité d'échange proton / deutérium est un processus qui implique la réaction de clivage de l'hydrogène directement mesurée grâce à l'activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂. Ainsi l'activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂ n'est pas sensée être inférieure à l'activité d'échange proton / deutérium. La plus faible activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂ peut être due aux différences de protocoles expérimentaux de mesure de chacune des activités d'échange et de conversion :

- (i) la diffusion de l'hydrogène dans ces deux expériences est différente, l'activité de conversion fait intervenir un transfert d'hydrogène à l'interface liquide / gaz impliquant un processus de réaction biphasique, alors que l'activité d'échange ne fait intervenir qu'un processus monophasique puisque la réaction est mesurée en milieu liquide ;
- (ii) la conversion para-H₂ / ortho-H₂ est réalisée en condition non saturante en hydrogène avec une concentration en hydrogène de 165 µM, inférieure à la valeur du Km de 223 µM pour l'hydrogène rapportée pour la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* (Erbes et Burris, 1978), alors que la réaction d'échange proton / deutérium est effectuée en condition saturante avec une concentration en hydrogène de 728 µM ;
- (iii) l'échelle de temps de la mesure de ces deux activités est différente, de plusieurs heures pour la réaction de conversion contre quelques minutes pour la réaction d'échange.

La seule référence de comparaison quantitative de ces deux activités pour une [FeFe]-hydrogénase est la publication de Fauque *et al.*, (1988), où les mesures des deux activités sont toutes réalisées en phase gazeuse dans des fioles en verre. Les auteurs obtiennent un rapport de 1,07 entre l'activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂ et l'activité d'échange proton / deutérium (dans D₂O) pour la [FeFe]-hydrogénase de *D. vulgaris*. Cette valeur indique que les deux activités sont équivalentes quand elles sont mesurées dans les mêmes conditions expérimentales.

En ce qui concerne l'augmentation importante des seules activités impliquant un transfert d'électrons, aucune explication ne peut être apportée à ce jour. L'activité améliorée de production d'hydrogène, effectuée en présence de 1 mM de méthyl viologène, est 24,5 fois plus faible que celle de la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* (Adams et Mortenson, 1984), mais atteint presque les 1/5^{ème} de celles des [FeFe]-hydrogénases d'algues vertes (Florin *et al.*, 2001) (voir paragraphe 3338. Caractérisation biochimique Tableau 3 et 5).

L'activité spécifique très élevée de consommation d'hydrogène (7,2 10⁵ µmole d'H₂ .min⁻¹ .mg⁻¹), effectuée en présence de 20 mM de méthyl viologène, est 50 fois plus importante que celle de la [FeFe]-hydrogénase I de *C. pasteurianum* (Adams et Mortenson, 1984) (Tableau 3). Cette forte valeur d'activité, très inattendue, reste en accord avec la valeur de k_{cat} qui est de 3 10⁶ s⁻¹ (Tableau 16). Des expériences de contrôle de cette activité de réduction du méthyl viologène ont été réalisées avec ou sans l'enzyme, sous atmosphère d'argon à la place de l'hydrogène, et avec ou sans DTT (Tableau 16).

Tableau 16 : Activités contrôle mesurées, observées avec ou sans enzyme, sous atmosphère d'hydrogène ou d'argon, avec ou sans DTT en utilisant le méthyl viologène à 20mM comme accepteurs d'électrons. ^a La valeur de pente mesurée en absence d'enzyme est soustraite à ces valeurs.

Enzyme	MV (20mM)	DTT (20mM)	Gaz	Consommation d'H ₂ ^a	
				Valeur de la pente	Activité enzymatique pour 100µl d'enzyme en %
-	x	x	H ₂	7 10 ⁻³	
x	-	x	H ₂	1,1 10 ⁻³	0,7
x	x	-	H ₂	0,15409 ^a	102
x	x	x	H ₂	0,15166 ^a	100
x	x	x	Ag	4,3 10 ⁻³	2,8

Elles ont permis de conclure que cette valeur très élevée d'activité de réduction du méthyl viologène est dépendante de l'enzyme et de l'hydrogène à plus de 97 % et non liée à la présence de DTT. La détermination de la valeur de k_{cat} de l'enzyme avec le benzyl viologène, qui est de $2,8 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ a permis de confirmer cette forte valeur. Cette constante de vitesse qui inclut à la fois les transferts d'électrons intra-moléculaire et inter-moléculaire, reste cependant inférieure à celle de $5 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$ déterminée par Kyritsis *et al.*, en 1997, pour le transfert intra-moléculaire entre deux centres [4Fe-4S] dans le cas de plusieurs ferrédoxines, et à celle de $6 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ utilisée dans un modèle cinétique de transfert d'électrons intra-moléculaire entre les centres fer-soufre de [NiFe]-hydrogénases (Bertrand *et al.*, 2000).

Ainsi, une valeur si élevée de k_{cat} pourrait indiquer que le méthyl viologène peut interagir plus ou moins directement avec le centre H de l'hydrogénase à fer, court-circuitant alors le transfert intra-moléculaire d'électrons.

Dans la littérature, peu de données ont été rapportées sur des mesures d'activités spécifiques de consommation d'H₂ d'hydrogénases à fer de clostridies (Adams et Mortenson, 1984 ; Adams, 1990 ; Girbal *et al.*, 2005). En plus des analyses spectroscopiques traditionnelles, des rapports intéressants sont maintenant disponibles sur la voltammétrie de film de protéine appliquée à deux [FeFe]-hydrogénases : l'hydrogénase de *M. elsdenii* pour étudier le comportement catalytique de l'enzyme en fonction du pH et du potentiel (Butt *et al.*, 1997) et l'hydrogénase de *D. desulfuricans* pour étudier l'inhibition / inactivation de l'enzyme (Vincent *et al.*, 2005 ; Parkin *et al.*, 2006). En utilisant cette technique d'électrochimie, Parkin *et al.* ont estimé la vitesse d'oxydation de l'H₂ de l'hydrogénase de *D. desulfuricans* à 4000 s^{-1} à 25 °C.

L'application de la voltammétrie de film de protéine (PVF) aux [FeFe]-hydrogénases clostridiales pourraient fournir de nouvelles données sur les performances catalytiques de consommation d'H₂ et sur les cinétiques de transfert d'électrons intra-moléculaire de ces enzymes, bien que l'activité spécifique soit encore difficile à déterminer avec précision en raison d'une imprécision de la quantification de la concentration en enzyme adsorbée (Butt *et al.*, 1997 ; Pershad *et al.*, 1999).

3. DETERMINATION DES PARAMETRES CINETIQUES

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* purifiée avec le protocole final, ont été déterminés dans le sens de consommation et production de l'hydrogène, en utilisant les différents partenaires d'oxydo-réduction disponibles : les transporteurs d'électrons physiologiques ferrédoxine et flavodoxine purifiés de chez *C. acetobutylicum*, (et pour comparaison, la ferrédoxine commerciale de *C. pasteurianum*) et artificiel le méthyl viologène (Tableau 17).

Les valeurs des constantes K_m sont respectivement de l'ordre du μM et mM pour les partenaires physiologiques et artificiel, dans le sens de consommation et production de l'hydrogène, ce qui est en accord avec les valeurs rapportées pour les [FeFe]-hydrogénases clostridiales (Adams et Mortenson, 1984 ; Quinkal *et al.*, 1994 ; Girbal *et al.*, 2005) (voir Chapitre I, paragraphe 3338 Caractérisation biochimique, page 76, Tableau 4).

Cependant, comparée à la [FeFe]-hydrogénase de *C. pasteurianum*, l'enzyme de *C. acetobutylicum* a montré un K_m plus élevé pour le méthyl viologène oxydé mais plus faible pour le méthyl viologène réduit et la ferrédoxine de *C. pasteurianum* réduite. Les améliorations du protocole expérimental de purification de la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* ont permis d'augmenter les valeurs de k_{cat} pour le méthyl viologène et la ferrédoxine de *C. pasteurianum* respectivement d'un facteur 278 et 5 dans le sens de consommation d'hydrogène, et respectivement d'un facteur 40 et 3 dans le sens de production d'hydrogène ; en parallèle, les valeurs du K_m sont réduites de moitié pour le méthyl viologène oxydé et les ferrédoxines oxydée et réduites de *C. pasteurianum* (Girbal *et al.*, 2005) (Tableau 4). La vitesse maximale de production d'hydrogène la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* purifiée avec le protocole amélioré est maintenant semblable à la vitesse

maximale obtenue avec la [FeFe]-hydrogénase de *C. pasteurianum* pour la ferrédoxine (Quinkal *et al.*, 1994).

Les efficacités catalytiques de consommation et de production d'hydrogène restent très élevées de l'ordre de $4 \cdot 10^7$ à $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour tous les substrats, sauf le méthyl viologène réduit, pour lequel l'augmentation du k_{cat} ne compense pas celle du K_m . Plus précisément, quelle que soit l'activité, nos résultats montrent que les ferrédoxines de *C. acetobutylicum* et *C. pasteurianum* sont des partenaires d'électrons équivalents de la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* en termes de K_m , de k_{cat} , et même d'efficacité catalytique. Ce n'est pas de même pour la ferrédoxine et la flavodoxine de *C. acetobutylicum* : bien que des efficacités catalytiques semblables aient été calculées, des K_m et k_{cat} différents ont été mesurés. En particulier pour la production d'hydrogène, les K_m , et k_{cat} de la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* sont environ 3 fois plus élevés pour la flavodoxine de *C. acetobutylicum* que pour la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*.

Tableau 17 : Paramètres cinétiques de la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* avec différents transporteurs d'électrons (MV : méthyl viologène ; Fd *Cp* : ferrédoxine de *C. pasteurianum*; Fd *Ca* : ferrédoxine de *C. acetobutylicum*; Flx *Ca* : flavodoxine reconstituée de *C. acetobutylicum*). ^a V_{\max} est exprimé en $\mu\text{mole d'H}_2 \text{ oxydé} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour le méthyl viologène et en $\mu\text{mole de métronidazole réduit} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ pour la ferrédoxine et la flavodoxine. ^b V_{\max} est exprimé en $\mu\text{mole d'H}_2 \text{ produit} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Transporteurs d'électrons	<i>Activité de consommation d'H₂</i>				<i>Activité de production d'H₂</i>			
	K_m (M)	V_{\max}^a	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (M)	V_{\max}^b	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
MV	$59 \cdot 10^{-3}$ $\pm 22 \cdot 10^{-3}$	$2,7 \cdot 10^6$ $\pm 0,7 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^6$ $\pm 0,7 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^7 \pm 3,2 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^{-3}$ $\pm 0,7 \cdot 10^{-3}$	416 ± 149	454 ± 149	$2,9 \cdot 10^5 \pm 2,2 \cdot 10^5$
Fd <i>Cp</i>	$11 \cdot 10^{-6}$ $\pm 6 \cdot 10^{-6}$	791 ± 198	864 ± 216	$7,8 \cdot 10^7 \pm 6,3 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,6 \cdot 10^{-6}$	133 ± 63	146 ± 71	$1 \cdot 10^8 \pm 9,2 \cdot 10^7$
Fd <i>Ca</i>	$10 \cdot 10^{-6}$ $\pm 4 \cdot 10^{-6}$	826 ± 207	901 ± 225	$9,0 \cdot 10^7 \pm 5,9 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^{-6}$ $\pm 1,4 \cdot 10^{-6}$	122 ± 31	133 ± 34	$4 \cdot 10^7 \pm 2,8 \cdot 10^7$
Flx <i>Ca</i>	$0,9 \cdot 10^{-6}$ $\pm 0,4 \cdot 10^{-6}$	40 ± 10	44 ± 11	$4,6 \cdot 10^7 \pm 3,0 \cdot 10^7$	$8,8 \cdot 10^{-6}$ $\pm 3,7 \cdot 10^{-6}$	442 ± 112	483 ± 122	$5,5 \cdot 10^7 \pm 3,8 \cdot 10^7$

D'un point de vue physiologique, ces résultats indiquent qu'en condition de croissance en carence en fer, la substitution de la ferrédoxine par la flavodoxine (ses concentrations intracellulaires peuvent être estimées entre 3 et 50 μM (Knight et Hardy, 1966 ; Ragsdale et Ljungdahl, 1984)) ne serait pas une limitation pour l'activité hydrogénase *in vivo* et donc n'expliquerait pas la diminution de 40 % de la production d'hydrogène observée dans des cellules de *C. acetobutylicum* en conditions de croissance en carence en fer (Junelles *et al.*, 1987).

4. CONCLUSION

Après l'optimisation du protocole de récolte des cellules de *C. acetobutylicum*, de purification, de stockage, et de dosage des [FeFe]-hydrogénases, nous avons déterminé les caractéristiques catalytiques et cinétiques de l'enzyme native. Nous avons confirmé une préférence de l'hydrogénase à fer à catalyser *in vitro* la réaction de consommation de l'hydrogène par rapport à la réaction de production. De plus, la valeur d'activité spécifique de production obtenue avec le méthyl viologène est toujours très inférieure à celle rapportée par Adams et Mortenson, 1984, mais supérieure à celle rapportée par King *et al.*, 2006; Au vu de nos résultats, nous pouvons supposer que ces derniers auteurs ont peut-être rencontré des problèmes d'oxydation de la protéine. L'amélioration du protocole de purification a permis d'augmenter l'activité de consommation de l'hydrogénase à fer native avec le méthyl viologène d'un facteur 130. Il est surprenant d'obtenir une valeur de k_{cat} si élevée ($3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$), mais cela semble indiquer que le méthyl viologène pourrait interagir plus ou moins directement avec le centre H de l'hydrogénase à fer, en évitant le transfert intra-moléculaire des électrons.

Les paramètres cinétiques K_m et V_{max} de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* purifiée avec le protocole final, ont été déterminés dans le sens de consommation et production de l'hydrogène, en utilisant les différents partenaires d'oxydo-réduction physiologiques et artificiel disponibles : ferrédoxine et flavodoxine de *C. acetobutylicum*, et pour comparaison, la ferrédoxine commerciale de *C. pasteurianum* et le méthyl viologène. Nos résultats montrent que les ferrédoxines de *C. acetobutylicum* et *C. pasteurianum* sont des partenaires d'électrons équivalents pour la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum* en termes de K_m , de k_{cat} , et même d'efficacité catalytique. Par contre, la ferrédoxine et la flavodoxine de *C.*

acetobutylicum sont distinctes : les efficacités catalytiques sont semblables mais les K_m et k_{cat} sont différents.

Il est remarquable que les mêmes efficacités catalytiques élevées de l'ordre de $4 \cdot 10^7$ à $10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ pour les activités de consommation et de production de l'hydrogène aient été obtenues avec tous les substrats, excepté avec le méthyl viologène réduit. Ce résultat reflète le haut potentiel de cette enzyme pour les activités enzymatiques liées à l'hydrogène, potentiel conservé avec différents transporteurs d'électrons.

PARTIE 5 :
CARACTERISATION CATALYTIQUE DES MUTANTS DE
L'HYDROGENASE

1. INTRODUCTION

Précédemment, nous avons montré que les hydrogénases à fer modifiées C48A et Δ FS2 de *C. acetobutylicum* sont plus sensibles à l'oxydation que l'hydrogénase à fer native, induisant des problèmes de stabilité de ces protéines. Même l'optimisation du protocole de récolte des cellules, de purification et de stockage ne permet pas la stabilisation des enzymes modifiées, contrairement à l'hydrogénase à fer native. Ainsi, la caractérisation biochimique de l'enzyme avec différents partenaires d'oxydo-réduction n'a pas pu être réalisée avec les hydrogénases à fer modifiées de *C. acetobutylicum*.

Pour comprendre la nature de la perte d'activité des hydrogénases à fer modifiées C48A et Δ FS2, différentes mesures ont été réalisées :

- Les mesures des activités d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ ont été réalisées et comparées à celles de l'hydrogénase à fer native pour vérifier le fonctionnement du site catalytique des hydrogénases à fer modifiées.
- La quantification des atomes de fer présents dans la protéine a été réalisée pour vérifier la perte du centre FS2 des mutants C48A et Δ FS2, et confirmer la présence des 18 atomes de fer dans les hydrogénases à fer modifiées et 20 atomes de fer dans l'hydrogénase à fer native.

Dans le cas particulier de l'hydrogénase à fer H93C, nous nous sommes intéressés à l'implication du ligand atypique du centre [4Fe-4S] FS4C sur la valeur du rapport des activités de consommation et de production d'hydrogène de l'enzyme.

2. FONCTIONNALITE DU SITE CATALYTIQUE

Les activités de consommation des hydrogénases native et modifiées de *C. acetobutylicum* purifiées avec le protocole final, ont été rapportées dans le tableau 17. Une chute d'activité de 99,9 % et 99,8 % a été observée pour chacun des mutants HydA C48A et HydA Δ FS2 par rapport à l'hydrogénase native. Pour savoir si la fonctionnalité du site catalytique des mutants HydA C48A et HydA Δ FS2 est affectée ou non, les activités d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ ont été mesurées et comparées à celles de l'hydrogénase à fer native. En effet, les réactions d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ ne font pas intervenir de transfert d'électrons, elles ne font intervenir que le clivage hétérolytique de l'hydrogène et le transfert de protons au niveau du site catalytique de l'enzyme. Si le fonctionnement du site catalytique n'est pas altéré chez les hydrogénases modifiées, leurs activités spécifiques d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ sont sensées être les mêmes que celles de l'hydrogénase à fer native.

Les résultats suivants (Tableau 18) ont été obtenus juste après décongélation des enzymes et connaissant l'instabilité des hydrogénases à fer modifiées, ils ne constituent que des ordres de grandeurs des activités.

Tableau 18 : Activités d'échange proton / deutérium, et activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂ des hydrogénases à fer de *C. acetobutylicum* native et modifiées Δ FS2 et C48A purifiées avec le protocole final. Activités exprimées en μ mole de H₂ .min⁻¹.mg⁻¹. Mesures réalisées en collaboration avec Dr L. Cournac, au CEA de Cadarache.

	<i>Activité de consommation d'H₂</i>	<i>Activité d'échange H⁺/D⁺</i>	<i>Activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂</i>
WT	1 254 181	1604	340
Δ FS2	2 309	114	38
C48A	1 293	38	4,6

Les activités spécifiques d'échange proton / deutérium des hydrogénases à fer modifiées Δ FS2 et C48A montrent une perte de 92,9 % et 97,6 % respectivement par rapport à celle de l'hydrogénase native. Les activités spécifiques de conversion para-H₂ / ortho-H₂ des hydrogénases modifiées Δ FS2 et C48A montrent une perte de 88,8 % et 99,7 % respectivement par rapport à celle de l'hydrogénase native.

Le fonctionnement du site catalytique de ces deux hydrogénases modifiées Δ FS2 et C48A est donc très affecté. Ainsi, la délétion d'un domaine entier FS2 de la protéine, mais aussi une simple mutation de substitution d'un ligand de ce domaine, situées en périphérie de la protéine ont induit une perte de fonctionnalité du site catalytique de l'enzyme.

Deux hypothèses sont alors émises pour comprendre le phénomène :

- Soit le site catalytique est intègre, mais il est devenu plus accessible à des éléments extérieurs : au solvant ou à l'oxygène par exemple.
- Soit le site catalytique n'est plus intègre. Cela pourrait être dû :
 - à des changements des états électroniques des atomes de fer au niveau du site catalytique des hydrogénases modifiées.
 - à un défaut d'atomes de fer du site catalytique.

Pour vérifier l'intégrité du site catalytique, la réalisation d'expériences de résonance paramagnétique électronique des hydrogénases modifiées sous leur forme oxydée aurait été la meilleure solution. Ces expériences auraient permis de montrer si les propriétés électroniques du site actif étaient affectées ou non chez les hydrogénases à fer modifiées. Mais nous possédons trop peu de quantité d'enzyme pour mettre en oeuvre ce type d'expériences qui nécessite une quantité relativement importante de protéine pure (de l'ordre de 1 mg).

Dans l'hypothèse d'une perte d'intégrité du site actif liée à la perte (partielle ou non) du centre H du site catalytique, les atomes de fer de la protéine ont été quantifiés par ICP-AES chez les hydrogénases à fer native et modifiées de *C. acetobutylicum* (Tableau 19). Les hydrogénases à fer de *C. acetobutylicum* sont normalement pourvues de 20 atomes de fer par molécule d'hydrogénase native et de 18 atomes de fer par molécule d'hydrogénases à fer modifiées Δ FS2 et C48A. Cette mesure permet également de confirmer l'élimination du centre fer-soufre FS2 dans les hydrogénases modifiées.

Tableau 19 : Nombre d'atomes de fer quantifiés par molécule d'hydrogénases à fer native et modifiées (Δ FS2 et C48A). Mesures réalisées en collaboration avec Dr L. Cournac, au CEA de Cadarache.

	<i>Nombre d'atomes de Fer par molécule</i>
WT	20 ± 5
Δ FS2	$9,9 \pm 1,6$

C48A	8,1 ± 0,6
------	-----------

Les quantités de fer présentes dans les hydrogénases à fer modifiées sont significativement inférieures à celle obtenue pour l'hydrogénase à fer native, et sont significativement inférieures aux valeurs théoriques. Les hydrogénases à fer modifiées Δ FS2 et C48A contiennent donc moins d'atomes de fer que prévu.

Cependant, il reste à savoir si les atomes de fer manquant correspondent effectivement à ceux du site catalytique et/ou aux centres fer-soufre du reste de la protéine (centre additionnel : FS4A et FS4B, et centre accessoire : FS4C, (en supposant pour HydA C48A que le centre accessoire FS2 ne soit pas formé)). Par ailleurs, l'absence de ces atomes de fer peut résulter soit de leur non-incorporation au sein de la protéine lors de l'expression protéique soit de leur perte par oxydation de la protéine lors de sa purification.

Nous avons donc effectué une expérience d'oxydation de la protéine et mesuré la quantité de fer avant et après exposition à l'oxygène (Tableau 20).

Tableau 20 : Quantification du nombre d'atomes de fer contenus par molécule d'hydrogénase à fer native avant et après une exposition à l'oxygène.

<i>WT</i>	<i>Nombre d'atomes de Fer par molécule</i>
Avant oxydation	18
Après oxydation	20.8

Ces résultats montrent qu'une oxydation de la protéine ne provoque pas un relargage des atomes de fer des centres fer-soufre de la protéine. Ainsi, l'absence d'atomes de fer dans les hydrogénases à fer modifiées n'est pas due à une oxydation de la protéine pendant la purification, mais il s'agirait plutôt d'un défaut d'incorporation des atomes de fer lors de l'expression de la protéine.

3. ANALYSE DU MUTANT H93C

L'hydrogénase à fer modifiée H93C de *C. acetobutylicum* a été construite pour reconstruire une structure classique de centre fer-soufre lié à quatre cystéines au niveau du

centre FS4C, et observer l'implication du ligand original histidine dans le transfert d'électrons entre l'hydrogénase et le méthyl viologène.

Malgré l'optimisation du protocole de purification, comme les autres hydrogénases à fer modifiées, l'hydrogénase à fer H93C est restée très instable, une chute d'activité enzymatique de 56 % a été mesurée en 24 H à 4°C. Nous avons toutefois émis l'hypothèse que les deux activités de production et de consommation d'hydrogène étaient affectées de la même manière, et qu'une variation du rapport Activité de consommation / Activité de production entre l'hydrogénase à fer native et l'hydrogénase à fer modifiée H93C pouvait être attribuée à l'effet de la substitution de l'histidine en cystéine au niveau du centre FS4C.

Les mesures d'activités spécifiques de consommation et de production d'hydrogène des hydrogénases à fer native et modifiée H93C (Tableau 21) ont été réalisées sur des échantillons protéiques non congelés provenant de cellules congelées, (ces valeurs ne peuvent donc pas être comparées aux valeurs précédemment obtenues pour l'enzyme native dans la partie 4).

Tableau 21 : Rapport entre l'activité spécifique de consommation de l'H₂ et l'activité spécifique de production de l'H₂ des hydrogénases à fer native et modifiée H93C avec le méthyl viologène comme partenaire d'oxydo-réduction.

	<i>H93C</i>	<i>WT</i>
AS consommation / AS production	565 ± 2,5	6 410

Un rapport de 565 est obtenu entre les activités de consommation et de production d'H₂ pour le mutant H93C, comparé à un facteur de 6410 pour l'hydrogénase native. Ainsi, l'hydrogénase à fer modifiée H93C perd 11 fois moins d'activité spécifique de production d'H₂ que d'activité de consommation par rapport à l'hydrogénase à fer native, démontrant ainsi un biais en faveur de la consommation de l'hydrogène moins marqué chez l'hydrogénase modifiée H93C que chez l'hydrogénase à fer native.

Dementin *et al.*, (2006) ont étudié le transfert intra-moléculaire et inter-moléculaire des électrons des [NiFe]-hydrogénases de *D. fructosovorans* native et modifiées H184C et H184G. Les auteurs ont montré que le changement de la coordination du centre distal n'a pas d'effet sur l'assemblage du centre [4Fe4S], la stabilité de la protéine, la chimie du site actif, et

l'activation de l'hydrogène au site catalytique (activité d'échange proton / deutérium inchangée). Cependant, les vitesses maximales de consommation d'hydrogène avec le méthylviologène comme accepteur d'électrons présentent respectivement une perte de 97 % et 98,3 % pour les mutants H184G et H184C par rapport à la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans* native, alors que les activités maximales de production d'hydrogène sont diminuées respectivement de 24 % et 53 % seulement. Les auteurs démontrent ainsi le rôle essentiel du ligand histidine dans le centre distal pour le transfert inter-moléculaire des électrons qui serait l'étape limitante dans la réaction d'oxydation de l'hydrogène (sens de consommation) et non dans la réaction de production de l'hydrogène (limitée probablement par le transfert de protons).

Il semblerait donc que pour l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum*, les évolutions des activités de production et de consommation d'hydrogène générées par la mutation H93C soient semblables à celles obtenues chez la [NiFe]-hydrogénase H184C de *D. fructosovorans*. Cependant, dans notre cas, des mesures complémentaires de l'évolution de l'activité d'échange proton / deutérium sont encore nécessaires pour pouvoir trancher sur l'implication de la mutation H93C dans le seul transfert d'électrons.

4. CONCLUSION

Même après l'optimisation du protocole de purification et de stockage, les hydrogénases à fer modifiées C48A, Δ FS2 et H93C présentent une instabilité importante, c'est pourquoi nous n'avons pas pu réaliser leurs caractérisations catalytique et cinétique complètes. Cependant, grâce aux mesures d'activités d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂, nous avons pu mettre en évidence, pour les hydrogénases modifiées Δ FS2 et C48A, que la perte d'activité spécifique de consommation d'hydrogène est due à la défaillance du site catalytique de l'enzyme. La quantification des atomes de fer dans les hydrogénases à fer native et modifiées nous a permis de savoir que les protéines modifiées possèdent beaucoup moins d'atomes de fer que ce qu'on attendait. Cette déficience en fer serait due à un défaut d'incorporation du fer lors de l'expression de la protéine lors de la culture de *C. acetobutylicum*.

Les activités obtenues pour l'hydrogénase à fer modifiée H93C de *C. acetobutylicum* ont été comparées aux résultats obtenus par Dementin *et al.*, 2006 sur l'hydrogénase nickel-fer modifiée H184C de *D. fructosovorans*. Pour les deux enzymes, le changement de

coordination d'un centre distal [4Fe-4S] d'une histidine en cystéine, entraîne une perte significativement plus importante de l'activité de consommation d'hydrogène par rapport à l'activité de production d'hydrogène.

Une fois que l'instabilité de l'hydrogénase à fer modifiée H93C sera un problème résolu et que l'intégrité du site catalytique sera vérifiée par la mesure de l'activité de conversion para-H₂ / ortho-H₂, des mesures de l'activité d'échange proton / deutérium seraient nécessaires pour déterminer quel type de transfert est touché par la mutation (transfert de protons et/ou d'électrons), et peut-être confirmer le fait que le transfert inter-moléculaire des électrons est, comme chez la [NiFe]-hydrogénase de *D. fructosovorans*, l'étape limitante de la réaction de consommation de l'hydrogène chez la [FeFe]-hydrogénase de *C. acetobutylicum*.

**CONCLUSION GENERALE ET
PERSPECTIVES**

Mes travaux de thèse avaient pour but la caractérisation des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* avec ses partenaires d'oxydo-réduction. Dans un premier temps, nous avons construit des mutants de l'hydrogénase à fer affectant les centres fer-soufre de surface, FS2 et FS4C, potentiellement impliqués dans le transfert inter-moléculaire des électrons entre l'enzyme et ses partenaires d'oxydo-réduction. Trois mutations ont été réalisées dans le but d'éviter la formation des centres fer-soufre de surface : la substitution d'une cystéine ligand en alanine pour chacun des centres de surface FS2 et FS4C, respectivement : C48A et C100A et la double substitution des cystéines ligands en alanine au niveau de ces deux centres : C48A-C100A. La mutation Δ FS2 a été réalisée pour permettre de déléter le domaine entier contenant le centre fer-soufre de surface FS2. La mutation Δ Da a été effectuée pour permettre de déléter tous les domaines additionnels et accessoires afin de revenir à une structure minimale semblable à celle des hydrogénases à fer d'algues vertes. La substitution de l'histidine 93 en cystéine au niveau du centre fer-soufre de surface FS4C avait pour but de reformer un centre [4Fe4S] typique lié à quatre cystéines, afin d'étudier l'impact du ligand histidine dans le transfert d'électrons. Les vecteurs d'expression navettes pPHhydA-C-Tag contenant les gènes des hydrogénases à fer native et modifiées C48A, C100A, C48A-C100A, Δ FS2, Δ Da et H93C, sous le contrôle du promoteur fort naturel de l'hydrogénase *PhydA*, ont été construits, méthylés chez *E. coli*, puis introduits dans *C. acetobutylicum*. Les hydrogénases à fer native et modifiées étiquetées avec le Strep-tag en position C-terminale, ont ensuite été exprimées en anaérobiose chez *C. acetobutylicum* ATCC 824 en culture discontinue de 1,5 l, et purifiées.

Pour l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum*, Girbal *et al.*, 2005 et King *et al.*, 2006, rapportent des activités de production de l'hydrogène 50 fois moins élevées que les valeurs rapportées par Adams et Mortenson, en 1984 pour son homologue de *C. pasteurianum*. Nous avons émis l'hypothèse que cela était peut-être dû à une perte de cette activité au cours du procédé de production et de purification de l'enzyme. Par ailleurs, en utilisant le protocole classique pour purifier nos hydrogénases native et modifiées, nous avons été confrontés à des problèmes de reproductibilité des mesures d'activité, de présence de protéines dégradées dans les échantillons de protéines purifiées, et d'instabilité des enzymes native et modifiées. Nous avons donc modifié et optimisé le protocole de récolte des cellules, de purification, du dosage enzymatique et de stockage des protéines en effectuant un lavage des cellules récoltées pour éliminer les protéases de *C. acetobutylicum*, en purifiant la protéine seulement en une étape

afin de diminuer le temps de purification, en évitant toute altération oxydative de la protéine en augmentant la réduction des tampons et des échantillons, en l'absence d'étape de congélation des cellules bactériennes. Ce protocole final a été utilisé pour la purification de toutes les hydrogénases à fer native et modifiées. Grâce à ces modifications, une meilleure pureté des hydrogénases à fer native et modifiées (les bandes parasites ne représentent plus que 2,5 % des protéines totales pour l'hydrogénase native et 6 % et 25 % des protéines totales pour les hydrogénases à fer modifiées H93C et Δ FS2), ainsi que des vitesses maximales des activités de consommation de l'hydrogène augmentées (respectivement d'un facteur 171 et 75 pour les hydrogénases à fer native et modifiée Δ FS2), ont été observées. L'hydrogénase à fer native a nettement été stabilisée contrairement aux hydrogénases à fer modifiées, dont l'instabilité persistante est restée une limitation importante pour la réalisation de leur caractérisation catalytique.

Ainsi, seul le profil catalytique complet de l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* a pu être réalisé. L'amélioration du protocole de purification a permis d'augmenter l'activité de consommation de l'hydrogénase à fer native avec le méthyl viologène d'un facteur 130, et l'activité de production d'un facteur 16, par contre les activités d'échange proton / deutérium et de conversion para-H₂ / ortho-H₂ n'ont pas été augmentées. Nous avons confirmé une préférence *in vitro* de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* à catalyser la réaction de consommation de l'hydrogène par rapport à la réaction de production (rapport de 4444). La valeur de l'activité spécifique de production obtenue reste cependant toujours très inférieure à celle rapportée par Adams et Mortenson, 1984 pour l'hydrogénase à fer I de *C. pasteurianum*. Il est surprenant d'obtenir une valeur de k_{cat} si élevée ($3 \cdot 10^6 \text{ s}^{-1}$) en consommation de l'hydrogène. Cela semble indiquer que le méthyl viologène pourrait interagir plus ou moins directement avec le centre H de l'enzyme, en évitant le transfert intra-moléculaire des électrons.

Nous avons réalisé quelques tests préliminaires de mesure d'activité de transfert d'électrons de l'hydrogénase à fer native avec une électrode par voltammétrie de film de protéine (PVF) en collaboration avec C. Léger (BIP, Marseille). Ainsi, nous pouvons nous affranchir du transfert inter-moléculaire des électrons entre l'enzyme et un partenaire redox, puisque l'enzyme est directement adsorbée sur l'électrode. Les résultats obtenus montrent que la protéine s'adsorbe relativement bien sur l'électrode de graphite pyrolytique et forme un film stable. Cependant comme nous n'avons pas pu quantifier la concentration de protéine adsorbée, les résultats restent donc que très qualitatifs. Les voltammogrammes montrent que

la protéine est un très bon catalyseur du transfert d'électrons *in vitro* avec l'électrode et confirme une activité de consommation de l'hydrogène plus élevée que l'activité de production sans pour autant nous donner une valeur de leur rapport.

Concernant le profil catalytique des hydrogénases à fer modifiées, nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les hydrogénases modifiées au niveau du domaine contenant le centre fer-soufre de surface FS2 : C48A et Δ FS2. Une perte très importante des activités spécifiques de consommation d' H_2 des hydrogénases modifiées mesurées avec le méthyl viologène a été observée par rapport à celle de l'hydrogénase à fer native. De plus, les activités spécifiques d'échange proton / deutérium et les activités spécifiques de conversion para- H_2 / ortho- H_2 sont-elles aussi diminuées ce qui montre une perte importante de fonctionnalité de leur site actif. Pour vérifier l'intégrité du site actif des hydrogénases à fer modifiées (C48A et Δ FS2), la quantification des atomes de fer présents dans ces protéines a été réalisée. Cela nous a permis de montrer que ces protéines modifiées possèdent beaucoup moins d'atomes de fer que la quantité théorique. Cette déficience en fer serait due à un défaut d'incorporation du fer lors de l'expression de la protéine lors de la culture de *C. acetobutylicum* et non à une perte des atomes de fer liée à une oxydation de la protéine pendant la purification. Des spectres de RPE des enzymes modifiées oxydées seraient nécessaires pour montrer via les propriétés électroniques du centre H, si ces atomes de fer manquant correspondent au site actif ou non. Le défaut d'incorporation des atomes de fer dans la protéine pourrait être lié à un manque de protéines de maturation. Pour tenter d'y remédier, dans le cas où le site actif est bien intègre alors des maturases de types « Isc » pourraient être sur-exprimées en parallèle de l'hydrogénase pour incorporer les centres fer-soufre additionnel et accessoires manquant, et/ou dans le cas où le site actif n'est pas intègre alors les trois protéines de maturation du site catalytique des [FeFe]-hydrogénases HydE, HydF, HydG de *C. acetobutylicum* (King *et al.*, 2006) pourraient être sur-exprimées en parallèle.

D'autres hydrogénases à fer modifiées ont été réalisées dans le laboratoire, notamment les mutants de la cystéine C299 en alanine et en sérine, située proche du site catalytique potentiellement impliquée dans le transfert de protons. Les activités de conversion para- H_2 / ortho- H_2 de ces deux mutants se sont avérées être très inférieures à celle de l'hydrogénase à fer native. Ainsi ces données indiquent, que la position de la mutation soit périphérique ou très proche du site catalytique, et que ce soit une mutation vers une alanine ou une sérine, la mutation peut induire une altération de la fonctionnalité du site catalytique de l'enzyme.

Ainsi, le choix des mutations à effectuer est assez délicat. Dans le cas où l'incorporation partielle du fer serait liée à un changement conformationnel trop important consécutif à la délétion d'un centre fer-soufre, le choix de la nature des mutations pourrait être autre. Ainsi, il serait envisageable de remplacer deux cystéines ligands du centre fer-soufre, par des résidus stériquement plus encombrants (leucine, isoleucine, alanine), afin d'avoir un double effet : l'absence du centre fer-soufre et la cavité remplie par les chaînes latérales hydrophobes de ces acides aminés.

Les analyses biophysiques des hydrogénases (RPE et FTIR), nécessitent une quantité importante de protéines (de l'ordre de 1 mg), malheureusement, les modifications du protocole de purification n'ont pas amélioré le rendement de purification des hydrogénases, et nous avons préféré privilégier la qualité c'est-à-dire l'amélioration de l'activité enzymatique de la protéine, à la quantité de protéine purifiée. Ces expériences de caractérisation biophysique sont donc actuellement difficilement réalisables. Pour augmenter la quantité de protéine purifiée, nous pourrions exprimer la protéine à plus grande échelle chez *C. acetobutylicum*, en utilisant des équipements de fermentation, de récolte et de purification adaptés à l'anaérobiose pour cette échelle. Pour augmenter le rendement de purification, nous pourrions augmenter l'affinité de la protéine étiquetée pour son support Strep-tactin, en insérant par exemple un espaceur d'une dizaine d'acides aminés entre l'hydrogénase et le Strep-tag, ceci a été démontré fonctionnel pour l'hydrogénase à fer de *C. reinhardtii* étiquetée avec le Strep-tag (information issue de Grégory Von Abendroth, université de Bochum, Allemagne). Ainsi, nous pourrions réaliser des spectres RPE des hydrogénases à fer modifiées réduites et observer la disparition de pics liée à l'absence du centre fer-soufre de surface FS2 et peut-être ainsi attribuer les pics restants des spectres à chacun des centres fer-soufre de surface.

La mutation H93C de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* a été réalisée pour comprendre l'impact du ligand histidine original du centre fer-soufre FS4C dans le transfert d'électrons. L'instabilité de notre mutant H93C n'a permis que de donner une comparaison du rapport des activités de consommation et de production d'hydrogène entre cette hydrogénase H93C et l'hydrogénase à fer native.

L'hydrogénase à fer modifiée H93C perd 11 fois moins d'activité spécifique de production d' H_2 que d'activité de consommation par rapport à l'hydrogénase à fer native, démontrant ainsi un biais en faveur de la consommation de l'hydrogène moins marqué chez

l'hydrogénase modifiée H93C que chez l'hydrogénase à fer native. Il apparaît donc que les activités de production et de consommation d'hydrogène de l'hydrogénase à fer modifiée H93C de *C. acetobutylicum*, évoluent de manière semblable à celles obtenues chez la [NiFe]-hydrogénase H184C de *D. fructosovorans*. Cependant, pour notre hydrogénase modifiée H93C, lorsque nous aurons vérifié que l'enzyme possède un site catalytique intègre et fonctionnel, des mesures complémentaires de l'évolution de l'activité d'échange proton / deutérium seront encore nécessaires pour pouvoir trancher sur l'implication de la mutation H93C dans le seul transfert d'électrons. Ces résultats montrent qu'il est possible par ingénierie protéique de modifier le rapport des activités de consommation et de production, ceci présente un intérêt dans la perspective de générer des hydrogénases optimisées à souhait en faveur de l'une ou l'autre de ses activités.

Les deux partenaires physiologiques de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum*, sont la ferrédoxine et la flavodoxine. La purification de la ferrédoxine exprimée naturellement chez *C. acetobutylicum* en solvantogénèse lors d'une culture discontinuée régulée à pH 4,8, a permis de montrer que la ferrédoxine 2[4FE-4S] endogène majoritaire correspond à celle codée par la séquence CAC0303. La flavodoxine CAC0587 a été produite au cours d'une expression hétérologue chez *E. coli*. Elle a été purifiée via son étiquette Strep-Tag sous forme d'un mélange d'holo- et apoflavodoxine. Une reconstitution *in vitro* a permis d'obtenir ~100 % d'holoprotéine.

Ces deux partenaires physiologiques purifiés ont été utilisés pour déterminer les paramètres cinétiques de l'hydrogénase à fer native de *C. acetobutylicum* dans les sens de consommation et production de l'hydrogène. Nous avons également utilisé pour comparaison le partenaire artificiel : le méthyl viologène et l'homologue de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum* : la ferrédoxine de *C. pasteurianum*. L'instabilité persistante des hydrogénases à fer modifiées de *C. acetobutylicum* ne nous a pas permis de réaliser cette caractérisation cinétique pour ces enzymes. Une même efficacité catalytique élevée de consommation de l'hydrogène a été obtenue avec le partenaire d'oxydo-réduction artificiel, le méthyl viologène, et les deux partenaires d'oxydo-réduction physiologiques, la ferrédoxine et la flavodoxine de *C. acetobutylicum*. Ce résultat reflète que le haut potentiel de cette enzyme pour l'oxydation de l'hydrogène est conservé avec trois types de partenaires d'oxydo-réduction.. La comparaison des paramètres cinétiques obtenus avec la ferrédoxine et la flavodoxine de *C. acetobutylicum*, semble montrer qu'en condition de culture de *C. acetobutylicum* en carence en fer, la

substitution de la ferrédoxine par la flavodoxine ne serait pas une limitation pour l'activité hydrogénase *in vivo*.

Lorsque les hydrogénases à fer modifiées seront stabilisées, et que le problème de fonctionnalité de leur site actif sera résolu, la caractérisation cinétique de l'hydrogénase Δ Da sera intéressante. En effet, King *et al.*, 2006 ont montré qu'un mutant de délétion de tous les domaines additionnel et accessoires (HydA Δ N) chez *C. acetobutylicum*, n'était plus capable de catalyser la réaction de production d'hydrogène avec la ferrédoxine comme donneur d'électrons. Dans cette publication, rien n'est mentionné sur la stabilité de ce mutant, et aucune donnée d'activité d'échange proton / deutérium ou de conversion para-H₂ / ortho-H₂ n'est apportée pour confirmer la fonctionnalité du site catalytique. La reproduction de cette expérience avec notre mutant Δ Da nous permettrait de confirmer que les domaines additionnel et accessoires sont indispensables au transfert d'électrons inter-moléculaire entre l'enzyme et la ferrédoxine.

Tous ces travaux ont permis de ne remplir que partiellement l'objectif de départ de la thèse qui était de comprendre le mécanisme de catalyse de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* et plus particulièrement le transfert inter-moléculaire d'électrons entre l'enzyme et ses partenaires d'oxydo-réduction. Cependant, malgré les problèmes rencontrés, nous avons acquis des données enzymatiques sur la protéine, et nous avons désormais une expérience sur sa réactivité fonctionnelle vis-à-vis de la mutagenèse dirigée.

Dans le contexte de recherches appliquées sur la production d'énergie à partir de ressources renouvelables, les potentialités catalytiques de l'hydrogénase à fer HydA de *C. acetobutylicum* que nous avons démontrées pourraient être utilisées dans le développement :

(i) de catalyseur enzymatique de la réaction anodique dans une biopile à combustible H₂/O₂. Cette approche est développée en particulier dans l'équipe du Dr. A. Bergel (LGC, Toulouse), à qui nous avons fourni de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* pour tester cette enzyme comme biocatalyseur de la réaction d'oxydation de l'hydrogène à l'anode ;

(ii) de procédés de bioconversion par *C. acetobutylicum* de substrats issus de l'agriculture (amidon) en biohydrogène avec une forte productivité. En effet, la productivité naturelle de production d'hydrogène la plus élevée, en culture continue sur glucose, parmi toutes les bactéries produisant de l'hydrogène, est réalisée à notre connaissance, par *C. acetobutylicum* ATCC 824 avec 2,4 litres d'hydrogène produit par litre de culture et par heure (Soni *et al.*, 1987); De plus, tous les outils d'ingénierie métabolique (sur-expression / délétion

chromosomique de gènes) sont disponibles chez ce micro-organisme, pour orienter préférentiellement le flux d'électrons vers l'hydrogénase et la synthèse d'hydrogène.

Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners

Marie Demuez¹, Laurent Cournac², Olivier Guerrini¹, Philippe Soucaille¹ & Laurence Girbal¹

¹Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, INSA, Toulouse, France; and ²CEA Cadarache, DSV, IBEB, SBVME, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, UMR 6191 CNRS/CEA/Université Aix-Marseille, Saint-Paul-lez-Durance, France

Correspondence: Laurence Girbal, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, INSA, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse cedex 4, France. Tel.: +33 5 61 55 94 19; fax: +33 5 61 55 94 00; e-mail: girbal@insa-toulouse.fr

Present address: Philippe Soucaille, Metabolic Explorer, Bio pôle Clermont Limagne, 63360 Saint-Beauzire, France.

Received 28 March 2007; revised 11 June 2007; accepted 4 July 2007.
First published online 6 August 2007.

DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.00868.x

Editor: Wilfrid Mitchell

Keywords

[FeFe]-hydrogenase; *Clostridium acetobutylicum*; ferredoxin; flavodoxin.

Introduction

The biological production of hydrogen, a 'clean' energy carrier, has become one of the most promising alternatives to the exploitation of fossil energy sources. In living organisms, the production or utilization of hydrogen is performed by hydrogenases, which catalyze the reaction $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$. They form a diverse group of enzymes, often classified according to the transition metal cofactors associated with the protein (Vignais *et al.*, 2001). Among the hydrogenases, the [FeFe]-hydrogenases often catalyze the reduction of protons to yield hydrogen at high turnover numbers (Adams, 1990).

To the author's knowledge, the microorganism exhibiting the highest reported rates of hydrogen production from hexose is the anaerobic bacterium *Clostridium acetobutyli-*

Abstract

In *Clostridium acetobutylicum*, [FeFe]-hydrogenase is involved in hydrogen production *in vivo* by transferring electrons from physiological electron donors, ferredoxin and flavodoxin, to protons. In this report, by modifications of the purification procedure, the specific activity of the enzyme has been improved and its complete catalytic profile in hydrogen evolution, hydrogen uptake, proton/deuterium exchange and *para*-H₂/*ortho*-H₂ conversion has been determined. The major ferredoxin expressed in the solvent-producing *C. acetobutylicum* cells was purified and identified as encoded by ORF CAC0303. *Clostridium acetobutylicum* recombinant holoflavoferredoxin CAC0587 was also purified. The kinetic parameters of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase for both physiological partners, ferredoxin CAC0303 and flavodoxin CAC0587, are reported for hydrogen uptake and hydrogen evolution activities.

cum with a productivity in chemostat of $2.4 \text{ L H}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Soni *et al.*, 1987). Two [FeFe]-hydrogenases formerly called HydA and HydB (Gorwa *et al.*, 1996; King *et al.*, 2006) and a putative [NiFe]-hydrogenase revealed by genome sequencing of the pSOL1 megaplasmid (Nölling *et al.*, 2001) are present in *C. acetobutylicum* ATCC 824. [FeFe]-hydrogenases should be renamed, according to the hydrogenase nomenclature for multiple isoenzymes in a single species (Vignais *et al.*, 2001), HydA1 (gene CAC0028, instead of HydA) and HydA2 (gene CAC3230, instead of HydB). Comparison of the hydrogen production rates between the two *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenases showed that HydA1 was almost 10-fold more active than HydA2 (King *et al.*, 2006) suggesting that *in vivo* hydrogen production in *C. acetobutylicum* is mainly performed by HydA1.

In *C. acetobutylicum*, the physiological electron donor of hydrogenase is reduced ferredoxin. Ferredoxin is reduced mainly during oxidative decarboxylation of pyruvate catalyzed by a pyruvate ferredoxin oxidoreductase. During acidogenic metabolism (correlated with a high hydrogen production rate), an additional ferredoxin-reducing pathway is present via a NADH ferredoxin oxidoreductase activity (Vasconcelos *et al.*, 1994; Girbal *et al.*, 1995a). In clostridia, the amount of ferredoxin fluctuates according to the culture conditions (Knight & Hardy, 1966; Ragsdale & Ljungdahl, 1984). Under iron-deficient conditions, flavodoxin was suggested to substitute *in vivo* for ferredoxin in many redox reactions. *In vitro*, it was confirmed that flavodoxin could replace ferredoxin as an electron carrier for clostridial pyruvate ferredoxin oxidoreductases (Mayhew, 1971; Petitdemange *et al.*, 1979; Fitzgerald *et al.*, 1980), NADH oxidoreductase (Petitdemange *et al.*, 1979) and hydrogenase (Chen & Blanchard, 1979; Fitzgerald *et al.*, 1980).

In this study, the specific activity of the purified *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase HydA1 has been optimized and its complete activity profile for hydrogen evolution, hydrogen uptake, proton/deuterium exchange and *para*-H₂/*ortho*-H₂ conversion has been determined. The determination of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase kinetic parameters for its physiological redox partners, the endogenous *C. acetobutylicum* ferredoxin and flavodoxin, is also reported.

Materials and methods

Bacterial strains and media

Clostridium acetobutylicum ATCC 824 was obtained from the American Type Culture Collection and grown on a glucose minimal medium (Vasconcelos *et al.*, 1994) supplemented for the recombinant strain with erythromycin (40 µg mL⁻¹), calcium carbonate (2 g L⁻¹), iron sulfate (100 mg L⁻¹), nickel II chloride (6 mg L⁻¹), zinc sulfate (120 mg L⁻¹) and nitrioltriacetic acid (400 mg L⁻¹) in a 1.5 L batch culture maintained at 37 °C and at pH 4.8 and 6.5 for, respectively, ferredoxin and hydrogenase expression. *Escherichia coli* strain BL21(DE3) was obtained from Novagen (VWR, Fontenay sous Bois, France) and recombinant strains were grown on a medium containing 20 g L⁻¹ glucose, 10 g L⁻¹ tryptone, 5 g L⁻¹ yeast extract, 2.6 g L⁻¹ HEPES, 50 mg L⁻¹ FeSO₄, 200 mg L⁻¹ nitrioltriacetic acid, 0.5 g L⁻¹ K₂HPO₄ and 2 g L⁻¹ NaCl with carbenicillin (100 µg mL⁻¹) in a 1.5 L batch culture maintained at 30 °C and at pH 6.8.

Ferredoxin isolation

Anaerobic conditions (85% N₂, 10% H₂ and 5% CO₂) were maintained throughout the entire purification procedure.

The purification protocol was adapted from Moulis & Meyer (1982). While cells were still in the exponential growth phase (OD_{620 nm} in the range of 5–6), they were harvested anaerobically (20 min at 11 300 g and 4 °C), transferred into the anaerobic chamber, washed and concentrated 30 times in 100 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM Na-dithionite and 10% glycerol and frozen at -20 °C. Cells were broken by sonication and centrifuged (3400 g, 30 min at 4 °C). The supernatant was heated to 55 °C for 15 min and centrifuged (3400 g, 30 min at 4 °C) again to eliminate precipitated material. The pH of the supernatant was adjusted to pH 7.4 by adding solid Tris-base, diluted twofold with water and loaded on a 20 × 2 cm DEAE-cellulose (Sigma, St Quentin Fallavier, France) column equilibrated with 0.02 M Tris-HCl pH 7.4 and NaCl 0.1 M. After washing, a 72 mL linear gradient (0.6 mL min⁻¹) from 0.1 to 1 M NaCl in 0.02 M Tris-HCl pH 7.4 was run. The brown ferredoxin-containing fractions having the highest A_{390 nm}/A_{280 nm} ratio were loaded on a 40 × 1.6 cm Hiprep Sephacryl S-100HR (Amersham Biosciences, Saclay, France) column equilibrated with 0.05 M Tris-HCl pH 8.0. The brownish fractions were pooled, and the ferredoxin concentration was 560 µg mL⁻¹ with an A_{390 nm}/A_{280 nm} ratio of 0.86. The purity of the ferredoxin preparation was checked by 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the Silver Stain System Plus (Biorad, Marne la coquette, France). Standard denaturing buffer was supplemented or not with 20 mM dithiothreitol (DTT) and heated at 100 °C for 10 min. Page Ruler Prestained standards from Euromedex (Mundolsheim, France) were used as molecular weight markers. N-terminal microsequencing of the protein was realized by the Plate-forme d'Analyse et de Microséquence des Protéines from Institut Pasteur, Paris, France.

Flavodoxin cloning, expression and purification

The flavodoxin CAC0587 gene was PCR-amplified from *C. acetobutylicum* genomic DNA using the forward oligonucleotide primer 5'-GGATTTCCATATGGTGAAAATAA CATAATTTATTGCTC-3' introducing the NdeI restriction site and reverse primer 5'-CGGAATCTTATTTTTCAAATT GAGGATGTGACCAGCTATTTATAAGAGCCTTACCAAAC TC-3' inserting the *Strep*-tag II sequence (IBA GmbH, Göttingen, Germany) and the EcoRI restriction site at the 3'-end of the gene. The amplified fragment (470 bp) was digested by NdeI and EcoRI and ligated into the expression vector pET21 (Novagen) linearized with the same endonucleases. The sequence of the 470 bp insert in the resulting pET21-Flx vector was verified before using this vector to transform *E. coli* BL21(DE3) containing an inducible T7 polymerase under the control of the *lac* promoter. Flavodoxin expression and purification were performed in aerobic conditions. Flavodoxin expression was induced in

E. coli (pET21-Flx) cells at an OD_{600 nm} of 0.5 by adding 20 µM IPTG. When the culture reached an OD_{600 nm} of 2–3, the cells were collected by centrifugation (11 300 g for 20 min at 4 °C), resuspended in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, 10% glycerol and broken by sonication. To precipitate nucleic acids, streptomycin sulfate (3.2 g L⁻¹) was added to the disrupted cell suspensions before centrifugation at 4150 g for 20 min at 4 °C. Avidin (0.16 g L⁻¹) was added to block the binding of biotin and biotinylated proteins. After a 30 min incubation at 4 °C, the extract was diluted four times and filtered (5 µm, Sartorius, VWR) and passed over a StrepTactin-Superflow (IBA GmbH) affinity column pre-equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.15 M NaCl. The flavodoxin was eluted with 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl containing 2.5 mM desthiobiotin. The purity of the flavodoxin preparation was checked by 15% SDS-PAGE. Prestained low-range SDS-PAGE standards were used (Biorad). The flavodoxin yield was 500 µg from a 750 mL culture of *E. coli* (pET21-Flx).

Flavin mononucleotide (FMN) removal and *in vitro* binding

An FMN cofactor was released from holoflavodoxin protein by incubation in 5% (v/v) trichloroacetic acid for 5 min at room temperature, followed by centrifugation at 12 000 g for 1 min and at 4 °C (Swenson & Krey, 1994). The supernatant fraction was neutralized with 2 M K₂HPO₄. The removed FMN was quantified by fluorescence (excitation wavelength = 445 nm and emission wavelength = 525 nm) with trichloroacetic acid-treated FMN [purity 98% (HPLC) commercial FMN, Sigma] as a standard. Additional FMN binding to apoflavodoxin was performed *in vitro* according to Rogers & Sykes (1990). To 1.5 mL of 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA containing apoflavodoxin (200 µg mL⁻¹) and 500 µL of 441 µM FMN were added. After 2 h at 4 °C, the solution was centrifuged at 7500 g and 4 °C to pellet any undissolved material and unbound FMN was removed by membrane separation using 3 K OMEGA microsep (Pall, VWR).

[FeFe]-hydrogenase expression and purification

Homologous expression of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase HydA1 in the form of a C-terminal Strep-tag II-tagged protein was performed using *C. acetobutylicum* (pPHhydA_{Ca}-C-tag) strain as described by Girbal *et al.*, 2005. Modifications of the protein purification protocol and storage conditions are described in the text.

Enzyme assays

In vitro hydrogen uptake assays coupled with methyl viologen and ferredoxin/flavodoxin reduction were adopted from

Vasconcelos *et al.* (1994) and Chen & Blanchard (1979), respectively. The *in vitro* hydrogen evolution assay was performed at 35 °C with shaking as described previously (Girbal *et al.*, 1995b). H⁺/deuterium exchange was followed continuously in the aqueous phase by a mass-spectrometric method (Jouanneau *et al.*, 1980) at 37 °C in a 1.5 mL vessel of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7, and 1 mM dithionite. *Para*-H₂/*ortho*-H₂ conversion activity was measured using the same setup as described by Berlier *et al.* (1990). Hydrogenase was incubated at 25 °C, in shaking anaerobic bottles containing 5 mL of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7, 2 mM dithionite and 10 mL of *para*-enriched hydrogen gas space. Aliquots (0.2 mL) of the gas phases were sampled periodically. The two spin isomers were separated by gas chromatography in a liquid N₂-cooled alumina column (helium gas carrier) and detected at the outlet by mass spectrometry. The *para*-H₂ content decrease to equilibrium at ambient temperature was quantified over time. The *para*-H₂/*ortho*-H₂ conversion reaction obeys first-order kinetics with time constant k_0 (in min⁻¹). The reaction rate v_0 (in µmoles min⁻¹) is then expressed as $v_0 = n_0 k_0$ where n_0 is the amount of H₂ (in µmoles) in the gas phase (Yagi *et al.*, 1973).

Determination of protein and iron concentrations

Clostridium acetobutylicum [Fe-Fe]-hydrogenase, flavodoxin and ferredoxin concentrations were determined according to the method of Bradford (1976). Bovine serum albumin was used as a standard for the two first proteins and commercial *Clostridium pasteurianum* ferredoxin (Sigma) for *C. acetobutylicum* ferredoxin.

The iron content was measured using ICP-AES (Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer) analysis. The stoichiometric level of iron per hydrogenase molecule was calculated using protein concentration determined by amino acid analysis using an HPLC method after on-line automated precolumn derivatization. The amino acid derivatives were separated on a C₁₈ reverse-phase column and measured by a diode-array detector.

Results and discussion

Isolation of *C. acetobutylicum* ferredoxin

The purification procedure of *C. acetobutylicum* ferredoxin involved heat treatment, anion exchange chromatography and gel filtration (see 'Materials and methods'). During the anion exchange chromatography, it was ensured that the flow-through fraction did not contain significant ferredoxin using an enzymatic assay with purified hydrogenase. At the

end of the purification procedure, the eluted fraction was found to contain a small-size protein purified to apparent homogeneity as determined by SDS-PAGE after dithiothreitol reduction of the sample (Fig. 1a). N-terminal microsequencing of this protein from two independent purifications gave the sequence AYKIT (the N-terminal methionine was absent) that matched a 56 amino acid protein encoded by (ORF) CAC0303 in the *C. acetobutylicum* genome (Nölling *et al.*, 2001). The amino acid sequence deduced from ORF CAC0303 was found to have 87% identity with *C. pasteurianum* ferredoxin (Graves *et al.*, 1985) and to contain two CX₂CX₂CX₃CP motifs highly conserved among bacterial ferredoxins binding two [4Fe-4S] clusters. In the *C. acetobutylicum* genome, five ORFs (CAC0075, CAC0105, CAC0303, CAC3527 and CAC3621) are annotated as coding for putative ferredoxins. The present results show that ORF CAC0303 encodes the major ferredoxin expressed in the solvent producing *C. acetobutylicum* cells grown at pH 4.8. Tomas *et al.* (2003), by DNA-array-based transcriptional analyses, have demonstrated that ORF CAC0303 expression was positively controlled by the Spo0A regulator and present during the stationary phase of a *C. acetobutylicum* culture. Promoter analysis of ORF CAC0303 revealed a putative Spo0A recognition sequence (TATCGAA) and the presence of phased A-tracts (upstream and within the promoter region). Phased A-tracts were suggested to be involved in the stimulation of the promoter activity of *C. pasteurianum* ferredoxin and *Clostridium perfringens* putative ferredoxin (Kaji *et al.*, 2003).

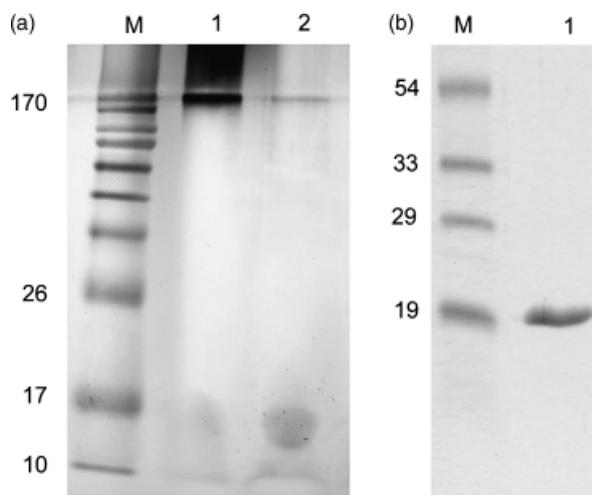


Fig. 1. Purification of *Clostridium acetobutylicum* ferredoxin and flavodoxin. (a) Silver staining of ferredoxin. Lane 1, purified ferredoxin without dithiothreitol in the denaturing buffer; lane 2, purified ferredoxin with dithiothreitol in the denaturing buffer. (b) Coomassie staining of flavodoxin. Lane 1, purified flavodoxin. M, standard proteins (sizes in kDa).

Expression and purification of *C. acetobutylicum* flavodoxin

Because in the literature several authors have reported direct expression of recombinant clostridial flavodoxin holoprotein in *E. coli* (Eren & Swenson, 1989; Bradley & Swenson, 1999), it was decided to express a *C. acetobutylicum* flavodoxin in *E. coli* in the form of a *Strep*-Tag fusion protein. In the *C. acetobutylicum* genome, four ORFs (CAC0203, CAC0587, CAC2452 and CAC3417) are annotated as coding for putative flavodoxins (Nölling *et al.*, 2001). It was decided to heterologously express the flavodoxin CAC0587 gene and to purify the corresponding protein for the following reasons: (1) comparison of the deduced amino acid sequences of the four ORFs showed that flavodoxin CAC0587 had the highest identity (56% compared with 28% for CAC2452 and 17–18% for CAC0203 and CAC3417) with *Clostridium beijerinckii* (MP) flavodoxin (Tanaka *et al.*, 1974); (2) an amino acid sequence alignment with *C. beijerinckii* flavodoxin showed that the Glu59 residue in the *C. beijerinckii* sequence, which was demonstrated to serve as a crucial hydrogen bond acceptor for N(3)H of FMN, was conserved in flavodoxin CAC0587 but not in the three other putative flavodoxins (Bradley & Swenson, 1999); (3) the phosphate-binding motif Ser/Thr–X–Thr–Gly–X–Thr involved in the interaction with FMN and usually conserved in all flavodoxins was present in the flavodoxin CAC0587 sequence but not conserved in flavodoxins CAC0203, CAC2452 and CAC3417 (Muralidhara & Wittung-Stafshede, 2005) and (4) it was previously shown by DNA-array transcriptional analyses of *C. acetobutylicum* strains that the ORF CAC0587 gene was effectively transcribed *in vivo* (Tomas *et al.*, 2003), while no information on transcription of the three other ORFs has been reported. *Clostridium acetobutylicum* flavodoxin (CAC0587) was purified by affinity chromatography to apparent homogeneity as determined by SDS-PAGE (Fig. 1b). After trichloroacetic acid treatment, released FMN was measured by fluorescence, and an FMN-binding yield of $56 \pm 13\%$ was calculated for this initial flavoprotein preparation. In order to increase this percentage, *in vitro* FMN binding to the apoflavodoxin was performed by adding free FMN molecules to the initial flavodoxin preparation. *In vitro* reconstitution led to a $112 \pm 18\%$ FMN-binding flavoprotein in the final preparation, which was later used for kinetic parameter determination.

Optimization of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase-specific activity and complete activity profile

Purification of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase HydA1 in the form of a *Strep*-tagged protein was reported

previously by two groups after homologous expression (Girbal *et al.*, 2005) or heterologous expression in *E. coli* (in coexpression with three maturases) (King *et al.*, 2006). Unexpectedly low *in vitro* hydrogen evolution activities were found, at least 50-fold lower than the $4000 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ reported for the highly homologous *C. pasteurianum* [FeFe]-hydrogenase I (Adams & Mortenson, 1984), leading to an abnormal ratio of 500 between H_2 uptake activity and H_2 evolution activity when compared with the similar activities in both directions usually reported for clostridial [FeFe]-hydrogenases (Adams & Mortenson, 1984; Adams, 1990). It was suggested that some activity (especially the hydrogen evolution activity) could have been lost during cell/protein storage and/or protein purification. Hence, some modifications were introduced into the purification protocol described by Girbal *et al.*, 2005: (1) in order to decrease any oxidative alteration of the protein, *C. acetobutylicum* cells were flushed at the end of the culture with pure hydrogen and concentrated in a 100% hydrogen atmosphere – all the buffers and solutions required for the protein purification were flushed with pure hydrogen instead of nitrogen – and the purified protein preparation was stored in a 100% hydrogen atmosphere; (2) in order to avoid cell storage, the cell pellet was no longer frozen before sonication. The stoichiometric level of iron per hydrogenase molecule (20 ± 5 iron atoms/molecule) in the newly purified enzyme was confirmed. Taking the above precautions, *in vitro* [FeFe]-hydrogenase-specific activities were increased 16-fold for H_2 evolution and 130-fold for H_2 uptake (both using methyl viologen as a redox partner) (Table 1). It should be noted that these new activity, values led to an even more increased ratio of H_2 uptake activity to H_2 evolution activity, which now reached 4400. To complete the activity profile of the enzyme, specific H^+ /deuterium exchange and *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion activities were measured before and after modification of the purification procedure. A small positive effect on the level of these two activities was observed. It should be noted that the specific *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion activities were six times lower than those of the H^+ /deuterium exchange, which is surprising because the H^+ /deuterium exchange process involves the hydrogen cleavage reaction measured via the *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion activity. The lower specific

para- H_2 /*ortho*- H_2 conversion activities may be due to differences in the *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion and H^+ /deuterium exchange experimental protocols: (1) a biphasic reaction process involving liquid/gas hydrogen transfer in the first assay compared with a monophasic reaction in liquid medium in the second one; (2) nonsaturating hydrogen conditions during the *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion; indeed, from the H_2 content of the gas phase, hydrogen concentration can be estimated to be around $165 \mu\text{M}$ in solution in this assay, i.e. lower than the K_m value of $223 \mu\text{M}$ for H_2 reported for the *C. pasteurianum* [FeFe]-hydrogenase I (one should note that this K_m , the only available value in the literature, was determined for H_2 uptake coupled to methyl viologen reduction and not for the *para/ortho* reaction, Erbes & Burris, 1978), to be compared with hydrogen saturating conditions in the exchange reaction with a hydrogen concentration of $728 \mu\text{M}$ at 37°C ; and (3) a time-scale measurement of several hours for the conversion reaction compared with only a few minutes during the exchange process. In the only study where these two activities were compared quantitatively in the case of an [FeFe]-hydrogenase, Fauque *et al.* (1988), from measurements all performed on the gas phase in glass vials, reported a 1.07 ratio between *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion and H/D^+ (in D_2O) exchange activities of the *Desulfovibrio vulgaris* [FeFe]-hydrogenase. This indicates that these activities should be equivalent when measured under the same conditions. The results here showed that only the activities involving electron transfer, i.e. H_2 uptake and H_2 evolution but not *para*- H_2 /*ortho*- H_2 conversion and H^+ /deuterium exchange, are highly increased by the modifications of the purification protocol. However, in the case of H^+ /deuterium exchange measurement by mass spectrometry, it was believed that the activity might be underestimated, probably because the experimental device did not ensure the very strict reductive environment that seems to be required for high enzyme activity. Indeed, when the H_2 uptake activity was measured in such a device, it was significantly reduced ($4000 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) but was still 2.5-fold higher than the H^+ /deuterium exchange activity measured with the same equipment. One hypothesis to explain why the H^+ /deuterium exchange rates are lower than the dye-coupled H_2 uptake rates might be that the reverse proton transfer

Table 1. Specific activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase purified by classical and improved purification protocols

	Specific activities in $\mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$			
	H_2 uptake*	H_2 evolution [†]	H^+ /deuterium exchange	<i>para</i> - H_2 / <i>ortho</i> - H_2 conversion
Classical protocol	$5522 \pm 789^\ddagger$	$10 \pm 5^\ddagger$	1504 ± 96	224 ± 133
Improved protocol	$7.2 \times 10^5 \pm 0.2 \times 10^5$	162 ± 4	1604 ± 39	340 ± 202

*Using 20 mM methyl viologen as electron acceptor.

[†]Using 1 mM methyl viologen as electron donor.

[‡]Values are from Girbal *et al.* (2005).

and/or proton–hydride recombination (two steps included in H⁺/deuterium exchange but not in H₂ uptake) are rate limiting.

The specific H₂ uptake activity ($7.2 \times 10^5 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) measured in the presence of 20 mM methyl viologen (Table 1) was associated with a V_{max} value of $2.7 \times 10^6 \mu\text{mol H}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Table 2). This V_{max} unexpectedly reached a 200-fold higher level than the V_{max} reported for *C. pasteurianum* [FeFe]-hydrogenase I (Adams & Mortenson, 1984). Control experiments measuring methyl viologen reduction in the presence and absence of enzyme, under an argon atmosphere instead of a hydrogen atmosphere, with and without dithiothreitol led to the conclusion that this high methyl viologen reduction activity was over 97% H₂- and enzyme-dependent and not linked to dithiothreitol. A k_{cat} value of $2.8 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ for H₂ uptake activity was also confirmed using benzyl viologen instead of methyl viologen as an electron acceptor. This rate constant (including both intra- and intermolecular electron transfers) nevertheless remains lower than the rate constants of the order of $5 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ determined for several ferredoxins for the intramolecular electron transfer between two [4Fe-4S] clusters (Kyritsis *et al.*, 1997), and than the rate constants of $6 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ used in a kinetic model for intramolecular electron exchange between the Fe-S centers of [NiFe]-hydrogenases (Bertrand *et al.*, 2000). Anyway, such a high k_{cat} might indicate that methyl viologen could be prone to interact more or less directly with the H cluster, shunting the intramolecular electron transfer chain and therefore activity may be limited by other key steps such as diffusion of H₂ and methyl viologen. In the literature, very few reports deal with the measurement of the specific H₂ uptake activity of clostridial [FeFe]-hydrogenases (Adams & Mortenson, 1984; Adams, 1990; Girbal *et al.*, 2005). Besides traditional spectroscopic assays, interesting reports are now available on protein film voltammetry (i.e. a direct electrochemistry of a protein molecule adsorbed onto an electrode in such a way that there is fast interfacial electron transfer and complete retention of the active site chemistry, very favorable conditions for kinetic measurements) applied to two [FeFe]-hydrogenases: *Megasphaera elsdenii* [FeFe]-hydrogenase to investigate enzyme catalytic behavior vs. pH and potential (Butt *et al.*, 1997) and *Desulfovibrio desulfuricans* [FeFe]-hydrogenase to study enzyme inhibition/inactivation (Vincent *et al.*, 2005; Parkin *et al.*, 2006). Using this electrochemical technique, Parkin *et al.* estimated the H₂ oxidation rate of *D. desulfuricans* [FeFe]-hydrogenase to be 4000 s^{-1} at 25 °C, a value still 750-fold lower than the k_{cat} reported in this paper. Application of protein film voltammetry to clostridial [FeFe]-hydrogenases might provide new data on H₂ uptake catalytic performance and intramolecular electron transfer kinetics of these enzymes, although specific activity is still difficult to determine

Table 2. Kinetic parameters of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase for different electron carriers

Electron carriers	H ₂ uptake				H ₂ evolution			
	K_{m} (M)	V_{max}^*	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_{m} (M)	V_{max}^\dagger	k_{cat} (s ⁻¹)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
MV	$59 \times 10^{-3} \pm 22 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^6 \pm 0.7 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6 \pm 0.7 \times 10^6$	$5.1 \times 10^7 \pm 3.2 \times 10^7$	$1.6 \times 10^{-3} \pm 0.7 \times 10^{-3}$	416 ± 149	454 ± 149	$2.9 \times 10^5 \pm 2.2 \times 10^5$
Cp Fd	$11 \times 10^{-6} \pm 6 \times 10^{-6}$	791 ± 198	864 ± 216	$7.8 \times 10^7 \pm 6.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^{-6} \pm 0.6 \times 10^{-6}$	133 ± 63	146 ± 71	$1 \times 10^8 \pm 9.2 \times 10^7$
Ca Fd	$10 \times 10^{-6} \pm 4 \times 10^{-6}$	826 ± 207	901 ± 225	$9.0 \times 10^7 \pm 5.9 \times 10^7$	$3.3 \times 10^{-6} \pm 1.4 \times 10^{-6}$	122 ± 31	133 ± 34	$4 \times 10^7 \pm 2.8 \times 10^7$
Ca Fix	$0.9 \times 10^{-6} \pm 0.4 \times 10^{-6}$	40 ± 10	44 ± 11	$4.6 \times 10^7 \pm 3.0 \times 10^7$	$8.8 \times 10^{-6} \pm 3.7 \times 10^{-6}$	442 ± 112	483 ± 122	$5.5 \times 10^7 \pm 3.8 \times 10^7$

* V_{max} is expressed in micromole of oxidized H₂ min⁻¹ mg⁻¹ for methyl viologen and in μmole of reduced metronidazole min⁻¹ mg⁻¹ for ferredoxin and flavodoxin.

† V_{max} is expressed in micromole of evolved H₂ min⁻¹ mg⁻¹.

MV, methyl viologen; Cp Fd, ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*; Ca Fd, ferredoxin from *C. acetobutylicum*; Ca Fix, reconstituted flavodoxin from *C. acetobutylicum*.

precisely due to an inaccurate quantification of adsorbed enzyme concentration (Butt *et al.*, 1997; Pershad *et al.*, 1999).

Kinetic parameters of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase

The kinetic parameters of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase purified by the improved protocol were determined for both H₂ uptake and H₂ evolution activities using as acceptors the endogenous purified *C. acetobutylicum* ferredoxin (*Ca* Fd) and flavodoxin (*Ca* Fld) and for comparison using the homologous commercial *C. pasteurianum* ferredoxin (*Cp* Fd) and the artificial redox partner methyl viologen (Table 2). K_m values in the micromolar and millimolar ranges with ferredoxin and methyl viologen, respectively, for H₂ uptake and H₂ evolution are in agreement with those reported for *C. pasteurianum* [FeFe]-hydrogenase (Adams & Mortenson, 1984; Quinkal *et al.*, 1994; Girbal *et al.*, 2005). However, compared with *C. pasteurianum* [FeFe]-hydrogenase, the *C. acetobutylicum* enzyme showed a higher K_m for oxidized methyl viologen but lower values for reduced methyl viologen and reduced *Cp* Fd. Improvements in the purification protocol of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase led to increased k_{cat} values for either activity with both *Cp* Fd and methyl viologen (five- and 278-fold, respectively, for H₂ uptake and around three- and 40-fold for H₂ evolution) while the K_m values were reduced at least twofold for oxidized methyl viologen and (oxidized and reduced) *Cp* Fd (Girbal *et al.*, 2005). The V_{max} for H₂ evolution of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase purified by the improved protocol is now similar to that of *C. pasteurianum* [FeFe]-hydrogenase V_{max} (Quinkal *et al.*, 1994). The catalytic efficiencies of H₂ uptake and H₂ evolution were very high in the range of 4×10^7 – 10^8 M⁻¹ s⁻¹ for all substrates except reduced methyl viologen, for which the high turnover did not counterbalance the high K_m . More precisely, for either activity, our results showed that *Ca* Fd and *Cp* Fd are equivalent electron partners of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase in terms of K_m , turnover and hence catalytic efficiency. However, this is not true for *Ca* Fd and *Ca* Flx: although similar catalytic efficiencies were calculated, different K_m and k_{cat} values were measured. In particular for hydrogen production, K_m and k_{cat} values for *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase were around threefold higher with *Ca* Flx compared with *Ca* Fd. From

a physiological viewpoint, these results indicate that under iron-limited conditions, the substitution of ferredoxin by flavodoxin, whose intracellular concentrations in low-iron-grown clostridial cells can be estimated to be in the 3–50 μM range (Knight & Hardy, 1966; Ragsdale & Ljungdahl, 1984), might not be a limitation for *in vivo* hydrogenase activity and thus would not by itself explain the 40% decrease of

hydrogen production observed in low-iron-grown *C. acetobutylicum* cells (Junelles *et al.*, 1988).

Conclusions

In this report, a complete catalytic/kinetic characterization of *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase is provided. An optimized purification procedure of the enzyme and its physiological redox partners, endogenous ferredoxin and flavodoxin is presented. Analysis of the purified enzyme revealed two important features of the *C. acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase: a very high specific H₂ uptake activity (10^6 μmol H₂ min⁻¹ mg⁻¹) measured in the presence of methyl viologen, and high catalytic efficiencies (10^7 – 10^8 M⁻¹ s⁻¹) for both H₂ uptake and H₂ evolution activities (except for methyl viologen oxidation) with either artificial or physiological redox partners.

These results reflect the high potential of this enzyme in hydrogen-related activities that is conserved with different electron carriers. In the competitive context of applied research on energy generation from renewable resources, this potential could have promising technological applications, such as to build enzymatic catalysts of the anode reaction in H₂/O₂ fuel cells, or to develop microbial processes based on conversion of biomass (in particular, cellulose-derived sugars and hemicellulose) into biohydrogen by *C. acetobutylicum* with high productivity.

Acknowledgements

The authors thank Valérie Laroute for her technical assistance in amino acid analysis and Patrick Carrier for assistance in ICP-AES measurements.

References

- Adams MW (1990) The structure and mechanism of iron-hydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **1020**: 115–145.
- Adams MWW & Mortenson LE (1984) The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. *J Biol Chem* **259**: 7045–7055.
- Berlier Y, Lespinat PA & Dimon B (1990) A gas chromatographic-mass spectrometric technique for studying simultaneous hydrogen–deuteron exchange and para-orthohydrogen conversion in hydrogenases of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Anal Biochem* **188**: 428–431.
- Bertrand P, Dole F, Asso M & Guigliarelli B (2000) Is there a rate-limiting step in the catalytic cycle of [NiFe] hydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **5**: 682–691.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254.

- Bradley LH & Swenson RP (1999) Role of glutamate-59 bonded to N(3)H of flavin mononucleotide cofactor in the modulation of the redox potentials of the *Clostridium beijerinckii* flavodoxin. Glutamate-59 is not responsible for the pH dependency but contributes to the stabilization of the flavin semiquinone. *Biochemistry* **38**: 12377–12386.
- Butt JN, Filipiak M & Hagen WR (1997) Direct electrochemistry of *Megasphaera elsdenii* iron hydrogenase. Definition of the enzyme's catalytic operating potential and quantification of the catalytic behaviour over a continuous potential range. *Eur J Biochem* **245**: 116–122.
- Chen J-S & Blanchard DK (1979) A simple hydrogenase-linked assay for ferredoxin and flavodoxin. *Anal Biochem* **93**: 216–222.
- Erbes DL & Burris RH (1978) The kinetics of methyl viologen oxidation and reduction by the hydrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta* **524**: 45–54.
- Eren M & Swenson RP (1989) Chemical synthesis and expression of a synthetic gene for the flavodoxin from *Clostridium* MP. *J Biol Chem* **264**: 14874–14879.
- Fauque G, Peck HD, Moura JGG *et al.* (1988) The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol Rev* **54**: 299–344.
- Fitzgerald MP, Rogers LJ, Rao KK & Hall DO (1980) Efficiency of ferredoxins and flavodoxins as mediators in systems for hydrogen evolution. *Biochem J* **192**: 665–672.
- Girbal L, Croux C, Vasconcelos I & Soucaille P (1995a) Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol Rev* **17**: 287–297.
- Girbal L, Vasconcelos I, Saint-Amans S & Soucaille P (1995b) How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev* **16**: 151–162.
- Girbal L, Von Abendorth G, Winkler M *et al.* (2005) Homologous/heterologous over-expression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activity. *Appl Environ Microbiol* **71**: 2777–2781.
- Gorwa MF, Croux C & Soucaille P (1996) Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **178**: 2668–2675.
- Graves MC, Mullenbach GT & Rabinowitz JC (1985) Cloning and nucleotide sequence determination of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *Proc Natl Acad Sci* **82**: 1653–1657.
- Jouanneau Y, Kelley BC, Berlier Y, Lespinat PA & Vignais PM (1980) Continuous monitoring, by mass spectrometry, of H₂ production and recycling in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol* **143**: 628–636.
- Junelles AM, Janati-Idrissi R, Petitdemange H & Gay R (1988) Iron effect on acetone-butanol fermentation. *Curr Microbiol* **17**: 299–303.
- Kaji M, Matsushita O, Tamai E *et al.* (2003) A novel type of DNA curvature present in a *Clostridium perfringens* ferredoxin gene: characterization and role in gene expression. *Microbiology* **149**: 3083–3091.
- King PW, Posewitz MC, Ghirardi ML & Seibert M (2006) Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J Bacteriol* **188**: 2163–2172.
- Knight E & Hardy RWF (1966) Isolation and characteristics of flavodoxin from nitrogen-fixing *Clostridium pasteurianum*. *J Biol Chem* **241**: 2752–2756.
- Kyritsis P, Huber JG, Quinkal I, Gaillard J & Moulis JM (1997) Intramolecular electron transfer between [4Fe-4S] clusters studied by proton magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **36**: 7839–7846.
- Mayhew SG (1971) Properties of two clostridial flavodoxins. *Biochim Biophys Acta* **235**: 276–288.
- Moulis JM & Meyer J (1982) Characterization of the selenium substituted 2[4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **21**: 4762–4771.
- Muralidhara BK & Wittung-Stafshede P (2005) FMN binding and unfolding of *Desulfovibrio desulfuricans* flavodoxin: 'hidden' intermediates at low denaturant concentrations. *Biochim Biophys Acta* **1747**: 239–250.
- Nölling J, Breton G, Omelchenko MV *et al.* (2001) Genome sequence and comparative analysis of the solvent producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**: 4823–4838.
- Parkin A, Cavazza C, Fontecilla-Camps JC & Armstrong FA (2006) Electrochemical investigations of the interconversions between catalytic and inhibited states of the [FeFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Am Chem Soc* **128**: 16808–16815.
- Pershad HR, Duff JLC, Heering HA, Duin EC, Albracht SPJ & Armstrong FA (1999) Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H⁺/H₂ values. *Biochemistry* **38**: 8992–8999.
- Petitdemange H, Marczak R & Gay R (1979) NADH-flavodoxin oxidoreductase activity in *Clostridium tyrobutyricum*. *FEMS Microbiol Lett* **5**: 291–294.
- Quinkal I, Davasse V, Gaillard J & Moulis J-M (1994) On the role of conserved proline residues in the structure and function of *Clostridium pasteurianum* 2[4Fe-4S] ferredoxin. *Protein Eng* **7**: 681–687.
- Ragsdale SW & Ljungdahl LG (1984) Characterization of ferredoxin, flavodoxin, and rubredoxin from *Clostridium formicoaceticum* grown in media with high and low iron contents. *J Bacteriol* **157**: 1–6.
- Rogers LJ & Sykes GA (1990) Conformational changes in *Chondrus crispus* flavodoxin on dissociation of FMN and reconstitution with flavin analogues. *Biochem J* **272**: 775–779.
- Soni BK, Soucaille P & Goma G (1987) Continuous acetone butanol fermentation: influence of vitamins on the metabolic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **27**: 1–5.

- Swenson RP & Krey GD (1994) Site-directed mutagenesis of tyrosine-98 in the flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): regulation of oxidation-reduction properties of the bound FMN cofactor by aromatic, solvent, and electrostatic interactions. *Biochemistry* **33**: 8505–8514.
- Tanaka M, Haniu M, Yasunobu KT & Mayhew SG (1974) The amino acid sequence of the *Clostridium* MP flavodoxin. *J Biol Chem* **249**: 4393–4396.
- Tomas CA, Alsaker KV, Bonarius HPJ *et al.* (2003) DNA array-based transcriptional analysis of asporogenous, nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5. *J Bacteriol* **185**: 4539–4547.
- Vasconcelos I, Girbal L & Soucaille P (1994) Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J Bacteriol* **176**: 1443–1450.
- Vignais PM, Billoud B & Meyer J (2001) Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 455–501.
- Vincent KA, Parkin A, Lenz O *et al.* (2005) Electrochemical definitions of O₂ sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases. *J Am Chem Soc* **127**: 18179–18489.
- Yagi T, Tsuda M & Inokuchi H (1973) Kinetic studies on hydrogenase. Parahydrogen-orthohydrogen conversion and hydrogen-deuterium exchange reactions. *J Biochem* **73**: 1069–1081.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, M. W. 1987. The mechanisms of H₂ activation and CO binding by hydrogenase I and hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. *J Biol Chem* **262**:15054-61.

Adams, M. W. 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim Biophys Acta* **1020**:115-45.

Adams, M. W., E. Eccleston, and J. B. Howard. 1989. Iron-sulfur clusters of hydrogenase I and hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:4932-6.

Adams, M. W., M. K. Johnson, I. C. Zambrano, and L. E. Mortenson. 1986. On the novel H₂-activating iron-sulfur center of the "Fe-only" hydrogenases. *Biochimie* **68**:35-42.

Adams, M. W., and L. E. Mortenson. 1984. The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *J Biol Chem* **259**:7045-55.

Adams, M. W., L. E. Mortenson, and J. S. Chen. 1980. Hydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **594**:105-76.

Adams, M. W., and E. I. Stiefel. 1998. Biological hydrogen production: not so elementary. *Science* **282**:1842-1843.

Adams, M. W., and E. I. Stiefel. 2000. Organometallic iron: the key to biological hydrogen metabolism. *Curr Opin Chem Biol* **4**:214-220.

Afting, C., E. Kremmer, C. Brucker, A. Hochheimer, and R. K. Thauer. 2000. Regulation of the synthesis of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) and of HmdII and HmdIII in *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch Microbiol* **174**:225-232.

Agar, J. N., C. Krebs, J. Frazzon, B. H. Huynh, D. R. Dean, and M. K. Johnson. 2000. IscU as a scaffold for iron-sulfur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **39**:7856-62.

Albracht, S. P. 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim Biophys Acta* **1188**:167-204.

Albracht, S. P. 2001. Spectroscopy-the functional puzzle. In Cammack R, Frey M & Robson R, (eds): *Hydrogen as a Fuel*:110-158.

Armengaud, J., J. Gaillard, E. Forest, and Y. Jouanneau. 1995. Characterization of a [2[4Fe-4S] ferredoxin obtained by chemical insertion of the Fe-S clusters into the apoferredoxin II from *Rhodobacter capsulatus*. *Eur J Biochem* **231**:396-404.

Armengaud, J., and Y. Jouanneau. 1995. Overexpression in *Escherichia coli* of the fdxA gene encoding *Rhodobacter capsulatus* ferredoxin II. *Protein Expr Purif* **6**:176-84.

Atta, M., M. E. Lafferty, M. K. Johnson, J. Gaillard, and J. Meyer. 1998. Heterologous biosynthesis and characterization of the [2Fe-2S]-containing N-terminal domain of *Clostridium pasteurianum* hydrogenase. *Biochemistry* **37**:15974-80.

Atta, M., and J. Meyer. 2000. Characterization of the gene encoding the [Fe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochim Biophys Acta* **1476**:368-71.

Bahl, H., W. Andersch, and G. Gottschalk. 1982. Continuous production of acetone and butanol by *Clostridium acetobutylicum* in a two-stage phosphate limited chemostat. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **15**:201-205.

Bahl, H., M. Gottwald, A. Kuhn, V. Rale, W. Andersch, and G. Gottschalk. 1986. Nutritional Factors Affecting the Ratio of Solvents Produced by *Clostridium acetobutylicum*. *Appl*

Environ Microbiol **52**:169-172.

Ballongue, J., J. Amine, H. Petitdemange, and R. Gay. 1986. Enhancement of solvents production by *Clostridium acetobutylicum* cultivated on a reducing compounds depletive medium. Biomass. **10**:121-129.

Bennett, G. N., and F. B. Rudolph. 1995. The central metabolic pathway from acetyl-CoA to butyryl-CoA in *Clostridium acetobutylicum*. FEMS Microbiology Review **17**:241-249.

Berkessel, A. 2001. Activation of dihydrogen without transition metals. Curr Opin Chem Biol **5**:486-90.

Berkessel, A., and R.K. Thauer 1995. On the mechanism of catalysis by a metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: enzymatic transformation of H₂ without a metal and its analogy to the chemistry of alkanes in superacidic solution. Angew Chem **107**:2418-2421.

Berks, B. C., T. Palmer, and F. Sargent. 2003. The Tat protein translocation pathway and its role in microbial physiology. Adv Microb Physiol **47**:187-254.

Berks, B. C., F. Sargent, and T. Palmer. 2000. The Tat protein export pathway. Mol Microbiol **35**:260-74.

Berlier, Y., P. A. Lespinat, and B. Dimon. 1990. A gas chromatographic-mass spectrometric technique for studying simultaneous hydrogen-deuteron exchange and para-ortho-hydrogen conversion in hydrogenases of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. Anal Biochem **188**:427-31.

Bertini, I., A. Donaire, B. A. Feinberg, C. Luchinat, M. Piccioli, and H. Yuan. 1995. Solution structure of the oxidized 2[4Fe-4S] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Eur J Biochem **232**:192-205.

Bertrand, P., F. Dole, M. Asso, and B. Guigliarelli. 2000. Is there a rate-limiting step in the catalytic cycle of Ni-Fe hydrogenases? J Biol Inorg Chem **5**:682-91.

Bleijlevens, B., T. Buhrke, E. van der Linden, B. Friedrich, and S. P. Albracht. 2004. The auxiliary protein HypX provides oxygen tolerance to the soluble [NiFe]-hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16 by way of a cyanide ligand to nickel. J Biol Chem **279**:46686-91.

Blokesch, M., S. P. Albracht, B. F. Matzanke, N. M. Drapal, A. Jacobi, and A. Bock. 2004. The complex between hydrogenase-maturation proteins HypC and HypD is an intermediate in the supply of cyanide to the active site iron of [NiFe]-hydrogenases. J Mol Biol **344**:155-67.

Blokesch, M., and A. Bock. 2006. Properties of the [NiFe]-hydrogenase maturation protein HypD. FEBS Lett **580**:4065-8.

Blokesch, M., A. Paschos, E. Theodoratou, A. Bauer, M. Hube, S. Huth, and A. Bock. 2002. Metal insertion into NiFe-hydrogenases. Biochem Soc Trans **30**:674-80.

Bock, A., P. W. King, M. Blokesch, and M. C. Posewitz. 2006. Maturation of hydrogenases. Adv Microb Physiol **51**:1-71.

Boynton, Z. L., G. N. Bennett, and F. B. Rudolph. 1996. Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl Environ Microbiol **62**:2758-66.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem **72**:248-54.

Bradley, L. H., and R. P. Swenson. 1999. Role of glutamate-59 hydrogen bonded to N(3)H of the flavin mononucleotide cofactor in the modulation of the redox potentials of the *Clostridium beijerinckii* flavodoxin. Glutamate-59 is not responsible for the pH dependency but contributes to the

stabilization of the flavin semiquinone. *Biochemistry* **38**:12377-86.

Brazzolotto, X., J. K. Rubach, J. Gaillard, S. Gambarelli, M. Atta, and M. Fontecave. 2006. The [Fe-Fe]-hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* **281**:769-74.

Brereton, P. S., M. J. Maher, P. A. Tregloan, and A. G. Wedd. 1999. Investigation of the role of surface residues in the ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta* **1429**:307-16.

Brugna, M., M. T. Giudici-Ortoni, S. Spinelli, K. Brown, M. Tegoni, and M. Bruschi. 1998. Kinetics and interaction studies between cytochrome c3 and Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Proteins* **33**:590-600.

Bruschi, M., and F. Guerlesquin. 1988. Structure, function and evolution of bacterial ferredoxins. *FEMS Microbiol Rev* **4**:155-75.

Burnett, R. M., G. D. Darling, D. S. Kendall, M. E. LeQuesne, S. G. Mayhew, W. W. Smith, and M. L. Ludwig. 1974. The structure of the oxidized form of clostridial flavodoxin at 1.9-Å resolution. *J Biol Chem* **249**:4383-92.

Butt, J. N., M. Filipiak, and W. R. Hagen. 1997. Direct electrochemistry of *Megasphaera elsdenii* iron hydrogenase. Definition of the enzyme's catalytic operating potential and quantitation of the catalytic behaviour over a continuous potential range. *Eur J Biochem* **245**:116-22.

Buurman, G., S. Shima, and R. K. Thauer. 2000. The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett* **485**:200-204.

Cambillau, C., M. Frey, J. Mosse, F. Guerlesquin, and M. Bruschi. 1988. Model of a complex between the tetrahemic cytochrome c3 and the ferredoxin I from *Desulfovibrio desulfuricans* (Norway strain). *Proteins* **4**:63-70.

Cammack, R. 2001. The catalytic machinery. In Cammack R, Frey M, Robson R (eds): *Hydrogen as a fuel*:159-180.

Cammack, R. 1999. Hydrogenase sophistication. *Nature* **397**:214-215.

Cammack, R., D. S. Patil, E. C. Hatchikian, and V. M. Fernandez. 1987. Nickel and iron-sulfur centers in *Desulfovibrio gigas* hydrogenase: ESR spectra, redox properties and interactions. *Biochim Biophys Acta* **912**:98-109.

Cary, J. W., D. J. Petersen, E. T. Papoutsakis, and G. N. Bennett. 1990. Cloning and expression of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetoacetyl-coenzyme A : acetate/butyrate : coenzyme A-transferase in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **56**:1576-1583.

Casalot, L., and M. Rousset. 2001. Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *Trends Microbiol* **9**:228-237.

Chen, J. S., and D. K. Blanchard. 1979. A simple hydrogenase-linked assay for ferredoxin and flavodoxin. *Anal Biochem* **93**:216-22.

Chen, Z., B. J. Lemon, S. Huang, D. J. Swartz, J. W. Peters, and K. A. Bagley. 2002. Infrared studies of the CO-inhibited form of the Fe-only hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* I: examination of its light sensitivity at cryogenic temperatures. *Biochemistry* **41**:2036-43.

Cohen, J., K. Kim, P. King, M. Seibert, and K. Schulten. 2005b. Finding gas diffusion pathways in proteins: application to O₂ and H₂ transport in Cpl [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects. *Structure* **13**:1321-1329.

Cohen, J., K. Kim, M. Posewitz, M. L. Ghirardi, K. Schulten, M. Seibert, and P. King.

2005a. Molecular dynamics and experimental investigation of H(2) and O(2) diffusion in [Fe]-hydrogenase. *Biochem Soc Trans* **33**:80-82.

Cornillot, E., C. Croux, and P. Soucaille. 1997a. Physical and genetic map of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 chromosome. *J Bacteriol* **179**:7426-34.

Cornillot, E., R. V. Nair, E. T. Papoutsakis, and P. Soucaille. 1997b. The genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 reside on a large plasmid whose loss leads to degeneration of the strain. *J Bacteriol* **179**:5442-7.

Cornillot, E., and P. Soucaille. 1996. Solvent-forming genes in clostridia. *Nature* **380**:489.

Croux, C., V. Paquet, G. Goma, and P. Soucaille. 1990. Purification and characterization of acidolysin, an acidic metalloprotease produced by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **56**:3634-42.

Datta, R., and J. G. Zeikus. 1985. Modulation of Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation by Carbon Monoxide and Organic Acids. *Appl Environ Microbiol* **49**:522-529.

De Lacey, A. L., C. Stadler, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, H. J. Fan, S. Li, and M. B. Hall. 2002. IR spectroelectrochemical study of the binding of carbon monoxide to the active site of *Desulfovibrio fructosovorans* Ni-Fe hydrogenase. *J Biol Inorg Chem* **7**:318-26.

Dementin, S., V. Belle, P. Bertrand, B. Guigliarelli, G. Adryanczyk-Perrier, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, and C. Leger. 2006. Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in NiFe hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers. *J Am Chem Soc* **128**:5209-18.

Ding, H., and R. J. Clark. 2004. Characterization of iron binding in IscA, an ancient iron-sulphur cluster assembly protein. *Biochem J* **379**:433-40.

Doelle, H. W. 1975. *Bacterial metabolism*. 2nd ed. Academic Press, Inc., New York.

Dürre, P., R. J. Fischer, A. Kuhn, K. Lorenz, W. Schreiber, B. Sturzenhofecker, S. Ullmann, K. Winzer, and U. Sauer. 1995. Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*: catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. *FEMS Microbiol Rev* **17**:251-

Eitinger, T., and M. A. Mandrand-Berthelot. 2000. Nickel transport systems in microorganisms. *Arch Microbiol* **173**:1-9.

EIAntak, L., X. Morelli, O. Bornet, C. Hatchikian, M. Czjzek, A. Dolla, and F. Guerlesquin. 2003. The cytochrome c3-[Fe]-hydrogenase electron-transfer complex: structural model by NMR restrained docking. *FEBS Lett* **548**:1-4.

Erbes, D. L., and R. H. Burris. 1978. The kinetics of methyl viologen oxidation and reduction by the hydrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim Biophys Acta* **525**:45-54.

Eren, M., and R. P. Swenson. 1989. Chemical synthesis and expression of a synthetic gene for the flavodoxin from *Clostridium* MP. *J Biol Chem* **264**:14874-9.

Fauque, G., H. D. Peck, Jr., J. J. Moura, B. H. Huynh, Y. Berlier, D. V. DerVartanian, M. Teixeira, A. E. Przybyla, P. A. Lespinat, I. Moura, and et al. 1988. The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol Rev* **4**:299-344.

Fernandez, V. M., E. C. Hatchikian, D. S. Patil, and R. Cammack. 1986. ESR-detectable nickel and iron-sulphur centres in relation to the reversible activation of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase. *Biochim Biophys Acta* **883**:145-154.

Fischer, R. J., J. Helms, and P. Durre. 1993. Cloning, sequencing, and molecular analysis of

the sol operon of *Clostridium acetobutylicum*, a chromosomal locus involved in solventogenesis. J Bacteriol **175**:6959-69.

Fitzgerald, M. P., L. J. Rogers, K. K. Rao, and D. O. Hall. 1980. Efficiency of ferredoxins and flavodoxins as mediators in systems for hydrogen evolution. Biochem J **192**:665-72.

Florin, L., A. Tsokoglou, and T. Happe. 2001. A novel type of iron hydrogenase in the green alga *Scenedesmus obliquus* is linked to the photosynthetic electron transport chain. J Biol Chem **276**:6125-32.

Fontaine, L. 2001. Analyse fonctionnelle du mégaplasme pSOL1 de *Clostridium acetobutylicum* ATCC824: De la séquence à la caractérisation du rôle physiologique. Toulouse.

Fontaine, L., I. Meynial-Salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux, and P. Soucaille. 2002. Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J Bacteriol **184**:821-30.

Fontecilla-Camps, J. C., M. Frey, E. Garcin, C. Hatchikian, Y. Montet, C. Piras, X. Vernede, and A. Volbeda. 1997. Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? Biochimie **79**:661-6.

Forestier, M., P. King, L. Zhang, M. Posewitz, S. Schwarzer, T. Happe, M. L. Ghirardi, and M. Seibert. 2003. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. Eur J Biochem **270**:2750-8.

Frazzon, J., J. R. Fick, and D. R. Dean. 2002. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. Biochem Soc Trans **30**:680-5.

Frey, M. 2002. Hydrogenases: hydrogen-activating enzymes. Chembiochem **3**:153-60.

Garcin, E., X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1999. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. Structure **7**:557-66.

Geoghegan, S. M., S. G. Mayhew, G. N. Yalloway, and G. Butler. 2000. Cloning, sequencing and expression of the gene for flavodoxin from *Megasphaera elsdenii* and the effects of removing the protein negative charge that is closest to N(1) of the bound FMN. Eur J Biochem **267**:4434-44.

Gerischer, U., and P. Dürre. 1990. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the acetoacetate decarboxylase gene region from *Clostridium acetobutylicum*. J Bacteriol **172**:6907-18.

Ghirardi, M. L., P. W. King, M. C. Posewitz, P. C. Maness, A. Fedorov, K. Kim, J. Cohen, K. Schulten, and M. Seibert. 2005. Approaches to developing biological H₂-photoproducing organisms and processes. Biochem Soc Trans **33**:70-2.

Girbal, L., C. Croux, I. Vasconcelos, and P. Soucaille. 1995b. Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. FEMS Microbiol. Rev. **17**:287-297.

Girbal, L., I. Mortier-Barriere, F. Raynaud, C. Rouanet, C. Croux, and P. Soucaille. 2003. Development of a sensitive gene expression reporter system and an inducible promoter-repressor system for *Clostridium acetobutylicum*. Appl Environ Microbiol **69**:4985-8.

Girbal, L., and P. Soucaille. 1994. Regulation of *Clostridium acetobutylicum* metabolism as revealed by mixed-substrate steady-state continuous cultures: role of NADH/NAD ratio and ATP pool. J Bacteriol **176**:6433-8.

Girbal, L., and P. Soucaille. 1998. Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. Trends in biotechnology **16**:11-16.

Girbal, L., I. Vasconcelos, S. Saint-Amans, and P. Soucaille. 1995a. How neutral red modified carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH. *FEMS Microbiol Rev* **16**:151-162.

Girbal, L., I. Vasconcelos, and P. Soucaille. 1994. Transmembrane pH of *Clostridium acetobutylicum* is inverted (more acidic inside) when the in vivo activity of hydrogenase is decreased. *J Bacteriol* **176**:6146-7.

Girbal, L., G. Von Abendroth, M. Winkler, P. M. Benton, I. Meynial-Salles, C. Croux, J. W. Peters, T. Happe, and P. Soucaille. 2005. Homologous and heterologous overexpression in *Clostridium acetobutylicum* and characterization of purified clostridial and algal Fe-only hydrogenases with high specific activities. *Appl Environ Microbiol* **71**:2777-81.

Gorwa, M. F., C. Croux, and P. Soucaille. 1996. Molecular characterization and transcriptional analysis of the putative hydrogenase gene of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **178**:2668-75.

Graves, M. C., G. T. Mullenbach, and J. C. Rabinowitz. 1985. Cloning and nucleotide sequence determination of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:1653-7.

Green, E. M., and G. N. Bennett. 1996. Inactivation of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Biochem Biotechnol* **57-58**:213-21.

Grupe, H., and G. Gottschalk. 1992. Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *Appl Environ Microbiol* **58**:3896-3902.

Happe, R. P., W. Roseboom, G. Egert, C. G. Friedrich, C. Massanz, B. Friedrich, and S. P. Albracht. 2000b. Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett* **466**:259-63.

Happe, R. P., W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. Albracht, and K. A. Bagley. 1997. Biological activation of hydrogen. *Nature* **385**:126.

Happe, T., A. Hemschemeier, M. Winkler, and A. Kaminski. 2002. Hydrogenases in green algae: do they save the algae's life and solve our energy problems? *Trends Plant Sci* **7**:246-50.

Happe, T., B. Mosler, and J. D. Naber. 1994. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **222**:769-74.

Happe, T., and J. D. Naber. 1993. Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* **214**:475-81.

Happe, T., K. Schutz, and H. Bohme. 2000a. Transcriptional and mutational analysis of the uptake hydrogenase of the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *J Bacteriol* **182**:1624-31.

Hatchikian, C. E., A. S. Traore, V. M. Fernandez, and R. Cammack. 1990. Characterization of the nickel-iron periplasmic hydrogenase from *Desulfovibrio fructosovorans*. *Eur J Biochem* **187**:635-43.

Hatchikian, E. C., N. Forget, V. M. Fernandez, R. Williams, and R. Cammack. 1992. Further characterization of the [Fe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 7757. *Eur J Biochem* **209**:357-65.

Hatchikian, E. C., V. Magro, N. Forget, Y. Nicolet, and J. C. Fontecilla-Camps. 1999. Carboxy-terminal processing of the large subunit of [Fe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*

ATCC 7757. J Bacteriol **181**:2947-52.

He, S. H., M. Teixeira, J. LeGall, D. S. Patil, I. Moura, J. J. Moura, D. V. DerVartanian, B. H. Huynh, and H. D. Peck, Jr. 1989. EPR studies with ⁷⁷Se-enriched (NiFeSe) hydrogenase of *Desulfovibrio baculatus*. Evidence for a selenium ligand to the active site nickel. J Biol Chem **264**:2678-82.

Higuchi, Y., H. Ogata, K. Miki, N. Yasuoka, and T. Yagi. 1999. Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. Structure **7**:549-56.

Higuchi, Y., F. Toujou, K. Tsukamoto, and T. Yagi. 2000. The presence of a SO molecule in [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki as detected by mass spectrometry. J Inorg Biochem **80**:205-11.

Higuchi, Y., T. Yagi, and N. Yasuoka. 1997. Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. Structure **5**:1671-80.

Hoff, K. G., J. J. Silberg, and L. E. Vickery. 2000. Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **97**:7790-5.

Hube, M., M. Blokesch, and A. Bock. 2002. Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: role of accessory proteins HypA and HybF. J Bacteriol **184**:3879-85.

Janati-Idrissi, R., A. M. Junelles, A. el Kanouni, H. Petitdemange, and R. Gay. 1989. Pyruvate fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. Biochem Cell Biol **67**:735-9.

Jones, D. T., and D. R. Woods. 1986. Acetone-butanol fermentation revisited. Microbiol. Rev. **50**:484-524.

Jouanneau, Y., B. C. Kelley, Y. Berlier, P. A. Lespinat, and P. M. Vignais. 1980. Continuous monitoring, by mass spectrometry, of H₂ production and recycling in *Rhodospseudomonas capsulata*. J Bacteriol **143**:628-36.

Junelles, A. M., R. Janati-Idrissi, H. Petitdemange, and R. Gay. 1987. Effect of pyruvate on glucose metabolism in *Clostridium acetobutylicum*. Biochimie **69**:1183-90.

Jungermann, K., R. K. Thauer, E. Rupprecht, C. Ohrloff, and K. Decker. 1969. Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluverii*. FEBS Lett **3**:144-146.

Kaji, M., O. Matsushita, E. Tamai, S. Miyata, Y. Taniguchi, S. Shimamoto, S. Katayama, S. Morita, and A. Okabe. 2003. A novel type of DNA curvature present in a *Clostridium perfringens* ferredoxin gene: characterization and role in gene expression. Microbiology **149**:3083-91.

Kim, B. H., P. Bellows, R. Datta, and J. G. Zeikus. 1984. Control of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Fermentations: Utilization of Carbon Monoxide to Inhibit Hydrogen Production and to Enhance Butanol Yields. Appl Environ Microbiol **48**:764-770.

King, P. W., M. C. Posewitz, M. L. Ghirardi, and M. Seibert. 2006. Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. J Bacteriol **188**:2163-72.

Kleihues, L., O. Lenz, M. Bernhard, T. Buhrke, and B. Friedrich. 2000. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. J Bacteriol **182**:2716-24.

Knight, E., Jr., A. J. D'Eustachio, and R. W. Hardy. 1966. Flavodoxin: a flavoprotein with ferredoxin activity from *Clostridium pasteurianum*. Biochim Biophys Acta **113**:626-8.

- Knight, E., Jr., and R. W. Hardy.** 1966. Isolation and characteristics of flavodoxin from nitrogen-fixing *Clostridium pasteurianum*. *J Biol Chem* **241**:2752-6.
- Korbas, M., S. Vogt, W. Meyer-Klaucke, E. Bill, E. J. Lyon, R. K. Thauer, and S. Shima.** 2006. The iron-sulfur cluster-free hydrogenase (Hmd) is a metalloenzyme with a novel iron binding motif. *J Biol Chem* **281**:30804-13.
- Kovacs, K. L., L. C. Seefeldt, G. Tigy, C. M. Doyle, L. E. Mortenson, and D. J. Arp.** 1989. Immunological relationship among hydrogenases. *J Bacteriol* **171**:430-5.
- Kummerle, R., P. Kyritsis, J. Gaillard, and J. M. Moulis.** 2000. Electron transfer properties of iron-sulfur proteins. *J Inorg Biochem* **79**:83-91.
- Kutty, R., and G. N. Bennett.** 2007. Characterization of a novel ferredoxin with N-terminal extension from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Arch Microbiol* **187**:161-9.
- Kyritsis, P., J. G. Huber, I. Quinkal, J. Gaillard, and J. M. Moulis.** 1997. Intramolecular electron transfer between [4Fe-4S] clusters studied by proton magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **36**:7839-46.
- Lampen, J. O., and W. H. Peterson.** 1943. Growth factor requirements of Clostridia. *Arch. Biochem.* **2**:443-449.
- Lee, S. F., C. W. Forsberg, and L. N. Gibbins.** 1985a. Cellulolytic Activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **50**:220-228.
- Lee, S. F., C. W. Forsberg, and L. N. Gibbins.** 1985b. Xylanolytic Activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Environ Microbiol* **50**:1068-1076.
- Lee, S. Y., L. D. Mermelstein, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis.** 1992. Vector construction, transformation, and gene amplification in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Ann N Y Acad Sci* **665**:39-51.
- Liu, Z. P., and P. Hu.** 2002. A density functional theory study on the active center of Fe-only hydrogenase: characterization and electronic structure of the redox states. *J Am Chem Soc* **124**:5175-82.
- Ludwig, M. L., K. A. Patridge, A. L. Metzger, M. M. Dixon, M. Eren, Y. Feng, and R. P. Swenson.** 1997. Control of oxidation-reduction potentials in flavodoxin from *Clostridium beijerinckii*: the role of conformation changes. *Biochemistry* **36**:1259-80.
- Lyon, E. J., S. Shima, R. Boecher, R. K. Thauer, F. W. Grevels, E. Bill, W. Roseboom, and S. P. Albracht.** 2004. Carbon monoxide as an intrinsic ligand to iron in the active site of the iron-sulfur-cluster-free hydrogenase H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase as revealed by infrared spectroscopy. *J Am Chem Soc* **126**:14239-48.
- Lyon, E. J., S. Shima, G. Buurman, S. Chowdhuri, A. Batschauer, K. Steinbach, and R. K. Thauer.** 2004. UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. *Eur J Biochem* **271**:195-204.
- Maldonado, S., A. Lostao, M. P. Irun, J. Fernandez-Recio, C. Gustavo Genzor, E. Begona Gonzalez, J. A. Rubio, A. Luquita, F. Daoudi, and J. Sancho.** 1998. Apoflavodoxin: structure, stability, and FMN binding. *Biochimie* **80**:813-20.
- Marczak, R., J. Ballongue, H. Petitdemange, and R. Gay.** 1984. Regulation of the biosynthesis of NADH-Rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*. *Current Microbiology* **10**:165 - 168.
- Marczak, R., J. Ballongue, H. Petitdemange, and R. Gay.** 1985. Differential levels of

ferredoxin and rubredoxin in *Clostridium acetobutylicum*. *Biochimie* **67**:241-8.

Marczak, R., H. Petitdemange, F. Alimi, J. Ballongue, and R. Gay. 1983. [Effect of growth phase and composition of the medium on the rate of biosynthesis of NADH: rubredoxin oxidoreductase in *Clostridium acetobutylicum*]. *C R Seances Acad Sci III* **296**:469-74.

Matias, P. M., C. M. Soares, L. M. Saraiva, R. Coelho, J. Morais, J. Le Gall, and M. A. Carrondo. 2001. [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3. *J Biol Inorg Chem* **6**:63-81.

McGlynn, S. E., S. S. Ruebush, A. Naumov, L. E. Nagy, A. Dubini, P. W. King, J. B. Broderick, M. C. Posewitz, and J. W. Peters. 2007. In vitro activation of [FeFe] hydrogenase: new insights into hydrogenase maturation. *J Biol Inorg Chem* **12**:443-7.

Meinecke, B., J. Bertram, and G. Gottschalk. 1989. Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch Microbiol* **152**:244-50.

Melis, A., and T. Happe. 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* **127**:740-8.

Mermelstein, L. D., and E. T. Papoutsakis. 1993. In vivo methylation in *Escherichia coli* by the *Bacillus subtilis* phage phi 3T I methyltransferase to protect plasmids from restriction upon transformation of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **59**:1077-81.

Mermelstein, L. D., N. E. Welker, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis. 1992. Expression of cloned homologous fermentative genes in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Biotechnology (N Y)* **10**:190-5.

Meyer, C. L., and E. T. Papoutsakis. 1989a. Continuous and biomass recycle fermentations of *Clostridium acetobutylicum*, part 1: ATP supply and demand determines product selectivity. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **4**:1-10.

Meyer, C. L., and E. T. Papoutsakis. 1989b. Increased levels of ATP and NADH are associated with increased solvent production in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**:450-459.

Meyer, J. 2001. Ferredoxins of the third kind. *FEBS Lett* **509**:1-5.

Meyer, J. 2007. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* **64**:1063-84.

Meyer, J., and J. Gagnon. 1991. Primary structure of hydrogenase I from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **30**:9697-704.

Montet, Y., P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. J. Field, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1997. Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol* **4**:523-6.

Morelli, X., M. Czjzek, C. E. Hatchikian, O. Bornet, J. C. Fontecilla-Camps, N. P. Palma, J. J. Moura, and F. Guerlesquin. 2000a. Structural model of the Fe-hydrogenase/cytochrome c553 complex combining transverse relaxation-optimized spectroscopy experiments and soft docking calculations. *J Biol Chem* **275**:23204-10.

Morelli, X., A. Dolla, M. Czjzek, P. N. Palma, F. Blasco, L. Krippahl, J. J. Moura, and F. Guerlesquin. 2000b. Heteronuclear NMR and soft docking: an experimental approach for a structural model of the cytochrome c553-ferredoxin complex. *Biochemistry* **39**:2530-7.

Morelli, X., and F. Guerlesquin. 1999. Mapping the cytochrome c553 interacting site using ¹H and ¹⁵N NMR. *FEBS Lett* **460**:77-80.

Moulis, J. M., and V. Davasse. 1995. Probing the role of electrostatic forces in the interaction of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin with its redox partners. *Biochemistry* **34**:16781-8.

Moulis, J. M., V. Davasse, and F. De Jesus. 1994. Characteristic features of the heterologous functional synthesis in *Escherichia coli* of a 2[4Fe-4S] ferredoxin. *Biometals* **7**:272-8.

Moulis, J. M., and J. Meyer. 1982. Characterization of the selenium-substituted 2 [4Fe-4Se] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*. *Biochemistry* **21**:4762-71.

Muralidhara, B. K., M. Chen, J. Ma, and P. Wittung-Stafshede. 2005. Effect of inorganic phosphate on FMN binding and loop flexibility in *Desulfovibrio desulfuricans* apo-flavodoxin. *J Mol Biol* **349**:87-97.

Muralidhara, B. K., and P. Wittung-Stafshede. 2005. FMN binding and unfolding of *Desulfovibrio desulfuricans* flavodoxin: "hidden" intermediates at low denaturant concentrations. *Biochim Biophys Acta* **1747**:239-50.

Nagy, L. E., J. E. Meuser, S. Plummer, M. Seibert, M. L. Ghirardi, P. W. King, D. Ahmann, and M. C. Posewitz. 2007. Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel [FeFe]-hydrogenase libraries. *Biotechnol Lett* **29**:421-30.

Nair, R. V., G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis. 1994. Molecular characterization of an aldehyde/alcohol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *J Bacteriol* **176**:871-85.

Nair, R. V., E. M. Green, D. E. Watson, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis. 1999. Regulation of the sol locus genes for butanol and acetone formation in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 by a putative transcriptional repressor. *J Bacteriol* **181**:319-30.

Nair, R. V., and E. T. Papoutsakis. 1994. Expression of plasmid-encoded aad in *Clostridium acetobutylicum* M5 restores vigorous butanol production. *J Bacteriol* **176**:5843-6.

Nicolet, Y., C. Cavazza, and J. C. Fontecilla-Camps. 2002. Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. *J Inorg Biochem* **91**:1-8.

Nicolet, Y., A. L. de Lacey, X. Vernede, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, and J. C. Fontecilla-Camps. 2001. Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Am Chem Soc* **123**:1596-601.

Nicolet, Y., B. J. Lemon, J. C. Fontecilla-Camps, and J. W. Peters. 2000. A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. *Trends Biochem Sci* **25**:138-43.

Nicolet, Y., C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, and J. C. Fontecilla-Camps. 1999. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* **7**:13-23.

Niviere, V., S. L. Wong, and G. Voordouw. 1992. Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a beta-lactamase fusion protein. *J Gen Microbiol* **138**:2173-83.

Nolling, J., G. Breton, M. V. Omelchenko, K. S. Makarova, Q. Zeng, R. Gibson, H. M. Lee, J. Dubois, D. Qiu, J. Hitti, Y. I. Wolf, R. L. Tatusov, F. Sabathe, L. Doucette-Stamm, P. Soucaille, M. J. Daly, G. N. Bennett, E. V. Koonin, and D. R. Smith. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *J Bacteriol* **183**:4823-38.

Olson, J. W., and R. J. Maier. 2000. Dual roles of *Bradyrhizobium japonicum* nickelin protein in nickel storage and GTP-dependent Ni mobilization. *J Bacteriol* **182**:1702-5.

Oxelfelt, F., P. Tamagnini, and P. Lindblad. 1998. Hydrogen uptake in *Nostoc* sp. strain PCC 73102. Cloning and characterization of a hupSL homologue. *Arch Microbiol* **169**:267-74.

Oxford, A. E., J. O. Lampen, and W. H. Peterson. 1940. Growth factor and other nutritional requirements of the acetone butanol organism, *Clostridium acetobutylicum*. *Biochem J* **34**:1588-97.

Papoutsakis, E. T. 1984. Equations and calculations for fermentations of butyric acid bacteria. *Biotechnol. Bioeng.* **26**:174-187.

Parkin, A., C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps, and F. A. Armstrong. 2006. Electrochemical investigations of the interconversions between catalytic and inhibited states of the [FeFe]-hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Am Chem Soc* **128**:16808-15.

Paschos, A., A. Bauer, A. Zimmermann, E. Zehelein, and A. Bock. 2002. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J Biol Chem* **277**:49945-51.

Paschos, A., R. S. Glass, and A. Bock. 2001. Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett* **488**:9-12.

Patzer, S. I., and K. Hantke. 1999. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:3307-9.

Peguín, S., and P. Soucaille. 1995. Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition. *Appl Environ Microbiol* **61**:403-405.

Pershad, H. R., J. L. Duff, H. A. Heering, E. C. Duin, S. P. Albracht, and F. A. Armstrong. 1999. Catalytic electron transport in *Chromatium vinosum* [NiFe]-hydrogenase: application of voltammetry in detecting redox-active centers and establishing that hydrogen oxidation is very fast even at potentials close to the reversible H⁺/H₂ value. *Biochemistry* **38**:8992-9.

Peters, J. W. 1999. Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Curr Opin Struct Biol* **9**:670-6.

Peters, J. W., W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, and L. C. Seefeldt. 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* **282**:1853-8.

Peters, J. W., R. K. Szilagyí, A. Naumov, and T. Douglas. 2006. A radical solution for the biosynthesis of the H-cluster of hydrogenase. *FEBS Lett* **580**:363-7.

Petersen, D. J., and G. N. Bennett. 1990. Purification of acetoacetate decarboxylase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and cloning of the acetoacetate decarboxylase gene in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **56**:3491-8.

Petersen, D. J., and G. N. Bennett. 1991. Cloning of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetyl coenzyme A acetyltransferase (thiolase; EC 2.3.1.9) gene. *Appl Environ Microbiol* **57**:2735-41.

Petersen, D. J., J. W. Cary, J. Vanderleyden, and G. N. Bennett. 1993. Sequence and arrangement of genes encoding enzymes of the acetone-production pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. *Gene* **123**:93-7.

Petersen, D. J., R. W. Welch, K. A. Walter, L. D. Mermelstein, E. T. Papoutsakis, F. B. Rudolph, and G. N. Bennett. 1991. Cloning of an NADH-dependent butanol dehydrogenase gene from *Clostridium acetobutylicum*. *Ann N Y Acad Sci* **646**:94-8.

Petitdemange, H., H. Blusson, and R. Gay. 1981. Detection of NAD(P)H--rubredoxin oxidoreductases in Clostridia. *Anal Biochem* **116**:564-70.

Pierik, A. J., M. Hulstein, W. R. Hagen, and S. P. Albracht. 1998. A low-spin iron with CN and CO as intrinsic ligands forms the core of the active site in [Fe]-hydrogenases. *Eur J Biochem* **258**:572-8.

Pierik, A. J., W. Roseboom, R. P. Happe, K. A. Bagley, and S. P. Albracht. 1999. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J Biol Chem* **274**:3331-7.

Pilak, O., B. Mamat, S. Vogt, C. H. Hagemeyer, R. K. Thauer, S. Shima, C. Vorrhein, E. Warkentin, and U. Ermler. 2006. The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. *J Mol Biol* **358**:798-809.

Posewitz, M. C., P. W. King, S. L. Smolinski, L. Zhang, M. Seibert, and M. L. Ghirardi. 2004. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem* **279**:25711-20.

Przybyla, A. E., J. Robbins, N. Menon, and H. D. Peck, Jr. 1992. Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **8**:109-35.

Quinkal, I., V. Davasse, J. Gaillard, and J. M. Moulis. 1994. On the role of conserved proline residues in the structure and function of *Clostridium pasteurianum* 2[4Fe-4S] ferredoxin. *Protein Eng* **7**:681-7.

Ragsdale, S. W., and L. G. Ljungdahl. 1984. Characterization of ferredoxin, flavodoxin, and rubredoxin from *Clostridium formicoaceticum* grown in media with high and low iron contents. *J Bacteriol* **157**:1-6.

Reith, J. H., R. H. Wijffels, and H. Barten. 2003. Bio-methan and Bio-hydrogen: Status and perspectives of biological methan and hydrogen production. Eds Reith J.H., Wijffels R.H. and Barten H.

Rogers, L. J., and G. A. Sykes. 1990. Conformational changes in *Chondrus crispus* flavodoxin on dissociation of FMN and reconstitution with flavin analogues. *Biochem J* **272**:775-9.

Rogers, P. 1986. Genetics and biochemistry of *Clostridium* relevant to development of fermentation processes. *Adv. Appl. Microbiol.* **31**:1-60.

Rosano, C., S. Zuccotti, M. Bucciattini, M. Stefani, G. Ramponi, and M. Bolognesi. 2002. Crystal structure and anion binding in the prokaryotic hydrogenase maturation factor HypF acylphosphatase-like domain. *J Mol Biol* **321**:785-96.

Roseboom, W., M. Blokesch, A. Bock, and S. P. Albracht. 2005. The biosynthetic routes for carbon monoxide and cyanide in the Ni-Fe active site of hydrogenases are different. *FEBS Lett* **579**:469-72.

Rousset, M., Y. Montet, B. Guigliarelli, N. Forget, M. Asso, P. Bertrand, J. C. Fontecilla-Camps, and E. C. Hatchikian. 1998. [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11625-30.

Rubach, J. K., X. Brazzolotto, J. Gaillard, and M. Fontecave. 2005. Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermatoga maritima*. *FEBS Lett* **579**:5055-60.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Sambrook, J., and D. W. Russell. 1989. *The condensed protocols from Molecular cloning: a laboratory manual*.

Santangelo, J. D., D. T. Jones, and D. R. Woods. 1991. Metronidazole activation and isolation of *Clostridium acetobutylicum* electron transport genes. *J Bacteriol* **173**:1088-95.

Sargent, F., S. P. Ballantine, P. A. Rugman, T. Palmer, and D. H. Boxer. 1998a. Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit--identification of a soluble precursor of the small subunit in a hypB mutant. *Eur J Biochem* **255**:746-54.

Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, and T. Palmer. 1998b. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. *Embo J* **17**:3640-50.

Sauer, U., and P. Dürre. 1995. Differential induction of genes related to solvent formation during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture of *Clostridium acetobutylicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**:115-120.

Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert, and P. J. Kiley. 2001. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:14895-900.

Sebban-Kreuzer, C., M. Blackledge, A. Dolla, D. Marion, and F. Guerlesquin. 1998a. Tyrosine 64 of cytochrome c553 is required for electron exchange with formate dehydrogenase in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Biochemistry* **37**:8331-40.

Sebban-Kreuzer, C., L. Blanchard, B. Bersch, M. J. Blackledge, D. Marion, A. Dolla, and F. Guerlesquin. 1998b. 1H-NMR study of the structural influence of Y64 substitution in *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough cytochrome c553. *Eur J Biochem* **251**:787-94.

Shima, S., E. J. Lyon, M. Sordel-Klippert, M. Kauss, J. Kahnt, R. K. Thauer, K. Steinbach, X. Xie, L. Verdier, and C. Griesinger. 2004. The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase hmd: structure of the light-inactivation product. *Angew Chem Int Ed Engl* **43**:2547-51.

Shima, S., and R. K. Thauer. 2007. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem Rec* **7**:37-46.

Sofia, H. J., G. Chen, B. G. Hetzler, J. F. Reyes-Spindola, and N. E. Miller. 2001. Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res* **29**:1097-106.

Soni, B. K., P. Soucaille, and G. Goma. 1987. Continuous acetone butanol fermentation: influence of vitamins on the metabolic activity of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **27**:1-5.

Stephenson, M., and L. H. Stickland. 1931. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen: The properties of the enzyme. *Biochem J* **25**:205-14.

Stim-Herndon, K. P., D. J. Petersen, and G. N. Bennett. 1995. Characterization of an acetyl-CoA C-acetyltransferase (thiolase) gene from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene* **154**:81-5.

Swenson, R. P., and G. D. Krey. 1994. Site-directed mutagenesis of tyrosine-98 in the flavodoxin from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough): regulation of oxidation-reduction properties of the bound FMN cofactor by aromatic, solvent, and electrostatic interactions. *Biochemistry* **33**:8505-14.

Takahashi, Y., and U. Tokumoto. 2002. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**:28380-3.

Tanka, M., M. Haniu, F. Yasunobu, and S. G. Mayhew. 1974. The amino acid sequence of the *Clostridium* MP flavodoxin. *J Biol Chem* **249**:4393-6.

Thauer, R. K., K. Jungermann, and K. Decker. 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* **41**:100-80.

Thauer, R. K., B. Kaufer, M. Zahringer, and K. Jungermann. 1974. The reaction of the iron-sulfur protein hydrogenase with carbon monoxide. *Eur J Biochem* **42**:447-52.

Thauer, R. K., A. R. Klein, and G. C. Hartmann. 1996. Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem Rev* **96**:3031-3042.

Theodoratou, E., R. Huber, and A. Bock. 2005. [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. *Biochem Soc Trans* **33**:108-11.

Tomas, C. A., K. V. Alsaker, H. P. Bonarius, W. T. Hendriksen, H. Yang, J. A. Beamish, C. J. Paredes, and E. T. Papoutsakis. 2003. DNA array-based transcriptional analysis of asporogenous, nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* strains SKO1 and M5. *J Bacteriol* **185**:4539-47.

Valentine, R. C. 1964. Bacterial Ferredoxin. *Bacteriol Rev* **28**:497-517.

Van der Spek, T. M., A. F. Arendsen, R. P. Happe, S. Yun, K. A. Bagley, D. J. Stufkens, W. R. Hagen, and S. P. Albracht. 1996. Similarities in the architecture of the active sites of Ni-hydrogenases and Fe-hydrogenases detected by means of infrared spectroscopy. *Eur J Biochem* **237**:629-34.

Van Dijk, C., H. J. Grande, S. G. Mayhew, and C. Veeger. 1980. Properties of the hydrogenase of *Megaspheera elsdenii*. *Eur J Biochem* **107**:251-61.

Vasconcelos, I., L. Girbal, and P. Soucaille. 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *J Bacteriol* **176**:1443-50.

Verhagen, M. F., T. W. O'Rourke, A. L. Menon, and M. W. Adams. 2001. Heterologous expression and properties of the gamma-subunit of the Fe-only hydrogenase from *Thermotoga maritima*. *Biochim Biophys Acta* **1505**:209-19.

Vignais, P. M., B. Billoud, and J. Meyer. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol Rev* **25**:455-501.

Vignais, P. M., and A. Colbeau. 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol* **6**:159-88.

Vincent, K. A., A. Parkin, O. Lenz, S. P. Albracht, J. C. Fontecilla-Camps, R. Cammack, B. Friedrich, and F. A. Armstrong. 2005. Electrochemical definitions of O₂ sensitivity and oxidative inactivation in hydrogenases. *J Am Chem Soc* **127**:18179-89.

Volbeda, A., M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* **373**:580-7.

Volbeda, A., J. C. Fontecilla-Camps, and M. Frey. 1996. Novel metal sites in protein structures. *Curr Opin Struct Biol* **6**:804-12.

Volbeda, A., L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Roseboom, S. P. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, and J. C. Fontecilla-Camps. 2005. Structural differences between the ready and unready oxidized states of [NiFe] hydrogenases. *J Biol Inorg Chem* **10**:239-49.

Vollherbst-Schneck, K., J. A. Sands, and B. S. Montencourt. 1984. Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol* **47**:193-4.

Voordouw, G. 1990. Hydrogenase genes in *Desulfovibrio*. In J. P. Belaich, M. Bruschi and J.L. Garcia (ed.), Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer.:37-41.

Voordouw, G. 1992. Evolution of hydrogenase genes. Adv. Inorg. Chem. **38**:397-422.

Voordouw, G., and S. Brenner. 1985. Nucleotide sequence of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough). Eur J Biochem **148**:515-20.

Voordouw, G., W. R. Hagen, K. M. Kruse-Wolters, A. van Berkel-Arts, and C. Veeger. 1987. Purification and characterization of *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) hydrogenase expressed in *Escherichia coli*. Eur J Biochem **162**:31-6.

Voordouw, G., J. E. Walker, and S. Brenner. 1985. Cloning of the gene encoding the hydrogenase from *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) and determination of the NH₂-terminal sequence. Eur J Biochem **148**:509-14.

Walsh, M. A., A. McCarthy, P. A. O'Farrell, P. McArdle, P. D. Cunningham, S. G. Mayhew, and T. M. Higgins. 1998. X-ray crystal structure of the *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough) apoflavodoxin-riboflavin complex. Eur J Biochem **258**:362-71.

Walter, K. A., G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis. 1992. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. J Bacteriol **174**:7149-58.

Walter, K. A., R. V. Nair, J. W. Cary, G. N. Bennett, and E. T. Papoutsakis. 1993. Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Gene **134**:107-11.

Waterson, R. M., F. J. Castellino, G. M. Hass, and R. L. Hill. 1972. Purification and characterization of cottonase from *Clostridium acetobutylicum*. J Biol Chem **247**:5266-71.

Welch, R. W., F. B. Rudolph, and E. T. Papoutsakis. 1989. Purification and characterization of the NADH-dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824). Arch Biochem Biophys **273**:309-18.

Weyer, E. R., and L. F. Rettger. 1927. A Comparative Study Of Six Different Strains Of The Organism Commonly Concerned In Large-Scale Production Of Butyl Alcohol And Acetone By The Biological Process. J Bacteriol **14**:399-424.

Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph, and E. T. Papoutsakis. 1988. Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents. Appl Environ Microbiol **54**:2717-2722.

Wiesenborn, D. P., F. B. Rudolph, and E. T. Papoutsakis. 1989. Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. Appl Environ Microbiol **55**:323-9.

Winkler, M., B. Heil, B. Heil, and T. Happe. 2002. Isolation and molecular characterization of the [Fe]-hydrogenase from the unicellular green alga *Chlorella fusca*. Biochim Biophys Acta **1576**:330-4.

Winzer, K., K. Lorenz, B. Zickner, and P. Dürre. 2000. Differential regulation of two thiolase genes from *Clostridium acetobutylicum* DSM 792. J Mol Microbiol Biotechnol **2**:531-41.

Wu, L. F., and M. A. Mandrand. 1993. Microbial hydrogenases: primary structure, classification, signatures and phylogeny. FEMS Microbiol Rev **10**:243-69.

Yagi, T., M. Tsuda, and H. Inokuchi. 1973. Kinetic studies on hydrogenase. Para-hydrogen /

ortho-hydrogen conversion and hydrogen-deuterium exchange reactions. J Biochem (Tokyo) **73**:1069-81.

Zheng, L., V. L. Cash, D. H. Flint, and D. R. Dean. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. J Biol Chem **273**:13264-72.

Zhou, T., Y. Mo, A. Liu, Z. Zhou, and K. R. Tsai. 2004. Enzymatic mechanism of Fe-only hydrogenase: density functional study on H-H making/breaking at the diiron cluster with concerted proton and electron transfers. Inorg Chem **43**:923-30.

Zirngibl, C., R. Hedderich, and R. K. Thauer. 1990. N5, N10-Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. FEBS Lett **261**:112-116.

Zirngibl, C., W. Van Dongen, B. Schworer, R. Von Bunau, M. Richter, A. Klein, and R. K. Thauer. 1992. H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. Eur J Biochem **208**:511-20.

Titre de la thèse : Etude des relations structure-fonctions de l'hydrogénase à fer de *Clostridium acetobutylicum* avec ses partenaires d'oxydo-réduction

Résumé de la thèse :

Source d'énergie renouvelable et non polluante, le biohydrogène connaît un intérêt croissant. En culture continue sur glucose, la productivité d'hydrogène la plus élevée est réalisée par la bactérie anaérobie *Clostridium acetobutylicum* avec 2,4 litres d'hydrogène produit l⁻¹ h⁻¹. Cette production d'hydrogène est catalysée par la [FeFe]-hydrogénase HydA.

Pour comprendre et améliorer les capacités de ce micro-organisme pour la production d'hydrogène, nous avons voulu caractériser les relations structure-fonctions de HydA avec ses partenaires d'oxydo-réduction.

Par homologie avec l'hydrogénase à fer I de *Clostridium pasteurianum*, les centres [4Fe-4S] FS4C et [2Fe-2S] FS2, situés en surface de la protéine, pourraient être impliqués dans le transfert inter-moléculaire d'électrons entre HydA et ses partenaires d'oxydo-réduction. Notre objectif a alors été de déterminer l'implication de FS4C et FS2 dans ce transfert.

Pour cela, des mutations par substitutions d'acides aminés et par délétions de domaines ont été effectuées au niveau de FS4C et FS2. Pour palier des problèmes d'instabilité des hydrogénases à fer native et modifiées, le protocole de purification a été amélioré. L'hydrogénase native a nettement été stabilisée, mais l'instabilité persistante des hydrogénases modifiées est restée une limitation importante pour leur caractérisation catalytique. La perte d'activité des hydrogénases modifiées a pu être corrélée à une perte importante de fonctionnalité de leur site actif et à un nombre d'atomes de fer incorporés inférieur à la valeur théorique.

Les partenaires physiologiques d'oxydo-réduction de HydA chez *C. acetobutylicum*, la ferrédoxine CAC0303 et la flavodoxine, ont été purifiés. Le profil catalytique complet et les paramètres cinétiques des activités de consommation et de production d'hydrogène de HydA native avec différents partenaires d'oxydo-réduction ont été déterminés. L'amélioration du protocole de purification a permis d'augmenter significativement les activités de consommation et production d'hydrogène. Nous avons confirmé la préférence *in vitro* de HydA à catalyser la consommation de l'hydrogène par rapport à la production. Une valeur très élevée de k_{cat} a été obtenue avec le substrat artificiel, méthyl viologène, en consommation d'hydrogène. Cela semble indiquer que le méthyl viologène pourrait interagir plus ou moins directement avec le site actif de l'enzyme, en évitant le transfert intra-moléculaire d'électrons.

Des efficacités catalytiques élevées de consommation et de production de l'hydrogène ont été obtenues avec le méthyl viologène (sauf sous sa forme réduite), la ferrédoxine et la flavodoxine. Ce résultat reflète le haut potentiel de HydA pour les réactions liées à l'hydrogène, potentiel conservé aussi bien pour ses partenaires redox physiologiques qu'artificiel. Ainsi, en condition de croissance en carence en fer, la substitution de la ferrédoxine par la flavodoxine ne serait pas une limitation pour l'activité hydrogénase *in vivo*.

MOTS-CLES : Hydrogénase ; *Clostridium acetobutylicum* ; Centre fer-soufre ; Hydrogène.

Thesis title : Study of the structure-functions relationship of the iron-only hydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* with its redox partners

Thesis summary :

The biological production of hydrogen, a "clean" energy carrier, has recently aroused a great interest. The most efficient reported micro-organism for hydrogen production from hexose is the anaerobic bacterium *Clostridium acetobutylicum* with a chemostat production of $2.4 \text{ l H}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, catalyzed by the HydA [FeFe]-hydrogenase.

In order to understand and improve *C. acetobutylicum* hydrogen potentialities, we have attempted to characterize the structure-function relationships of HydA with its redox partners.

By homology with the [FeFe]-hydrogenase of *Clostridium pasteurianum*, the [4Fe-4S] FS4C and [2Fe-2S] FS2 clusters located on the protein surface were predicted to be involved in the inter-molecular electron transfer between HydA and its redox partners. Our goal was to determine the implication of the FS4C and FS2 clusters in this transfer.

To do so, mutagenesis by amino acid substitutions and domain deletions was performed on FS4C and FS2. In order to stabilize native and modified hydrogenases, the purification protocol was improved. Native hydrogenase was successfully stabilized, while the persisting instability of modified hydrogenase was an obstacle of their catalytic characterization. Decreased activity of modified hydrogenases was due to a loss of active site functionality and to a lower iron content than the theoretical value.

The physiological redox partners of HydA, ferredoxine CAC0303 and flavodoxin, were purified. The complete catalytic profile of HydA and its kinetic parameter with different redox partners for hydrogen uptake and hydrogen production were determined. The optimized purification protocol led to a significant increase of both hydrogen uptake and hydrogen production activities. We confirmed that the *in vitro* hydrogen uptake was more favourable than the hydrogen production. A very high k_{cat} was determined with the artificial substrate methyl viologen for the hydrogen uptake activity. This result might indicate that methyl viologen could be prone to interact more or less directly with the active site, shunting the intra-molecular electron transfer chain.

High catalytic efficiencies for both H_2 uptake and H_2 production activities were observed with either artificial (except for reduced methyl viologen) and physiological redox partners. This result reflects the high potential of HydA for hydrogen-related activities which is conserved with three different electron carriers. Hence, in iron-limited growth conditions, the *in vivo* substitution of ferredoxin by flavodoxin might not be a limitation for *in vivo* hydrogenase activity.

KEY-WORDS : Hydrogenase ; *Clostridium acetobutylicum* ; Iron-sulfur center ; Hydrogen.