



HAL
open science

Etude structure-fonction de l'hydrogénase à fer et ingénierie du métabolisme de l'hydrogène chez *Clostridium acetobutylicum*

Charles Gauquelin

► **To cite this version:**

Charles Gauquelin. Etude structure-fonction de l'hydrogénase à fer et ingénierie du métabolisme de l'hydrogène chez *Clostridium acetobutylicum*. Biochimie [q-bio.BM]. INSA de Toulouse, 2017. Français. NNT : 2017ISAT0018 . tel-01713620

HAL Id: tel-01713620

<https://theses.hal.science/tel-01713620>

Submitted on 20 Feb 2018

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.

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par :

Charles Gauquelin

le lundi 9 octobre 2017

Titre :

Etude structure-fonction de l'hydrogénase à fer et ingénierie du métabolisme de l'hydrogène chez *Clostridium acetobutylicum*

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unité de recherche :

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

Directeur/trice(s) de Thèse :

Isabelle Meynial-Salles

Jury :

Philippe Soucaille, Professeur des Universités, Toulouse

Gilles Peltier, Chercheur CEA, Cadarache

Mohamed Atta, Chercheur CEA, Grenoble

Laurent Cournac, Directeur de Recherche, Dakar

Sébastien Dementin, Chargé de Recherche, Marseille

Isabelle Meynial-Salles, Professeur des Universités, Toulouse

Remerciements

Je tiens à remercier premièrement le Professeur Isabelle Meynial-Salles de m'avoir accueilli au sein de l'équipe EAD3 et d'avoir encadré mes travaux. Merci encore de m'avoir permis d'apprendre autant !

Je tiens à remercier le Professeur Philippe Soucaille pour avoir suivi attentivement ces recherches ; merci pour tous vos conseils, vos idées et pour toutes ces discussions passionnantes.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir pris le temps de juger mon travail. Merci pour toutes vos remarques et vos conseils très enrichissants.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel du LISBP et en particulier tous mes collègues de l'EAD3 qui m'ont permis de passer des moments forts agréables : Christian, Simon, JSO, Céline, Minyeong, Thao, Maily, Emma, Lizeth, Célia, Maya, Liang, Antoine, Damien, Sylvain, Nicolas, Guillaume, Xie, Cécile, et tous les autres...

Merci à toutes les personnes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler précédemment, vous avez su à chaque fois nourrir mon intérêt pour la recherche.

Merci à tous mes amis rencontrés au fil des années, c'est toujours un plaisir de vous retrouver !

Merci à ma famille pour leur soutien indéfectible tout au long de cette thèse !

Merci à Iridium, « *Le plus petit des félins est une œuvre d'art* » Leonard de Vinci

Merci à Emilie, pour toutes les aventures que nous avons vécues ensemble et pour toutes celles qui nous reste à partager, je t'aime !

Résumé

L'hydrogène gazeux est une source d'énergie particulièrement attractive. A l'heure actuelle, les systèmes de bio-production de dihydrogène sont peu développés mais pourraient permettre de s'affranchir de l'utilisation des énergies fossiles. Parmi ces systèmes la fermentation bactérienne, pourrait être utilisée. La bactérie *Clostridium acetobutylicum* est étudiée depuis de nombreuses années du fait de ses capacités naturelles à produire des solvants et du dihydrogène. Chez cette bactérie, la production de dihydrogène est catalysée par des hydrogénases, enzymes impliquées dans l'oxydation de la ferrédoxine réduite, qui permet la réduction des protons et la formation du gaz. Parmi les différentes classes d'hydrogénases, les hydrogénases à fer ([Fe-Fe] hydrogénases) sont très majoritairement impliquées dans la réduction des protons. Toutes les enzymes partagent un domaine protéique très conservé (le Domaine H), hébergeant le site catalytique inorganique (le Cluster H). L'enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum*, possède également le Domaine F contenant en tous quatre centres fer-soufre dits accessoires. Au cours de ces travaux, l'implication des centres fer-soufre du Domaine F sur les capacités catalytiques de l'enzyme a été étudiée, ainsi que les mécanismes de transfert d'électrons entre l'enzyme et son partenaire physiologique d'oxydoréduction principal : la ferrédoxine 2[4Fe-4S].

Les conditions de purification de l'enzyme CaHydA ont tout d'abord été optimisées, permettant ainsi l'obtention d'enzymes hautement purifiées sans formation de formes dégradées. Un nouveau système d'expression hétérologue de la ferrédoxine 2[4Fe-4S] de *C. acetobutylicum* a été développé et a conduit à l'obtention de grande quantité de ferrédoxine dont la qualité a été validée de points de vue biophysique et biochimique. Différents variants ciblés de l'hydrogénase ont été créés, produits puis purifiés afin de les caractériser par une combinaison de méthodes biochimiques, électrochimiques, spectroscopiques et de modélisation moléculaire. Ceci a permis de mettre en évidence pour la première fois l'implication des centres fer-soufre accessoires du Domaine F dans les capacités catalytiques de l'enzyme. Enfin, il a été démontré que le centre [2Fe-2S] de surface FS2 de l'enzyme était le point d'entrée des électrons provenant de la ferrédoxine réduite. Par ailleurs, une approche ayant pour but de développer une souche ingénierée de *C. acetobutylicum* dont la croissance serait dépendante d'une hydrogénase mutée capable d'interagir dans les conditions physiologiques et donc utilisable pour le criblage *in vivo* d'hydrogénases variantes a été développée. Une telle souche a été construite mais sa caractérisation physiologique a montré qu'elle ne pouvait pas être finalement utilisée comme l'outil recherché ; en effet des mécanismes inattendus d'adaptation métabolique de la bactérie *C. acetobutylicum* ont été mis en évidence conduisant à l'obtention d'une souche capable de croître sans aucune activité hydrogénase.

Abstract

Hydrogen is a promise full energy source. Systems for bioproduction of dihydrogen are poorly developed but could make it possible to avoid of the use of fossil fuels. The bacterium *Clostridium acetobutylicum* has been studied for many years due of its ability to produce solvents and dihydrogen. The hydrogenase catalyses the oxydation of reduced ferredoxin, leading to reduction of protons and dihydrogen formation. Among the three different classes of hydrogenases, the [Fe-Fe] Hydrogenases harbor a very conserved domain (H-Domain) containing the inorganic catalytic site (Cluster H). CaHydA from *C. acetobutylicum* possesses, in addition, the F-Domain containing four accessory iron-sulfur clusters. The involvement of accessory iron-sulfur cluster of F-Domain on the catalytic capacities of the enzyme has never been assessed. Moreover, which of the two surface iron-sulfur cluster of the F-Domain who interacts with the physiological redox partner ferredoxin is unknown.

CaHydA purification conditions have first been optimized, leading to the production of reproducible great amount of purified enzymes. Secondly, a new system for heterologous production of 2[4Fe-4S] ferredoxin in *E. coli* has been developed and led to the purification of a biochemically and biophysically validated ferredoxin. Different CaHydA mutants enzymes, modified in the Fe-S cluster composition of the F-Domain have been purified, and spectroscopically, biochemically and electrochemically characterized. These mutants enzymes, impaired in their catalytic activity both in solution and wired to an electrode, suggested, for the first time that the Fe-S clusters of the F-Domain have a long-range thermodynamic effect on the H-cluster and modulate enzyme's functions. Moreover, it has been shown, and confirmed by molecular modelling, that the [2Fe-2S] surface cluster FS2 of the enzyme is the entry point for the electrons coming from the reduced ferredoxin.

Besides, an approach has been developed to engineer a *C. acetobutylicum* strain that can be used for the *in vivo* screening of mutated hydrogenases capable of interacting under physiological conditionsto sustain the growth of a *C. acetobutylicum* strain. This strain has been successfully obtain but could not be used as intended; indeed, its physiological and genetic characterization revealed an unexpected mechanism of metabolic adaptation of the bacterium *C. acetobutylicum* leading to the selection of a strain capable of growing without any hydrogenase activity, which was never described before.

Table des matières

INTRODUCTION.....	11
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	16
1.1. La bactérie <i>Clostridium acetobutylicum</i>	16
1.1.1. Introduction	16
1.1.2. <i>Clostridium acetobutylicum</i>	16
1.1.3. Métabolisme	17
1.1.3.1. Métabolisme primaire	18
1.1.3.2. Voies métaboliques de production	19
1.1.3.2.1. La réaction phosphoroclastique	19
1.1.3.2.2. La voie du métabolisme intermédiaire	20
1.1.3.3. La voie de production des acides	24
1.1.3.3.1. La voie de l'acétate	24
1.1.3.3.2. La voie du butyrate.....	24
1.1.3.4. La voie de production des solvants	25
1.1.3.4.1. La production des alcools	25
1.1.3.4.2. La production de l'acétone.....	27
1.1.2.5. La production de lactate, d'acétoïne et de glycérol	27
1.1.3.5. Métabolisme énergétique	28
1.1.3.5.1. Protéines et enzymes du flux électronique.....	28
1.1.3.5.2. Induction de la solvantogénèse.....	29
1.1.4. Métabolisme de l'azote.....	30
1.2. Biosynthèse des centres fer-soufre.....	34
1.2.1. Introduction	34
1.2.2. Voies de biosynthèse des centres fer-soufre	35
1.2.2.1. Le système ISC	35
1.2.2.2. Le système SUF	38
1.2.2.3. La régulation des systèmes.....	39
1.2.3. Particularités des systèmes de biosynthèses chez les clostridies et chez <i>C. acetobutylicum</i>	40
1.3. Les ferrédoxines	43
1.3.1. Introduction	43
1.3.2. Classification des ferrédoxines.....	43
1.3.2.1. Ferrédoxines contenant des centres [2Fe-2S]	43
1.3.2.2. Ferrédoxines contenant des centres [4Fe-4S]	45
1.3.2.2.1. Phylogénie des ferrédoxines bactériennes	45
1.3.2.2.2. Ferrédoxine bactérienne type.....	46
1.3.2.3. Autres protéines de transfert d'électrons.....	49
1.3.2.3.1. Protéines de Rieske.....	49
1.3.2.3.2. HIPIPs	49
1.3.2.3.3. Rubredoxine.....	49
1.4. Les hydrogénases	52
1.4.1. Introduction	52
1.4.2. Classification.....	53
1.4.3. Hydrogénases sans centre fer-soufre	53
1.4.4. Hydrogénases à nickel-fer.....	54
1.4.4.1. Site et cycle catalytique	55
1.4.4.2. Voies de transfert d'électrons	57
1.4.4.3. Diversité des [NiFe] hydrogénases.....	58
1.4.4.4. Maturation des [NiFe] hydrogénases.....	62

1.4.5.	Les hydrogénases à fer	64
1.4.5.1.	Introduction	64
1.4.5.2.	Classification, diversité et phylogénie des [Fe-Fe] hydrogénases	65
1.4.5.3.	Evolution structurale des [Fe-Fe] hydrogénases	67
1.4.5.4.	L'hydrogénase à fer CaHydA de <i>Clostridium acetobutylicum</i>	69
1.4.5.4.1.	Structure Globale	69
1.4.5.4.2.	Domaine H et site catalytique	71
1.4.5.4.3.	Cycle catalytique	72
1.4.5.4.4.	Environnement du Cluster H.....	75
1.4.5.4.5.	Cystéine 298	76
1.4.5.4.6.	Voie de transfert des protons	77
1.4.5.4.7.	Voie de transfert du dihydrogène.....	78
1.4.5.4.8.	Sensibilité à l'oxygène	79
1.4.5.4.9.	Domaine F et centres fer-soufre accessoires	80
1.4.5.5.	Maturation des hydrogénases	84
1.4.5.5.1.	Introduction.....	84
1.4.5.5.2.	Les différentes protéines de maturation.....	85
1.4.5.5.2.1.	HydF	85
1.4.5.5.2.2.	HydG.....	86
1.4.5.5.2.3.	HydE	87
1.4.5.5.3.	Mécanisme global de maturation des [FeFe] hydrogénases	87
1.4.5.5.4.	Maturation <i>in vitro</i>	89
1.4.6.	Caractérisation des hydrogénases	90
1.4.6.1.	Caractérisation biochimique	90
1.4.6.2.	Electrochimie directe des protéines.....	92
1.4.6.3.	Caractérisation spectroscopique	92
2.	MATERIEL ET METHODES.....	97
2.1.	Souches et plasmides utilisés	97
2.2.	Milieux de cultures et conditions de croissance	97
2.2.1.	Conservation des souches	97
2.2.2.	Conditions de croissance	98
2.2.3.	Milieux de culture.....	99
2.2.3.1.	Milieux de culture pour <i>E. coli</i>	99
2.2.3.1.1.	Conditions de culture pour l'expression de la ferrédoxine recombinante.....	100
2.2.3.2.	Milieux de culture pour <i>C. acetobutylicum</i>	100
2.2.3.2.1.	Cultures sur milieu solide et milieu liquide.....	100
2.2.3.2.2.	Cultures discontinues en bioréacteur	101
2.3.	Techniques de génie génétique	102
2.3.1.	Préparation d'ADN plasmidique	102
2.3.2.	Techniques de clonage	102
2.3.3.	Amplification de fragments d'ADN par réactions de PCR	103
2.3.4.	Table des oligonucléotides utilisés	104
2.3.5.	Transformation de souches <i>E. coli</i> par choc thermique	104
2.3.6.	Transformation de souches <i>C. acetobutylicum</i> Δ CA_C1502	104
2.3.7.	Constructions plasmidiques.....	105
2.3.7.1.	pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP.....	105
2.3.7.2.	pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP	105
2.3.7.3.	Construction des plasmides des enzymes variants de CaHydA	106
2.3.7.4.	Enzymes chimériques	106
2.4.	Méthodes de biochimie.....	107
2.4.1.	Préparation des extraits acellulaires.....	107

2.4.2.	Récolte anaérobie des cellules.....	107
2.4.2.1.	Récolte anaérobie des cellules de culture <i>E. coli</i>	107
2.4.2.2.	Récolte anaérobie des cellules à partir du fermenteur.....	107
2.4.3.	Purification des hydrogénases.....	107
2.4.3.1.	Protocole initial.....	107
2.4.3.2.	Adaptation du protocole de purification.....	108
2.4.3.3.	Protocole final.....	108
2.4.4.	Purification de la ferrédoxine.....	108
2.4.5.	Analyse des protéines.....	109
2.4.5.1.	Concentration en protéines.....	109
2.4.5.2.	Analyse sur gel de polyacrylamide.....	109
2.4.5.2.1.	Préparation des échantillons.....	109
2.4.5.2.2.	Analyse en conditions SDS-PAGE.....	110
2.4.5.2.3.	Western-Blot.....	111
2.4.5.3.	Analyse par Spectrophotométrie en ultra-violet.....	112
2.4.5.4.	Dosage des atomes de fer.....	112
2.4.5.5.	Analyse des protéines par dichroïsme circulaire.....	112
2.4.6.	Tests d'activités.....	112
2.4.6.1.	Test d'activité de consommation du dihydrogène.....	112
2.4.6.2.	Tests d'activité de production du dihydrogène.....	114
2.4.6.3.	Réaction d'échange proton-deutérium.....	116
2.4.6.4.	Dosage des activités enzymatiques par electrochimie directe.....	116
2.4.6.5.	Tests de l'activité enzymatique de la thiolase.....	116
2.5.	Dosage des produits de fermentation.....	117
2.6.	Bio-informatique.....	117
2.7.	Modélisation moléculaire.....	118
3.	RESULTATS.....	120
3.1.	Conception et synthèse des variants de l'hydrogénase à fer de <i>C. acetobutylicum</i> et d'hydrogénases chimériques.....	122
3.1.1.	Introduction.....	122
3.1.2.	Hydrogénases variants des centres fer-soufre.....	123
3.1.3.	Enzymes chimériques.....	127
3.1.3.1.	Chimère HydX_1.....	127
3.1.3.2.	Chimère HydX_3.....	129
3.2.	Purification de l'enzyme CaHydA de <i>C. acetobutylicum</i>	133
3.2.1.	Introduction.....	133
3.2.2.	Système d'expression et de purification initial.....	133
3.2.3.	Identifications des sources de variation des activités spécifiques.....	133
3.2.4.	Amélioration du système de production, extraction et purification.....	136
3.2.5.	Conclusion.....	139
3.3.	Production et purification de la ferrédoxine de <i>C. acetobutylicum</i>	142
3.3.1.	Introduction.....	142
3.3.2.	Construction d'une souche <i>E. coli</i> pour la production de ferrédoxine en anaérobiose stricte.....	142
3.3.2.1.	Souche <i>E. coli</i> BL21 DE3 Δ iscR::Kana Codon+ + pET21c_CAC0303_ST.....	142
3.3.2.2.	Souche <i>E. coli</i> MG1655 Δ iscR::Kana <i>pthI_Fd-LL-C-Tag</i>	143
3.3.3.	Résultats.....	144

3.3.3.1.	Purification de la ferrédoxine Fd-LL-C-Tag	144
3.3.3.2.	Validation de la fonctionnalité de la ferrédoxine Fd-LL-C-Tag.....	145
3.4.	Caractérisation des variants de l'enzyme.....	150
3.4.1.	Introduction	150
3.4.2.	Purifications et tests d'activité	150
3.4.2.1.	L'hydrogénase HydA_ΔDA.....	150
3.4.2.2.	L'hydrogénase HydA_C100A	151
3.4.2.3.	L'hydrogénase HydA_C48A	152
3.4.2.4.	L'hydrogénase HydA_H93C	153
3.4.2.5.	L'hydrogénase HydA_ΔFS2	154
3.4.2.6.	L'hydrogénase HydX_1	156
3.4.3.	Rôle du Domaine F chez les hydrogénases à fer	158
3.4.3.1.	Repliement des protéines et dosage du fer.....	158
3.4.3.2.	Spectres UV-visible	160
3.4.3.3.	Caractérisation électrochimique	161
3.4.3.4.	Activité des enzymes en solution	163
3.4.3.4.1.	Activité de consommation et de production du dihydrogène	163
3.4.3.4.2.	Activités d'échange proton/deutérium en solution.....	164
3.4.3.4.3.	Voies de transfert des protons.	165
3.4.4.	Paramètres cinétiques des différents variants de l'enzyme et interactions avec les partenaires d'oxydoréduction physiologiques et artificiels	168
3.4.4.1.	Enzyme HydA_ΔDA et impact du Domaine F	170
3.4.4.2.	Interaction avec le partenaire rédox physiologique : la ferrédoxine	171
3.4.4.3.	Biais catalytique.....	173
3.4.5.	Modélisation moléculaire et interaction avec les partenaires d'oxydoréduction	174
3.4.5.1.	Méthyl viologène.....	174
3.4.5.2.	Ferrédoxine.....	177
3.4.6.	Conclusion	179
3.5.	Dessin, conception et développement d'une souche de <i>C. acetobutylicum</i> dont la croissance est dépendante de la surexpression de l'hydrogénase	182
3.5.1.	Introduction	182
3.5.2.	Stratégie et conception de la souche	182
3.5.3.	Résultats.....	184
3.5.3.1.	Construction de la souche-outil de criblage	184
3.5.3.2.	Utilisation et validation de l'outil de criblage	185
3.5.3.3.	Tests d'activités des enzymes.....	187
3.5.3.4.	Contrôle de la souche-outil.....	188
3.5.3.4.1.	Profils de fermentation des différentes souches.....	188
3.5.3.4.2.	Tests 5-FU.....	188
3.5.3.4.3.	Tests d'activité thiolase	191
3.5.3.5.	Profils produits de la nouvelle souche	192
3.5.4.	Conclusion	194
CONCLUSION GENERALE		198
LISTE DES ABREVIATIONS		219
ANNEXES.....		227
Gènes des enzymes chimériques		227
Cartes des plasmides		228

Introduction

Introduction

L'hydrogène est l'atome le plus abondant de l'univers, cependant, sous forme de gaz (dihydrogène), il n'est retrouvé qu'à l'état de traces dans l'atmosphère terrestre (0,5 ppm). Le dihydrogène (H_2) est un gaz très léger, possédant une température d'ébullition très basse de $-252,76\text{ °C}$. Sa capacité calorifique est environ deux fois supérieure à celle du gaz naturel et trois fois supérieure à celle de l'essence, ce qui en fait une source d'énergie particulièrement attractive.

A l'heure actuelle, près de la moitié de la production de dihydrogène mondiale est réalisée par vaporeformage de gaz naturel, ce qui demeure la méthode la plus employée [1]. En réalité, ce procédé permet d'obtenir un mélange de gaz qui contient majoritairement du dihydrogène mais aussi du monoxyde de carbone (CO) et du dioxyde de carbone (CO_2). Il est également possible d'obtenir du dihydrogène, retrouvé sous forme de mélange, appelé gaz de synthèse (« syngas »), par oxydation partielle d'hydrocarbures. Le dihydrogène peut aussi être produit par électrolyse de l'eau, utilisant alors un courant électrique comme source d'énergie, mais nécessite l'utilisation de platine, très couteux, comme catalyseur métallique.

Actuellement, plus de la moitié de la production de dihydrogène est utilisée pour la synthèse d'ammoniac (NH_3), ensuite employé dans la synthèse d'engrais [1]. Le dihydrogène est également utilisé pour le raffinage et la désulfuration des hydrocarbures. Seule une très faible proportion du dihydrogène produit est actuellement utilisée comme source d'énergie, et de manière encore confidentielle dans les piles à combustibles ou sous forme liquide comme carburant dans l'aéronautique.

Il existe cependant des systèmes de bio-production de dihydrogène permettant de s'affranchir de l'utilisation des énergies fossiles, qui peuvent opérer en présence (« photofermentation ») ou en l'absence de lumière. Depuis les années 1990, les systèmes de photofermentation sont basés sur l'utilisation de l'algue verte photosynthétique *C. reinhardtii*, qui dans des conditions de carences en soufre réalise la production de dihydrogène à la place de dioxygène. Cependant, la production de dihydrogène par fermentation bactérienne est décrite depuis une centaine d'année. Parmi ces micro-organismes, la bactérie *Clostridium*

acetobutylicum est décrite comme une des bactéries les plus performante capable de produire du dihydrogène en chemostat à une productivité élevée de $2.4 \text{ L H}_2\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ [2].

La bactérie anaérobie *C. acetobutylicum*, largement utilisée pour ses capacités naturelles à produire des solvants durant la Première Guerre Mondiale, possède un métabolisme particulier. En effet, cette bactérie est naturellement capable de synthétiser du dihydrogène, de l'éthanol, du butanol et de l'acétone. Chez cette bactérie, comme chez les micro-algues, la production de dihydrogène est catalysée par des hydrogénases, enzymes impliquées dans l'oxydation de la ferrédoxine réduite, qui permet la réduction des protons et la formation du gaz.

Les hydrogénases à fer ([Fe-Fe] hydrogénases) sont très majoritairement impliquées dans la réduction des protons. Toutes ces enzymes partagent une structure commune comprenant un domaine protéique très conservé, hébergeant le site catalytique inorganique et des domaines protéiques comprenant des centres fer-soufre dits accessoires. L'enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum*, de type M3 [3], possède trois domaines protéiques contenant en tout quatre centres fer-soufre accessoires ; parmi toutes les [Fe-Fe] hydrogénases, elle est décrite comme l'enzyme possédant la plus forte activité de production de dihydrogène mesurée *in vitro* [4].

A l'heure actuelle, l'étude des [Fe-Fe] hydrogénases est principalement centrée sur la sensibilité à l'oxygène de ces enzymes [5], qui reste l'inconvénient majeur à leurs applications biotechnologiques à grande échelle. Des travaux sont également réalisés pour comprendre les mécanismes permettant la maturation de ces enzymes ou pour mettre en lumière les voies de transfert des protons, nécessaires aux activités catalytiques. Toutefois, l'étude des mécanismes de transferts d'électrons entre la ferrédoxine et l'hydrogénase de *C. acetobutylicum*, de même que l'implication des centres fer-soufre accessoires dans les performances catalytiques de l'enzyme restent peu explorés.

L'objectif des travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat est donc d'améliorer la compréhension des mécanismes de transfert d'électrons au sein de cette enzyme. Les études réalisées se focalisent d'une part sur le transfert d'électrons

intramoléculaire qui implique les centres fer-soufre accessoires présents au sein de l'enzyme et d'autre part, sur le transfert intermoléculaire avec le partenaire physiologique d'oxydoréduction principal : la ferrédoxine 2[4Fe-4S].

La stratégie développée pour mener à bien cette étude a été de concevoir, par mutagenèse dirigée, des variants cibles de l'hydrogénase. Une fois produites et purifiées, l'ensemble des enzymes sont caractérisées par une combinaison de méthodes biochimiques, électrochimiques et de modélisation moléculaire et leurs caractéristiques sont comparées à celles de l'hydrogénase native CaHydA de *C. acetobutylicum*. A cette approche classique de conception de variants ciblés, des enzymes chimériques composées de domaines protéiques venant de deux organismes différents, enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum* et enzyme CrHydA1 de *C. reinhardtii*, ont été construites. Enfin, afin de caractériser biochimiquement, l'ensemble de ces enzymes avec le partenaire physiologique, une stratégie de production et de purification de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] de *C. acetobutylicum* a été réalisée.

En parallèle de cette approche biochimique, une approche ayant pour but de développer une souche utilisable pour le criblage *in vivo* d'hydrogénases mutées capables d'interagir dans les conditions physiologiques afin d'assurer la croissance de la bactérie a été mise en œuvre.

Ce manuscrit de thèse, qui rend compte de l'ensemble des travaux réalisés, est organisé en trois parties :

Le premier chapitre est une étude bibliographique reprenant les connaissances actuelles sur le métabolisme de la bactérie *C. acetobutylicum*, mettant en lumière l'importance de l'hydrogénase dans les capacités de production de cet organisme. Après avoir évoqué la biosynthèse des centres fer-soufre et les ferrédoxines, les hydrogénases, en particulier les [Fe-Fe] hydrogénases, sont décrites.

Le deuxième chapitre rend compte du matériel biologique utilisé et des différentes techniques, de biologie moléculaire, de biochimie, d'enzymologie et de modélisation moléculaire, mises en place lors des expérimentations.

Enfin, le troisième chapitre détaille les résultats obtenus qui concernent la conception, la purification et la caractérisation des enzymes étudiées (enzyme sauvage et variants). Une nouvelle méthode de purification de la ferrédoxine est décrite. Les résultats obtenus lors du développement et de l'utilisation d'une souche de *C. acetobutylicum* pour le criblage d'enzymes sont également présentés.

Etude Bibliographique

La bactérie *Clostridium acetobutylicum*

1. Etude bibliographique

1.1. La bactérie *Clostridium acetobutylicum*

1.1.1. Introduction

Les membres du genre *Clostridium*, appartenant au phylum des firmicutes, sont des bactéries à gram positif anaérobies strictes. Les cellules végétatives ont la forme de bâtonnets et possèdent des flagelles. Ces bactéries sont également capables de générer des spores supportant des conditions extrêmes de pH et de température.

Il existe des espèces pathogènes (*C. perfringens*, *C. difficile*) et certaines espèces sont capables de sécréter des toxines responsables de maladies telles que le botulisme ou le tétanos (*C. botulinum* et *C. tetani*, respectivement). Certaines clostridies acétogènes (*C. ljungdahlii*) sont aussi capables d'utiliser la voie de Wood-Ljungdahl pour la fixation du dioxyde de carbone (CO₂) [6].

D'autres espèces, ne présentant pas de caractère pathogène, sont capables de produire des solvants d'intérêt industriel tels que le butanol ou l'acétone à partir de substrats carbonés. C'est le cas par exemple des espèces *Clostridium beijerinckii*, *C. pasteurianum* et *C. acetobutylicum*.

1.1.2. *Clostridium acetobutylicum*

La souche type *C. acetobutylicum* ATCC 824, présente dans la nature au niveau de certains sols et dans de nombreux végétaux, a suscité l'intérêt grâce à ses propriétés solvantogènes. En effet, à la suite des travaux de Chaim Weizmann, cet organisme a largement été utilisé pour la production d'acétone, intervenant dans la fabrication de cordite, explosif utilisé lors de la première Guerre Mondiale.

La taille de la bactérie varie entre 2,4 x 0,6 µm et 4,7 x 0,9 µm en fonction de la souche considérée. Les spores, plus petites, sont facilement identifiables au microscope de par leur réfringence. Thermorésistants et tolérants à l'oxygène, ces spores peuvent germer après de longues périodes de latence, lorsque l'environnement redevient favorable à la croissance.

Le génome de la souche *C. acetobutylicum* ATCC 824 a été entièrement séquencé [7], il est composé d'un chromosome de 3,94 Mb et d'un méga-plasmide de 192 kb (appelé pSOL) qui contient une majorité de gènes responsables de la production de solvants [8]. Ce génome a la particularité de contenir une faible teneur en bases G-C (31%) [7].

La bactérie *C. acetobutylicum* est capable de métaboliser de nombreuses sources carbonées mais n'est pas capable de réduire le sulfate ni de métaboliser la cellulose cristalline. Deux composés sont nécessaires à sa croissance sur un milieu synthétique : l'acide para-aminobenzoïque et la biotine (Vitamine B₈). Sa température optimale de croissance est d'environ 35°C.

1.1.3. Métabolisme

Dans des conditions de culture discontinue, à pH non régulé, la souche *C. acetobutylicum* présente un métabolisme biphasique : une première phase appelée « acidogénèse » où sont produits les acides (acétate et butyrate) est suivie d'une phase appelée « solvantogénèse » où sont produits majoritairement les solvants (acétone, butanol et éthanol). La phase acidogène est caractérisée par une croissance rapide, avec un rapport de gaz produits $H_2/CO_2 > 1$, où la production des acides organiques permet la production d'ATP mais entraîne une diminution du pH du milieu de culture des cellules. Cette baisse de pH entraîne ensuite une inhibition de la croissance, le milieu de culture est alors dé-toxifié grâce à une consommation des acides (acétate et butyrate) précédemment produits, associée à la production des solvants. : acétone, butanol et éthanol à un ratio 3:6:1 Durant cette phase de solvantogénèse, la croissance est quasi-nulle et le pH du milieu de culture augmente légèrement. A la fin de la phase stationnaire, une sporulation des cellules est observée, permettant d'obtenir un état de dormance du microorganisme.

En conditions de cultures continues (chemostats), il est possible de maintenir la souche dans différents états physiologiques stables, en modulant le pH du milieu de culture et la source de carbone : phase d'acidogénèse à pH 6,5 et phase de solvantogénèse à pH 4,4 lors de la croissance sur glucose. Par ailleurs, il est possible de maintenir les cellules en phase d'alcoologénèse, où il y a une grande disponibilité en nucléotides réduits (NADH et NADPH). La production d'éthanol et de butanol est observée mais sans production d'acétone. L'état d'alcoologénèse peut être obtenue de différentes façon : croissance à pH 6.6 sur glucose et glycérol (source de carbone d'avantage réduite que le glucose) [9] ou par limitation l'activité hydrogénase. La diminution de l'activité *in vivo* de l'hydrogénase peut être obtenue de différentes manières : augmentation de la pression partielle en hydrogène, ajout

de monoxyde de carbone, croissance en conditions de limitation en fer, ajout de methyl viologène ou de rouge neutre [10].

1.1.3.1. Métabolisme primaire

Les hexoses (le plus souvent du glucose) sont dégradés par la voie d'Embden-Meyerhorf-Parnas (voie de la glycolyse), une mole d'hexose conduit à la formation de deux moles de pyruvate avec formation de deux moles d'ATP et de deux moles de NADH.

Trois enzymes particulièrement importantes sont impliquées. La glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (Gapdh) convertit le glycéraldéhyde 3-phosphate en 1,3-biphosphoglycérate avec production de deux moles de NADH. La phosphoglycérate kinase (Pgc) transforme le 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate avec production d'une mole d'ATP et la pyruvate kinase (Pyk) convertit enfin le phosphoénolpyruvate en pyruvate avec production d'une mole d'ATP (Figure 1).

Les pentoses sont dégradés par la voie des pentoses-phosphate ; après transformation des sucres en pentoses 5-phosphate, ceux-ci sont convertis via une transaldolase et une transacétolase, en fructose 6-phosphate et glycéraldéhyde 3-phosphate pour rejoindre la voie de la glycolyse.

Par ailleurs, il existe une voie métabolique l'utilisation du glycérol comme source de carbone. Le glycérol est d'abord phosphorylé par une glycérol kinase qui permet la formation de glycérol-3-phosphate qui est ensuite converti en dihydroxyacétone phosphate (Dhap) avec formation de NADH. Le Dhap peut ensuite être isomérisé en glyceraldéhyde 3-phosphate pour entrer dans la voie d'Embden-Meyerhorf-Parnas. Toutefois, il est à noter que la souche sauvage de *C. acetobutylicum* est incapable de croître avec le glycérol comme unique source de carbone, en effet, l'excès de NADH produit est trop important pour être pris en charge par le métabolisme [9].

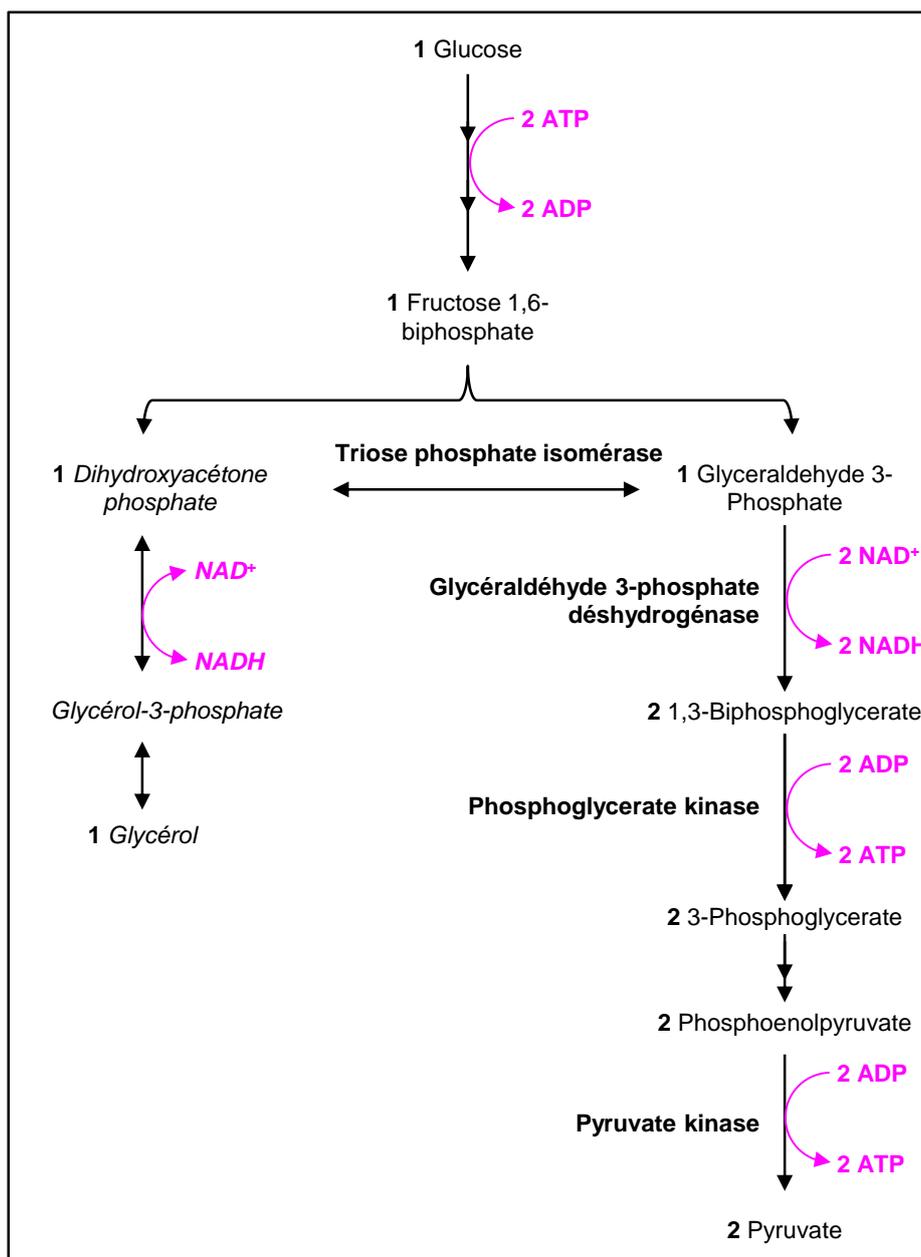


Figure 1: Schéma simplifié de la voie de la glycolyse, mettant également en évidence la voie d'utilisation possible du glycérol comme source de carbone. Lors de la croissance sur glucose uniquement ; la voie de la glycolyse permet la formation de 2 ATP et de 2 NADH. La voie d'utilisation du glycérol comme source de carbone est représentée en italique car ce substrat ne peut pas être utilisé seul.

1.1.3.2. Voies métaboliques de production

1.1.3.2.1. La réaction phosphoroclastique

Le pyruvate issu de la glycolyse subit une décarboxylation oxydative pour former de l'acétyl-CoA, de la ferrédoxine réduite et du dioxyde de carbone. Cette réaction, catalysée par la pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) doit nécessairement être couplée à une autre réaction permettant la régénération de la ferrédoxine

oxydée. La Pfor principale de *C. acetobutylicum* (codée par le gène CA_C2229 [11]) a été purifiée et caractérisée. Chaque sous unité de l'homodimère possède une masse de 123 kDa, contient 0.39 mole de TPP (thiamine pyrophosphate) et un centre [4Fe-4S]. Les *Km* pour le pyruvate et le coenzyme A sont de l'ordre du micromolaire [12].

Cependant, la régénération de la ferrédoxine oxydée doit ensuite être réalisée.

En phase d'acidogénèse, ce couplage est réalisé en grande majorité avec l'hydrogénase HydA catalysant alors la production de dihydrogène ; en phase de solvantogénèse, la ferrédoxine réduite est réoxydée majoritairement via des ferrédoxine NAD(P)⁺-réductase pour la production de nucléotides réduits (Figure 2).

1.1.3.2.2. La voie du métabolisme intermédiaire

L'acétylCoA est le métabolite charnière sur lequel vont se brancher les voies métaboliques permettant la production des acides et des solvants (Figure 2). Le métabolisme intermédiaire, qui permet la formation de butyryl-CoA à partir de l'acétyl-CoA fait intervenir quatre enzymes : la thiolase, la β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase, la crotonase et la butyryl-CoA déshydrogénase.

La thiolase (Acétyl-CoA acétyltransférase, ThI) est l'enzyme clé du métabolisme intermédiaire, cette enzyme permet la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA. L'activité de cette enzyme va distribuer le flux de carbone vers les composés à deux carbones (acétate et éthanol), à trois carbones (acétone) ou à quatre carbones (butyrate et butanol). Chez *C. acetobutylicum*, on retrouve deux gènes codant pour des thiolases, toutefois seule l'activité liée à l'expression du gène *thIA* (CA_C2873) est physiologiquement impliquée dans le métabolisme [13]. Cette enzyme est essentielle pour les cellules et il a été démontré que l'inactivation de ce gène est impossible [14].

La thiolase (ThI) est une enzyme homo-tétramerique composée de quatre sous-unités de 44 kDa chacune [15,16]. L'implication dans l'activité de cette enzyme, de certains domaines ou résidus particuliers, a pu être mise en évidence. Il existe un domaine en forme de boucle impliqué dans la liaison au CoASH, les résidus Cys88, Cys378 et His348 sont impliqués dans l'activité catalytique et les résidus Arg133,

His156 et Gly222 sont impliqués dans la sensibilité au CoA-SH [13] ; l'enzyme étant normalement inhibée par des concentrations de CoA-SH de l'ordre du micromolaire. Il a été montré que, de façon surprenante, le K_m apparent de la thiolase pour l'acétoacétyl-CoA (0,032 mM lors de la réaction de thiolase) était environ dix fois plus faible que le K_m apparent pour l'acétyl-CoA (0,27 mM lors de la réaction de condensation). De plus, la réaction de condensation est défavorable d'un point de vue thermodynamique [17], ceci implique la nécessité de réaction permettant de déplacer l'équilibre en faveur de la production d'acétoacétyl-CoA *in vivo* .

En phase d'acidogénèse, la thiolase entraîne la production de butyrate ; l'acétyl-CoA est alors moins disponible pour la phosphotransacétylase impliquée dans la production d'acétate. L'activité de la thiolase entraîne donc des variations dans le niveau d'énergie disponible pour la cellule (production d'une mole d'ATP par mole d'acétyl-CoA lors de la production d'acétate qui est diminué par deux lors de la production de butyrate) [16].

Le principal mécanisme de régulation de cette enzyme est considéré comme étant le rapport relatif entre l'acétyl-CoA et le CoA-SH, qui est pour ce dernier, inhibiteur de l'enzyme. Le pH ne semble pas être un élément de régulation de la thiolase, cependant le niveau d'activité de la thiolase est deux fois supérieur en phase de solvantogénèse par rapport à la phase d'acidogénèse [16] ; et cette enzyme est aussi impliquée dans la re-consommation des acides puisqu'elle influence le niveau d'acétoacétyl-CoA disponible pour la CoA-transférase.

Récemment, la résolution de la structure de la thiolase de *C. acetobutylicum* dans différents états rédox a montré que cette enzyme était régulée, par les conditions oxydantes ou réductrices des cellules, à travers un mécanisme de bascule entre deux états, par la formation réversible d'un pont disulfure entre les résidus cystéine Cys88 et Cys378 qui rend l'enzyme inactive [18].

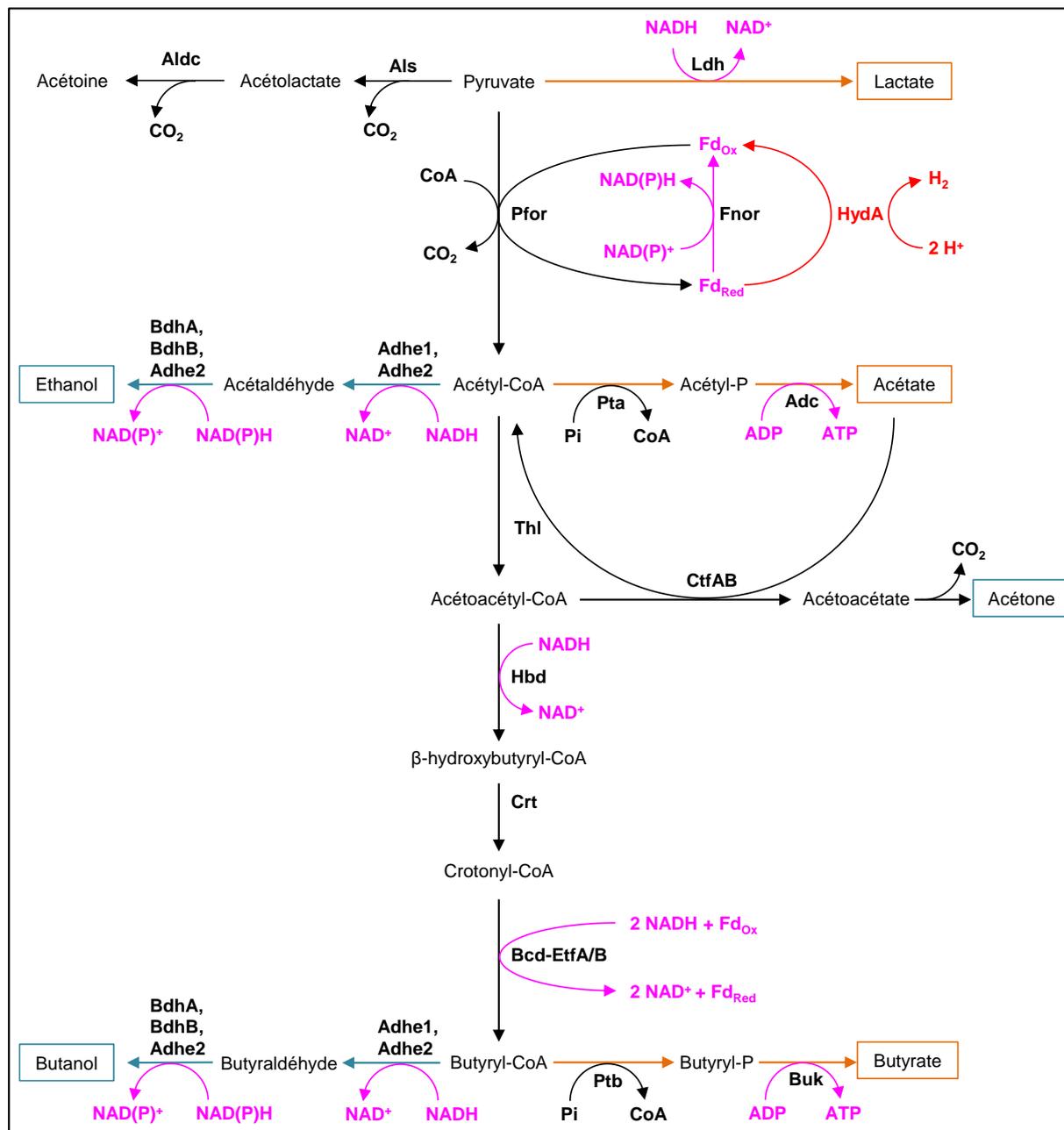


Figure 2 : Voies métaboliques et enzymes impliquées dans la formation des acides et des solvants chez *C. acetobutylicum*.

L'acétoacétyl-CoA est ensuite pris en charge par la β -hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase (Hbd) qui catalyse la formation de β -hydroxybutyryl-CoA. Cette enzyme, codée par le gène *hbd* (*CA_C2708*), fonctionne physiologiquement avec le NADH comme cofacteur [19]. Par ailleurs, cette enzyme n'est pas essentielle et l'inactivation du gène *hbd* entraîne l'obtention de souches produisant majoritairement de l'éthanol [20]; en effet, l'inactivation de Hbd interrompt les voies de production de butyrate et de butanol situées en aval. L'enzyme CbHbd de *Clostridium butyricum*, dépendante du NADH, est plus efficace que celle de *C. acetobutylicum* et les

mutations K50A, K54A et L232Y ont encore permis d'augmenter le rapport K_{cat}/K_m de cette enzyme, d'un facteur cinq environ. [21] Par ailleurs, l'enzyme retrouvée chez *Clostridium kluyveri* est, elle, dépendante du NADPH [22].

La crotonase (Crt), codée par le gène *crt* (CA_C2712), permet ensuite la déshydratation du β -hydroxybutyryl-CoA en crotonyl-CoA.

La butyryl-CoA déshydrogénase (Bcd), codée par le gène *bcd* (CA_C2711) catalyse enfin la réduction du crotonyl-CoA en butyryl-CoA. Il a été montré chez *C. kluyveri* que cette activité se faisait de manière simultanée avec la réduction de la ferrédoxine par le NADH, ceci grâce à un complexe formé entre Bcd les protéines EtfA/EtfB pour « electron transfer flavoprotein » (codées par les gènes *etfA* (CA_C2709) et *etfB* (CA_C2710)) [23]. Cette réaction correspond à un des premiers exemples de conservation d'énergie par bifurcation d'électrons. En effet, au sein du complexe Bcd-EtfA/B, la réduction exergonique du crotonyl-CoA en butyryl-CoA est couplée à la réduction endergonique de la ferrédoxine par deux moles de NADH (Figure 3). Le complexe Bcd-EtfA/B chez *C. kluyveri* est hétérotétramérique, formé de quatre sous unités Bcd (41 kDa), deux sous unités EtfA (36 kDa) et deux sous unités EtfB (28 kDa). On retrouve au sein de ce complexe au moins quatre groupes prosthetiques FAD (Flavine adénine dinucléotide) [24]. Les activités butyryl-CoA deshydrogénase du complexe Bcd-EtfA/B de *C. acetobutylicum* ont été mesurées et il apparaît que l'activité du complexe est strictement dépendante du NADH [11].

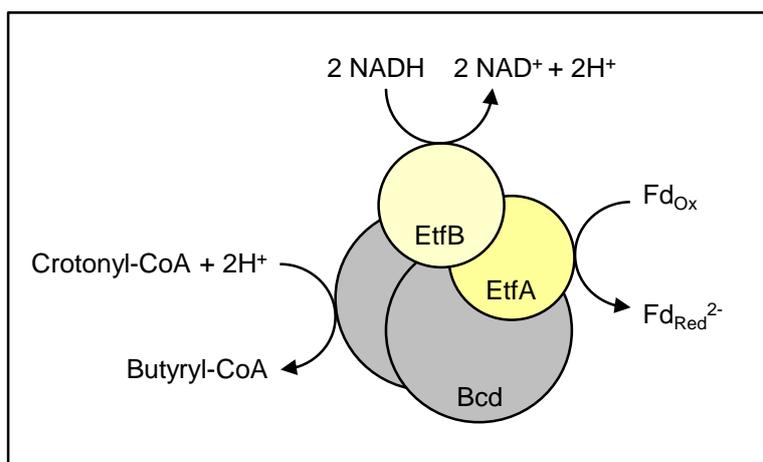


Figure 3 : Fonctionnement théorique du complexe Bcd-EtfA/B d'après Buckel et Thauer [23]. Les positions des interactions des partenaires d'oxydo-réduction sont placées de manière arbitraire.

Les gènes *crt*, *bcd*, *hbd* ainsi que les gènes *etfA* et *etfB*, responsables de la conversion de l'acétyl-CoA en butyryl-CoA sont organisés sous forme d'un opéron unique appelé *bcs* [25].

1.1.3.3. La voie de production des acides

1.1.3.3.1. La voie de l'acétate

Chez *C. acetobutylicum*, la production d'acétate à partir d'acétyl-CoA est réalisée grâce à deux enzymes : la phosphotransacétylase et l'acétate kinase.

La phosphotransacétylase (Pta), codée par le gène *pta* (*CA_C1742*), est une enzyme de 36,2 kDa qui catalyse la conversion de l'acétyl-CoA en acétyl-phosphate [26].

L'acétate kinase (Ack), codée par le gène *ack* (*CA_C1743*), est une enzyme de 44,3 kDa retrouvée vraisemblablement sous forme dimérique dans la cellule. Cette enzyme catalyse la déphosphorylation de l'acétyl-phosphate en acétate avec formation d'une mole d'ATP à partir d'ADP [27]. Cette production d'acétate, durant la phase d'acidogénèse, est donc particulièrement importante car elle permet à la cellule d'obtenir une mole d'ATP par mole d'acétyl-CoA consommé.

Par ailleurs, l'activité de ces deux enzymes est maximum à la fin de la phase d'acidogénèse, il semble donc qu'elles soient régulées de manière simultanée, ceci est appuyé par le fait que les deux gènes sont retrouvés sous forme d'un opéron unique au niveau du chromosome bactérien.

1.1.3.3.2. La voie du butyrate

Le butyryl-CoA est transformé en butyryl-phosphate par la phosphotransbutyrylase, codé par le gène *ptb* (*CA_C3076*), puis en butyrate par la butyrate kinase (gène *bukl*, *CA_C3075*) avec formation d'une mole d'ATP. Les deux gènes *ptb* et *bukl* forment un opéron unique dont la transcription est sous la dépendance du promoteur pPTB.

La phosphotransbutyrylase (Ptb) est une enzyme formée de huit sous unités ayant chacune une masse de 31 kDa, qui peut fonctionner à la fois dans le sens de production ou de consommation du butyryl-phosphate. [28] Cette enzyme possède une large gamme de substrat, toutefois son activité sur l'acétyl-CoA est bien inférieure à celle de Pta. Cette enzyme présente une forte sensibilité vis-à-vis du pH, avec des baisses d'activités lorsque le pH diminue, en particulier à la fin de la phase

d'acidogènese. Ceci pourrait alors intervenir dans le basculement du flux de carbone vers la production de butanol à partir de butyryl-CoA. Par ailleurs, l'activité de Ptb pour la consommation du butyryl-phosphate est moins affectée par le pH, ce qui met en évidence le rôle de cette enzyme dans la consommation du butyrate pour la formation de butanol durant la phase de solvantogènese.

La butyrate kinase (BukI) est une enzyme dimérique dont chaque sous unité possède une masse moléculaire de 39 kDa, qui catalyse la formation d'une mole de butyrate et d'une mole d'ATP à partir d'une mole de butyryl-phosphate. D'une manière similaire à ce qui est observé pour l'activité de l'acétate kinase, la production d'ATP joue un rôle très important dans le métabolisme énergétique global de la cellule, et l'activité maximum de cette enzyme est retrouvée en fin de phase d'acidogènese. Par ailleurs, il existe une seconde enzyme butyrate kinase (BukII) qui, malgré un *K_m* apparent pour le butyrate (620 mM) beaucoup plus élevé que celui de l'enzyme BukI (14 mM), peut expliquer la faible production de butyrate résiduelle observée après inactivation du gène *bukI*. [29,30]

1.1.3.4. La voie de production des solvants

1.1.3.4.1. La production des alcools

L'éthanol et le butanol sont produits à partir de l'acétyl-CoA et du butyryl-CoA, respectivement. La production de ces solvants, en deux étapes, implique l'utilisation de deux types d'enzymes : les aldéhyde et alcool déshydrogénases. De nombreuses enzymes ont été décrites, possédant des affinités différentes pour chacun des substrats.

Une première aldéhyde deshydrogénase a été purifiée chez *C. acetobutylicum* B643, cette enzyme homo-dimérique, formé de deux sous-unité de 56 kDa, présente une activité aussi bien avec l'acétyl-CoA qu'avec le butyryl-CoA [31]. Cette enzyme, majoritairement dépendante du NADH semble donc impliquée dans la production d'éthanol et de butanol. Toutefois sa vitesse maximale de réaction est bien plus élevée avec le butyryl-CoA qu'avec l'acétyl-CoA ce qui pourrait expliquer le ratio élevé butanol/éthanol typique des fermentations de *C. acetobutylicum*.

Chez *C. acetobutylicum* ATCC824, le gène *adhE1* (ou *aad*, *CA_P0162*), présent sur le méga-plasmide pSOL, code pour l'aldéhyde/alcool déshydrogénase AdhE1. Cette enzyme, d'environ 96 kDa, exprimée en conditions anaérobies chez *E. coli*, montre des activités aldéhyde déshydrogénase et alcool déshydrogénase, spécifiques du NADH.

Cette enzyme est considérée comme étant l'enzyme principale impliquée dans la production des alcools chez *C. acetobutylicum*. Par ailleurs, l'inactivation du gène *adhE1* entraîne une très forte diminution de la production de butanol, ceci confirmant l'implication de cette enzyme dans la production de butanol [32]. Récemment, il a été montré que l'enzyme AdhE1 était strictement dépendante du NADH et qu'elle avait très peu d'activité alcool déshydrogénase [11].

Le gène *adhe2* (*CA_P0035*), porté également par le méga-plasmide pSOL, code pour une seconde aldéhyde/alcool déshydrogénase AdhE2. Cette enzyme est exprimée spécifiquement en conditions d'alcoologénèse (culture continue réalisée à pH 4,4 sur un mélange de glucose et de glycérol) et est spécifique du NADH [33]. La régulation de cette enzyme, semble être exercée par la protéine Rex, elle-même sensible au rapport NADH/NAD⁺ [34].

Par ailleurs, il existe trois enzymes butyraldéhyde déshydrogénases BdhA/B/C dépendantes du NADPH [11]. Les deux isoenzymes dimériques BdhA et BdhB ont été caractérisées chez *C. acetobutylicum*, elles possèdent une masse de 82 kDa. Ces deux enzymes ont des activités largement plus élevées avec le butyraldéhyde qu'avec l'acétaldéhyde, ce qui montre leur implication spécifique dans la voie de production du butanol.

Le schéma global de production des alcools, en fonction des différentes conditions de cultures continues montre que l'activité butyraldéhyde déshydrogénase est majoritairement réalisée par les enzymes AdhE2 (acido et alcoologénèse) ou AdhE1 (solvantogénèse) alors que l'activité butanol déshydrogénase était réalisée par les enzymes BdhB (acido et solvantogénèse) ou AdhE2 (alcoologénèse). [32]

1.1.3.4.2. La production de l'acétone

La formation d'acétone à partir d'acétoacétyl-CoA nécessite une CoA-transférerase pour former de l'acétoacétate. L'acétoacétate est ensuite décarboxylé par l'acétoacétate décarboxylase pour donner de l'acétone et du dioxyde de carbone.

La CoA-transférerase (CtfA/B) est une enzyme de 93 kDa, vraisemblablement homotétramérique car formée de deux sous-unités α et β retrouvées chacune deux fois. Les gènes *ctfA* et *ctfB* (*CA_P0163* et *CA_P0164*) codant ces sous-unités sont situés sur le méga-plasmide pSOL au sein de l'opéron *sol* qu'ils forment avec le gène *adhE1*.

Cette enzyme catalyse *in vivo* l'activation d'un acide carboxylique avec un groupement thioester CoA.

L'acétoacétate décarboxylase (Adc), codée par le gène *adc* (*CA_P0165*), situé en aval du gène *ctfB* mais en dehors de l'opéron *sol*, est une enzyme constituée de 12 sous-unités identiques de 28 kDa chacune. Cette enzyme permet la décarboxylation de l'acétoacétate pour former de l'acétone et du dioxyde de carbone.

Il a été montré que la ré-assimilation de l'acétate se faisait grâce au complexe Adc-CtfA/B. Le rôle de cette enzyme dans le métabolisme est essentiel puisqu'elle permet, pendant la phase de solvantogénèse, la consommation de l'acétate produit pendant la phase précédente d'acidogénèse. Le milieu de culture est alors détoxifié.

1.1.2.5. La production de lactate, d'acétoïne et de glycérol

La production d'acide lactique chez *C. acetobutylicum* se fait directement à partir du pyruvate grâce à l'action de la lactate déshydrogénase. Parmi plusieurs gènes présents chez *C. acetobutylicum*, l'enzyme Ldh, codée par le gène *ldh* (*CA_C0267*), catalyse donc la réduction irréversible du pyruvate en lactate selon un mécanisme strictement dépendant du NADH. La production de lactate est généralement associée à des cultures présentant une limitation nutritionnelle. Dans certaines conditions métaboliques et en l'absence de certaines protéines clés (Pfor, hydrogénase, ferrédoxine), le métabolisme est redirigé vers la production de lactate qui correspond à la seule voie possible de consommation du NADH.

La formation d'acétoïne, qui est un produit de fermentation minoritaire de *C. acetobutylicum*, a été très peu étudiée. La production d'acétoïne se fait à partir de pyruvate. Deux moles de pyruvate sont condensées en α -acétolactate grâce à l' α -

acétolactate synthase (Als) avec formation d'une mole de dioxyde de carbone. L'acétoïne est ensuite obtenu par décarboxylation de l' α -acétolactate grâce à l'action de l' α -acétolactate décarboxylase (Aldc). Les gènes *alsS* (CA_C3652) et *alsD* (CA_C2967) codant les enzymes Als et Aldc respectivement, ont été mis en évidence chez la souche *C. acetobutylicum*; pourtant, les gènes ne sont pas retrouvés sous forme d'un opéron unique comme c'est normalement le cas chez les bactéries [35].

Par ailleurs, une faible production de glycérol par *C. acetobutylicum* est observée. Il faut pour cela, qu'au niveau de la glycolyse, le glycerol-3-phosphate formé soit isomérisé en dihydroxyacétone phosphate (Dhap) qui sera lui-même converti en glycérol phosphate avec consommation d'une mole de NADH. Ensuite, le glycérol phosphate doit être déphosphorylé pour donner du glycérol. L'enzyme permettant cette dernière réaction n'est pourtant pas décrite et il est admis que la glycérol kinase ne puisse pas fonctionner dans le sens de la déphosphorylation du glycérol phosphate chez *C. acetobutylicum* (Figure 1).

1.1.3.5. Métabolisme énergétique

La régulation du métabolisme de *C. acetobutylicum* et le basculement en phase de solvantogénèse en particulier sont associés à une modification du flux électronique.

1.1.3.5.1. Protéines et enzymes du flux électronique

Plusieurs protéines ou enzymes sont impliquées dans la régulation du flux électronique. Chez *Clostridium acetobutylicum*, la ferrédoxine est la protéine charnière du transport du flux d'électrons dans des conditions normales de croissance. Elle capte les électrons issus de la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA par la pyruvate ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) pour les transférer à l'hydrogénase qui les élimine sous la forme de dihydrogène. La ferrédoxine interagit également comme substrats des ferrédoxine NAD(P)⁺-réductase pour réguler les concentrations en NAD(P)H et NAD(P)⁺ et permettre d'adapter le métabolisme de la bactérie en fonction de ses besoins [11].

Par ailleurs, il est à noter qu'au sein des cellules, la ferrédoxine est retrouvée à 90% sous forme réduite, alors que le NAD^+ est retrouvé à plus de 90% sous forme oxydée. D'autre part, le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ est égal à 1/40 [24].

Dans des conditions de carence en fer, où les centres fer-soufre de certaines protéines ne peuvent être formés, la flavodoxine peut alors intervenir comme protéine de transfert d'électrons.

La pyruvate-ferrédoxine oxydoréductase (Pfor) est l'enzyme productrice de ferrédoxine réduite dans la première phase du métabolisme. Il est à noter qu'aucune activité de la Pfor n'est détectée avec les nucléotides NAD(P)^+ comme accepteurs d'électrons [12]. La réduction du crotonyl-CoA en butyryl-CoA génère également de la ferrédoxine réduite.

L'hydrogénase est l'enzyme clé du métabolisme, en particulier en phase d'acidogénèse, puisqu'elle permet la ré-oxydation de la ferrédoxine réduite ; ce mécanisme d'élimination du pouvoir réducteur est associé à la production d'hydrogène moléculaire.

Trois gènes codant pour des hydrogénases sont présents chez *Clostridium acetobutylicum*, ceux-ci codent pour deux [Fe-Fe]-hydrogénases (*hydA* et *hydB*) et pour une [Ni-Fe]-Hydrogénase. Toutefois, la production *in vivo* d'hydrogène est très majoritairement réalisée par HydA, l'hydrogénase codée par le gène *hydA* (CA_C0028). Cette enzyme monomérique de type M3 (selon la classification établie par Meyer [36]) et d'une taille de 64,2 kDa, catalyse *in vitro* les réactions de réduction des protons et d'oxydation de l'hydrogène, alors que seule la production d'hydrogène est observée *in vivo*.

1.1.3.5.2. Induction de la solvantogénèse

Les mécanismes permettant le basculement de la phase d'acidogénèse à la phase de solvantogénèse ne sont pas clairement élucidés, toutefois il est admis que la nécessaire détoxification du milieu de culture caractérisée par un pH faible lié à des fortes concentrations en acides acétiques et butyriques, joue un rôle dans l'induction de la solvantogénèse. La présence d'acétate dans le milieu de culture de même que l'accumulation du butyryl-P interviennent également dans le basculement de la phase d'acidogénèse à la phase de solvantogénèse. D'autre part, un autre élément régulateur particulièrement important du métabolisme de *Clostridium acetobutylicum*

est le ratio NAD(P)H/NAD(P)⁺. En effet, une disponibilité accrue des nucléotides réduits entraîne l'initiation de la production d'alcools.

Il a été montré que la protéine Rex contrôle, en fonction du ratio NADH/NAD⁺, l'expression de certains gènes impliqués dans la formation de butanol entre autre. [34]. Cette protéine, composée de 214 acides aminés, est codée par le gène *CA_C2713* qui se situe juste en amont de l'opéron *bcs*. Il a été mis en évidence une fixation de la protéine Rex au niveau de la région promotrice de plusieurs gènes : *thl*, *crt*, *ldh* et *adhE2* au niveau d'un motif consensus de 18 paires de bases (TTGTTwwwTTwTTAACAA).

Lorsque le ratio NADH/NAD⁺ est bas, Rex est fixée sur l'ADN et réprime la transcription. En revanche, lorsque le ratio NADH/NAD⁺ est élevé, le NADH se fixe sur la protéine Rex qui se dissocie alors de l'ADN permettant la transcription des gènes. Ceci est dû au fait que la protéine Rex a une plus grande affinité pour le NADH que pour le NAD⁺ [34].

1.1.4. Métabolisme de l'azote

L'azote est un élément essentiel de la vie sur Terre, il est très abondamment disponible sous forme de gaz (N₂) dans l'atmosphère mais seuls peu d'organismes sont capables de l'incorporer sous cette forme, quasi inerte. La plupart des organismes doivent utiliser de l'azote fixé sous forme d'ammoniac (NH₃) ou de nitrate (NO₃⁻). La fixation de l'azote qui correspond la conversion d'azote gazeux en ammoniac est donc une étape critique du cycle biochimique de l'azote et du maintien de la vie sur Terre. La fixation biologique de l'azote est retrouvée chez les organismes procaryotes libres ou symbiotiques où elle est rendue possible grâce à la présence de nitrogénases.

Les nitrogénases sont des complexes enzymatiques qui permettent la catalyse de la réaction : $N_2 + 8 H^+ + 8 e^- \rightarrow 2 NH_3 + H_2$. Il est à noter que cette réaction est différente de la simple réduction de l'azote par 6 protons et 6 électrons, qu'elle est couplée à la production d'une mole de dihydrogène et qu'elle est très coûteuse en énergie puisqu'elle requiert 16 équivalents ATPs. L'activité de cette enzyme peut également être mesurée lors de la réaction de la réduction de l'acétylène en éthylène. Ce complexe protéique est inhibé par le monoxyde de carbone et par l'oxygène de manière irréversible [37]. La fixation du diazote en ammoniac est suivie

par le transfert de l'ammoniac par les enzymes glutamate et glutamine synthases dans les voies de biosynthèse des acides aminés [38].

Le complexe nitrogénase est formé de deux composants : les protéines Fe et les protéines MoFe. Les protéines Fe sont homodimériques et contiennent un centre [4Fe-4S] par dimère, elles sont impliquées dans le transfert d'électrons jusqu'au site catalytique. Ce transfert d'électrons implique également la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Les protéines MoFe sont des hétérotétramères formés de deux sous unités α et de deux sous unités β . Chaque protéine MoFe contient deux centres fer-soufre de type P-clusters [Fe_8S_7] situés à l'interface entre les sous unités α et β et deux centres fer-molybdène catalytiques FeMo-Co [$\text{Fe}_7\text{MoS}_9\text{C}$] situés au sein des sous unités α .

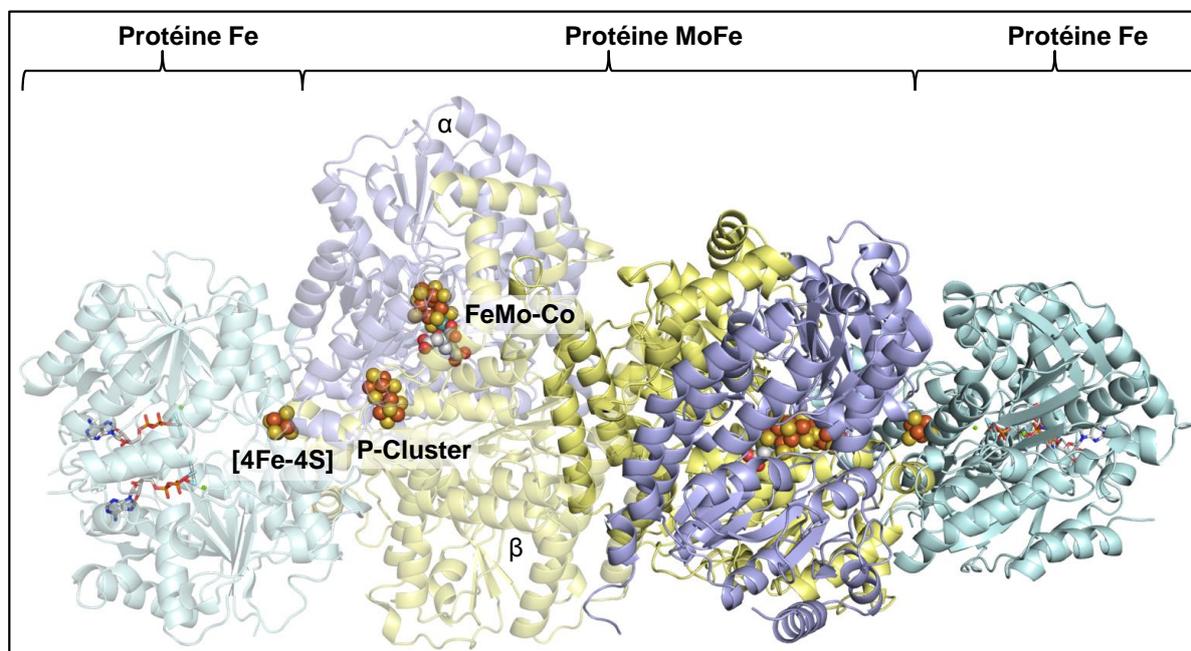


Figure 4: Complexe de la nitrogénase de *Azotobacter vinelandii*. Les protéines Fe homodimériques, contenant un centre [4Fe-4S], et permettant la liaison de l'ATP, sont représentées en bleu. Le complexe hétéro-tétramérique de la protéine MoFe, contenant les P-cluster et les centre catalytique FeMo-Co sont formés des sous-unités α (en violet) et β (en jaune)(Fichier PDB : 1N2C)[39].

De nombreux gènes font partie de l'opéron *nif*, nécessaire à la synthèse du complexe nitrogénase. Chez la bactérie *Klebsiella oxytoca*, 20 gènes font partis de l'opéron. Les gènes *nifH*, *nifD* et *nifK* codent pour les protéines structurales Fe et MoFe ; les gènes *nifY*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifV*, *nifB* et *nifQ* sont impliqués dans la biosynthèse du site catalytique FeMo-Co ; le gène *nifM* est impliqué dans la biosynthèse de la protéine Fe ; les gènes *nifS*, *nifU* et *nifZ* sont impliqués dans la

biosynthèse des centres fer-soufre (voir Chapitre 1.2.2) ; les gènes *nifJ* et *nifF* sont impliqués dans le transfert d'électrons, les gènes *nifL* et *nifA* sont impliqués dans la régulation de la transcription alors que la fonction des gènes *nifT* et *nifW* est encore inconnue. Les capacités de fixation du diazote par la bactérie *C. acetobutylicum* ont été mises en évidence très tôt dans les années 1950 [38] et la bactérie *C. pasteurianum* a été le premier micro-organisme libre capable de réaliser la fixation du diazote, à être isolé à la fin du 19^{ième} siècle par Winogradsky. Toutefois, l'opéron *nif* chez *C. acetobutylicum* correspond au plus petit des opérons *nif* décrits jusqu'alors puisqu'il est constitué uniquement de neuf gènes.

Les trois gènes *nifHDK* codent pour les protéines Fe et MoFe ; les gènes *nifE*, *nifN-B* (fusionnés chez *C. acetobutylicum*), *nifVw* et *nifVa* codent pour les protéines responsables de la synthèse du cofacteur FeMo-Co et il y a deux gènes *nifI-1* et *nifI-2*. Comme indiqué dans le Chapitre 1.2.3, il faut noter que les gènes *nifU* et *nifS*, impliqués dans la biosynthèse du centre [4Fe-4S] de la protéine Fe, sont absents chez *C. acetobutylicum*. C'est donc la machinerie SUF qui doit être responsable de la formation des centres fer-soufre pour toutes les protéines chez *C. acetobutylicum*, y-compris pour la nitrogénase [40].

Etude Bibliographique

Biosynthèse des centres fer-soufre

1.2. Biosynthèse des centres fer-soufre

1.2.1. Introduction

Les centres fer-soufre (Fe-S), découverts dans les années 1960, correspondent à des structures particulières retrouvées au sein de métalloprotéines, distribuées de façon ubiquitaire, des bactéries aux mammifères.

Ces cofacteurs liés de façon covalente, permettent aux protéines d'acquérir des conformations et / ou des fonctions particulières. Les atomes de fer et de soufre qui les composent sont majoritairement coordonnés par les groupements thiol des résidus cystéines des protéines bien que certains autres acides aminés puissent être impliqués (histidine par exemple...). Il est admis que les centres fer-soufre étaient déjà présents chez le dernier ancêtre commun universel [41] et qu'ils ont eu un rôle prépondérant dans l'apparition de la Vie sur Terre tant ils font le lien entre le monde minéral et biologique. Les centres fer-soufre sont retrouvés sous plusieurs états rédox et exhibent des potentiels d'oxydoréduction qui sont dépendants de la géométrie du centre, des ligands impliqués dans leur coordination et de l'environnement protéique. Les métalloprotéines contenant des centres fer-soufre possèdent de nombreuses fonctions au sein des cellules : elles sont impliquées dans le transfert d'électrons (comme les ferrédoxines (voir Chapitre 1.3)), le stockage du fer et la biosynthèse des centres eux-mêmes, la régulation de certains gènes (IscR), mais également dans les catalyses enzymatiques, en particulier de réactions faisant intervenir des éléments inorganiques importants à l'époque de la Vie primitive (hydrogène et hydrogénases, azote et nitrogénases, monoxyde de carbone et CO deshydrogénase) [41]. Un exemple de différents centres fer-soufre existants, possédant ou non une activité catalytique est donné Figure 5. Le potentiel rédox des centres [4Fe-4S] des ferrédoxines est compris entre -700 mV et -100 mV, à l'exception des HIPIPs pour lesquelles, ils sont compris entre +50 mV et +400 mV. Le potentiel rédox des centres [3Fe-4S] est compris entre -450 mV et -50 mV. Le potentiel rédox des centres [2Fe-2S] est compris entre -450 mV et -250 mV [42].

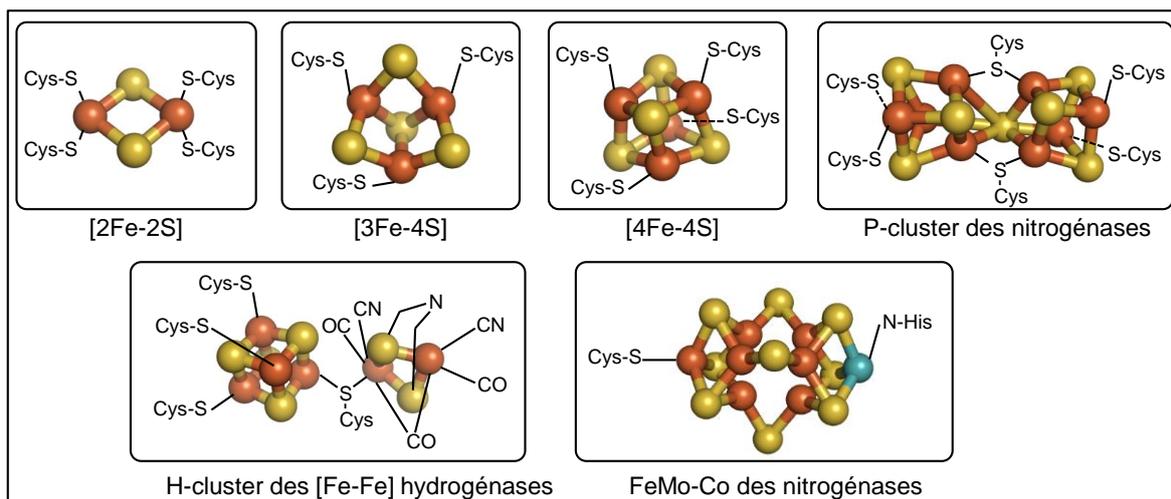


Figure 5: Représentation des certains types de centres fer-soufre, impliqués ou non dans des sites catalytiques. Les atomes de fer sont représentés en jaune et ceux de soufre couleur cuivre, l'atome de carbone situé au sein du centre FeMo-Co n'est pas représenté.

1.2.2. Voies de biosynthèse des centres fer-soufre

Le grand nombre de protéines contenant des centres fer-soufre suggère l'existence de mécanismes globaux de biosynthèse et de transfert des centres fer-soufre. Trois systèmes sont décrits : NIF, ISC et SUF. Pour chacun d'entre eux, la phase de biosynthèse des centres, à partir de fer et de soufre, est suivi d'une phase de transfert du centre formé aux apo-protéines.

La première voie de biosynthèse de centres fer-soufre a été décrite suite à l'étude de la nitrogénase d'*Azotobacter vinelandii*, enzyme permettant la fixation de l'azote et qui contient des centres fer-soufre [37]. Il a alors été mis en évidence deux gènes : *nifS* et *nifU* codant pour deux protéines NifS et NifU, respectivement.

La protéine NifS est une cystéine désulfurase homodimérique, qui catalyse l'incorporation du soufre au niveau d'un résidu cystéine selon un mécanisme dépendant du pyridoxal-5'-phosphate (PLP). La protéine NifU est retrouvée sous forme de complexe homodimérique d'échafaudage des centres fer-soufre qui sont finalement transférés à la nitrogénase [43].

1.2.2.1. Le système ISC

Le système ISC (« Iron-Sulfur Cluster »), système principal retrouvé chez les procaryotes, a été largement étudié et bien décrit, Il existe 8 gènes différents dans

l'opéron *isc*, qui codent pour 8 protéines impliquées dans la biosynthèse des centres fer-soufre, bien que le rôle de certaines protéines soit encore incertain (Figure 6).

La protéine IscS correspond à une cystéine désulfurase. Cette protéine homodimérique de 45 kDa, très conservée, permet la transformation de la L-cystéine en L-alanine, couplée au stockage d'un atome de soufre, par un mécanisme dépendant du PLP. Le soufre se retrouve stocké sous forme de persulfure (R-S-S-H) au niveau du résidu cystéine Cys328 chez *E. coli* [44].

La protéine IscU est la protéine d'échafaudage du centre fer-soufre à proprement parlé. Cette protéine, retrouvée sous forme de complexe avec la protéine IscS, peut fonctionner comme accepteur de fer et de soufre. IcsS présente des résidus particuliers impliqués dans la coordination des centres fer-soufre : 3 cystéines et une histidine (Cys37, Cys63, Cys106 et His106 chez *E. coli*). Cette protéine présente aussi un motif peptidique particulier ⁹⁹-LPPVK-¹⁰³ impliqué dans l'interaction avec la protéine HscA.

Les protéines HscA et HscB, correspondent à des chaperonnes et co-chaperonnes appartenant à la famille DnaK/DnaJ [45]. La protéine HscA possède une activité ATPasique et un site SDB (« Substrate Binding Domain ») permettant la reconnaissance spécifique de la protéine IscU [45]. La protéine HscB interagit avec la protéine IscU par l'intermédiaire de résidus hydrophobes. Malgré différentes hypothèses, il semble que les protéines HscA et HscB soit pourvues d'un double rôle, à la fois de facilitation des transferts des centres fer-soufre aux cibles apoformes et de stabilisation des complexes IscU/IscS. En effet, les protéines IscU et HscA peuvent être retrouvées dans différents états conformationnels en fonction de leur implication dans des complexes et de la liaison de l'ATP, respectivement [45]. La ferrédoxine Fdx retrouvée dans l'opéron *isc* est une ferrédoxine de 12 kDa environ comportant un centre [2Fe-2S] (voir Chapitre 1.3). Cette protéine est particulièrement importante puisque sa délétion entraîne les mêmes phénotypes que ceux observés après les délétions des protéines IscS et IscU. Cette ferrédoxine est impliquée dans le transfert d'électrons nécessaires à la réduction de la forme persulfure pour la formation des liaisons Fe-S. Elle pourrait également agir dans la réduction de deux centres [2Fe-2S] pour la formation d'un centre unique de type [4Fe-4S] ainsi que dans le transfert des centres eux-mêmes [45].

La protéine CyaY, est un homologue bactérien de la frataxine eucaryote. Cette protéine, bien que ne faisant pas partie des protéines codées dans l'opéron *isc* est impliquée dans la biosynthèse des centres fer-soufre. Il a premièrement été proposé que CyaY soit le donneur d'atomes de fer du fait de ses différences d'affinité apparentes entre fer ferreux et fer ferrique, mais il semblerait que CyaY ait plutôt un rôle de régulateur de la formation des centres fer-soufre, par la stabilisation et / ou l'induction de changements conformationnels pour le transfert des centres fer-soufre. En effet, cette protéine peut interagir avec le complexe IscU/IscS, mais son rôle exact reste à déterminer.

Le rôle de la petite protéine IscX (66 acides aminés) est encore incertain, mais de la même façon que la protéine CyaY, cette protéine pourrait agir comme modulateur de la formation des centres fer-soufre.

La protéine IscA, d'environ 12 kDa, peut être retrouvée sous forme de dimère ou de tétramère et possède une « poche cystéine » formée par trois résidus cystéine. Son rôle exact est encore aujourd'hui incertain, toutefois, cette protéine pourrait être impliquée dans la réparation des centres fer-soufre, dans la transformation des centres [2Fe-2S] en centres [4Fe-4S] mais surtout dans le transfert des centres fer-soufres aux apo-protéines puisqu'elle est maintenant reconnue comme une protéine de type ATC (A-type carriers) [45].

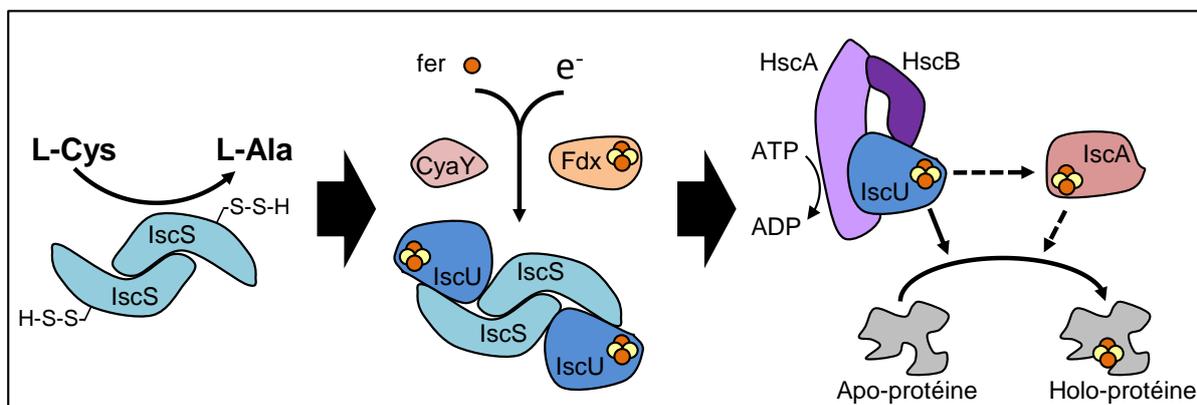


Figure 6: Fonctionnement simplifié des protéines du système ISC. La désulfuration de la L-cystéine en L-alanine conduit à la formation d'un persulfure au niveau d'une cystéine de la protéine IscS. Les centres fer-soufres se forment au sein des protéines IscU, après apport de fer et d'électrons et du soufre mobilisé. Le transfert des centres fer-soufres formés aux apoprotéines cibles fait intervenir les chaperonnes ainsi que potentiellement la protéine IscA. La protéine CyaY est représentée ici comme ayant un rôle dans l'apport des atomes de fer et la protéine IscX n'est pas représentée.

1.2.2.2. Le système SUF

Le système SUF (« Sulfur formation ») est le plus ancien des trois systèmes de formation de centres fer-soufre caractérisés et était vraisemblablement présent au sein des ancêtres des espèces modernes [46]. Six gènes sont présents dans l'opéron *suf* (Figure 8).

Ce système, activé en conditions de stress cellulaire fait intervenir deux complexes protéiques qui interagissent ensemble: SufSE et SufBCD.

SufS est une protéine homologue à la protéine IscS car elle possède l'activité de cystéine désulfurase (dépendante du PLP) qui permet l'apport de soufre ; la forme persulfure étant formée au niveau de la cystéine Cys364 chez *E. coli* [45]. La protéine SufE correspond à un complexe hétérodimérique qui permet le don de soufre pour l'assemblage des clusters. En effet, SufE interagit avec SufS pour récupérer le soufre de la cystéine Cys364 de SufS au niveau du résidu cystéine Cys51.

SufE a une structure similaire à IscU mais il lui manque les motifs permettant de lier des centres fer-soufre et permettant d'interagir avec les chaperonnes.

SufB est la protéine d'échafaudage des centres fer-soufre à proprement parler, elle interagit avec la protéine SufD et avec un homodimère de protéine SufC qui possède une activité ATPasique. Le complexe existe majoritairement sous la forme SufBC₂D, bien que d'autres formes soient également retrouvées. La forme SufBC₂D permet par ailleurs la liaison d'une molécule de FADH₂ qui pourrait servir de donneur d'électrons, utilisés pour l'assemblage des centres fer-soufre.

La protéine SufA est un membre de la famille ATC et comme IscA, peut intervenir dans le transfert des centres fer-soufre depuis le complexe SufBC₂D aux apoprotéines.

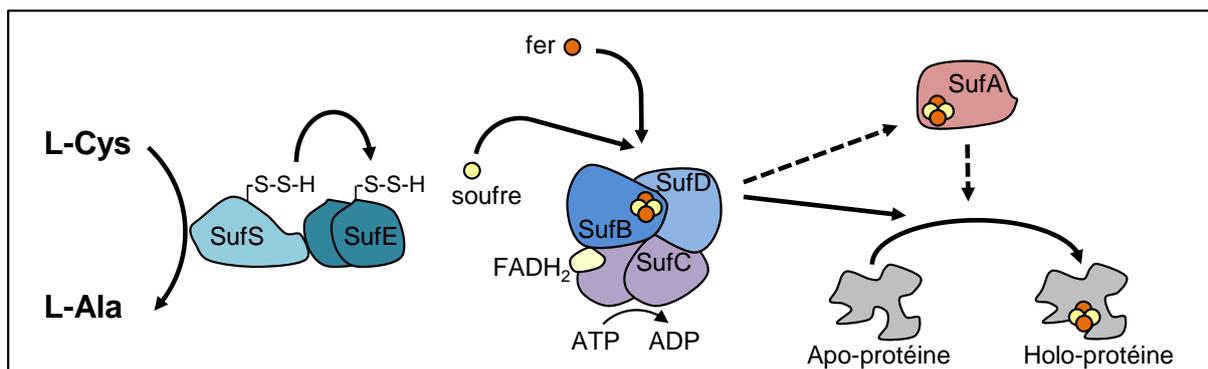


Figure 7: Fonctionnement simplifié des protéines du système Suf. La désulfuration de la L-cystéine en L-alanine conduit à la formation d'un persulfure au niveau de la protéine SufS qui est transféré sur la protéine SufE. Les centres fer-soufres se forment au niveau du complexe SufBC₂D, après apport de fer et d'électrons et du soufre mobilisé. Le transfert des centres fer-soufres formés aux apoprotéines cibles se fait directement ou fait intervenir la protéine SufA. Les gènes et les protéines ayant des séquences homologues ou des fonctions similaires ont le même code couleur que celle du système ISC (Figure 6).

1.2.2.3. La régulation des systèmes

La protéine IscR est le régulateur de l'expression des gènes de l'opéron *isc*, de l'opéron *suf* et également de plus de 40 gènes chez *E. coli*. Cette protéine est donc impliquée dans la régulation de l'homéostasie et dans les réponses à des situations de carences en fer.

Cette protéine peut lier un centre [2Fe-2S] (forme Holo-IscR) coordonné par 3 résidus cystéine et un résidu histidine mais peut être retrouvée sans centre fer-soufre (forme Apo-IscR). Deux types de motifs sur l'ADN peuvent être reconnus par la protéine IscR. Sous la forme Holo-IscR, l'expression de l'opéron *isc* est réprimé par la liaison de la protéine Holo-IscR sur un motif dit de Type-1. A l'inverse, en conditions de carences en fer, la protéine IscR perd son centre fer-soufre et c'est la forme Apo-IscR qui induit l'expression de l'opéron *suf* en se liant à un motif de Type-2. Il a par ailleurs été montré que la surexpression de certains gènes de l'opéron *isc* de même que la délétion du gène *iscR* permettait une meilleure incorporation des centres fer-soufre lors de stratégies de surexpression de protéines recombinantes, en particulier hydrogénases et ferrédoxines bactériennes, chez *E. coli* [47–49].

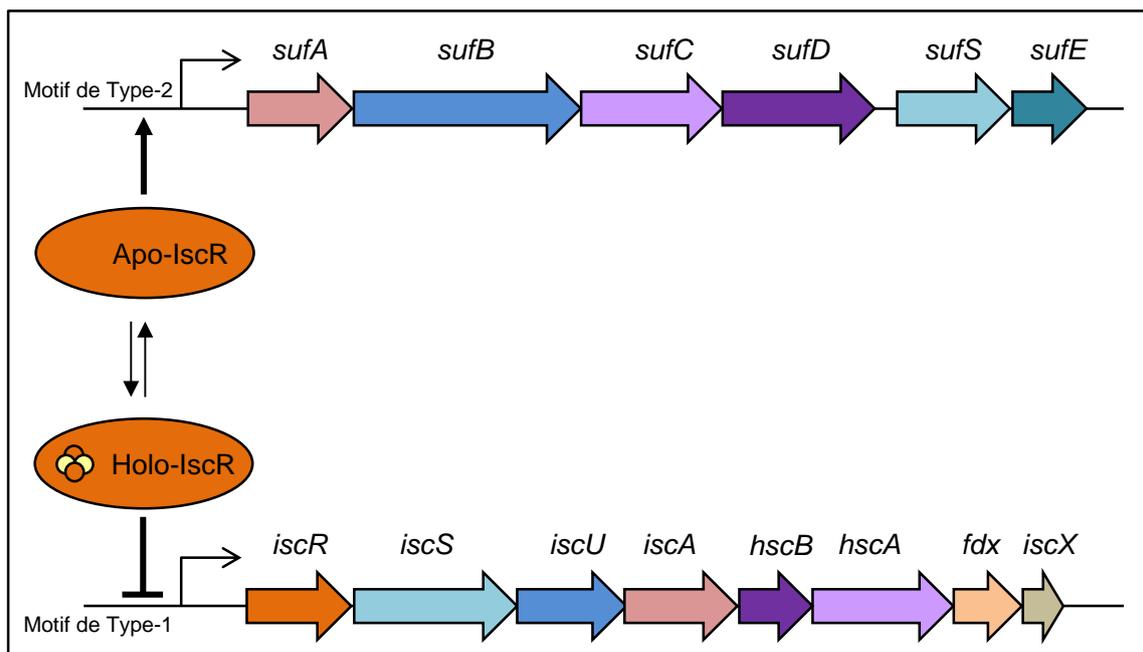


Figure 8 : Organisation des gènes dans les opérons ISC et SUF et régulation par les deux formes de la protéine IscR. Les gènes codant pour des protéines ayant des fonctions similaires sont colorés de la même façon.

1.2.3. Particularités des systèmes de biosynthèses chez les clostridies et chez *C. acetobutylicum*.

Les voies de biosynthèses des centres fer-soufre retrouvées chez les bactéries Gram négatives sont différentes de celles retrouvées chez les bactéries Gram positives.

Le système ISC retrouvé chez certaines clostridies diffère de celui retrouvé chez *E. coli*. En effet, seuls les gènes *iscR*, *iscS* et *iscU* sont retrouvés dans l'opéron et l'analyse de la séquence du gène *iscR* a montré que le résidu histidine impliqué dans la coordination du centre fer-soufre chez *E. coli* est absent [40]. De plus, chez les clostridies capables de fixation de l'azote, comme *C. beijerinckii*, *C. lentocellum* et *C. acetobutylicum*, les systèmes retrouvés diffèrent encore. Il a été montré que ces bactéries contenaient une copie de la région des gènes codant pour le système SUF des Bacilli, mais pas les composants du système de biosynthèse des centres fer-soufre NIF [40]. Il semblerait même que chez *C. acetobutylicum*, l'opéron *isc* ne contienne que le gène *IscR* et que la biosynthèse des centres fer-soufre soit donc réalisée uniquement par le système SUF [50].

Il est cependant à noter que ces trois systèmes semblent redondants même s'ils ne sont pas forcément tous retrouvés chez un même organisme. Pourtant il a été

proposé que la redondance de ces systèmes puisse être une réponse évolutive face à l'émergence de l'oxygène sur Terre. En effet, celui-ci aurait entraîné à la fois une diminution du fer soluble disponible dans les océans primitifs et des dégâts importants sur les centres fer-soufre eux-mêmes ; de ce fait, la multiplication des systèmes de biosynthèse aurait permis à la fois une meilleure incorporation du fer et l'apparition de systèmes de réparation des centres fer-soufre [41].

Etude Bibliographique

Les ferrédoxines

1.3. Les ferrédoxines

1.3.1. Introduction

Le terme de « ferrédoxine » a pour la première fois été introduit par Wharton pour décrire une protéine de couleur marron, contenant du fer et impliquée dans le transfert d'électrons, retrouvée chez les bactéries anaérobies capables de production de dihydrogène [51,52]. Les ferrédoxines en tant que protéines simples contenant des centres fer-soufre sont indéniablement liées à l'apparition de la vie sur Terre [41]. En dehors de leur origine bactérienne, à l'heure actuelle, de nombreuses protéines différentes sont désignées par le terme de « ferrédoxine » et retrouvées de façon ubiquitaire. Celles-ci sont impliquées dans le transfert d'électrons mais aussi dans d'autres mécanismes possibles comme la sensibilité aux conditions rédox, au fer ou à l'oxygène, le transfert du soufre ou d'équivalents rédox, le stockage ou le transfert de fer [41,53].

1.3.2. Classification des ferrédoxines

Les ferrédoxines peuvent être classées selon différents critères (taille, nombre et type de centre fer-soufre, organismes d'origine...). Après avoir été organisées selon le type de centre fer-soufre qu'elles contiennent, la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] sera décrite.

1.3.2.1. Ferrédoxines contenant des centres [2Fe-2S]

Au sein de ce groupe, les ferrédoxines ne contiennent qu'un seul centre fer-soufre de type [2Fe-2S] ; elles peuvent être divisées en trois sous-groupes :

Les ferrédoxines dites « de plantes » retrouvées chez les organismes photosynthétiques, les ferrédoxines de type « vertébrés » et les ferrédoxines de type thioredoxine [53,54].

Les ferrédoxines de type « plante » permettent le transfert d'électrons entre le Photosystème I et différentes enzymes, en particulier la ferrédoxine-NADP⁺ oxydoréductase (FNR) [55] ; elles sont donc impliquées dans la liaison entre les réactions qui se font en présence ou en absence de lumière [56].

Les ferrédoxines de types plantes sont des protéines globulaires d'environ 100 acides aminés où le centre fer-soufre est situé à la surface de la protéine, au sein d'une boucle contenant trois des quatre résidus cystéines permettant sa

coordination. Bien que ces protéines montrent une grande diversité de fonctions, leurs structures restent globalement les mêmes. Les variations possibles correspondent à une extension N-terminale d'environ 20 acides aminés, ou sont retrouvées au niveau des acides aminés impliqués dans les interactions avec les protéines partenaires [53].

Les ferrédoxines [2Fe-2S] de types « vertébré » comprennent en réalité des ferrédoxines provenant effectivement d'organismes supérieurs, comme l'Adrénodoxine (Adx) retrouvée chez l'homme [57], mais aussi de procaryotes comme la putidaredoxine (Pdx) de *Pseudomonas putida* [58–60]. Ces protéines sont impliquées dans le transfert d'électrons vers les cytochromes P450.

Il est à noter que les structures des ferrédoxines de type « plante » et de type « vertébrés » sont très proches et que des structures similaires peuvent être retrouvées au sein de protéines de plus grandes tailles comme c'est le cas chez l'hydrogénase de *C. acetobutylicum* (Chapitre 1.4.5.4.8) [61,62].

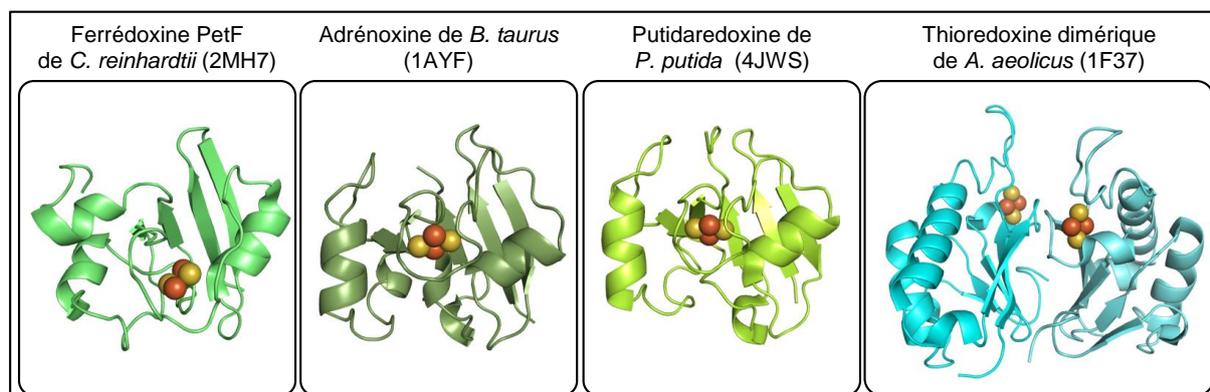


Figure 9 : Représentation tridimensionnelle des différentes ferrédoxines contenant des centres [2Fe-2S]. Les identifiants des fichiers PDB sont indiqués entre parenthèses.

Au sein des ferrédoxines [2Fe-2S], les ferrédoxines de type thioredoxine ont un statut particulier. Ces ferrédoxines ont été initialement isolées chez *C. pasteurianum*, *Azotobacter vinelandii* et *Aquifex aeolicus* [63–65]. Avec une masse molaire d'environ 25 kDa, ces protéines retrouvées sous forme dimériques sont plus grandes que les ferrédoxines ([2Fe-2S] et [4Fe-4S]) généralement retrouvées [54].

La structure tri-dimensionnelle de cette ferrédoxine est inhabituelle mais ressemble pourtant à la thioredoxine largement retrouvée chez de nombreux organismes qui, elle, ne comporte pas de centre fer-soufre. La ferrédoxine de type thioredoxine

présente une boucle autour du centre fer-soufre et une large surface de dimérisation. Le centre fer-soufre est coordonné par quatre résidus cystéine qui sont organisés selon un motif unique : $-CX_{10,12}CX_{29,34}CX_3C-$ [54]. De plus, il a été montré que la chaîne polypeptidique présentait une grande flexibilité autour du centre fer-soufre et pouvait subir de larges réarrangements, induits par l'affinité des résidus cystéines pour le centre fer-soufre [53]. Par ailleurs, à ce jour, la fonction de cette ferrédoxine reste inconnue bien qu'il soit proposé qu'elle joue un rôle dans le métabolisme de l'azote en lien avec la nitrogénase.

1.3.2.2. Ferrédoxines contenant des centres [4Fe-4S]

Les ferrédoxines décrites ici correspondent à des protéines d'origine bactérienne, qui contiennent des centres [4Fe-4S] ou [3Fe-4S], à bas potentiel, et qui se distinguent donc des protéines HIPIPs (High Potentials Iron Proteins).

1.3.2.2.1. Phylogénie des ferrédoxines bactériennes

La ferrédoxine de *C. pasteurianum*, contenant deux centres [4Fe-4S], fut la première protéine à centre fer-soufre à être isolée [52]. Ce modèle des ferrédoxines [4Fe-4S] est décrit en détail par la suite [66]. La structure particulière, très ancienne, de cette ferrédoxine est largement retrouvée mais a aussi subi de nombreux réarrangements pour donner différents types de ferrédoxines bactériennes. Ceux-ci peuvent correspondre à des insertions peptidiques en position N- ou C-terminale, une perte d'un des centres avec éventuellement la formation d'un pont disulfure et / ou la transformation d'un centre [4Fe-4S] en centre [3Fe-4S] (Figure 10) [53].

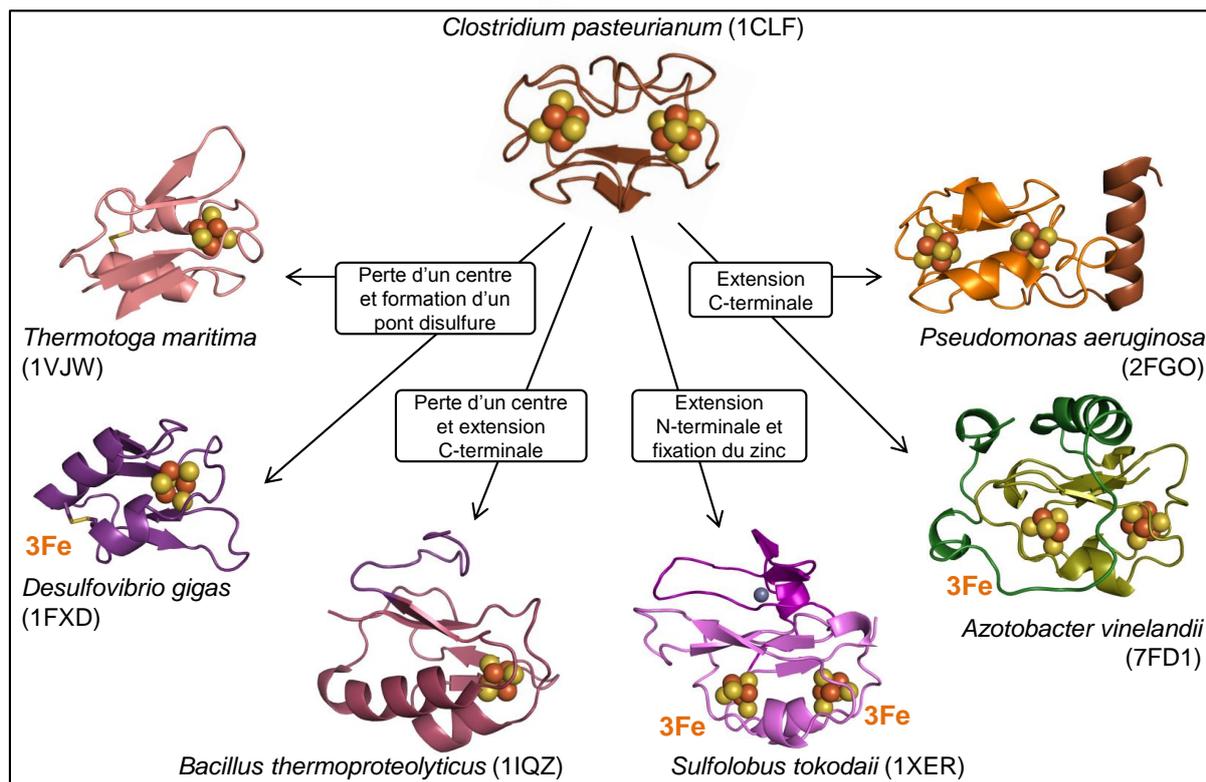


Figure 10: Phylogénie des ferrédoxines bactériennes d'après Meyer [52]. Les identifiants des fichiers PDB sont indiqués entre parenthèses.

De ce fait, les ferrédoxines retrouvées chez les organismes thermophiles, moins symétriques seraient dérivées des ferrédoxines 2[4Fe-4S] primitives, en accord avec une origine de la vie mésophile [53] et en opposition à ce qui a pu être proposé précédemment [67].

1.3.2.2.2. Ferrédoxine bactérienne type

La ferrédoxine bactérienne type, correspondant à celle retrouvée chez *C. acetobutylicum* est une petite protéine acide d'environ 6 kDa (50 à 60 acides aminés) de couleur brune caractéristique, chargée négativement à pH neutre.

La ferrédoxine, codée par le gène *CA_C0303* (168 pb) chez *C. acetobutylicum*, présente une structure primaire symétrique relativement simple, dénommée « ferredoxin fold » de type $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ mais témoignant d'une ancestrale duplication de gène (Figure 11) [68]. En effet, il est retrouvé deux motifs peptidiques -Cx₂Cx₂Cx₃CPV- ou les atomes de soufre des résidus cystéines permettent la liaison des centres fer-soufre. Cependant, ces résidus cystéines ne sont pas consécutifs dans la séquence mais chevauchant ; en effet, le motif -Cx₂Cx₂Cx₃- implique les

cystéines Cys1 à Cys3 d'un centre fer-soufre alors que le motif –CPV- contient la dernière cystéine (Cys4) de l'autre centre fer-soufre [69] (Figure 11).

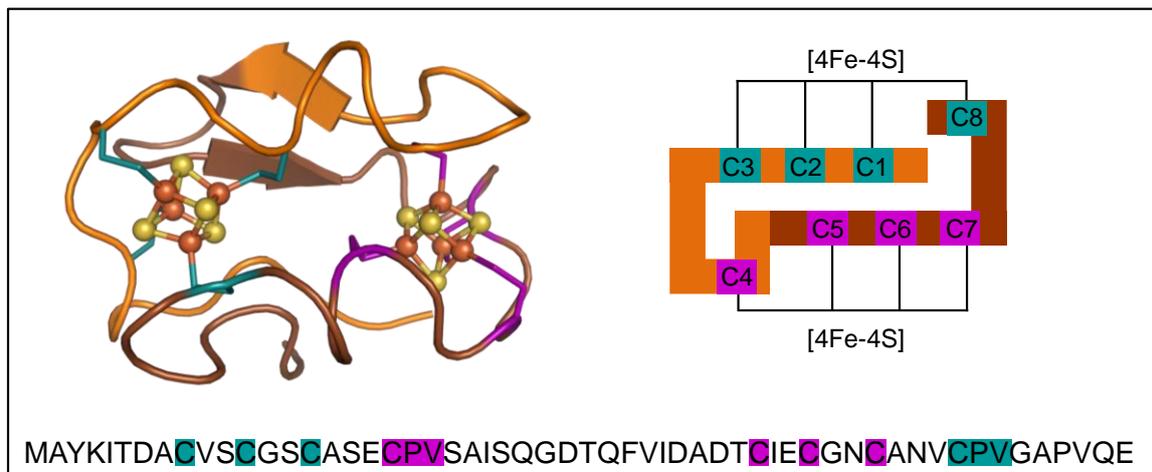


Figure 11 : Représentation tridimensionnelle, schématique et séquence protéique de la ferrédoxine 2[4Fe-4S] bactérienne type. Pour chacune des représentations, les résidus cystéines impliqués dans la formation de chacun des centres fer-soufre sont colorés de la même façon.

Chez les ferrédoxines [2Fe-2S], seulement une petite partie de la protéine est dédiée à la coordination du centre fer-soufre alors que la plus grande partie constituée de structure secondaire semble stabiliser l'ensemble. Chez les ferrédoxines [4Fe-4S], les centres fer-soufre sont fermement enveloppés par la courte chaîne polypeptidique, et le repliement peptidique semble déterminé uniquement pour la coordination des centres. De ce fait, il semble que les ferrédoxines [4Fe-4S] soient plus robustes et polyvalentes que les ferrédoxines [2Fe-2S].

L'impact de certains acides aminés de la ferrédoxine sur les interactions avec la pyruvate ferrédoxine oxydo-réductase (Pfor), de même qu'avec l'hydrogénase à fer a été étudié. Il a été montré que les résidus à la surface de la ferrédoxine avaient peu d'importance pour l'interaction par rapport à ceux qui pouvait modifier l'environnement direct des centres fer-soufre. La modification de la sphère de coordination des centres fer-soufre sur le potentiel des centres a également été étudiée [70,71], de même que les résidus impliqués dans le transfert d'électrons au sein même de la ferrédoxine [72].

La purification des ferrédoxines bactériennes peut se faire selon différents protocoles. Ces protéines ont initialement été isolées à partir d'extraits protéiques

totaux issus de cultures de *C. pasteurianum* grâce à des colonnes chromatographiques échangeuses d'anions [52,66,73].

La surexpression hétérologue, chez *E. coli*, de ferrédoxines bactériennes a également été décrite, [74,75], les protéines sont exprimées avec ou sans étiquettes (StrepTag) à partir de gènes non optimisés pour l'expression chez l'hôte. Parfois, après la purification, une reconstitution *in vitro* des centres fer-soufre peut être mise en œuvre et abouti à l'obtention d'une ferrédoxine de qualité équivalente à la protéine native [74].

Depuis, l'utilisation de souches *E. coli* chez lesquelles, l'ensemble de l'opéron *isc* est surexprimé ou chez lesquelles le gène *iscR* (répresseur de l'opéron *isc*) est délété a permis une optimisation de la surexpression de ferrédoxines 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum* avec un taux d'apoforme de la protéine abaissé (Chapitre 1.2.2.1) [47,76,77].

Dernièrement, une nouvelle méthode de purification en une étape de la ferrédoxine 2[4Fe-4S] contenant une étiquette StrepTag, exprimée dans une souche *E. coli* Δ *iscR* a été décrite [49].

Les ferrédoxines présentent des caractéristiques particulières et plusieurs techniques permettent de s'assurer de la qualité des centres fer-soufre présents au sein des protéines.

Les centres [4Fe-4S] à l'état réduit sont observables par spectrophotométrie UV-Vis. Ils entraînent un pic d'absorption autour de 390 nm. De ce fait les ferrédoxines bactériennes sont caractérisées par un ratio d'absorbances entre la partie protéique (mesurée à 280 nm) et les centres fer-soufre (mesurée à 390 nm) situé entre 0,69 et 0,83 [49,66,73,75].

La résonance paramagnétique électronique (RPE) permet de détecter la présence de centres fer-soufre à l'état réduit ([4Fe-4S]⁺) au sein des protéines et de distinguer ceux-ci de centres [3Fe-4S] [74].

Avec la voltampérométrie (ou PFV pour « Protein Film Voltametry »), les protéines sont adsorbées sur une électrode de graphite et il est possible d'imposer un potentiel d'oxydoréduction au centres fer-soufre et d'observer un signal sous la forme de voltampérogrammes cycliques. Il est alors possible de caractériser et de mesurer le potentiel d'oxydoréduction de chacun des centres fer-soufre (Chapitre 1.4.6.2) [74].

1.3.2.3. Autres protéines de transfert d'électrons

1.3.2.3.1. Protéines de Rieske

Les protéines Rieske sont des protéines d'environ 120 acides aminés contenant un centre [2Fe-2S]. Initialement caractérisées comme des sous unités de protéines de plus grande taille ; elles ont également été retrouvées sous forme libre, impliquées dans le transfert d'électrons. Le centre fer-soufre est situé à une extrémité de la protéine, à l'interface de deux boucles protéiques stabilisées par un pont disulfure. Le centre [2Fe-2S] est coordonné grâce à deux résidus cystéines et deux résidus histidine ; ce qui entraîne une élévation du potentiel rédox du centre [53,78].

1.3.2.3.2. HIPIPs

Les protéines HIPIPs (« High Potentials Iron Protein ») correspondent à une classe particulière de ferrédoxine [4Fe-4S]. Ces protéines impliquées dans le transfert d'électrons au cytochrome des bactéries photosynthétiques comportent un centre [4Fe-4S] qui est coordonné par quatre résidus cystéine. Toutefois, du fait de l'environnement hydrophobe et d'un réseau de liaison hydrogène, le cluster réalise la transition vers l'oxydation jusqu'à l'état $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$, et de ce fait, montre un potentiel d'oxydoréduction élevé (entre +100 et +400 mV) [53,79].

1.3.2.3.3. Rubredoxine

Le site actif de la rubredoxine (Rd), protéine d'environ 55 acides aminés retrouvée chez *C. pasteurianum*, est constitué d'un unique atome de fer coordonné par quatre résidus cystéine selon un double motif $-\text{Cx}_2\text{C}-$ [80].

Le potentiel de ce centre, ne contenant donc pas de soufre inorganique, est situé entre -100 et +200 mV. Il existe des différences dans les formes des rubredoxines, certaines peuvent être de plus grande taille (jusqu'à 160 acides aminés), il peut exister une extension C-terminale et certaines sont retrouvées sous forme d'homodimère [53]. Par ailleurs, le repliement de la rubredoxine est très proche de celui du site actif des protéines de Rieske, et il est même possible de réaliser la conversion du centre actif de la rubredoxine en centre [2Fe-2S] et inversement, par des mutations de certains résidus. Finalement, les rubredoxines présentent de nombreuses similarités avec les protéines en doigts de zinc et la rubredoxine elle-même à la même affinité pour le fer et le zinc [53].

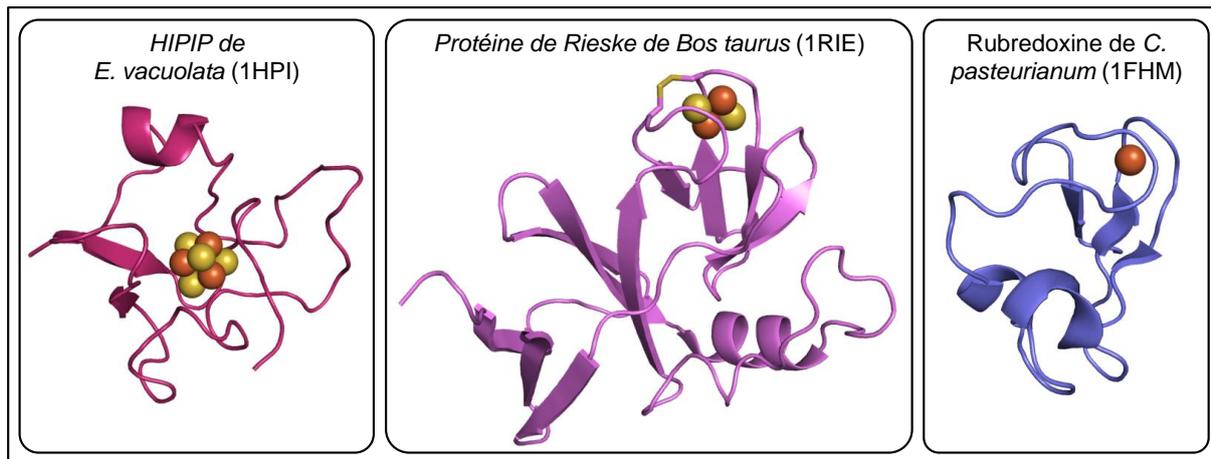


Figure 12 : Représentation tridimensionnelle des protéines de transfert d'électrons : HIPIPs, Protéine de Rieske et Rubrédoxine. Les identifiants des fichiers PDB sont indiqués entre parenthèse.

Etude Bibliographique

Les hydrogénases

1.4. Les hydrogénases

1.4.1. Introduction

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 suivante :



Ces enzymes peuvent avoir différents sites catalytiques, plusieurs rôles, plusieurs localisations et plusieurs partenaires en fonction des organismes.

Les réactions enzymatiques catalysées par les hydrogénases sont centrales pour le métabolisme des organismes chez lesquelles elles sont retrouvées. Le rôle des hydrogénases peut être classé en trois différentes fonctions :

La réduction des protons (production de dihydrogène) est catalysée par les hydrogénases au cours d'un processus fermentatif couplé à l'oxydation de substrats carbonés. Ce processus, retrouvé chez les bactéries anaérobies strictes telles que les clostridies, permet de disposer d'un excès de pouvoir réducteur éliminé avec les protons comme seuls accepteurs d'électrons. Chez les bactéries aérobies ou anaérobies, l'oxydation du dihydrogène (consommation de dihydrogène) est une source d'électrons et peut être couplée à des réactions productrices d'énergie. Des molécules ou ions sont alors utilisés comme accepteurs terminaux d'électrons. Enfin, la réduction cytoplasmique des protons induit l'alcalinisation du cytoplasme et l'oxydation périplasmique du dihydrogène cause l'acidification du périplasma. Ce processus contribue à générer un gradient de protons, ou force protomotrice, utilisable par les cellules. Chez les archées méthanogènes, les hydrogénases sans centre fer-soufre sont impliquées dans une des réactions permettant la réduction du dioxyde de carbone en méthane avec le dihydrogène [81]. Chez les algues vertes photosynthétiques, la production d'hydrogène est un moyen d'éliminer un excédent d'électrons en conditions anaérobies et en présence de lumière [82].

Les hydrogénases sont physiologiquement orientées pour réaliser l'oxydation de l'hydrogène ou la réduction des protons, toutefois, certaines enzymes sont dites « réversibles » dans le sens où, *in vitro*, elles sont capables de catalyser les deux réactions. De plus, les vitesses de réaction sont le plus souvent différentes, on définit

alors le « biais catalytique », qui n'a pas de réalité physiologique ou métabolique et qui est une propriété des enzymes caractérisées *in vitro*, qui peut varier en fonction de différents critères (substrats, méthodes ou conditions de réactions) [83,84].

Par ailleurs, la grande diversité des hydrogénases implique une grande diversité de partenaires des enzymes. En effet, même pour des enzymes de la même classe, les partenaires peuvent être différents (ferrédoxines, cytochromes...) mais ils sont toujours impliqués dans le transfert d'électrons, alors que le transport du dihydrogène et le transfert des protons semblent être des mécanismes passifs.

Par ailleurs, certaines hydrogénases récemment décrites sont capables de bifurcation d'électrons pour minimiser la perte d'énergie au sein des cellules [24,85]. En effet, chez certaines hydrogénases à fer, comme celle retrouvée chez *Thermotoga maritima*, la réduction des protons en dihydrogène se fait grâce l'oxydation exergonique de la ferrédoxine couplée à l'oxydation endergonique du NADH [86,87]. La fermentation de composés carbonés réduits n'est pas nécessaire à la re-oxydation du NADH et le rendement en ATP peut être augmenté [88].

1.4.2. Classification

Les hydrogénases possèdent toutes un atome de fer impliqué dans l'activité catalytique ; la classification des hydrogénases est cependant basée sur l'agencement de cet atome de fer au niveau du site actif des enzymes et en particulier sur les métaux impliqués dans la formation du site catalytique. Trois classes d'hydrogénases phylo-génétiquement distinctes et ne possédant pas de similarité de séquence sont donc définies : les hydrogénases sans centre fer-soufre ([Fe] hydrogénases), les [Ni-Fe] hydrogénases et les [Fe-Fe] hydrogénases [89].

1.4.3. Hydrogénases sans centre fer-soufre

Les hydrogénases sans centre fer-soufre ([Fe] hydrogénases) ne sont retrouvées que chez les archées méthanogéniques. Ces enzymes ne possèdent pas de centre fer-soufre mais un cofacteur contenant un atome de fer. La structure de l'enzyme de *Methanocaldococcus jannaschii* (38 kDa) a été résolue [90]. Ces enzymes réalisent la réduction réversible du methenyltetrahydromethanopterin (methenyl-H4MPT⁺) en methylenetetrahydromethanopterin (methylene-H4MPT) avec production

d'hydrogène moléculaire. Ces enzymes sont aussi connues sous le nom de d'hydrogénases Hmd pour « Hydrogen-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase » [91]. Il est à noter que l'activité de cette enzyme est dépendante du substrat (methenyl-H₄MPT⁺) et qu'elle ne réalise pas la réduction d'accepteurs d'électrons artificiels, comme le méthyl viologène par exemple [81].

1.4.4. Hydrogénases à nickel-fer

Les hydrogénases à nickel-fer ([NiFe] hydrogénases) sont les mieux connues. Les [NiFe] hydrogénases correspondent à une famille d'enzymes très diverses, davantage répandues que les [FeFe] hydrogénases et donc largement étudiées. Elles sont retrouvées chez les bactéries et chez les archées mais pas chez les eucaryotes. Elles possèdent, de ce fait, un caractère ancestral et il est proposé qu'elles aient pu jouer un rôle clef dans le métabolisme du dernier ancêtre commun universel [92]. Ces enzymes possèdent un atome de nickel et un atome de fer dans leur site actif mais certaines d'entre elles peuvent également contenir un atome de sélénium, elles sont alors appelées [NiFe(Se)] hydrogénases. *In vivo*, ces enzymes fonctionnent principalement dans le sens de consommation d'hydrogène et sont généralement localisées au niveau de la membrane ou du périplasme.

L'enzyme « standard » est formée de deux sous-unités [93,94]. La grande sous-unité α (de 46 à 72 kDa) comprend le site actif constitué du centre bimétallique nickel-fer profondément enfoui dans la protéine. Au niveau de la partie C-terminale de la grande sous-unité, il existe une extension peptidique qui est clivée lors de la maturation des enzymes.

La petite sous-unité β (de 23 à 38 kDa) contient trois centres fer-soufre impliqués dans le transfert d'électrons depuis le site actif jusqu'au partenaire d'oxydo-réduction.

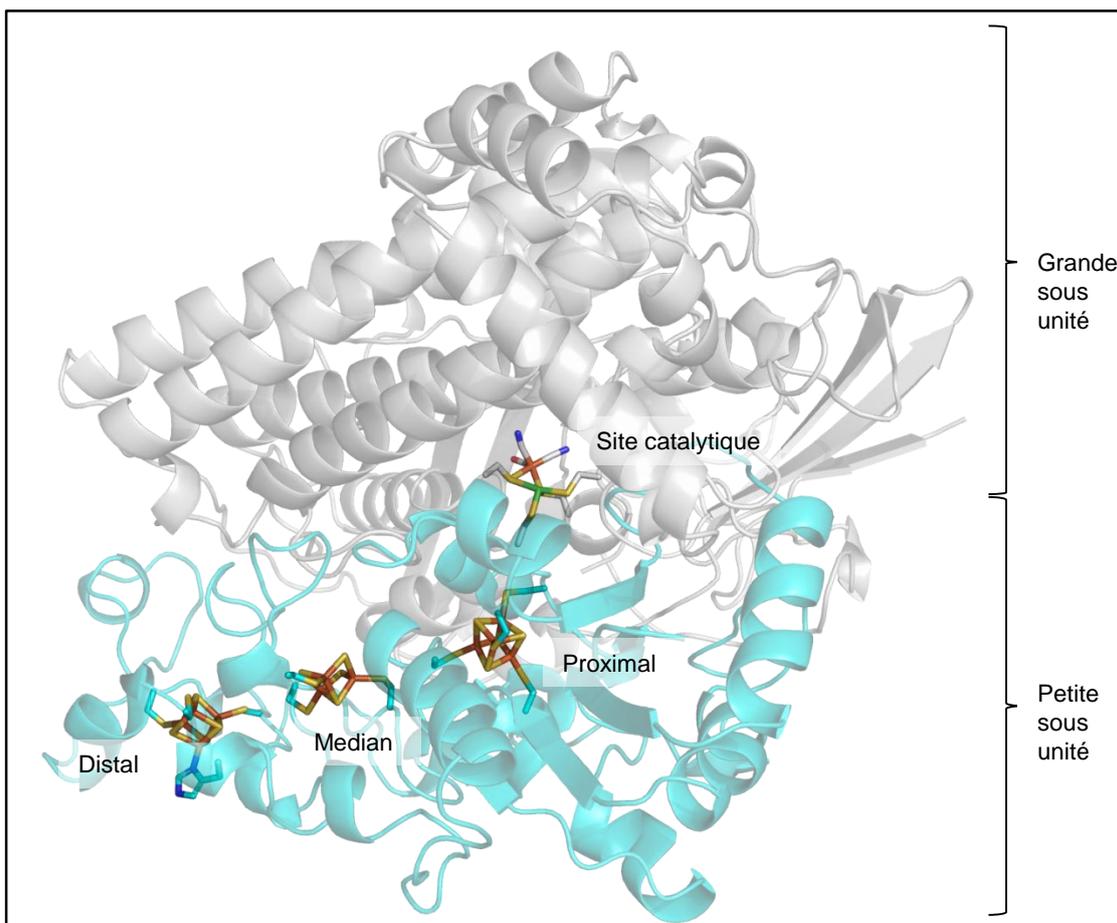


Figure 13: Structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à nickel-fer « standard » à deux sous unités retrouvée chez *Desulfovibrio gigas*. (Fichier PDB : 2FRV)

1.4.4.1. Site et cycle catalytique

Le site catalytique de l'enzyme est enfoui à 30 Å au sein de la grande sous unité. Il est formé d'un atome de fer et d'un atome de nickel coordonné par quatre résidus cystéines. Deux liaisons thiolate permettent la liaison de l'atome de nickel et deux liaisons thiolate pontent les deux atomes métalliques entre eux. Il y a par ailleurs, deux ligands CN^- et un ligand CO qui coordonnent l'atome de fer. Chez les [NiFe(S_e)] hydrogénases, une des cystéines permettant la coordination de l'atome de nickel est remplacée par une selenocystéine ; codée par le codon TGA [81].

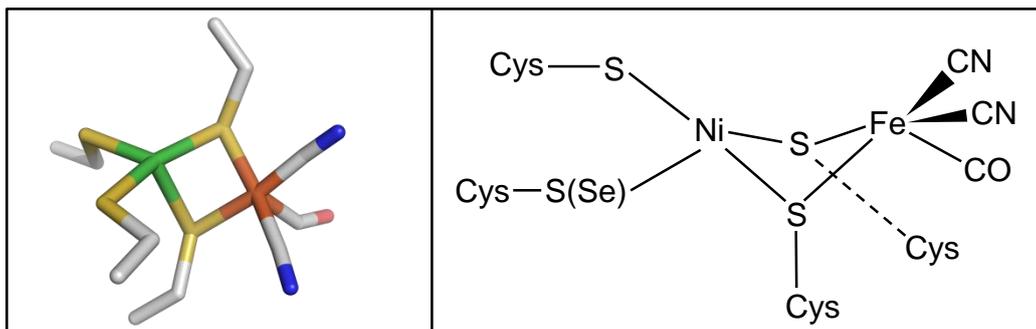


Figure 14: Représentation tridimensionnelle et schématique du site catalytique des [NiFe] hydrogénases. Chez les [NiFe(Se)] hydrogénases, l'atome de soufre de l'une des cystéine permettant la liaison à l'atome de nickel (coloré en vert) est remplacé par un atome de sélénium (Fichier PDB : 2FRV [95]).

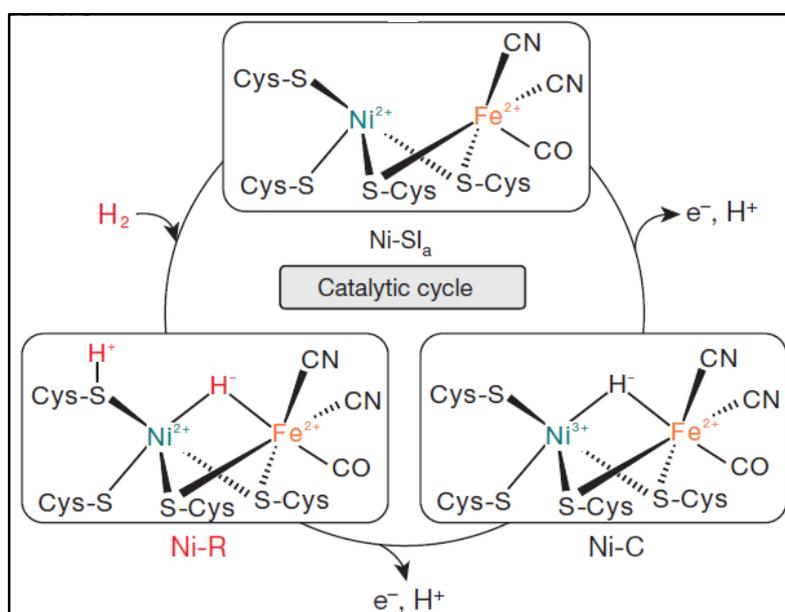


Figure 15: Représentation schématique des trois états principaux du cycle catalytique des [NiFe] hydrogénases, d'après Ogata et al. [93].

Le cycle catalytique classique comprend trois états principaux. A partir de l'état Ni-SI_a, le clivage hétéro-lytique d'une molécule de dihydrogène permet d'obtenir l'état Ni-R où un proton (H⁺) est lié à une cystéine qui coordonne l'atome de nickel alors que l'ion hydrure (H⁻) permet la liaison des atomes de nickel et de fer. L'oxydation de cet état Ni-R par la perte d'un électron et d'un proton conduit à l'état Ni-C où il ne reste que l'ion hydrure liant les atomes de nickel et de fer. La perte, à nouveau, d'un électron et d'un proton (à partir de l'ion hydrure) permet de revenir à l'état Ni-SI_a initial [81].

1.4.4.2. Voies de transfert d'électrons

Au niveau de la petite sous unité, on retrouve trois centres fer-soufre qui, lorsque l'enzyme fonctionne dans le sens de l'oxydation du dihydrogène, interviennent pour le transfert d'électrons depuis le site catalytique jusqu'au partenaire rédox : le cytochrome *c3* dans le cas de l'enzyme de *Desulfovibrio fructosovorans* [96,97].

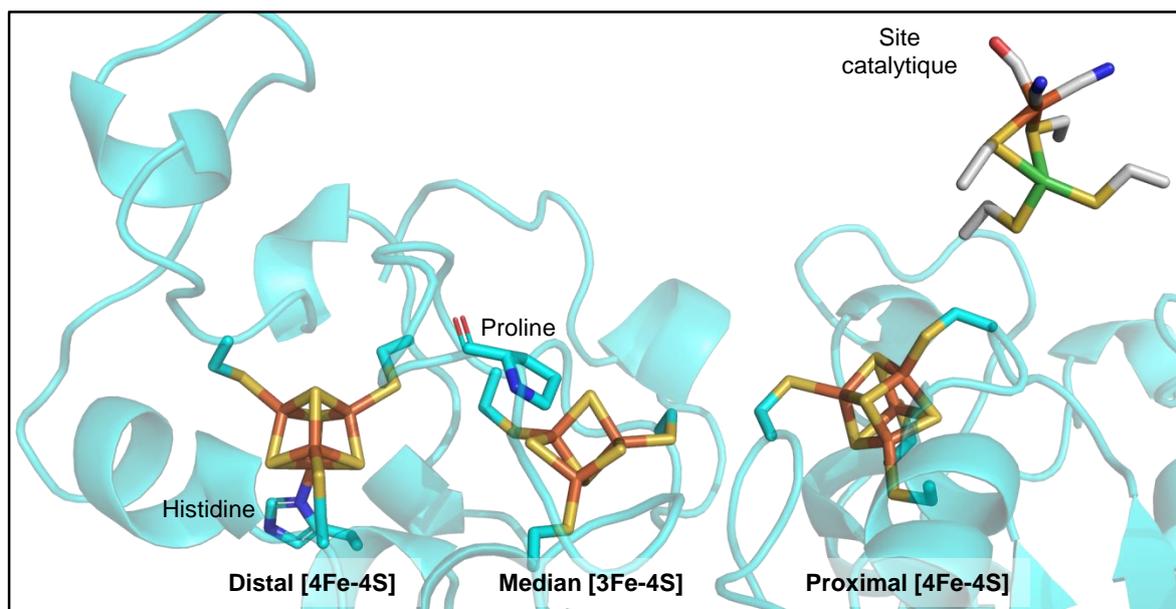


Figure 16: Centres fer-soufre de la petite sous unité de l'hydrogénase [NiFe] permettant le transfert des électrons depuis le site actif.

Une distance de 12 Å sépare chacun des centres fer-soufre ; de plus leur potentiel a été déterminé, de même que les cinétiques des réactions de transfert d'électrons entre les différents centres [96,97]. Le centre proximal est un centre [4Fe-4S] classique coordonné par quatre résidus cystéines. Cependant chez certaines enzymes résistantes à l'oxygène, le centre proximal apparaît comme un centre [4Fe-3S] dont la coordination implique six résidus cystéines, qui ont été montrés comme essentielles à la résistance à l'oxygène des enzymes [81,98]. Le centre médian est un centre [3Fe-4S], il est coordonné par trois cystéines et le dernier ligand est remplacé par une proline. Ce centre présente un potentiel d'oxydo-réduction élevé (-70 mV) comparé aux deux autres centres (-290 mV et -340 mV pour l'enzyme de *Desulfovibrio gigas* [99], pour le centre proximal et distal, respectivement). Le centre distal est un centre [4Fe-4S] atypique, en effet, il est coordonné par trois résidus cystéines et un acide aminé histidine. Les caractéristiques de ce centre ont été

étudiées et il a été montré qu'il intervenait également dans le biais catalytique des enzymes [83,96].

1.4.4.3. Diversité des [NiFe] hydrogénases

Quatre groupes différents peuvent être définis chez ces enzymes, sur la base de leur localisation et de leur fonction.

Groupe 1 : Les [NiFe] hydrogénases membranaires consommatrices de dihydrogène.

Le groupe 1 rassemble les hydrogénases membranaires consommatrices de dihydrogène. Les enzymes de ce groupe appelées Mbh (« membrane bound hydrogenases ») couplent l'oxydation du dihydrogène avec la réduction de différents accepteurs d'électrons comme l'oxygène, les nitrates, les sulfates, le dioxyde de carbone.

Les enzymes sont liées au cytochrome qui permet l'ancrage à la membrane et le transfert d'électrons à la quinone [100].

Ces enzymes sont retrouvées chez *E. coli* ou chez *Ralstonia eutropha*, où la Mbh est résistante à l'oxygène [98]. Chez la bactérie thermophile *Aquifex aolicus*, la Mbh1 est impliquée dans l'oxydation du dihydrogène liée à la réduction du dioxygène pour former de l'eau (d'où le nom « aquifex »). La Mbh2 couple l'oxydation du dihydrogène à la réduction du soufre élémentaire [81,100].

L'hydrogénase à nickel-fer putative retrouvée chez *C. acetobutylicum* appartiendrait également à ce groupe [11].

Groupe 2 : Les [NiFe] hydrogénases régulatrices senseurs de dihydrogène et consommatrices de dihydrogène.

Au sein du deuxième groupe on retrouve deux types d'enzymes.

Les hydrogénases consommatrices de dihydrogène (Groupe 2a) sont retrouvées chez des cyanobactéries capables de fixer l'azote [101]. Les enzymes sont alors impliquées dans la recapture de l'énergie perdue sous forme de dihydrogène lors de la réduction de l'azote inorganique par la nitrogénase (voir Chapitre 1.1.3). Le flux d'électrons généré peut ensuite être dirigé vers le pool de quinone pour réduire le dioxygène qui pourrait désactiver la nitrogénase [92].

Les hydrogénases régulatrices senseurs de dihydrogène (Groupe 2b), liées à une protéine histidine kinase, permettent la signalisation de la disponibilité du dihydrogène dans l'environnement. Chez *Ralstonia eutropha*, l'hydrogénase senseur HoxBC régule l'expression de la Mbh (HoxKGZ (Groupe 1)) et de l'hydrogénase soluble NAD-dépendante (HoxFUYH (Groupe 3d)) [102].

Groupe 3 : Les [NiFe]-hydrogénases cytoplasmiques hétéro-multimériques réversibles.

Le groupe 3a rassemble des hydrogénases retrouvées uniquement chez les archées méthanogéniques qui couplent l'oxydation réversible du dihydrogène avec la réduction du cofacteur F420 [92]. En plus des deux sous-unités classiques des [NiFe] hydrogénases, ces enzymes trimériques possèdent une sous-unité comprenant un centre [4Fe-4S] et un site de liaison du FAD [103].

Les enzymes du groupe 3b sont hétérotetramériques et retrouvées par exemple chez l'archée *Pyrococcus furiosus*. Ces enzymes, fonctionnent avec le NADPH pour la production de dihydrogène lors de la croissance en l'absence de soufre élémentaire [104].

Chez certaines archées méthanogènes on retrouve des enzymes trimériques réductrices du methyl viologène (MvhAGD) (Groupe 3c) associées au complexe « heterosulfide dehydrogenase » qui utilise l'hétérodissulfide CoM-S-S-CoB comme accepteur final d'électrons [105]. Ce complexe est un nouvel exemple de la possible conservation d'énergie réalisée par la bifurcation d'électrons où, à partir de l'oxydation du dihydrogène, la réduction endergonique de la ferrédoxine est couplée à la réduction exergonique du CoM-S-S-CoB [92].

Ce groupe est composé d'hydrogénases solubles bidirectionnelles multimériques (Groupe 3d) associées à un module à activité diaphorase (NADH oxydoréductase). Ces enzymes sont, par exemple, retrouvées chez *Ralstonia eutropha* ou chez *Synechocystis* spp. PCC 6803, où elles catalysent l'oxydation du dihydrogène ou la réduction des protons, respectivement [93].

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

Au sein du quatrième groupe, on retrouve différentes hydrogénases, toutes liées à la membrane et pour la plupart dépendantes de la ferrédoxine. On retrouve les enzymes réversibles à six sous unités permettant la translocation des ions (*Ech* pour

« Energy Converting Hydrogenase ») ; les enzymes, à au moins 13 sous-unités, liées à la membrane permettant la translocation des ions associés aux sous-unités homologues aux antiporteurs Na^+/H^+ et les variantes des derniers enzymes possédant des sous-unités additionnelles [92].

Récemment, il a été proposé la création d'un cinquième groupe d'enzymes rassemblant des hydrogénases proches de celles du groupe 1 mais qui ne possèdent pas de module permettant la liaison à la membrane, qui présentent des motifs de fixation du centre Ni-Fe atypiques et qui sont résistantes à l'oxygène [92].

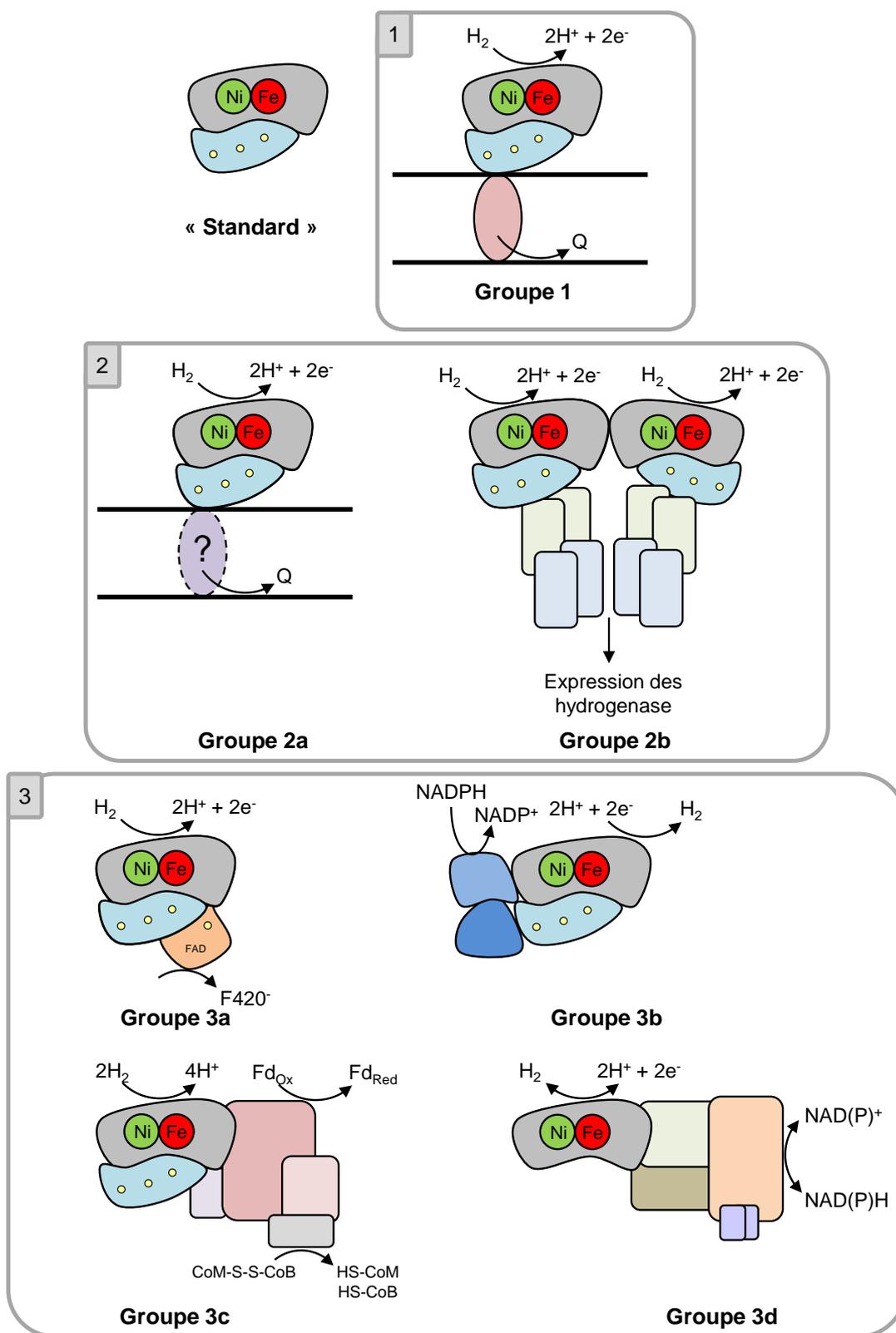


Figure 17: Représentation schématique des différentes [NiFe] hydrogénases appartenant aux trois premiers groupes.

1.4.4.4. Maturation des [NiFe] hydrogénases

La maturation, permettant l'obtention de [NiFe] hydrogénases, implique plusieurs étapes dont la synthèse du site catalytique, l'assemblage des deux sous unités et la translocation des enzymes. Les ligands cyanides (CN⁻) sont formés au niveau de la protéine HypE grâce à la protéine HypF. Ils sont ensuite transférés à un atome de fer au niveau du complexe HypCD où la protéine HypD a le rôle de protéine d'échafaudage. Le ligand CO, d'origine encore incertaine, est ajouté au futur site catalytique. Le cofacteur Fe(CN)₂CO est transféré à l'apoforme de la grande sous unité de l'hydrogénase. L'atome de nickel est ensuite incorporé grâce aux protéines HypA et HypB et il se produit le clivage du peptide C-terminal de la grande sous unité. En parallèle, les centres fer-soufre sont incorporés dans la petite sous-unité grâce aux voies classiques de biosynthèse (Chapitre 1.2.2) et les deux sous-unités sont rassemblées pour former l'enzyme complète [81].

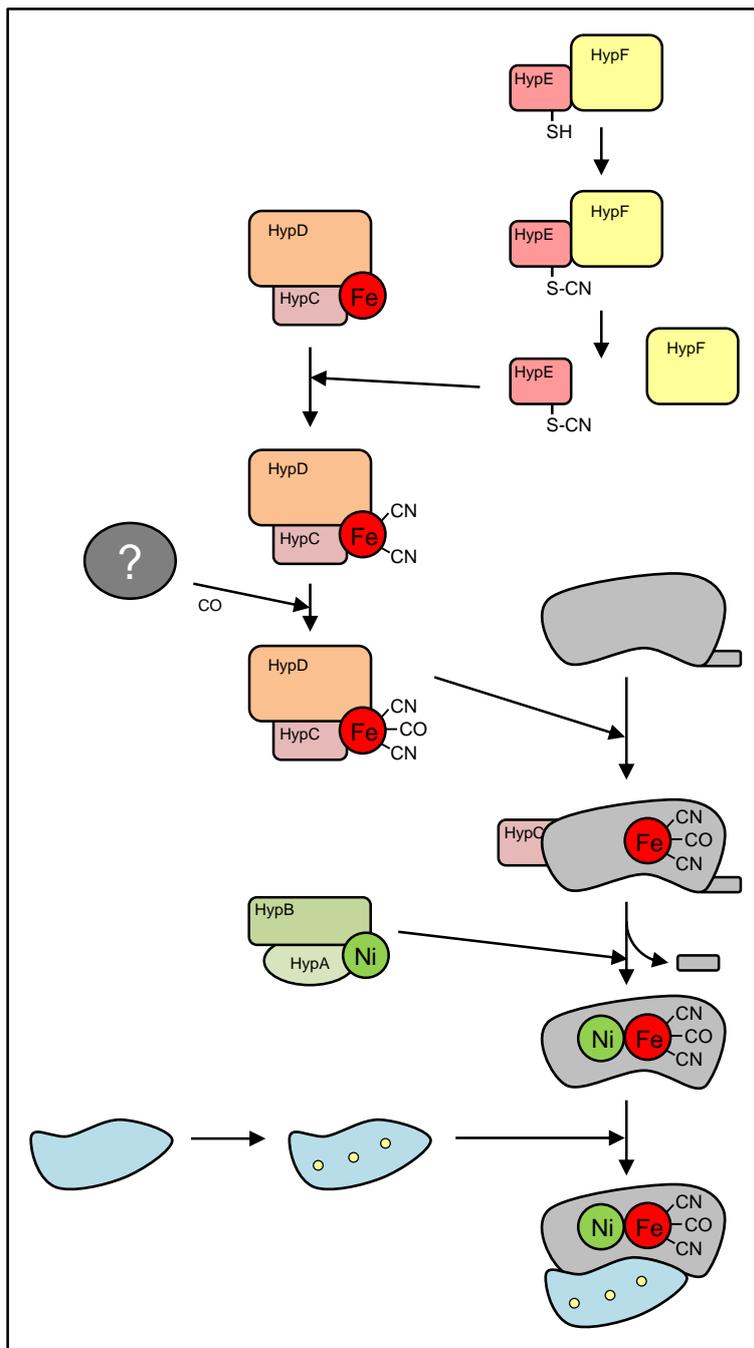


Figure 18: Schéma général de la maturation de la [NiFe] hydrogénase type, d'après Lubitz et al. [79].

1.4.5. Les hydrogénases à fer

1.4.5.1. Introduction

Les hydrogénases à fer ([Fe-Fe] hydrogénases) correspondent à un ensemble de plus de 700 enzymes de structures et de fonctions différentes, retrouvées sous formes monomériques ou multimériques, chez les bactéries et les eucaryotes mais qui n'ont pas encore été décrites chez les archées [106].

Les [FeFe] hydrogénases, moins répandues que les [Ni-Fe] hydrogénases, ont été isolées chez des bactéries anaérobies strictes (*Clostridia*), des bactéries hyperthermophilles (*Thermotoga maritima*), des bactéries réductrices de sulfate (*Desulfovibrio desulfuricans*) ainsi que chez des eucaryotes tels les protistes anaérobies (*Trichomonas vaginalis*) ou les algues vertes (*Chlamydomonas reinhardtii* ou *Chlorella vulgaris*) [89].

A la différence des [Ni-Fe]-hydrogénases, les [Fe-Fe]-hydrogénases ne contiennent que des atomes de fer au niveau du site actif de la protéine. *In vivo*, ces enzymes catalysent préférentiellement la production du dihydrogène en interagissant avec la ferrédoxine, la flavodoxine ou le cytochrome réduit comme donneur d'électrons physiologiques. Ces enzymes, particulièrement sensibles à l'oxygène, sont généralement constituées d'une unité catalytique mais peuvent contenir des domaines contenant des centres fer-soufre dits accessoires [89].

Les [Fe-Fe]-hydrogénases des bactéries anaérobies et des algues vertes sont monomériques, solubles et orientées vers la production de dihydrogène alors que chez les bactéries réductrices de sulfate elles sont généralement dimériques, périplasmiques et orientées dans le sens de la consommation du dihydrogène.

Les [Fe-Fe]-hydrogénases ont été largement étudiées, le clonage de leurs gènes a permis la surexpression homologue ou hétérologue pour leur purification, , et la caractérisation de nombreuses enzymes [48,107–111].

Il a été possible de définir une structure globale des différentes [Fe-Fe] hydrogénases et les alignements de séquences des différentes enzymes ont permis à la fois de détailler cette structure globale en différents domaines (Figure 20) et d'obtenir des données sur la phylogénie de ces enzymes (Figure 20) [3,112].

1.4.5.2. Classification, diversité et phylogénie des [Fe-Fe] hydrogénases

Toutes les [FeFe] hydrogénases existantes peuvent être organisées au sein de trois groupes différents [106]. Ces groupes sont établis sur la base des séquences des gènes codant pour les enzymes et de ceux présents autour des gènes codant pour les hydrogénases elles-mêmes. Le premier groupe (G1), est constitué d'enzymes généralement monomériques incapables de réaliser la bifurcation d'électrons. Le groupe G2 correspond à des hydrogénases trimériques qui contiennent les gènes *hydB* et *hydC* autour du gène codant pour l'enzyme, alors que les hydrogénases du groupe G3, tétramériques, contiennent les gènes *hydBCD* avec ou non le gène *hkl*. Il est prédit que les enzymes des groupes G2 et G3 soient capables de bifurcation d'électrons [106]. Les gènes *hydB* et *hydC* sont ceux codant pour la grande (51 kDa) et la petite sous unité (24 kDa) de la NADH deshydrogénase.

Indépendamment du fait, qu'associées avec les protéines HydB et HydC, les hydrogénases puissent réaliser la bifurcation d'électrons, elles possèdent toutes au minimum un domaine protéique d'environ 40 kDa, qui contient le site catalytique de l'enzyme (Chapitre 1.4.5.4.2). En complément du domaine catalytique, les enzymes peuvent présenter des domaines accessoires situés en position N- ou C-terminale. Ces domaines sont impliqués dans la flexibilité catalytique des enzymes et dans la modulation des transferts d'électrons jusqu'au site catalytique [89]. Ces domaines ont permis une classification des hydrogénases en douze types différents [106]. La structure de certaines enzymes est limitée au seul domaine catalytique comme dans le cas de l'enzyme CrHydA1 retrouvée chez *C. reinhardtii* qui appartient donc au type M1 (Figure 19). L'enzyme Dd retrouvée chez *Desulfovibrio desulfuricans* possède un domaine contenant deux centres [4Fe-4S] situés en partie N-terminale du domaine catalytique (Type M2i), elle a une structure proche des enzymes retrouvées chez *Megasphaera elsdenii* ou *C. autoethanogenum* (Figure 19)[48,106,113]. Les hydrogénases de type M3 possèdent également deux domaines contenant chacun un centre fer-soufre.

Les enzymes sont dans la très grande majorité cytosoliques et solubles et parmi toutes les structures possibles, 80% des enzymes sont de type M3a ou M2i.

Certaines enzymes, retrouvées essentiellement chez les bactéries sulfato-réductrices sont dimériques et ont subi l'insertion d'un peptide signal permettant leur

adressage à la membrane périplasmique. Par ailleurs, il n'existe qu'un seul exemple d'une potentielle hydrogénase à fer liée à la membrane [3].

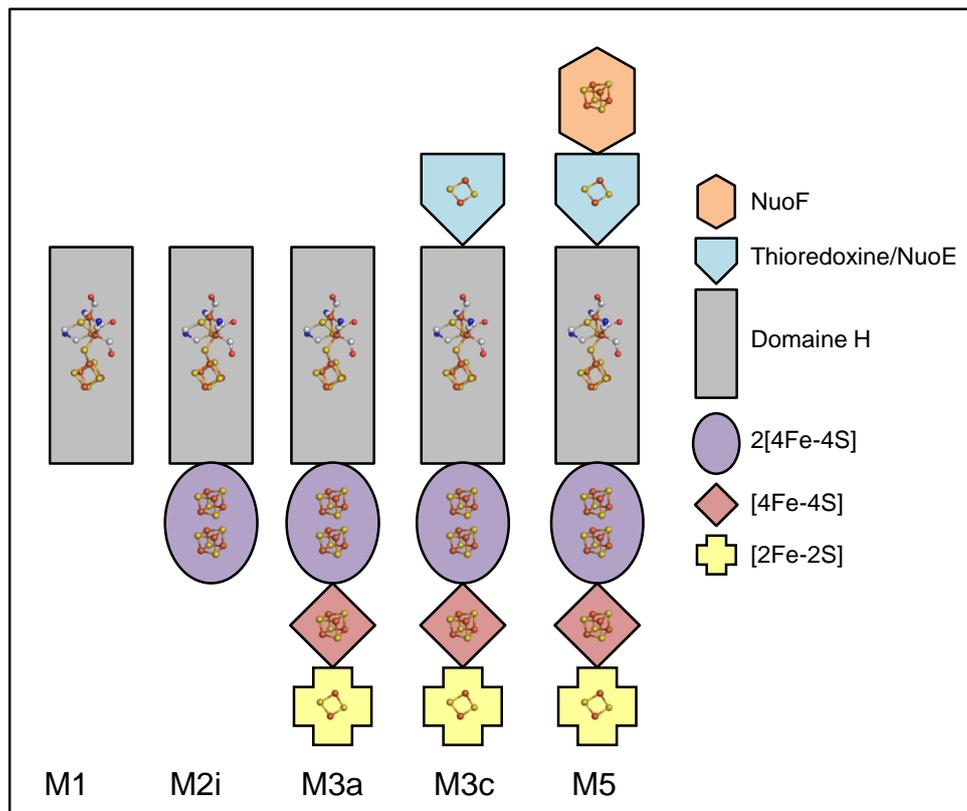


Figure 19: Diversité structurale des hydrogénases à fer, d'après Meyer [2] et Poudel et al. [104].

Les hydrogénases à fer ne sont pas retrouvées chez les archées ce qui suggère une apparition ultérieure à la séparation évolutive des archées et des bactéries. Pourtant, ces enzymes sont retrouvées chez les firmicutes (en particulier chez les clostridies) et chez les protéobactéries (δ -protéobactéries majoritairement), qui sont des lignées anciennes, ce qui implique une apparition précoce au sein des bactéries [3].

L'évolution ultérieure des hydrogénases est difficile à retracer au sein des bactéries car elles sont peu retrouvées dans d'autres classes de bactéries que celles citées précédemment.

Il est admis que leur présence chez les eucaryotes est le résultat de plusieurs transferts différents. En effet, il est proposé que les hydrogénases retrouvées chez les eucaryotes (cytosoliques ou au sein d'hydrogénosomes), soient apparues chez les protistes selon deux événements distincts. Une symbiose de bactérie aurait

permis l'apparition des hydrogénases des organites comme celles retrouvées au sein des chloroplastes ou des hydrogénosomes. Parallèlement, des transferts de gènes latéraux auraient permis l'apparition des hydrogénases cytosoliques [3].

Les protéines NarF et Nar1p sont retrouvées chez les levures et les eucaryotes supérieurs. Ces protéines, impliquées dans la synthèse ou la réparation des centres fer-soufre, ressemblent à une hydrogénase à fer minimale à laquelle il manque le site binucléaire catalytique [3]. Par ailleurs, il semblerait que ces enzymes ne puissent pas réaliser la consommation ou la production de dihydrogène ; de plus, les gènes de maturation des hydrogénases sont absents chez les levures et les eucaryotes supérieurs.

L'origine des hydrogénases retrouvées chez les algues vertes est cependant surprenante. Premièrement, elles sont retrouvées au sein des chloroplastes qui sont des organites issus d'une symbiose avec des cyanobactéries chez lesquelles les hydrogénases à fer ne sont pas retrouvées. Deuxièmement, la très grande majorité des hydrogénases à fer des algues vertes appartiennent au type M1 qui n'est retrouvé que chez ces organismes.

1.4.5.3. Evolution structurale des [Fe-Fe] hydrogénases

L'étude des séquences et des structures connues des différentes [Fe-Fe] hydrogénases ont permis de définir un schéma global phylogénétique d'évolution de ces enzymes (Figure 20) [3].

Dans ce modèle, l'hydrogénase initiale correspond à une hydrogénase de type M2i contenant le Domaine H comprenant le Cluster H et le domaine additionnel comprenant deux centres [4Fe-4S]. Cette enzyme peut être modifiée pour donner la forme hétérodimérique périplasmique retrouvée chez la bactérie *D. desulfuricans* ou perdre le domaine additionnel 2[4Fe-4S] pour donner les hydrogénases de structure minimale retrouvées typiquement chez les algues (Type M1). L'hydrogénase initiale peut aussi acquérir des domaines de différents types (domaines contenant des centres [4Fe-4S] ou [2Fe-2S], domaine de type NuoE ou NuoF) pour donner des hydrogénases de type M3, M3c et M5 [3,106].

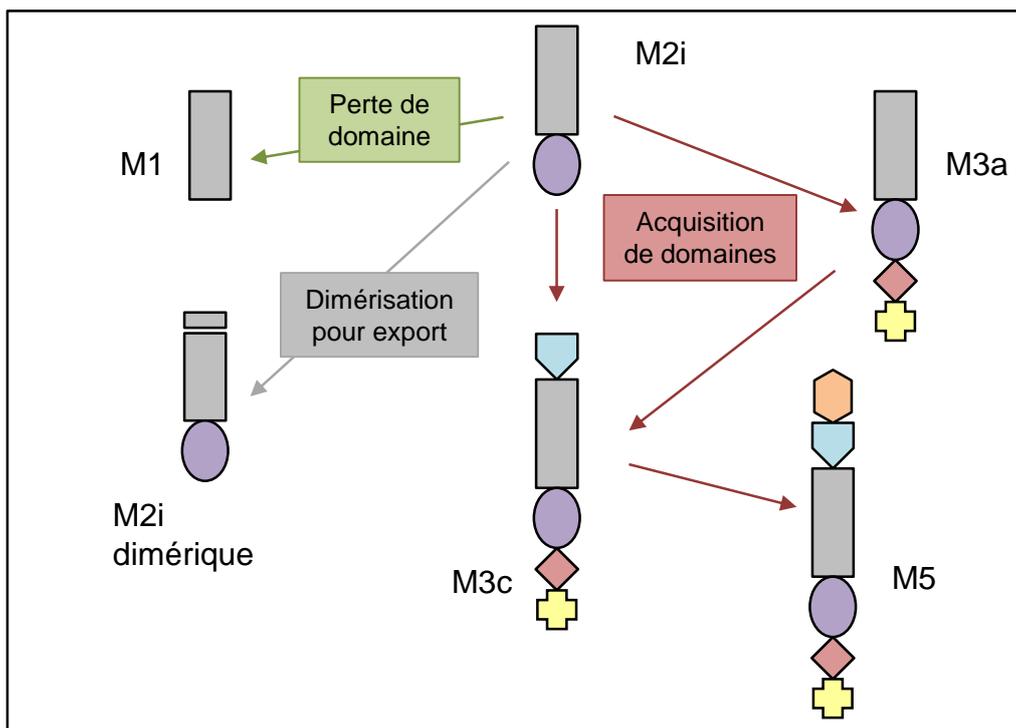


Figure 20: Schéma de l'évolution phylogénétique potentielle des [FeFe] hydrogénases. A partir de la structure ancestrale théorique (M2i) les enzymes sont soit modifiées pour pouvoir être retrouvées au niveau périplasmique (M2i dimérique), soit perdre (M1) ou acquérir des domaines supplémentaires (M3, M3c et M5) d'après Meyer [3] et Poudel *et al.* [106].

Toutefois, ce modèle a été récemment remis en question après la découverte d'une hydrogénase contenant des centres fer-soufre additionnels et accessoires chez l'algue eucaryote *Chlorella variabilis* NC64 [114]. Il a alors été proposé qu'un événement unique de symbiose initial ait permis aux algues ancestrales d'acquérir un gène unique codant pour une [Fe-Fe] hydrogénase contenant le Domaine H et les domaines accessoires et additionnels [114].

L'étude des gènes des protéines de maturation donne également des informations d'ordre phylogénétique. En effet, chez certaines bactéries, les trois protéines de maturation sont codées par trois gènes différents alors que chez *C. reinhardtii*, les gènes *hydE* et *hydF* sont fusionnés. Ceci confirmant l'origine bactérienne des gènes codant pour les hydrogénases et leurs protéines de maturation.

De plus, il a récemment été mis en évidence, pour la première fois, chez des algues du genre *Tetraselmis*, la présence à la fois d'une copie du gène *hydE* seul et d'une fusion *hydEF*. Ces algues du genre *Tetraselmis* présentent alors un génotype « intermédiaire » entre les deux embranchements [115].

1.4.5.4. L'hydrogénase à fer CaHydA de *Clostridium acetobutylicum*.

1.4.5.4.1. Structure Globale

L'enzyme CaHydA de *Clostridium acetobutylicum* est bien caractérisée en dépit du fait que sa structure n'ait pas été déterminée [108,116]. Cette enzyme possède 71% d'identité avec la [Fe-Fe] hydrogénase de *C. pasteurianum* dont la structure a été résolue (Figure 21)[117].

Cette enzyme est formée par 582 résidus et possède une masse moléculaire d'environ 65 kDa. Cette hydrogénase de type M3a, est constituée du Domaine H et comporte trois autres domaines décrits comme étant impliqués dans le transfert d'électrons [89]. Cette enzyme est métaboliquement impliquée dans la production de dihydrogène à partir de protons et d'électrons provenant de la ferrédoxine réduite (Chapitre 1.1.2.5).

1.4.5.4.2. Domaine H et site catalytique

Le Domaine H (« H-domain ») est la partie, très conservée, indispensable à l'activité de l'enzyme, qui est systématiquement retrouvée chez toutes les hydrogénases à fer. Ce domaine protéique d'environ 350 acides aminés comprend le site catalytique inorganique de l'enzyme appelé Cluster H (« H-Cluster»). Ce domaine protéique contient les résidus impliqués dans la coordination du site catalytique mais aussi ceux impliqués dans le transfert de protons [118] et ceux permettant la formation de canaux à gaz. Par ailleurs, lorsque la structure des enzymes est limitée au seul domaine catalytique (enzymes de type M1), ce dernier contient également tous les acides aminés permettant les interactions avec les partenaires d'oxydoréduction [111,119].

Le site catalytique Cluster H des hydrogénases à fer est formé d'un centre binucléaire à deux atomes de fer (2FeH) particulier lié à un centre [4Fe-4S] (4FeH) (Figure 22 et 23).

A partir des alignements de séquences des enzymes, ont été défini trois motifs peptidiques (L1, L2 et L3) [89] comportant des résidus cystéines impliqués dans la coordination du centre [4Fe-4S] (Figure 22 et 23). Les cystéines C2 (C299), C3 (C354) et C4 (C498) coordonnent le centre fer-soufre de façon classique alors que la cystéine C5 (C502) permet la liaison du centre 4FeH et du site binucléaire 2FeH (Figure 23).

La cystéine C1 (C298) est systématiquement retrouvée chez toutes les enzymes mais n'intervient pas dans la coordination du centre 4FeH.

Par ailleurs, dans certaines séquences d'hydrogénases, le résidu C2 peut être remplacé par un résidu sérine, changeant *a priori* la liaison S-Fe par une liaison O-Fe [89].

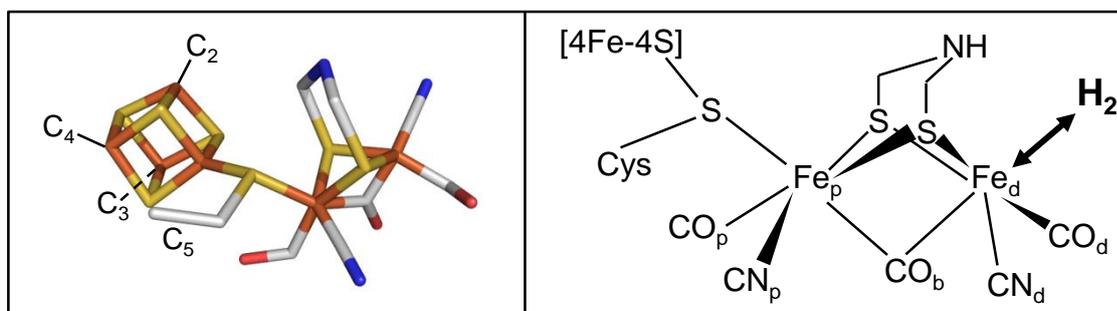


Figure 22 : Représentation tridimensionnelle et schématique du site catalytique des [FeFe] hydrogénases

Le site binucléaire est formé de deux atomes de fer, qui sont complétés par des ligands CN⁻ qui stabilisent le site catalytique et qui forment de nombreuses liaisons non covalentes avec des résidus situés dans son environnement direct. Un ligand CO est présent sur chacun des atomes de fer et un ligand CO (CO_b pour « bridging CO »), permet la liaison des deux atomes de fer ; tous sont nécessaires pour stabiliser les différents états rédox du site catalytique. Différentes possibilités ont été évoquées mais il est maintenant démontré que les deux atomes de fer sont par ailleurs liés entre eux par une molécule d'azadithiolate (ADT : -S-CH₂-NH-CH₂-S-) [120,121]. Les deux atomes de fer sont dénommés « proximal » et « distal » en fonction de leur position respective par rapport au centre 4FeH. C'est au niveau de l'atome de fer distal (Fe_d) que se fait la réaction de réduction des protons (Figure 22).

Par ailleurs, il a été montré que certains centres binucléaires synthétiques pouvaient permettre de maintenir une activité hydrogénase par l'établissement d'enzymes semi-synthétiques où le ligand ADT est modifié (Chapitre 1.4.5.5.4) [122,123].

1.4.5.4.3. Cycle catalytique

Le cycle catalytique comprend plusieurs étapes couplées de transfert de protons et d'électrons durant lesquelles les atomes de fer proximal (Fe_p) et distal (Fe_d) changent de valence et de coordination de ligand ; alors que le centre [4Fe-4S] change d'état de réduction. Deux états rédox sont bien caractérisés et permettent de schématiser simplement le cycle catalytique de l'enzyme : l'état actif « oxydé » H_{Ox} et l'état actif « réduit » H_{Red} (Figure 23). L'état H_{Ox}/H_{Ox}-H₂ est caractérisé par une configuration de valence mixte 4Fe_H(II)\Fe_p(I)Fe_d(II)-[]/[H₂], alors que l'état H_{Red} présente une configuration de valence 4Fe_H(II)\Fe_p(I)Fe_d(I) ; et, bien que le sous-cluster [4Fe-4S] présente la même configuration de valence (2⁺), ces deux états rédox n'ont pas les mêmes signatures en spectroscopie RPE, puisque le sous-cluster catalytique change de valence [89]. Récemment, un état « super-réduit » (H_{SRed}) du Cluster H a été proposé comme faisant partie du cycle catalytique, et ferait intervenir le centre [4Fe-4S] du Cluster H avec une configuration de valence [4Fe-4S]¹⁺ donnant un signal différent en spectroscopie RPE [124]. Dans cet état « super-réduit » H_{SRed}, le ligand CO_b ne lie pas les atomes Fe_p et Fe_d entre eux mais est lié uniquement à l'atome Fe_d. C'est l'observation, en spectroscopie FITR (Chapitre 1.4.6.3) de la perte du signal Fe-CO-Fe au profit d'un signal Fe-CO supplémentaire

qui a permis de mettre en évidence ce phénomène [124]. Toutefois, cet état H_{SRed} n'a été décrit que chez les enzymes DdH et CrHydA1, qui ne possèdent pas tous les centres fer-soufre accessoires présents chez l'enzyme CaHydA. Il est proposé, par ailleurs, que l'état H_{SRed} ne correspond pas à un intermédiaire du cycle catalytique mais à un état inactif stabilisé en conditions réductrices [92,125].

Récemment, il a été proposé que d'autres états intermédiaires du cycle catalytique, faisant intervenir des mécanismes de transferts couplés de protons et d'électrons, puissent exister. L'état H_{hyd} qui présenterait une configuration de valence $4Fe_H(I)\backslash Fe_p(I)Fe_d(I)-[H]$ avec le sous-cluster sous forme réduite $[4Fe-4S]^{1+}$ et un ion hydrure (H^-) lié à l'atome de fer distal. Cet état a pu être mis en évidence grâce à l'étude du variant de l'enzyme CrHydA_C169S (Chapitre 1.4.5.4.5) [126]. De plus, il a été proposé que l'état H_{Red} puisse consister en deux états différents : H_{Red} de configuration de valence $4Fe_H(I)\backslash Fe_p(I)Fe_d(II)$ et $H_{Red}H^+$ de configuration de valence $4Fe_H(II)\backslash Fe_p(I)Fe_d(I)-[H^+]$ pour lequel le ligand CO_b est lié uniquement à l'atome Fe_d [127]. L'ensemble des différents états rédox possibles du cycle catalytique sont détaillés en figure 24.

La présence de monoxyde de carbone au niveau du cluster entraîne une inhibition réversible de l'enzyme par formation de l'état H_{Ox-CO} (Figure 23). La fixation du CO sur le Cluster H est plus forte que la liaison du dihydrogène mais l'inhibition par le CO est réversible en particulier après illumination, du fait de la photo-labilité de la liaison Fe-CO [128]. De plus, la liaison du monoxyde de carbone protège les enzymes du dioxygène, suggérant le fait que CO et O_2 se fixeraient sur la même cible au niveau du site catalytique [129].

La fixation de l'oxygène sur le site catalytique entraîne une inhibition récemment décrite comme partiellement réversible [5,130]. La liaison du dioxygène se fait au niveau de l'atome de fer distal (Fe_d) du Cluster H, ce qui pourrait ensuite former des dérivés réactifs de l'oxygène entraînant la destruction du centre $[4Fe-4S]$ et du cluster H complet [89]. Il a récemment été proposé la possibilité d'une réactivation du site catalytique sous forme H_{Ox} par la réduction du dioxygène par quatre protons et quatre électrons pour former une molécule d'eau [5].

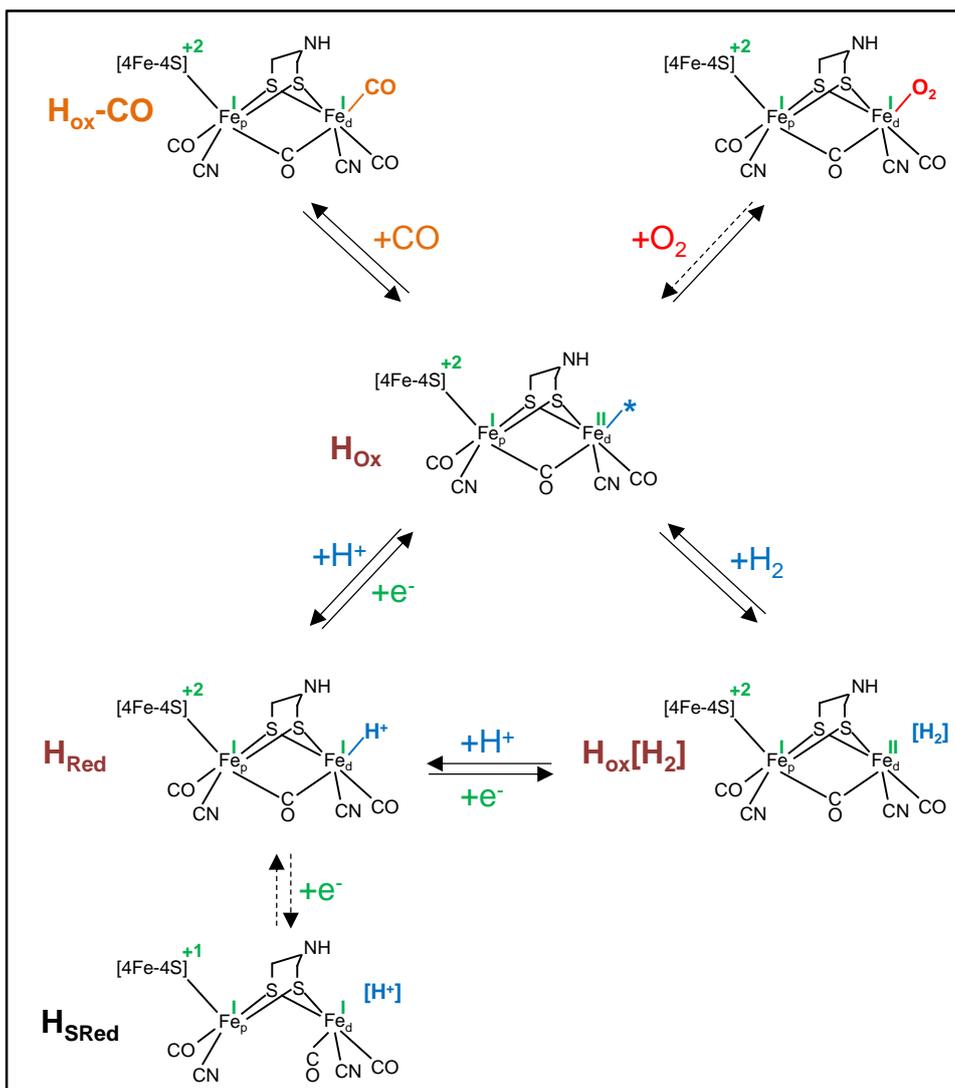


Figure 23: Représentation des différents états du site catalytique des [FeFe] hydrogénases.

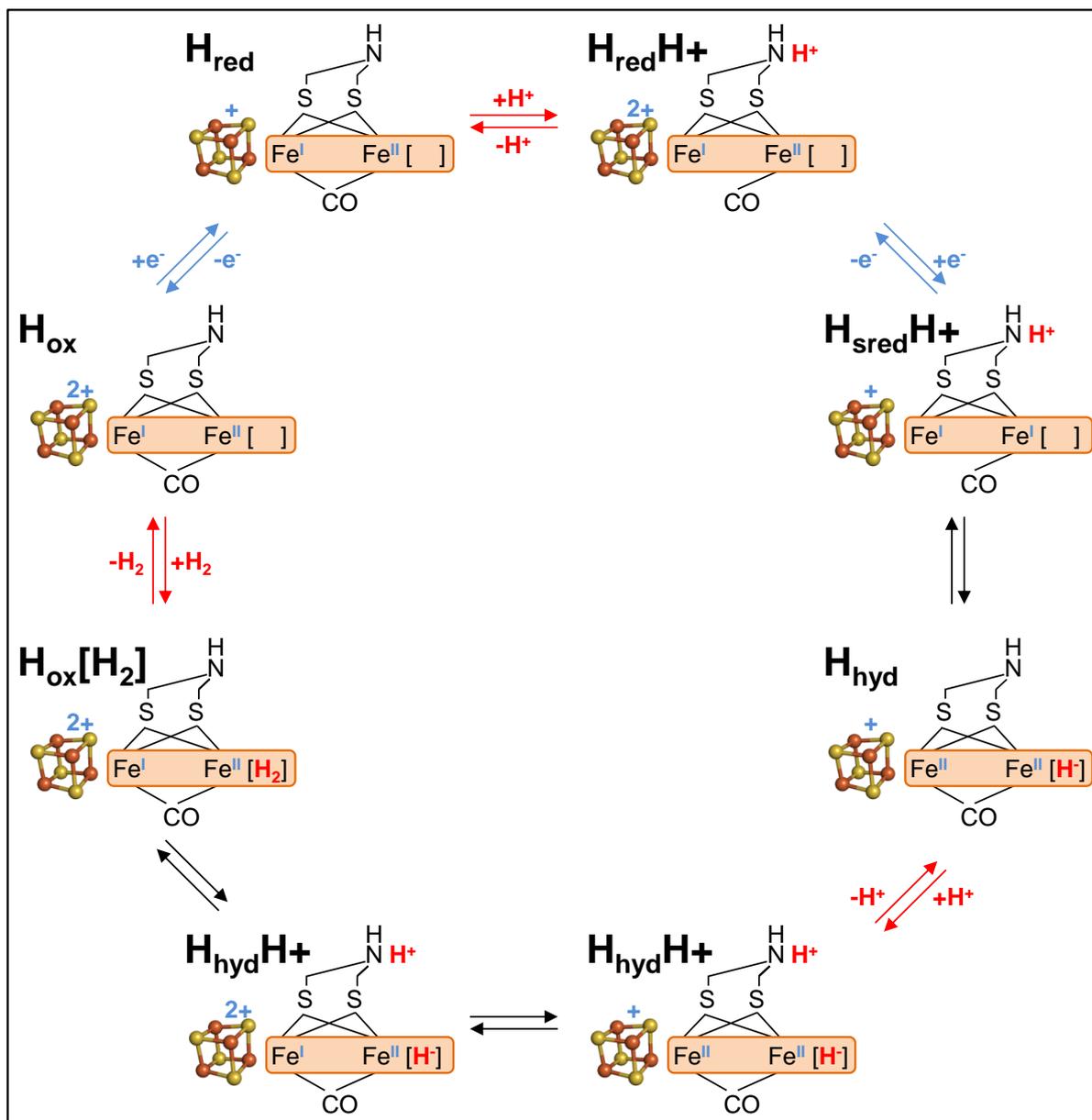


Figure 24: Modèle de cycle catalytique des hydrogénases à fer faisant intervenir tous les états rédox proposés. Les transferts d'électrons ainsi que les valences des deux sous-clusters sont indiqués en bleu, alors que les transferts de protons et leur liaison à l'atome Fe_a sont indiqués en rouge (d'après Sommer *et al.* [127]).

1.4.5.4.4. Environnement du Cluster H

Le site catalytique se trouve au centre d'une cavité hydrophobe, dont les acides aminés sont très conservés, formée par un repliement complexe de quatre boucles et quatre hélices peptidiques. Les interactions électrostatiques entre le Cluster H et les acides aminés de la poche influencent l'activité de l'enzyme.

La lysine 357 interagit avec le ligand CN^- distal et joue un rôle pendant la maturation du site catalytique. Les trois résidus sérine 322, proline 323 et glutamine 324 interagissent également avec ce ligand du Cluster H. Le ligand CN^- proximal est quant à lui stabilisé par les acides aminés Pro230 et Ser231. Bien qu'elle ne soit pas toujours conservée, la méthionine 352 interagit avec les ligands CO proximal et CO_b liant les deux atomes de fer. La phénylalanine 416 interagit avec un des atomes de soufre de la molécule d'ADT, alors que les acides aminés C298 et M496 sont définis comme interagissant avec l'atome d'azote de l'ADT dans la modulation du transfert de protons [89].

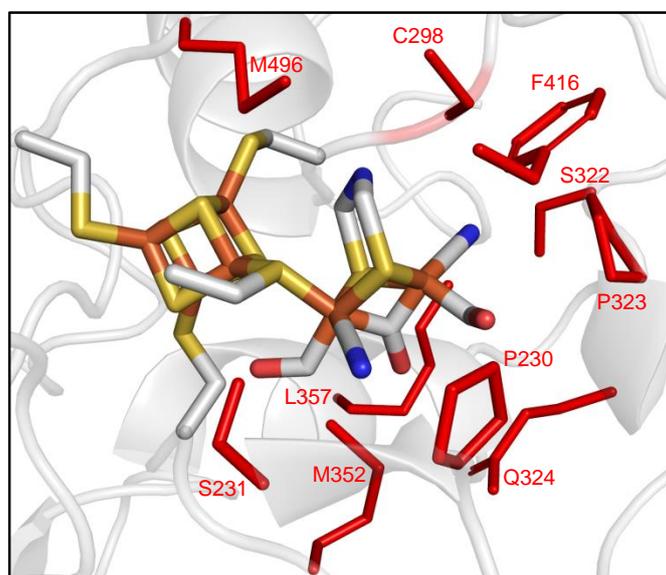


Figure 25 : Environnement du site catalytique et mise en évidence des résidus (baguettes colorées en rouge) interagissant directement avec le site binucléaire (baguettes multicolore).

1.4.5.4.5. Cystéine 298

Parmi tous les acides aminés impliqués dans les interactions avec le centre binucléaire catalytique, la cystéine C298 tient un rôle particulier. Cet acide aminé correspond à la cystéine C169 décrite pour l'enzyme CrHydA1 de *C. reinhardtii* ou la cystéine C299 décrite pour l'enzyme Cpl. Cet acide aminé cystéine, qui correspond à une des deux seules cystéines libres de la protéine est systématiquement retrouvé dans le motif peptidique associé au Cluster H. Ce résidu permet le transfert des protons jusqu'à l'atome d'azote de la molécule d'ADT. Différents résultats ont été obtenus après mutation de cet acide aminé. Les premières études ont indépendamment montré une diminution marquée de l'activité de l'enzyme suite à la

mutation C298A [116,118]. Les mutations C298L et C298S ont aussi montré des diminutions de l'activité de l'enzyme [116,118]. La mutation C298S conduit à la production d'une enzyme totalement inactive mais possédant un Cluster H intact qui a été caractérisé par spectroscopie RPE et FITR [131]. Depuis, des études par mutagenèse à saturation de site ont montré que seule la mutation de la cystéine 298 vers un résidu aspartate pouvait restaurer partiellement l'activité de l'enzyme [132]. Enfin, il a été montré par la caractérisation RPE et FITR que la mutation C298D entraînait des modifications de l'équilibre rédox entre les états H_{Ox} et H_{Red} , bien que le Cluster H ne soit pas affecté [133].

1.4.5.4.6. Voie de transfert des protons

Suite à la résolution de la structure de l'enzyme Dd de *D. desulfuricans*, une voie de transfert des protons a été proposée [110]. Depuis, des travaux basés sur des approches de modélisation moléculaire [134,135], complétés par la caractérisation biochimique de certains variants de l'enzyme Cpl de *C. pasteurianum* [118,136] ont permis de définir la voie de transfert des protons chez les hydrogénases à fer. En effet, la caractérisation biochimique de mutants ponctuels de l'hydrogénase de *C. pasteurianum* a mis en évidence l'importance des résidus Cys298, Glu278, Ser318, Glu281 dans le transfert des protons jusqu'au Cluster H, faisant intervenir également une molécule d'eau (Figure 26). Le rôle des résidus Ser319 et Arg285, situés à la surface de la protéine a été étudié récemment. Un rôle de régulateur de la vitesse de transfert des protons est proposé pour le résidu Arg285, alors que l'acide aminé Ser319 serait directement impliqué dans le transfert [136].

Il est à noter que la voie de transfert des protons est étudiée sur la base des activités de réduction des protons des enzymes, chez lesquelles seules des mutations ponctuelles uniques ont été introduites.

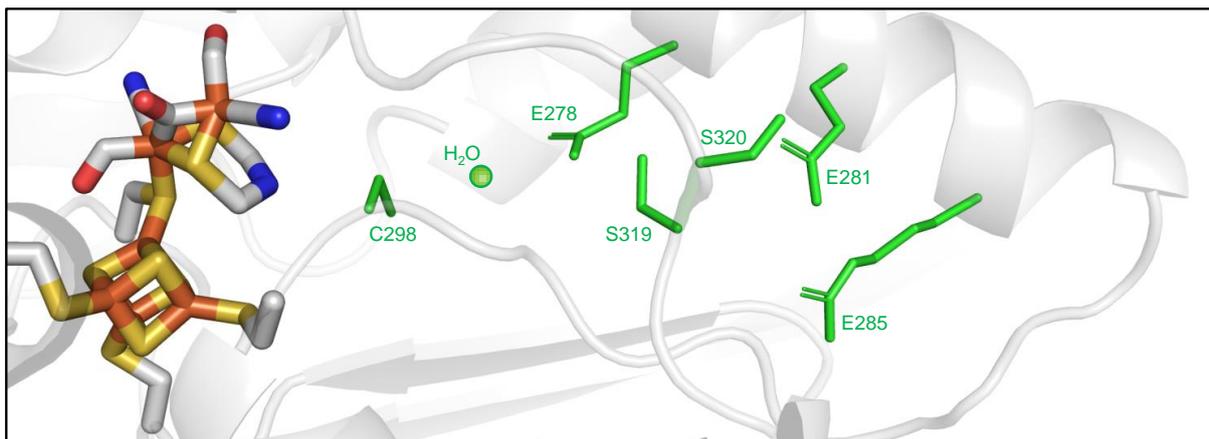


Figure 26: Mise en évidence de la voie de transfert des protons jusqu'au site catalytique de l'enzyme. Les résidus impliqués dans la voie de transfert de protons jusqu'au Cluster H sont représentés en baguettes colorés en vert.

1.4.5.4.7. Voie de transfert du dihydrogène

Deux voies préférentielles de diffusion des gaz, depuis la surface de la protéine jusqu'à la cavité centrale contenant le Cluster H ont été proposées (Figure 27) [89]. La voie A, définie à partir des structures des enzymes DdH et Cpl correspondrait à un canal pour le dihydrogène [110,117], cependant l'oxygène pourrait également emprunter cette voie pour parvenir au centre actif. La voie B, définie à partir de structure statique des enzymes ne permettrait pas le passage des gaz H_2 et O_2 ; toutefois des simulations de dynamique moléculaire ont montré que ces deux gaz, pouvaient emprunter cette voie jusqu'au site catalytique (Figure 27)[89,137,138]. En outre, une troisième voie a été définie. La voie W (pour « Wet Channel ») serait bordée de résidus hydrophiles interagissant avec des molécules d'eau et pourrait également intervenir dans le transfert des protons (Figure 27)[116].

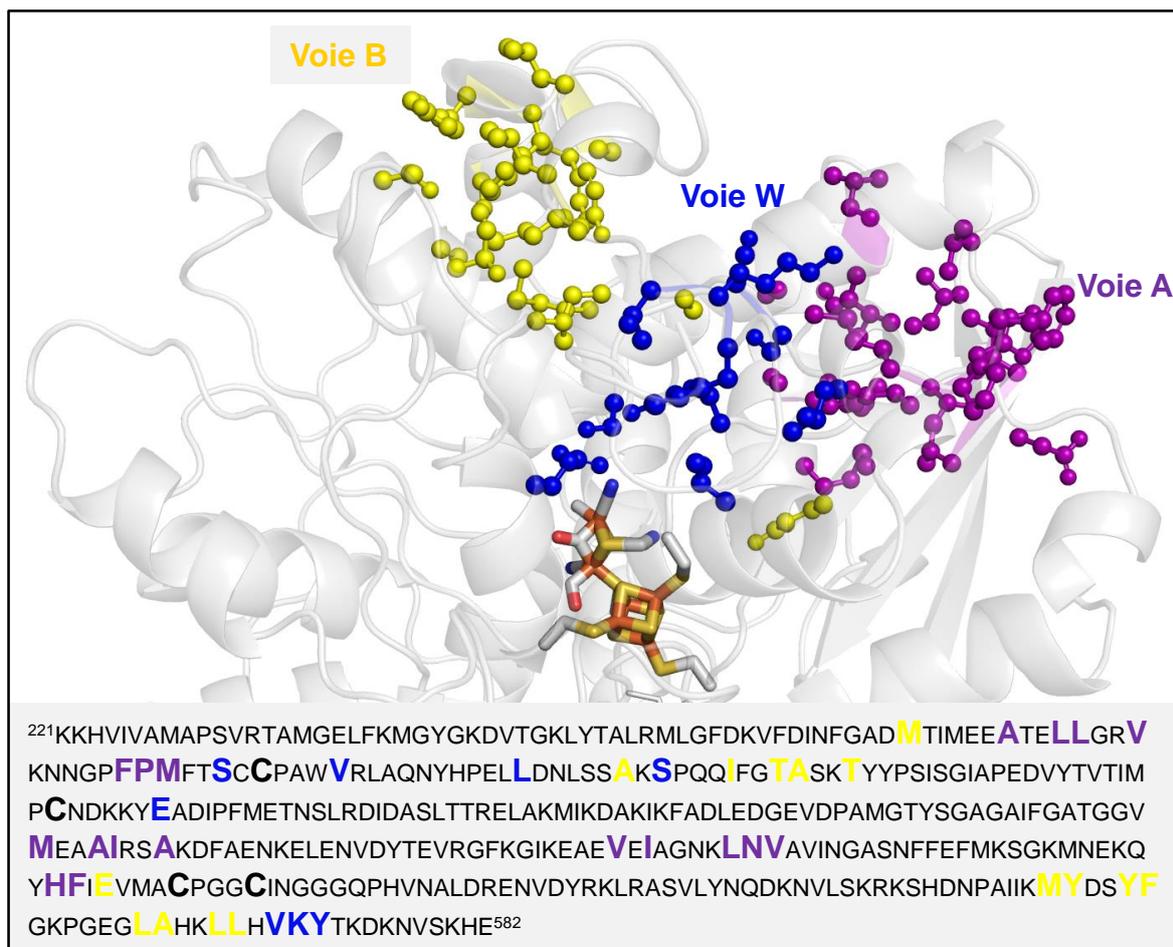


Figure 27: Mise en évidence des voies possibles de transfert des gaz jusqu'au site catalytique au sein du Domaine H.

1.4.5.4.8. Sensibilité à l'oxygène

La très forte sensibilité à l'oxygène des hydrogénases à fer est le plus important facteur limitant leur utilisation pour des applications biotechnologiques. Le mécanisme exact de l'inhibition par l'oxygène est encore inconnu, toutefois il est proposé que l'oxygène entraîne la formation de dérivés réactifs de l'oxygène entraînant une destruction du Cluster H. La sensibilité des différentes enzymes peut être évaluée en solution [139,140] ou par des méthodes d'électrochimie directe permettant de déterminer des paramètres cinétiques d'affinité pour l'oxygène [130]. Récemment, il a été mis en évidence que l'inhibition par l'oxygène pouvait être partiellement réversible [130] par la formation de molécules d'eau à partir d'oxygène, de protons et d'électrons [5]. Les formes inactivées par l'oxygène des hydrogénases sont obtenus plus rapidement avec l'enzyme CrHydA qu'avec l'enzyme CaHydA. C'est pourquoi, il a été proposé que la présence de centres fer-soufre accessoires susceptibles alors de protéger l'enzyme, puisse être lié à ce phénomène [5]. Par

ailleurs, il a été proposé que l'optimisation des transferts d'électrons jusqu'au site catalytique pouvaient diminuer la sensibilité à l'oxygène des enzymes. Ceci a été montré d'une part, avec la création d'une protéine de fusion entre la ferrédoxine 2[4Fe-4S] et l'enzyme Cpl [141] et d'autre part, avec la création d'une protéine de fusion entre la ferrédoxine [2Fe-2S] de type plante et l'hydrogénase CrHydA1 [82,142].

Des travaux ont récemment été réalisés dans le but d'augmenter la tolérance à l'oxygène de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* en réduisant le diamètre du canal de la voie A. L'effet attendu était d'empêcher la diffusion d'oxygène dans ce canal tout en garantissant un transfert de possible du dihydrogène [116], cependant les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence de mutation permettant de diminuer la sensibilité à l'oxygène. Par ailleurs, après des travaux de criblage d'enzymes, il a été montré que la mutation A280V, en combinaison avec d'autres mutation (N160D, I197V et N289D), entraînait une meilleure résistance à l'oxygène de l'enzyme de *C. pasteurianum* [140].

Finalement, il a aussi été montré que les hydrogénases DdH et CaHydA étaient plus rapidement inactivées par l'oxygène lors de l'oxydation du dihydrogène que lors de la réduction des protons [143].

1.4.5.4.9. Domaine F et centres fer-soufre accessoires

Au sein de la protéine, d'autres domaines contenant des centres fer-soufre peuvent s'ajouter au Domaine H. Chez les [FeFe] hydrogénases de type M3, le Domaine F correspond à l'ensemble des trois domaines contenant en tout quatre centres fer-soufre.

La présence du Domaine F empêche une interaction directe des partenaires d'oxydoréduction avec le site catalytique. Il est admis que ces centres fer-soufre dits « accessoires », ne possédant pas d'activité catalytique, de par leur nature, permettent le transfert des électrons jusqu'au site catalytique. L'étude de la structure de l'enzyme Cpl et de la position de chacun des centres fer-soufre a mis en évidence des voies préférentielles de transfert d'électrons [117].

Il est généralement admis que la distance maximum pour qu'un électron puisse être transféré d'un centre fer-soufre à un autre est de 14 Å [144]. Les centres fer-soufre accessoires FS4C et FS2 sont donc trop éloignés pour pouvoir s'échanger des

électrons, mais ces deux centres fer-soufre sont idéalement placés, à la surface de l'enzyme, pour pouvoir accepter des électrons des partenaires physiologiques. Ils sont également situés à une distance permettant le transfert des électrons jusqu'au centre FS4B, lui-même capable d'interagir avec le centre FS4A pour permettre le transfert d'électrons jusqu'au centre actif. Les centres FS4B et FS4A semblent trop enfouis au sein de la protéine pour interagir avec les donneurs d'électrons physiologiques (Figure 28).

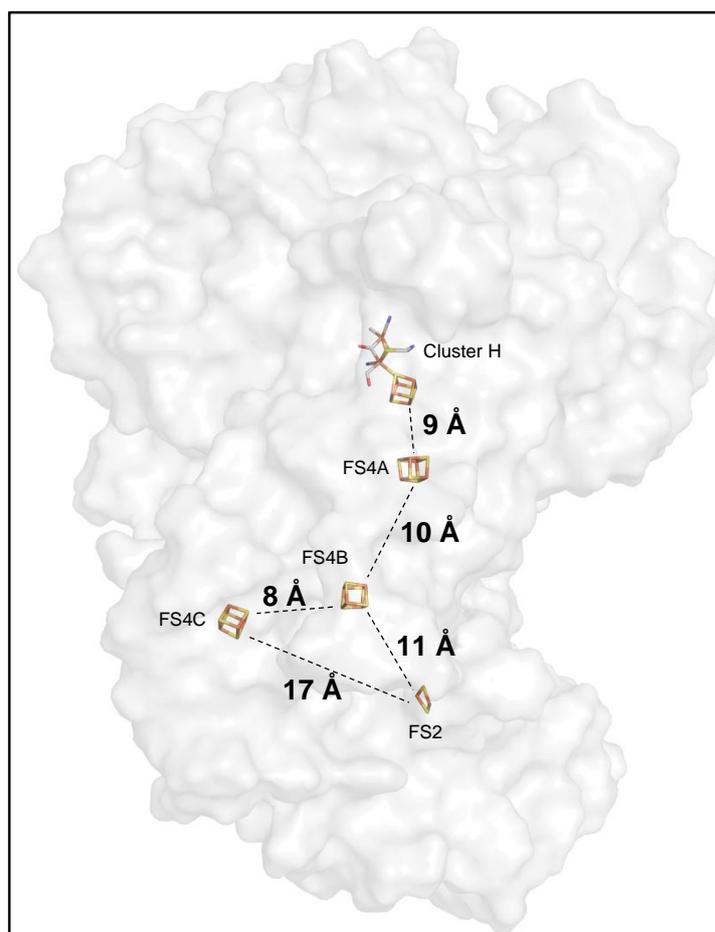


Figure 28: Mise en évidence des distances entre les différents centres fer-soufre.

Le premier domaine, contenant les centres fer-soufre FS4A et FS4B possède une très forte homologie avec les ferrédoxines bactériennes 2[4Fe-4S]. Ce domaine, composé d'environ 70 acides aminés contient deux centres [4Fe-4S], coordonnés chacun par quatre résidus cystéines. Les motifs peptidiques caractéristiques des centres fer-soufre des ferrédoxines clostridiales sont retrouvés en partie puisque seul le centre FS4A présente un motif -Cx₂Cx₂Cx₃CPV- complet (Figure 21). De plus, on observe bien, comme chez les ferrédoxines clostridiales que chacun de ces deux

centres fer-soufre est coordonné en partie par des cystéines non consécutives dans la séquence (Chapitre 1.3.2.2.2, Figure 11).

Deux domaines différents, retrouvés à la surface de l'enzyme présentent des caractéristiques particulières et du fait de leur position proche de la surface de l'enzyme, semblent être les candidats idéaux pour l'interaction de l'hydrogénase avec ses partenaires d'oxydoréduction physiologiques [92].

Le domaine accessoire comprenant le centre FS4C contient un centre fer-soufre de type [4Fe-4S], mais celui-ci est dit atypique car la liaison à la protéine des atomes de fer est réalisée par trois résidus cystéine et un résidu histidine (Figure 21), organisés selon le motif : -Hx₃Cx₂Cx₅C-. La structure de ce domaine, formé d'environ 70 acides aminés, présente une grande homologie avec les ferrédoxines retrouvées chez les organismes extrémophiles comme *Thermotoga maritima* [67], qui sont-elles mêmes issues de ferrédoxines de type clostridiales.

La présence de centre fer-soufre atypique a déjà été décrite chez les [NiFe] hydrogénases comme celle de *Desulfovibrio fructosovorans* [83,94,96]. Le rôle de cette histidine serait d'augmenter le potentiel d'oxydoréduction moyen du centre fer-soufre, comme cela est observé dans le cas des protéines de Rieske [53,78,117] Par ailleurs, il est à noter que c'est l'atome d'azote N ϵ du cycle imidazole de l'histidine H93 qui permet la coordination du cluster [4Fe-4S] chez l'hydrogénase CaHydA à la différence de ce qui est observé généralement, chez les protéines de Rieske ou les hydrogénases [Ni-Fe], où c'est l'atome N δ qui permet la liaison de l'atome de fer dans le cluster atypique (Figure 29).

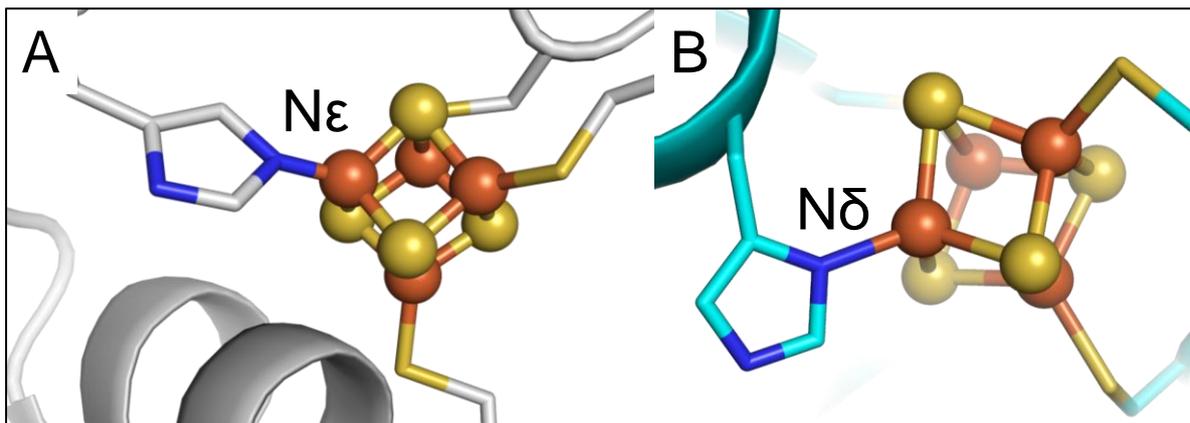


Figure 29: Coordination des centres fer-soufre [4Fe-4S] atypique par les résidus histidine. L'atome d'azote $N\epsilon$ est impliqué dans la liaison à l'atome de fer du centre atypique dans le cas de l'hydrogénase CaHydA (A), alors que c'est l'atome d'azote $N\delta$ qui est impliqué dans la liaison à l'atome de fer dans le centre distal des hydrogénases nickel-fer (B).

Le domaine situé en partie N-terminale de l'enzyme, formé d'environ 75 acides aminés, présente une forte homologie avec les ferrédoxines de types « plantes » ou « vertébrés » dont la phylogénie est peu décrite mais qui ont la particularité de contenir des centres [2Fe-2S] [61]. Le centre FS2 est coordonné par quatre résidus cystéine organisés selon le motif : $-Cx_{11}Cx_2Cx_{12}C-$. Ce domaine a été exprimé chez *E. coli* de façon isolée, ce qui a permis de confirmer cette homologie, de valider les résidus impliqués dans la coordination du centre fer-soufre et de mesurer le potentiel rédox du centre (autour de -400 mV) [62].

Toutefois, plusieurs approches expérimentales différentes ont mis en évidence que la présence du Domaine F pouvait influencer plusieurs caractéristiques de l'enzyme. En effet, après avoir testé un ensemble d'enzymes chimériques, Nagy *et al.* [145] ont montré que la fusion du Domaine F de l'enzyme CaHydA avec le Domaine H de l'enzyme de *C. saccharobutylicum* avait une activité supérieure à l'enzyme de *C. saccharobutylicum* [145].

Par ailleurs, il a été montré que les centres fer-soufre accessoires influençaient l'état redox du site catalytique ; en effet, la présence de domaines accessoires chez les enzymes DdH et Cpl en comparaison avec l'enzyme CrHydA1 entraîne des différences de comportement du ligand CO_b lors du cycle catalytique [146].

Des approches QM/MM, chez l'enzyme DdH, ont confirmé l'influence des centres fer-soufre accessoires sur l'état du cluster H. L'état redox du centre binucléaire est

directement influencé par l'état redox de l'équivalent du centre FS4B, alors que les états rédox des centres intermédiaires restent inchangés [147,148].

Enfin, la présence de domaines accessoires comportant des centres fer-soufre pourrait également intervenir dans la sensibilité des enzymes à l'oxygène. Il a été récemment confirmé que l'enzyme CaHydA était moins sensible à l'oxygène que l'enzyme CrHydA1 [130,137]. De plus, des expérimentations ont montré que la mutation de certains acides aminés situés autour de la sphère de coordination du centre FS4A, en particulier au niveau de l'isoleucine 197 conservée entre les enzymes Cpl et CaHydA, pouvait entraîner une tolérance à l'oxygène améliorée [140].

1.4.5.5. Maturation des hydrogénases

1.4.5.5.1. Introduction

L'assemblage et l'insertion du centre binucléaire dans les [FeFe] hydrogénases nécessitent des protéines spécifiques, dites de maturation.

La nécessité de protéines de maturation impliquées dans la formation du centre catalytique des hydrogénases a initialement été mise en évidence par l'expression hétérologue de [Fe-Fe] hydrogénases chez *E.coli*, qui exprime par ailleurs des [Ni-Fe] hydrogénases, et qui conduit à des protéines inactives [149–151].

Par ailleurs, il a été mis en évidence que les protéines de maturation n'étaient pas impliquées dans la formation des centres fer-soufre mais uniquement dans la synthèse puis l'insertion du centre catalytique bimétallique 2FeH, selon un mécanisme en plusieurs étapes [152,153].

En effet, il a été démontré, qu'au sein de la protéine HydAΔEFG, issue de *C. reinhardtii* et exprimée chez *E. coli* en l'absence des gènes *hydEF* et *hydG*, que le centre [4Fe-4S] (4FeH) était correctement formé alors qu'il subsistait un espace vide à la place du centre 2FeH [153].

Plusieurs expériences ont permis de déterminer le nombre et le type de protéines impliquées dans la maturation des [Fe-Fe] hydrogénases.

Chez *C. acetobutylicum*, on trouve trois gènes : *hydE*, *hydF* et *hydG* permettant l'expression de trois protéines : HydE, HydF et HydG.

L'expression chez *E. coli*, de l'enzyme CrHydA1 de *C. reinhardtii*, avec les gènes de maturation *hydE*, *hydF* et *hydG* de *C. acetobutylicum* a également conduit à la synthèse d'une hydrogénase active [151].

Enfin,, l'expression hétérologue de l'hydrogénase à fer de *C. reinhardtii* chez *C. acetobutylicum* [107] permet la production d'une protéine actives.

Ces résultats montrent la nécessité d'un système de maturation complet, spécifique de l'expression de [Fe-Fe] hydrogénases mais non spécifique de chaque enzyme, pour former un site catalytique parfaitement fonctionnel.

1.4.5.5.2. Les différentes protéines de maturation

Trois protéines sont impliquées dans la maturation des hydrogénases à fer, chacune d'elles ayant une activité propre.

1.4.5.5.2.1. HydF

La protéine HydF, codée par le gène *CA_C1651* chez *C. acetobutylicum*, est une protéine de 47 kDa sous forme monomérique mais qui est retrouvée dans les cellules sous forme dimérique ou tétramérique.

Chaque protéine HydF contient trois domaines distincts : un domaine N-terminal de fixation au GTP, un domaine de dimérisation et un domaine C-terminal contenant un centre fer-soufre de type [4Fe-4S] [154,155].

La structure de la protéine HydF de la bactérie *Thermotoga neapolitana* a été résolue (fichier PDB 3QQ5 [155]), toutefois, dans cette structure le centre fer-soufre n'est pas présent et il n'est pas possible de déterminer avec certitude quels acides aminés permettent sa coordination parmi ceux appartenant au motif -CxHx46,53HCx2C- [151,156]. Récemment, la résolution de la structure de la protéine HydF de la bactérie *Thermosipho melanesiensis* (fichier PDB 5KH0 [157]) a permis de mettre en évidence que la cette protéine possédait un centre [4Fe-4S] coordonné par trois résidus cystéines et un résidu glutamate [157].

Par ailleurs, il a été démontré la présence d'un centre fer-soufre de type [2Fe-2S] au sein de la protéine HydF purifiée en l'absence des protéines HydE et HydG [154]. Cependant, la fonction et la localisation exacte de ce centre, de même que les résidus pouvant être impliqués dans sa coordination sont encore inconnues. Il pourrait être impliqué dans le transfert d'électrons, être le site où se fait la synthèse

des ligands CO et CN, ou, être le précurseur direct du centre binucléaire retrouvé au niveau du Cluster H des hydrogénases [158]. Suite aux études sur l'activation *in vitro* des hydrogénases, il semble que cette dernière hypothèse soit à privilégier [159].

A l'heure actuelle, il est admis que la protéine HydF est la protéine d'échafaudage du centre binucléaire des [Fe-Fe] hydrogénases et que cette protéine permet, éventuellement sous forme dimérique [158], l'activation des hydrogénases par la distribution du centre binucléaire complet. Il a été proposé deux hypothèses de fixation du centre binucléaire au niveau du centre [4Fe-4S] de HydF, soit en faisant intervenir la liaison thiolate d'une cystéine comme cela est retrouvé au sein des hydrogénases [160]; soit en faisant intervenir une liaison cyanide « directe » entre le centre [4Fe-4S] et le centre binucléaire [122], qui est l'hypothèse privilégiée actuellement [157].

Par ailleurs, la protéine HydF possède aussi une activité GTPasique démontrée expérimentalement [161] ; la fixation et l'hydrolyse du GTP par la protéine HydF sont essentielles dans le rôle que joue cette protéine pour la synthèse du future site binucléaire catalytique. En effet, il a été montré que des mutations au niveau des acides aminés présents dans le motif Walker P-loop empêchait la formation d'hydrogénases actives [151].

A noter cependant que l'hydrolyse du GTP par HydF n'apparaît pas être indispensable au transfert du site catalytique à l'apo-enzyme. Il est proposé que l'activité GTPasique soit donc en lien avec des interactions de la protéine HydF avec les deux autres protéines de maturation HydE et HydG [158].

1.4.5.5.1.2. HydG

La protéine HydG est une protéine monomérique de 55 kDa, codée par le gène *CA_C1356* chez *C. acetobutylicum*.

Au sein de cette protéine de type SAM, un premier centre fer-soufre [4Fe-4S] de type SAM, coordonné par trois résidus cystéine et une molécule de S-adénosylméthionine (SAM), est retrouvé au niveau du motif peptidique $-C_{x_3}C_{x_2}C-$ dans la partie N-terminale de la protéine. Le deuxième centre fer-soufre, retrouvé au niveau du motif $-C_{x_2}C_{x_{22}}C-$ dans la partie C-terminale de la protéine, est de type [4Fe-4S]. La protéine HydG est impliquée dans la formation des résidus CO et CN⁻ du site catalytique [158,162].

Il a été montré que la réaction de synthèse de ces ligands se fait au minimum en deux étapes. La première réaction, dépendante du radical SAM, permet le clivage hétérolytique d'une molécule de tyrosine pour synthétiser du *p*-cresol et de la dehydroglycine (DHG), qui servira la synthèse des ligands CO et CN⁻ dans une deuxième réaction dépendant du deuxième centre fer-soufre [163].

1.4.5.5.1.3. HydE

La protéine HydE, codée par le gène *CA_C1631* chez *C. acetobutylicum* est une protéine de 42 kDa. Elle est indispensable à la maturation des hydrogénases, toutefois son rôle exact est encore inconnu.

HydE est une protéine de type SAM comportant le motif classique –Cx₃Cx₂C- dans sa partie N-terminale. La structure de la protéine HydE de *Thermotoga maritima* a été résolue (Fichier PDB : 3IIZ [164]), et il apparaît que cette protéine possède un second centre fer-soufre coordonné par les cystéines du motif –Cx₇Cx₂C- en position C-terminale. Il a récemment été démontré que ce second centre était de type [4Fe-4S] [165].

A l'heure actuelle, le rôle de la protéine HydF comme protéine d'échafaudage et de la protéine HydG comme la protéine permettant l'ajout des ligands CO et CN⁻ au centre binucléaire est bien défini. De ce fait, il est admis que la protéine HydE ait un rôle dans la liaison des deux atomes de fer par la molécule d'ADT; toutefois, le substrat ainsi que le produit exact de la réaction restent inconnus. Il semblerait cependant que la liaison des deux atomes de fer soit une des premières étapes de la biosynthèse du Cluster H, réalisé en lien avec la protéine HydF.

1.4.5.5.3. Mécanisme global de maturation des [FeFe] hydrogénases

La mise en évidence d'interactions directes possibles entre HydF et les deux autres protéines a permis de proposer un mécanisme global de maturation des hydrogénases détaillé Figure 30. Un centre [2Fe-2S] est initialement synthétisé par les voies classiques de synthèse des centres fer-soufre au niveau de la protéine HydF (1). La protéine HydE modifie ce centre en ajoutant le ligand azadithiolate (2). Ensuite, La protéine HydG synthétise et transfère les radicaux CN⁻ et CO au niveau du centre 2Fe (3). Le centre binucléaire complet, formé au sein de HydF est enfin transféré à l'hydrogénase immature (4).

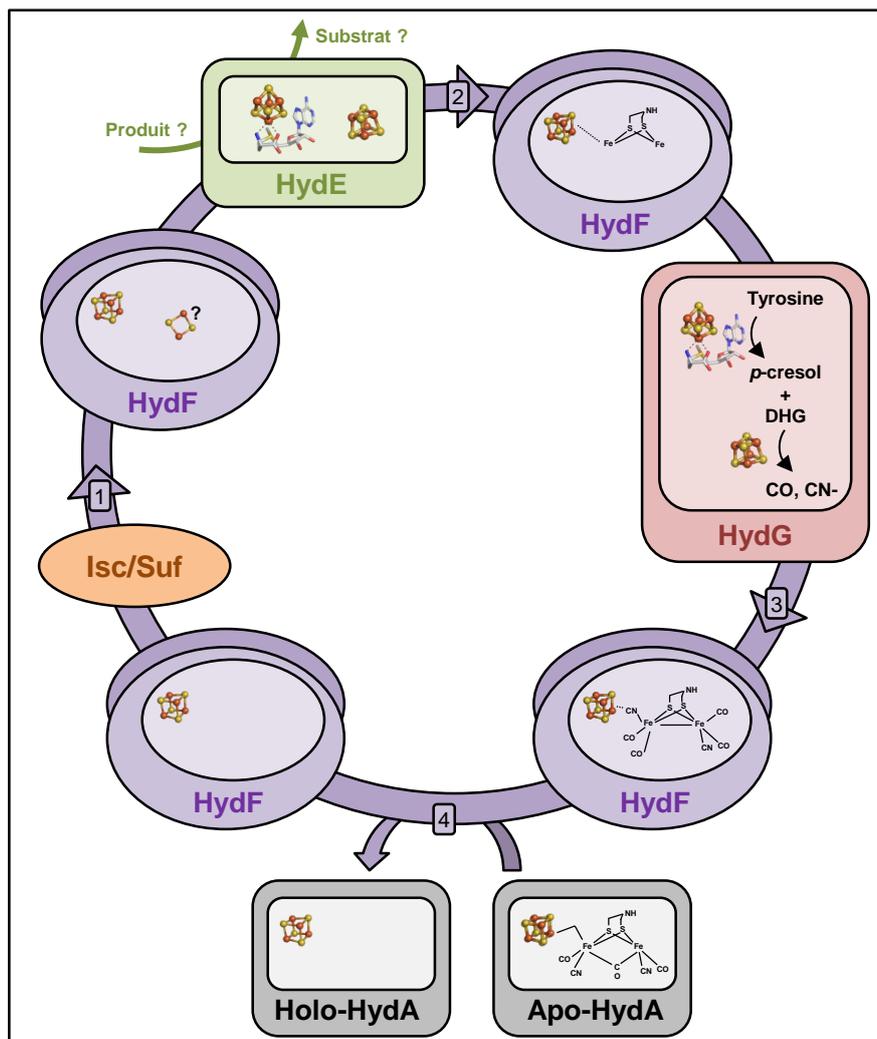


Figure 30: Mécanisme global de maturation des hydrogénases à fer.

Par ailleurs la structure de la protéine CrHydA1 purifiée en l'absence de protéines de maturation, comparée à celle de la protéine Cpl, a montré la présence d'un canal électropositif depuis la surface de la protéine jusqu'à la cavité centrale, uniquement présent dans la protéine immature de *C. reinhardtii* [153] ; ces résultats donnent également des informations sur les mouvements de deux boucles protéiques autour du site catalytique nécessaires à la maturation de l'enzyme [153].

1.4.5.5.4. Maturation *in vitro*

Par ailleurs, des expérimentations récentes ont montré qu'il était possible de produire des hydrogénases fonctionnelles *in vitro* en l'absence des protéines de maturation.

En effet, il a premièrement été montré que des centres binucléaires synthétiques imitant ceux retrouvés *in vivo* (Figure 31) pouvaient être transférés d'abord à la protéine HydF puis à l'hydrogénase elle-même [122].

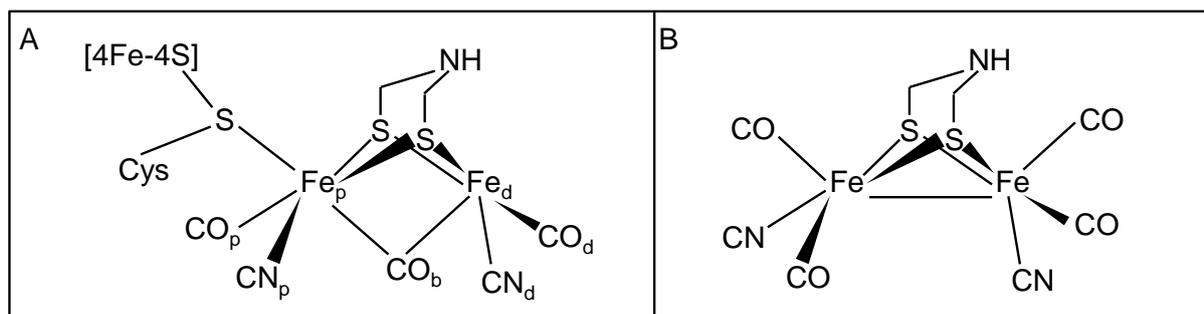


Figure 31: Représentation schématique des centres catalytiques binucléaires retrouvés au sein des enzymes (A) et des centres synthétiques avant activation (B).

Par la suite, il a été montré qu'il était également possible d'activer *in vitro* des apoenzymes uniquement avec l'ajout de ces centres binucléaires synthétiques. Ces derniers emprunteraient le canal précédemment évoqué pour être ensuite modifiés et former le Cluster H complet. Cette technique a été appliquée avec succès à des hydrogénases à fer de plusieurs types possédant ou non des domaines contenant des centres fer-soufres accessoires [4,48]. Enfin, il peut être utilisé des centres binucléaires synthétiques modifiés dans leur composition en ligands CO et CN et/ou dans la composition de la molécule liant les deux atomes de soufre [123].

Par ailleurs, il a été montré la possibilité de la substitution du centre 4FeH du Cluster H de l'enzyme CrHydA1 par un centre modifié [4Fe-4Se] contenant donc des atomes de sélénium. L'hydrogénase synthétisée s'est révélée aussi active que l'enzyme sauvage avec des partenaires d'oxydoréduction physiologiques ou artificiels [166].

1.4.6. Caractérisation des hydrogénases

1.4.6.1. Caractérisation biochimique

La caractérisation des enzymes est réalisée sur des protéines purifiées qui sont surexprimées soit de façon homologue ou hétérologue, le plus souvent chez *E. coli*, avec les protéines de maturation.

Les réactions catalysées par les hydrogénases à fer couramment mesurées pour caractériser ces enzymes sont la réaction d'oxydation (ou de réduction) de l'hydrogène couplée à la réduction (ou à l'oxydation) d'un partenaire d'oxydo-réduction, faisant intervenir le transfert de protons et le transfert inter et intra moléculaire d'électrons, conduisant au clivage hétérolytique du dihydrogène (ou à la production de dihydrogène).

Généralement, ces tests d'activité sont réalisés en solution et la réaction de réduction d'un accepteur d'électrons, physiologique ou artificiel, couplée ou non à une seconde réaction, est suivie avec un spectrophotomètre alors que la réaction de production de dihydrogène est suivie directement avec un système de chromatographie à gaz.

L'activité des enzymes peut être donnée sous forme d'activité spécifique, fonction de la quantité de protéine, mais il est aussi possible d'obtenir des valeurs de paramètres cinétiques comme les V_{max} (ou K_{cat}) ou les K_m pour les partenaires d'oxydo-réduction (accepteurs ou donneurs d'électrons).

Des variations sont observées pour les différentes activités rapportées, dues en partie à des différences de protocoles de mesures (concentration en partenaires, pH des réactions) mais il est possible de définir des valeurs de référence pour l'activité des [Fe-Fe] hydrogénases à fer de type M1, M2i et M3a (Tableau 1).

Type d'enzyme	Enzyme	Hôte	Protéines de maturation	Activité spécifique de réduction des protons (U/mg)	Références
M1	CrHydA1	<i>C. reinhardtii</i>	Endogènes	935	Happe, 1993
	CfHydA	<i>Chlorella fusca</i>	Endogènes	1000	Winkler, 2002
	CrHydA1	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	760	Girbal, 2005
	HydASo1	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	633	Girbal, 2005
	CrHydA1	<i>E. coli</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	150	King, 2006
	CrHydA1	<i>C. reinhardtii</i>	Endogènes	730 ± 146	Kamp, 2008
	CrHydA1	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	625	Von Abendroth, 2008
	CrHydA1	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	705 ± 654	Winkler, 2009
	CrHydA1	<i>E. coli</i>	<i>S. oneidensis</i>	641±88	Kuchenreuther, 2010
	CrHydA1*	<i>E. coli</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	1000	Yacobi, 2012
	CrHydA1	<i>S. oneidensis</i>	<i>S. oneidensis</i>	705 ± 60	Sybina, 2013
M2	MeHydA	<i>Megasphaera elsdenii</i>	Endogènes	400	Filipiak, 1989
	MeHydA	–	–	308 ± 40	Esselborn, 2013
	MeHydA	–	–	600 ± 50	Caserta, 2016
M3	CaHydA	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	10	Girbal, 2005
	CaHydA	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	416 ± 159	Demuez, 2006
	CaHydA	<i>C. acetobutylicum</i>	Endogènes	1750	Von Abendroth, 2008
	Cpl	<i>E. coli</i>	<i>S. oneidensis</i>	1087 ± 146	Kuchenreuther, 2010
	Cpl	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	–	2037 ± 616	Esselborn, 2013
	CaHydA	<i>E. coli</i> Rosetta DE3	<i>C. acetobutylicum</i>	1880 ± 108	Morra, 2015
	Cperfringens	<i>E. coli</i> Rosetta2(DE3)	<i>C. acetobutylicum</i>	1645 ± 16	Morra, 2015
	CaHydA	<i>E. coli</i>	<i>C. acetobutylicum</i>	1356	Morra, 2016

Tableau 1 : Activités spécifiques de réduction des protons de différents types d'hydrogénases à fer déterminées avec le méthyl viologène comme donneur d'électrons.

Par ailleurs, les paramètres cinétiques pour le méthyl viologène et pour la ferrédoxine ont été déterminés pour certaines enzymes.

Type d'enzyme	Enzyme	Méthylviologène		Ferrédoxine		Références
		Production H2	Consommation H2	Production H2	Consommation H2	
M3	Cpl	6,25 10 ⁻³	5 10 ⁻³	/	0,05 10 ⁻³	Adams 1984
	CaHydA	0,3 10 ⁻³	128 10 ⁻³	6 10 ⁻⁶	23 10 ⁻⁶	Girbal 2005
	CaHydA	1,6 10 ⁻³ ± 0,7 10 ⁻³	59 10 ⁻³ ± 22 10 ⁻³	3,3 10 ⁻⁶ ± 1,4 10 ⁻⁶	10 10 ⁻⁶ ± 4 10 ⁻⁶	Demuez 2006
M1	CrHydA1	0,41 10 ⁻³ ± 0,02 10 ⁻³	/	/	/	Sybina 2013
	CrHydA1	/	/	21 10 ⁻⁶ ± 2 10 ⁻⁶	/	Winkler 2009
	CrHydA1	0,830 10 ⁻³	/	35 10 ⁻⁶	/	Florin 2001

Tableau 2 : Constantes de Michaëlis rapportées pour différents types d'hydrogénases à fer déterminées avec le méthyl viologène ou la ferrédoxine comme partenaire d'oxydoréduction.

Malgré des variations, le *K_m* pour le méthyl viologène est de l'ordre du millimolaire alors que le *K_m* pour la ferrédoxine est de l'ordre du micromolaire (Tableau 2).

Il est également possible de mesurer la réaction de conversion du para-H₂ en ortho-H₂ (isomères de spin) qui fait intervenir uniquement le clivage de la molécule. Il est aussi possible de mesurer la vitesse de la réaction d'échanges des deux isotopes :

Dihydrogène (H₂) et Deutérium (D₂) qui fait intervenir le clivage de la molécule, le transfert de protons et la diffusion des gaz. [83]. Un transfert d'électrons est réalisé mais il ne fait pas intervenir de donneur ou d'accepteur externe [167].

1.4.6.2. Electrochimie directe des protéines

En électrochimie directe des protéines, ou électrochimie de film protéiques (PFV : « protein film voltametry ») les enzymes sont adsorbées sur une électrode, les électrons, issus de l'oxydation du dihydrogène, sont reçus directement sur l'électrode et un courant est mesuré, proportionnel à l'activité de l'enzyme.

L'inconvénient de cette technique est que certaines enzymes ne s'adsorbent pas sur l'électrode et qu'il n'est pas possible de mesurer la quantité d'enzymes adsorbée ; de ce fait il n'est pas possible de déduire l'activité absolue des enzymes.

Par ailleurs, le potentiel d'électrode peut être contrôlé, l'état rédox des enzymes est alors modifié et des informations sont obtenues sur l'activité des enzymes en fonction de leurs états rédox.

Il est possible d'enregistrer des voltamogrammes qui représentent les réponses des activités enzymatiques en fonction des variations de potentiels. Dans ces figures, les courants positifs révèlent une réaction d'oxydation du dihydrogène alors que les courants négatifs révèlent une réaction de réduction des protons. Il est possible de mettre en évidence différents états du Cluster H avec cette technique [124,125,168].

Par ailleurs, l'électrochimie directe des protéines est une technique de choix pour mesurer l'activité des enzymes en fonction de la concentration en substrat (H₂) ou en inhibiteur gazeux (CO et O₂) [5,129,130,169,170].

1.4.6.3. Caractérisation spectroscopique

Spectroscopie FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR : « Fourier Transform InfraRed spectroscopy ») est une technique utilisée pour obtenir le spectre d'absorption dans l'infrarouge d'un échantillon. Le spectre d'absorption dans l'infrarouge d'une molécule est dû à la vibration des liaisons atomiques entre les atomes de la molécule. Il existe deux types de vibration : étirement ou torsion.

Un spectromètre permet de collecter les données sur un large spectre, mais il est nécessaire de passer par une transformation de Fourier pour convertir les données

brutes en résultats. Les spectres infrarouges sont donnés en nombre d'onde qui correspond à l'inverse de la longueur d'onde.

La spectroscopie IR est appliquée à la biochimie des protéines et dans le cas des hydrogénases (et protéines de maturation), les expérimentations sont appliquées à l'observation des ligands spécifiques du site catalytique des hydrogénase à fer ou à nickel-fer.

En effet, les ligands CO et CN⁻ particuliers du site binucléaire du Cluster H des hydrogénases à fer peuvent être observés car il n'y a pas de chevauchement avec l'absorption d'autres parties de la protéine.

L'étude des enzymes a permis d'assigner chacun des pics du spectre aux ligands du site binucléaire.

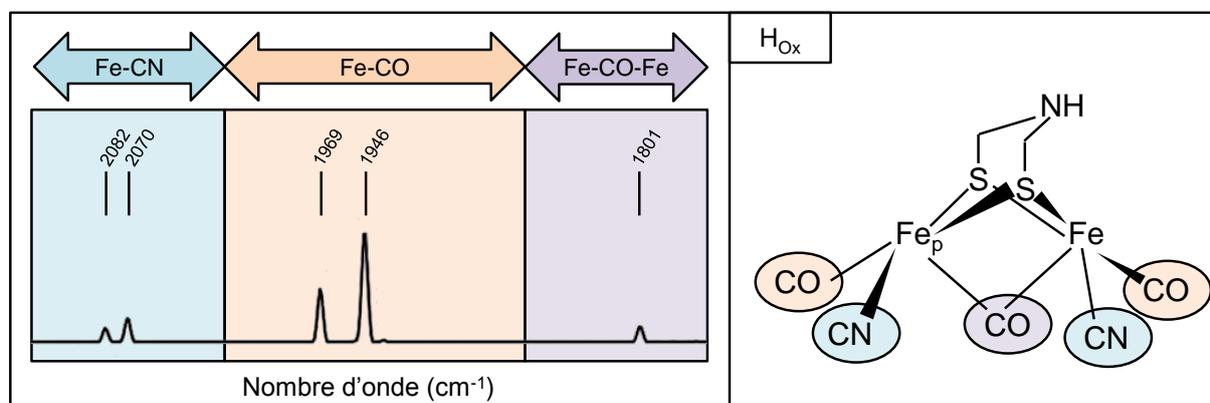


Figure 32: Représentation schématique du site catalytique des [FeFe] hydrogénases dans l'état H_{Ox} et pics d'absorption caractéristiques obtenus en spectroscopie Infra-rouge.

Il vient d'être publié très récemment des travaux permettant, d'assigner les différents spectres obtenus à chacun des états rédox possibles du centre binucléaire (Figure 33) [127].

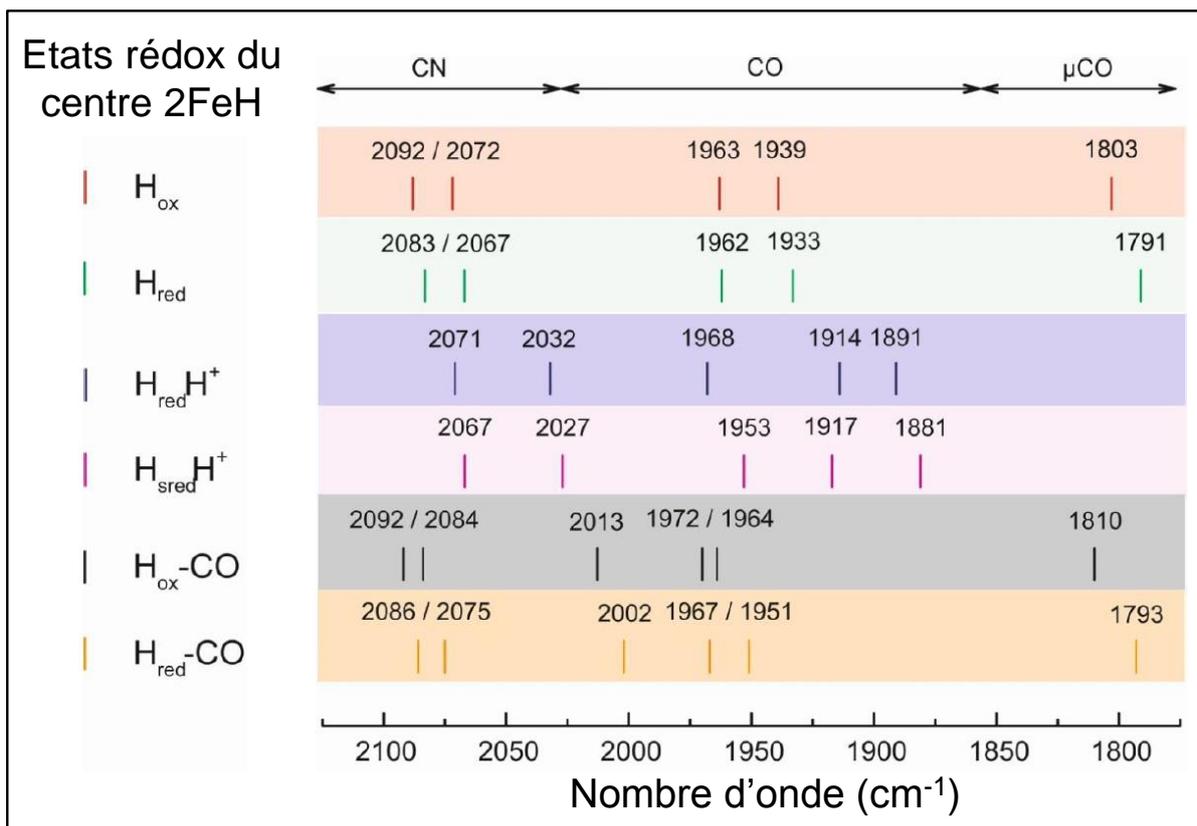


Figure 33: Position des pics pour chacun des états rédox du centre binucléaire (d'après Sommer *et al.* [127]).

Résonance paramagnétique électronique

La spectroscopie par résonance paramagnétique électronique permet de mettre en évidence la présence d'électrons non appariés au sein des protéines. Cette méthode est largement employée pour caractériser les centres fer-soufre au sein des hydrogénases, des protéines de maturation et des ferrédoxines [81].

Dichroïsme circulaire

Le dichroïsme circulaire est une méthode spectroscopique permettant d'obtenir des informations sur le repliement des protéines et sur le contenu en éléments de structures secondaires (hélices α et feuillets β) des protéines purifiées. Cette méthode peut être appliquée aux hydrogénases à fer pour renseigner l'état de leur repliement [132,171].

Spectroscopie UV

La spectroscopie UV (de 250 à 700 nm) peut aussi être appliquée aux hydrogénases, en particulier pour l'observation de la présence de centres [4Fe-4S] accessoires (observés à 410 nm) au sein des enzymes de Type M2i [48], toutefois les spectres d'absorption UV des enzymes sont complexes et très largement soumis aux conditions réductrices ou oxydantes de l'expérimentation [171]. En effet, les pics d'absorption caractéristiques des centres fer-soufre ne s'observent bien qu'en conditions oxydantes.

Enfin, le dosage des atomes de fer au sein des enzymes est largement répandu, pour s'assurer de la qualité des préparations protéiques ; il peut être réalisé par spectrométrie de masse [172] ou par méthode colorimétrique [173].

Matériel et méthodes

2. Matériel et méthodes

2.1. Souches et plasmides utilisés

Souches		Caractéristiques / Plasmides	Références / Origine
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Souche sauvage		ATCC
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Souche sauvage Δ buk		Dusséaux et al., 2013
<i>C. acetobutylicum</i> Δ CAC1502	Souche acceptant la transformation de plasmide non méthylés		Nguyen <i>et al.</i> , 2016
	pPH-CaHydA-LL-C-Tag		Demuez <i>et al.</i> , 2007
	pPH-HydA_ Δ DA-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_C48A-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_C100A-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_ Δ FS2-LL-C-Tag		Cette étude
<i>C. acetobutylicum</i> Δ cac1502 Δ upp Δ buk hydA60s ::IT	pPH-HydX_1-LL-C-Tag		Cette étude
	pCONSIntronhydAs		LISBP Dusséaux S.
	pTLS-hydA		LISBP Dusséaux S.
	pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP		Cette étude
	pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag		Cette étude
	pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP		Cette étude
	pPH-HydA_ Δ DA-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_C48A-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_C100A-LL-C-Tag		Cette étude
	pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag		Cette étude
<i>E. coli</i>	pPH-HydA_ Δ FS2-LL-C-Tag		Cette étude
	- (Sans plasmide)		Cette étude
	<i>Top10</i>		Life Technologies
	<i>BL21 DE3 ΔiscR ::Kana Codon+ pET21c_CAC0303</i>		INSA LISBP
	<i>MG1655 ΔiscR ::Kana</i>		INSA LISBP
	<i>MG1655 ΔiscR ::Kana pSOS95_CAC0303-opt-LL-StrepTag</i>		Cette étude
Plasmides		Caractéristiques	Références / Origine
Hydrogénase HydA de <i>Clostridium acetobutylicum</i>			
pPH-CaHydA-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, Long Linker (LL), C-Tag, hydrogénase sauvage HydA		Demuez <i>et al.</i> , 2007
pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP	CmR, ThiampR, RepL, LL, C-Tag, hydrogénase sauvage HydA		Cette étude
pPH-HydA_ Δ DA-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, PH, LL, C-Tag, hydrogénase variante HydA_ Δ DA		Cette étude
pPH-HydA_ Δ DA-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, PH, LL, C-Tag, hydrogénase variante HydA_ Δ DA		Demuez <i>et al.</i> , 2007
pPH-HydA_C48A-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, PH, LL, C-Tag, hydrogénase variante HydA_C48A		Demuez <i>et al.</i> , 2007
pPH-HydA_C100A-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, PH, LL, C-Tag, hydrogénase variante HydA_C100A		Demuez <i>et al.</i> , 2007
pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, PH, LL, C-Tag, hydrogénase variante HydA_H93C		Demuez <i>et al.</i> , 2007
pPH-HydA_ Δ FS2-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, PH, LL, C-Tag, hydrogénase variante HydA_ Δ FS2		Demuez <i>et al.</i> , 2007
Hydrogénase HydA1Cr de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			
pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag	AmpR, EryR, RepL, TSH, Long Linker (LL), C-Tag hydrogénase HydA1Cr_Opt		Von Abendroth <i>et al.</i> , 2008
pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP	CmR, ThiampR, RepL, TSH, LL, C-Tag, hydrogénase HydA1Cr_Opt		Cette étude
Hydrogénase Chimériques			
pPH-HydX_1-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, Long Linker (LL), C-Tag, hydrogénase chimérique HydX1		Cette étude
pPH-HydX_3-LL-C-Tag	AmpR, EryR, RepL, Long Linker (LL), C-Tag, hydrogénase chimérique HydX1		Cette étude
Autres plasmides			
pCONS-UPP-46			LISBP Croux C.
pET21c_CAC0303	AmpR, Ferrédoxine sauvage, C-Tag, promoteur inducible à l'IPTG		Guerrini <i>et al.</i> , 2007
pSOS95_CAC0303-opt-LL-StrepTag	AmpR, Ferrédoxine dont le gène est optimisé pour l'expression chez <i>E. coli</i> , LL, C-Tag, TSH		INSA LISBP
Légende			
AmpR	Résistance à l'ampicilline		
EryR	Résistance à l'érythromycine		
ThiampR	Résistance au thiamphénicol		
CmR	Résistance au chloramphénicol		
RepL	Origine de répllication chez <i>C. acetobutylicum</i>		
Long Linker (LL)	Séquence peptidique -GGSGGGSGGGS- placée entre la protéine et l'étiquette Strep-Tag		
C-Tag	Strep-Tag placé en position C-terminale		
PH	promoteur de l'hydrogénase		
TSH	promoteur de la thiolase		
Δ iscR ::Kana	Deletion du gène <i>iscR</i> , remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine		
Codon+	Plasmide possédant une résistance au chloramphénicol et permettant l'expression de protéines hétérologues chez <i>E. coli</i>		

Tableau 3 : Souches et plasmides utilisés

2.2. Milieux de cultures et conditions de croissance

2.2.1. Conservation des souches

Souches de *C. acetobutylicum*

Les souches de *C. acetobutylicum* ATCC 824 Δ CA_C1502 sont conservées sous forme de spores à -20°C , la sporulation étant obtenue après une culture de 4 à 5 jours à 37°C , en milieu synthétique liquide (MS, détaillé Chapitre 1.2.3.2.1). Les souches *C. acetobutylicum* non sporulantes sont conservées dans des fioles 5 mL

serties et préalablement dégazées à l'azote pur, à -80°C à partir de culture en phase exponentielle de croissance soit dans une solution de glycérol à 20% (concentration finale v/v) soit directement sans additifs.

Souches d'*E. coli*

L'ensemble des souches d'*E. coli* est conservé à -80°C dans une solution de glycérol à 20% (concentration finale v/v).

2.2.2. Conditions de croissance

Le maintien des conditions anaérobies strictes 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 ou 30 minutes pour des milieux de cultures de 24 ou 48 mL, respectivement.

Afin de vérifier qu'il n'y a pas de traces d'oxygène, un indicateur coloré d'oxydo-réduction : la résazurine (Concentration finale de 1 g/L) est ajoutée au milieu de culture. Les fioles sont autoclavées 20 minutes à 120 °C puis de la cystéine (Concentration finale de 0,5 g/L) peut être rajoutée en conditions anaérobies afin de réduire les traces résiduelles d'oxygène du milieu.

Pour les souches recombinantes, une pression de sélection est appliquée par ajout d'antibiotiques dans le milieu de culture à une concentration spécifique de chacun d'eux : érythromycine (40 µg/mL), thiamphénicol (25 à 50 µg/mL), clarithromycine (40µg/mL) ou tétracycline (15 µg/mL).

Des solutions concentrées d'antibiotiques sont préparées : érythromycine et clarithromycine à 2.5 mg/mL, préparées dans de l'éthanol pur et de l'acétone pur, respectivement ; thiamphénicol et tétracycline à 5 mg/mL préparées dans de l'éthanol pur.

Les inocula peuvent être obtenus en ensemençant à 10 % (v/v) des fioles de milieu synthétique, à partir de suspensions de stocks de spores, conservées à -20°C. Un choc thermique à 80°C est appliqué 15 minutes à la culture afin d'éliminer les formes végétatives et d'accélérer la germination des spores. Après refroidissement à température ambiante et ajout d'antibiotiques si nécessaire, la culture est ensuite placée à 37°C.

Les cultures sur boîtes de Pétri sont réalisées dans une boîte à gants (hotte Jacomex) anaérobie 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 pré-équilibrées 24 heures à l'atmosphère de la hotte anaérobie avant étalement des cellules.

La densité cellulaire des cultures est estimée par mesure de l'absorbance (densité optique (DO)) à 550nm (pour les cultures d'*E. coli*) ou à 620nm (pour les cultures de *C. acetobutylicum*), à l'aide d'un spectrophotomètre (Biochrom Libra), dans des cuves de 1 cm de trajet optique. Des dilutions, réalisées dans de l'eau osmosée,

peuvent être effectuées pour que la mesure soit dans la gamme de linéarité de l'appareil comprise entre 0,05 et 0,6 unité de DO.

2.2.3. Milieux de culture

2.2.3.1. Milieux de culture pour *E. coli*

Le milieu LB est couramment utilisé pour la culture des souches d'*E. coli* en conditions aérobies à 37°C. Il est complété avec des antibiotiques (ampicilline à 100 µg/mL, chloramphénicol à 30 µg/mL ou carbénicilline à 100 µg/mL) lors de cultures de souches transformées par des plasmides portant le gène de résistance à ces antibiotiques.

Des solutions concentrées d'antibiotiques sont préparées : ampicilline et carbénicilline à 100 mg/mL, préparées dans de l'eau ultra-pure ; chloramphénicol à 30 mg/mL préparé dans de l'éthanol pur.

En milieu liquide, les cultures sont agitées à 170 rpm.

Milieu **LB** [174]:

- Tryptone (BIOKAR A1401) 10 g/L
- Extrait de levure (BIOKAR A1202) 5 g/L
- NaCl (VWR/Prolabo 27810.295) 10 g/L

Pour les cultures sur boîtes de Petri, de l'agar est ajouté à la concentration de 15 g/L.

Le milieu SOC est utilisé pour la culture des souches lors de la phase d'expression phénotypique suivant la procédure de transformation (par choc thermique ou électroporation).

Milieu **SOC** [175] :

- Tryptone 20 g/L
- Extrait de levure 5 g/L
- NaCl 0,58 g/L
- KCl (VWR/Prolabo 26764.298) 0,19 g/L
- MgCl₂ (VWR/Prolabo 25108.295) 0,95 g/L
- MgSO₄ (VWR/Prolabo 25164.265) 1.20 g/L
- Glucose (VWR/Prolabo 24379.294) 3,66 g/L

Milieu **MAC** :

- Tryptone 10 g/L
- Extrait de levure 5 g/L
- HEPES (Sigma H4034) 23 g/L
- NTA (VWR/Prolabo 20431.265) 0,2 g/L
- FeSO₄ (Sigma F8048) 0,05 g/L
- NaCl 2 g/L
- K₂HPO₄ (VWR/Prolabo 26931.263) 0,5 g/L

Le pH du milieu est ajusté à 7,3 avec une solution d'ammoniaque concentrée (28%). Après stérilisation, le milieu MAC est supplémenté avec du glucose concentré (200 g/L) pour obtenir la concentration finale de 20 g/L.

Les cultures en milieu peuvent être réalisées en conditions aérobie, de micro-aérobie ou d'anaérobie stricte avec un milieu de culture dégazé à l'azote avant stérilisation. Les cultures sont agitées à 170 rpm.

2.2.3.1.1. Conditions de culture pour l'expression de la ferrédoxine recombinante

Les cultures se font en conditions anaérobies dans des fioles d'un volume maximum de 500 mL, contenant 400 mL de milieu de culture total.

Le milieu MAC supplémenté en glucose est utilisé. Le milieu de culture est également supplémenté avec du chlorure de fer(III) (FeCl_3) à la concentration finale de 500 μM (à partir d'une solution à la concentration de 250 mM, préparée dans l'eau et stérilisée par filtration à 0.22 μm), et du nitrate de sodium (NaNO_3) à la concentration finale de 1 mM (à partir d'une solution à la concentration de 200 mM, préparée dans l'eau et stérilisée par autoclave).

Les cultures sont inoculées à partir de pré-cultures réalisées dans le même milieu à une DO initiale théorique égale à 0,1. Les cultures sont réalisées à 30°C avec une agitation de 170 rpm pendant 24 heures.

Dans le cas de l'utilisation de la souche *E. coli* $\Delta\text{iscR}::\text{Kana}$ BL21 DE3 Codon+ + pET21c_CAC0303, dès que la culture atteint une DO supérieure à 0,8 ; l'expression de la ferrédoxine est induite avec l'ajout d'IPTG à la concentration de 1mM. Les cultures sont enfin récoltées après 3 à 4 heures d'expression. Une DO à 550 nm finale comprise entre 1,1 et 1,6.

Dans le cas de l'utilisation de la souche *E. coli* MG1655 $\Delta\text{iscR}::\text{Kana}$ + pSOS95_CAC0303-opt-LL-StrepTag, l'expression protéique n'est pas induite ; la culture est arrêtée, après 16 heures lorsque les cellules ont atteint une DO à 550 nm située entre 2 et 3, et les cellules sont introduites dans l'enceinte anaérobie et récoltées en conditions d'anaérobiose stricte.

2.2.3.2. Milieux de culture pour *C. acetobutylicum*

2.2.3.2.1. Cultures sur milieu solide et milieu liquide

Milieu synthétique (MS) à base de glucose :

- | | |
|--|-----------|
| • Glucose | 60 g/L |
| • KH_2PO_4 (VWR/Prolabo 26923.298) | 0,55 g/L |
| • K_2HPO_4 | 0,55 g/L |
| • $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ (VWR/Prolabo 25165.260) | 0,22 g/L |
| • $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ | 0,011 g/L |
| • CH_3COOH (VWR/Prolabo 20104.298) | 2,3 g/L |
| • Acide para-aminobenzoïque (Fluka 06930) | 8 mg/L |
| • Biotine (Sigma B4501) | 0,08 mg/L |
| • Carbonate de calcium (VWR/Prolabo 22300.290) | 2 g/L |

Le pH du milieu est ajusté à 6,5 avec une solution d'ammoniaque concentrée (28%). Les milieux de cultures sont dégazés à l'azote pur avant d'être stérilisés par autoclave à 121°C pendant 20 minutes. Pour les cultures sur boîtes de Petri, de l'agar est ajouté à la concentration de 15 g/L.

Milieu **CGM** (Clostridial Growth Medium) de composition :

- Extrait de levure 6,25 g/L
- KH₂PO₄ 0,94 g/L
- K₂HPO₄ 0,94 g/L
- MgSO₄, 7H₂O 0,5 g/L
- MnSO₄, H₂O (VWR/Prolabo 25300.290) 12,5 mg/L
- FeSO₄, 7H₂O 12,5 mg/L
- NaCl 1,25 g/L
- Asparagine 2,5 g/L
- (NH₄)₂SO₄ 2,5 g/L

Le pH du milieu est ajusté à 6,6 avec une solution d'ammoniaque concentrée. Le glucose à une concentration finale de 50 g/L final est ajouté après autoclave des milieux. Pour les cultures sur boîtes de Petri, de l'agar est ajouté à la concentration de 15 g/L.

Une solution de tampon MES, dont le pH est ajusté à 6.5, peut être ajoutée, à une concentration finale de 20 g/L, aux milieux de culture MS et CGM afin de tamponner le milieu et retarder l'acidification des cultures et l'arrêt de la croissance.

Une solution de Cystéine concentrée à 15g/L est préparée en faisant bouillir puis dégazer un volume de 50 mL d'eau osmosée pendant 20 minutes auquel sont ajouté 750 mg de Cystéine-HCl (Sigma C7880) avant stérilisation par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

Le milieu **RCA (Reinforced Clostridium Agar)**(Sigma 91365), obtenu à partir d'une préparation commerciale RCM (Reinforced Clostridial Medium) diluée dans de l'eau osmosée à 33 g/L, avec de l'agar à 15 g/L, est utilisé pour la sélection des clones de *C. acetobutylicum* après électrotransformation. Le pH est ajusté à 5,8 ou à 6,5 avec une solution d'acide chlorhydrique diluée.

2.2.3.2.2. Cultures discontinues en bioréacteur

Les cultures en fermenteurs sont réalisées dans des bioréacteurs de 2 litres de type BioStat2 (Sartorius, Aubagne, France), utilisant un volume de travail de culture de 1,5 L. Ce type d'installation permet le contrôle fin des différents paramètres de la culture à l'aide de sondes mesurant la température, le pH et le potentiel redox.

Le milieu est stérilisé dans le fermenteur et après autoclave, le milieu est dégazé pendant 30 minutes par un flux d'azote jusqu'à refroidissement puis maintenu légèrement en surpression afin d'éviter toute entrée d'oxygène. La sortie gaz du réacteur est protégée vis-à-vis de l'oxygène par un flacon contenant du pyrogallol. Les prélèvements pour le suivi de la DO à 620 nm et des produits de fermentation sont réalisés à l'aide d'un système dédié permettant la prise d'échantillon sans risques de contamination du fermenteur, ni d'entrée d'oxygène.

Les fermentations dans ce type de réacteur sont réalisées en milieu synthétique à base de glucose de composition :

- Glucose 60 g/L
- NH₄Cl 1,5 g/L
- KH₂PO₄ 0,5 g/L
- K₂HPO₄ 0,5 g/L
- MgSO₄, 7 H₂O 0,2 g/L

Les produits suivants sont rajoutés au fermenteur par filtration à 0,22 µm aux concentrations finales :

- FeSO₄ 100 mg/L
- NiCl₂ (Merck 6717) 6 mg/L
- ZnSO₄ (Sigma Z0251) 120 mg/L
- Acide nitrilotriacétique 400 mg/L

Ce mélange de sulfate de fer, chlorure de nickel, sulfate de zinc et acide nitrilotriacétique dont le pH est ajusté à 6,5 avec de la soude (NaOH 10N) correspond au « Mix 60 ». Il est préparé puis dégazé à chaud sous un flux d'azote avant d'être ajouté au milieu du fermenteur par filtration 0,2 µm.

Les composés suivants sont également ajoutés au fermenteur par filtration à 0,2 µm :

- Acide para-aminobenzoïque 8 mg/L
- Biotine 0,08 mg/L
- Antibiotiques pour souches recombinantes :
 - Erythromycine 40 µg/mL (Sigma E6376) ou
 - Thiamphénicol 25 µg/mL (Sigma T0261)

Le réacteur est inoculé avec 150 mL de pré-culture à DO=2 (correspondant à une culture de 24 heures), correspondant à 10 % du volume totale de la culture en fermenteur. Au cours de la culture, une heure après l'inoculation, le pH est régulé automatiquement par addition d'ammoniac (NH₄OH à 14 %) ; la température est maintenue à 37°C, l'agitation est de 300 rpm.

2.3. Techniques de génie génétique

2.3.1. Préparation d'ADN plasmidique

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du kit Neo Biotech selon les recommandations du fournisseur.

Les midi-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à l'aide du kit Sigma selon les recommandations du fournisseur.

Les préparations d'ADN plasmidiques ainsi obtenues peuvent ensuite être manipulées (digestion, ligation, concentration...) et permettre la transformation des souches d'*E. coli* et *C. acetobutylicum*.

2.3.2. Techniques de clonage

Les techniques de digestions et de clonages sont réalisées selon les procédures standards et selon les recommandations du fournisseur d'enzymes de restriction (New England Biolabs).

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 ou les produits issus de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sont purifiés à partir de gels d'agarose avec les kits Neo-Biotech selon les recommandations du fournisseur. Du tampon de charge (1X final) est ajouté aux échantillons avant dépôt. Les marqueurs de taille 1 kb ou 100 pb (New England Biolabs) sont couramment employés. L'ADN est visualisé aux ultraviolets ($\lambda = 254$ ou 312 nm) après coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET) à environ 0,5 $\mu\text{g/mL}$

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%

La ligation de fragments d'ADN se fait en utilisant l'enzyme T4 DNA ligase (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

2.3.3. Amplification de fragments d'ADN par réactions de PCR

L'amplification de fragments d'ADN est réalisée par la technique d'amplification en chaîne (PCR). Pour la vérification des constructions, la réaction est effectuée en utilisant l'ADN polymérase Crimson Taq (New England Biolabs). Les volumes réactionnels sont de 25 μL :

- Crimson Buffer HF 1X Final
- dNTP 0.2 mM
- Oligonucélotides 0,5 μM
- Crimson Taq 0.625 U
- Matrice 1 à 10 ng

L'ADN est amplifié pendant 25 ou 29 cycles dans un ThermoCycler Biorad MJMini :

Étapes	Température (°C)	Temps
Dénaturation initiale	95	10 minutes
Dénaturation	95	30 secondes
Hybridation	Température variable en fonction des oligonucléotides	30 secondes
Elongation	68	Temps variable en fonction de la taille des fragments à amplifier (1 kb/min)
Elongation finale	68	5 minutes

2.3.4. Table des oligonucléotides utilisés

Les oligonucléotides sont synthétisés par la société Eurogentec™ (Belgique).

Liste des oligonucléotides utilisés ordonnées par couples permettant la validation de certains gènes, plasmides ou loci		
Nom	Sequence	Plasmides ou loci validés
CAC0029_3F	tcattccattagtactgcataagctttaac	Oligonucléotide situé en amont du gène <i>hydA</i> sur le chromosome bactérien
HydA_PromF	AATTATATTTTACATTTTGGGAGGATAAACATG	Oligonucléotides spécifiques du gène <i>hydA</i> , permettant une amplification de ce gène situé sur les plasmides ou sur le chromosome bactérien
hydA_intron F	TAAATGGCAATGAAGTGCATACAGATAAAG	
Hyd_Middle_F	CAGTGTGTAATCGCTTGTCC	
HydAMilieu_D	caaaatgggatggaaaagatgtaacagg	
HydA_Nhel_F	ctatccttgagctagcaagag	
hydA_intron R	CATGTTGAGTCATCAAGACAAACATCATCA	
HydAMilieu_R	gctattcctgaaattgaaggatagtaag	
HydA_Δ90_R_2	gcctcttactcagtgtaatcaac	
HydA_AgeI_R	Ccataacgccaccggttc	
HydA1_Cr_R	aacactccagctccactccaac	Oligonucléotides spécifiques du gène <i>hydA1_Cr</i> et du gène codant la chimère <i>HydX1</i> , permettant une amplification de ces gènes situés sur les plasmides
HydA1_Cr_5F	TTAGAATGGGATCCGCAGCACCC	
HydA1_Cr_3R	CTACACTCCAGATATCTTTCTCTCG	
Hyd_Cr_X1_R	TGAGCAGCAGCTTCAGCTCT	
Hyd_Cr_X1_End_F	ACAATGGTTCTGCTCCTG	
Hyd_X_3_F	Caccacaatgatgtagc	Oligonucléotides spécifiques du gène <i>hydX3</i> codant la chimère <i>HydX3</i>
pSO5Term	gtagttgtgtggaattgtgagcgg	Oligonucléotides spécifiques de certains gènes portés par les différents plasmides
Ery5R	aagggtaaaatgccctttctgagcgg	
catP5R	gtacaaggtacactgcaaagtagtgg	
CatP3D	ggaaggaaagcacaatgctccgg	
UppR	ataatctatctccagcatctccaagacc	
Tetra_3F	GTAGTGATTTAACTTTTACAATGGACG	
iscR1_S	CGCCGCATCCGACAACAGG	Oligonucléotides permettant la validation de la délétion du gène <i>iscR</i>
iscR1_RV	TGCTGGTGATGATGTGCTTGCTT	
CAC0303_Verif_F	TGAGCGGATAACAATCCCC	Oligonucléotides spécifiques du gène <i>CA_C0303</i> codant la ferrédoxine
CAC0303_verif_R	TGTTAGCAGCGGATCTC	
Thl_5_F	GCTATATTGTATCATTITGGAGTATTAAGG	Oligonucléotides permettant une amplification du gène de la thiolase sur le chromosome bactérien
Thl_3_R	CATAAATATCATTATGACATTTTTTACCACAC	
Thl_5_F_Seq	GAATGAAGTTTCTTATGCACAAGT	Oligonucléotides permettant le séquençage du gène de la thiolase
Thl_3_R_Seq	AGTTTTAATTCTACATTTCTATCG	
Thl_Mid_R	GAAGGCAGGTTTTAATTTTGCAAG	
Thl_Mid_F	GTAGTTGATACAGATGAGCACCC	

Tableau 4 : Oligonucléotides utilisés

2.3.5. Transformation de souches *E. coli* par choc thermique

Pour réaliser les constructions plasmidiques, les cellules *E. coli* OneShot Top 10 (Life Technologies), sont utilisées. Typiquement, 10 µL de produit de ligation permettent de transformer 50 µL de cellules compétentes.

Transformation par choc thermique :

- Ajouter l'ADN au 50 µL de cellules compétentes
- Incuber 30 minutes dans la glace
- Faire un choc thermique à 42 °C pendant 30 secondes sans agitation
- Incuber 2 minutes dans la glace
- Ajouter 250 µL de milieu SOC
- Incuber 1 heure à 37 °C avec une agitation de 300 rpm
- Etaler les cellules sur le milieu de sélection

2.3.6. Transformation de souches *C. acetobutylicum* ΔCA_C1502

Les souches de *C. acetobutylicum* ΔCA_C1502 sont transformées par des préparations d'ADN plasmidiques concentrées par électroporation ; entre 50 et 100 µg d'ADN sont nécessaires pour obtenir des transformants, la concentration des préparations d'ADN est d'environ 5 µg/µL.

60 mL de culture en milieu CGM-Glucose en phase exponentielle de croissance (DO620 comprise entre 0.8 et 1.2) sont refroidies dans la glace puis dans l'enceinte anaérobie :

- les cellules sont centrifugées 10 minutes à 3000 *g*,
- les culots de cellules sont lavés par 8 mL de tampon d'électroporation à 4°C,
- les cellules sont centrifugées à nouveau 10 minutes à 3000 *g*,
- le culot de cellules est repris dans 500 µL de tampon d'électroporation à 4°C,
- la préparation d'ADN plasmidique concentrée est ajoutée aux cellules dans une cuvette d'électroporation.
- Le mélange est soumis à une décharge électrique avec les paramètres suivants :
 - Voltage = 1.8 kV
 - C = 50 µF
 - R = 600 ohms
- Les cellules sont transférées dans 10 mL de milieu CGM-Glucose et incubées au minimum 4heures à 37°C.
- Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 3000 *g*
- Le culot de cellules est repris dans 250 µL de tampon de milieu CGM-Glucose et la suspension de cellules est étalée sur milieu de sélection (Boites RCA pH 5.8 + antibiotique).

Les boites sont incubées à 37°C jusqu'à apparition des transformants (48 à 72 heures après la transformation).

Le tampon d'électroporation est composé de 10 mL de saccharose à 270 mM et de 150 µL de tampon phosphate de sodium (pH 7,4) à 200 mM, stérilisé par filtration 0.22 µm.

2.3.7. Constructions plasmidiques

2.3.7.1. pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP

Le vecteur pCONS-UPP-46 est digéré par les enzymes SmaI et NaeI qui génèrent un fragment d'intérêt de 1997 bp possédant des extrémités franches. Ce fragment possède à la fois le gène *upp* et la cassette de résistance au thiamphénicol *catP*.

Le vecteur pPH-CaHydA-LL-C-Tag est digéré par les enzymes ClaI et PstI qui génèrent un fragment d'intérêt de 5682 pb possédant des extrémités cohésives. L'utilisation de la T4 DNA Polymerase permet de générer sur ce fragment des extrémités franches à partir des extrémités cohésives. Les deux fragments d'intérêt sont ligués et des cellules *E. coli* Top10 sont transformées par le produit de ligation.

Des mini-préparations plasmidiques sont réalisées à partir des clones obtenus ; des digestions enzymatiques et des réactions de séquençage permettent de valider l'obtention du vecteur pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP, aussi désigné par CaHydA_catP-UPP.

2.3.7.2. pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP

Le plasmide pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP est digéré par les enzymes SacI et SfoI qui génèrent un fragment d'intérêt de 5669 bp. La digestion du plasmide pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag par les mêmes enzymes génère un fragment d'intérêt de 1897 pb. Les deux fragments d'intérêt sont ligués et des cellules *E. coli* Top10 sont transformées par le produit de ligation. Des mini-préparations plasmidiques sont

réalisées à partir des clones obtenus ; des digestions enzymatiques et des réactions de séquençage permettent de valider l'obtention du vecteur pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP aussi nommé CrHydA1_catP-UPP.

2.3.7.3. Construction des plasmides des enzymes variants de CaHydA

Par ailleurs, la plupart des plasmides permettant l'expression des enzymes variantes sont disponibles au laboratoire. Lors de l'élaboration des séquences codantes, il a été introduit des sites de restriction enzymatiques simultanément à l'introduction des mutations. Ces sites de restriction permettent de valider la présence des mutations ponctuelles par digestion enzymatiques des plasmides ou des produits d'amplification PCR.

Il est mis en évidence que les plasmides pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag et pPH-HydA_ΔFS2-LL-C-Tag disponibles au laboratoire et codant respectivement pour les enzymes variantes HydA_H93C et HydA_ΔFS2 portent une mutation indésirable au niveau du gène d'intérêt. Il est alors décidé de reconstruire ces plasmides.

Les plasmides pPH-CaHydA-LL-C-Tag est digéré par les enzymes NheI et AgeI et génère des fragments d'intérêt de 5642 pb. Les digestions, réalisées en parallèle, des plasmides pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag et pPH-HydA_ΔFS2-LL-C-Tag par les mêmes enzymes génèrent des fragments d'intérêt de 1188 pb et 1065 pb, respectivement. Ces fragments correspondent aux parties du gène *hydA* qui contiennent les mutations H93C et ΔFS2 et qui ne contiennent pas la mutation indésirable. Les fragments d'intérêt sont ligués et des cellules *E. coli* Top10 sont transformées par les produits de ligation.

Des mini-préparations plasmidiques sont réalisées à partir des clones obtenus ; des digestions enzymatiques et des réactions de séquençage permettent de valider l'obtention des vecteurs pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag, pPH-HydA_ΔFS2-LL-C-Tag.

Le plasmide codant pour l'enzyme HydA_ΔDA exprimée avec la séquence peptidique « Long Linker » est construit à partir du plasmide pPH-HydA_ΔDA-C-Tag ne possédant pas cette séquence « Long Linker ».

Le plasmide pPH-CaHydA-LL-C-Tag est digéré par les enzymes de restriction AgeI et SacI qui génèrent un fragment d'intérêt de 5095 pb. La digestion du plasmide pPH-HydA_ΔDA-C-Tag, par les mêmes enzymes, génère un fragment d'intérêt de 1152 pb. Les deux fragments d'intérêt sont ligués et des cellules *E. coli* Top10 sont transformées par le produit de ligation.

Des mini-préparations plasmidiques sont réalisées à partir des clones obtenus ; des digestions enzymatiques et des réactions de séquençage permettent de valider l'obtention du vecteur pPH-HydA_ΔDA-LL-C-Tag.

2.3.7.4. Enzymes chimériques

Dans le cas des enzymes chimères, après dessin des gènes réalisé au laboratoire selon la technique d'harmonisation des codons, les constructions plasmidiques ne sont pas réalisées au laboratoire. La synthèse des gènes et les constructions finales, directement utilisables sont commandées auprès du fournisseur Genearth (Ratisbonne, Allemagne).

2.4. Méthodes de biochimie

2.4.1. Préparation des extraits acellulaires

Des cultures des différentes souches sont réalisées en milieu MS, CGM-Glucose ou CGM-Glucose-MES 20g/L. 100 mL de culture, ayant atteint une $DO=2$, sont récoltés dans l'enceinte anaérobie par centrifugation à 8500 g pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite lavées par 50 mL de tampon 100 mM Tris/HCl pH 7.6 10 % glycérol, 10 mM Dithionite, préablement dégazé à l'azote pur et introduit dans l'enceinte anaérobie. Les cellules sont centrifugées à nouveau à 8500 g pendant 10 minutes, puis reprise dans 1 mL de tampon 100 mM Tris/HCl pH 7.6 10 % glycérol, 10 mM Dithionite. Les cellules sont soniquées 4 fois 30 secondes dans la glace avec 2 minutes de pause entre chaque sonication, puis centrifugées 5 minutes à 12000 g. Le surnageant issu de la centrifugation est conservé et utilisé pour tester les activités enzymatiques des différentes souches (consommation ou production de dihydrogène, activité de thiolyse).

2.4.2. Récolte anaérobie des cellules

2.4.2.1. Récolte anaérobie des cellules de culture *E. coli*

Les cellules ayant exprimé les ferrédoxines bactériennes sont récoltées en conditions anaérobies dans la boîte à gants. Les cellules sont centrifugées 10 minutes à 8500 g, lavées avec du tampon 100 mM Tris/HCl pH7.6, 10 % glycérol, DTT 2 mM et concentrées environ 80 fois, les cellules qui ne sont pas utilisées directement sont stockées à -80°C .

2.4.2.2. Récolte anaérobie des cellules à partir du fermenteur

Lorsque la DO a atteint une valeur supérieure à 4, à partir du fermenteur, le mout de fermentation est collecté dans une bouteille de 2 L continuellement dégazée sous flux d'hydrogène pur.

Dans l'enceinte anaérobie, après ajout de dithionite (10 mM final) aux cellules, ces dernières sont centrifugées pendant 10 minutes à 8500 g puis les culots de cellules sont repris dans du tampon 100 mM Tris/HCl pH7,6, 10 % glycérol, 10 mM dithionite. Ainsi les cellules sont concentrées 30 fois puis finalement reprises dans du tampon 100 mM Tris/HCl pH 7,6 10 % glycérol, 2 mM dithionite. Un volume de 50 mL de suspension cellulaire est obtenu à partir d'un volume de culture de 1.5 L. Les cellules qui ne sont pas directement utilisées pour les étapes de purification sont stockées à -80°C après sertissage sous flux d'hydrogène pur.

2.4.3. Purification des hydrogénases

Le protocole de purification des hydrogénases a été modifié au cours de ce travail de thèse, le protocole initial, de même que les adaptations de ce protocole et le protocole final sont présentés. Les raisons des changements ainsi que les résultats ayant conduit à l'établissement du protocole final sont détaillés dans le Chapitre 3.2.

2.4.3.1. Protocole initial

Toutes les étapes sont réalisées dans l'enceinte anaérobie.

Les cellules, aliquotées par fraction de 5 mL, sont soniquées 4 fois 30 secondes dans la glace avec 2 minutes de pause entre chaque sonication (Appareil Bioblock, muni d'une micro-sonde, puissance 30).

Les cellules sont centrifugées une première fois à 8500 g pendant 5 minutes.

Le surnageant, contenant l'extrait protéique est conservé alors que le culot cellulaire est éliminé.

Le sulfate de streptomycine (concentration finale 40 mg/mL) est ajouté à l'extrait protéique afin de précipiter les acides nucléiques. L'extrait protéique est incubé à 4°C pendant 15 minutes puis centrifugé à nouveau à 8500 g pendant 5 minutes pour ne conserver que le surnageant.

De l'avidine (concentration finale 40 µg/mL) est ajouté à l'extrait protéique total afin d'éliminer les protéines couplées avec la biotine qui pourraient se fixer sur le support de chromatographie; les cellules sont incubées à 4°C pendant 30 minutes.

L'extrait protéique est dilué avec du tampon Tris/HCl 100 mM, NaCl 150 mM, dithionite 2 mM, pH 8 puis filtré à 5 µm.

L'extrait brut est déposé sur colonne contenant une résine Streptactin SuperFlow (IBA) préalablement équilibrée avec du tampon Tris/HCl 100 mM, NaCl 150 mM, dithionite 2 mM, pH 8. La colonne est lavée par 50 mL de tampon Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Dithionite 2 mM, pH 8. L'élution de la protéine est réalisée, sous flux d'hydrogène pur, avec du tampon Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Dithionite 2 mM, pH 8, contenant 2.5 mM de Desthiobiotine. Du dithiothréitol (DTT) à la concentration finale de 2 mM est ajouté à chaque fraction.

2.4.3.2. Adaptation du protocole de purification

Certaines purifications ont été réalisées dans des conditions différentes :

Du méthyl viologène peut être ajouté aux tampons Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Dithionite 2 mM, pH 8 et Tris HCl 100 mM, NaCl 150 mM, Dithionite 2 mM, pH 8, Desthiobiotine 2.5 mM, à la concentration finale de 0.02 mM afin de vérifier l'état de réduction du tampon.

La concentration en Dithionite dans les tampons peut être abaissée à 0.5 mM.

L'extrait protéique total récupéré après traitement à l'avidine peut ne pas être dilué et directement déposé sur la colonne de purification après filtration.

Le dithiothréitol (DTT) peut ne pas être ajouté à chaque fraction d'élution.

La concentration en desthiobiotine dans le tampon d'élution peut être modifiée : 2.5 mM, 7.5 mM ou 10 mM.

2.4.3.3. Protocole final

Le protocole final de purification des enzymes correspond au protocole initial avec les modifications suivantes :

- La concentration en dithionite dans tous les tampons est de 0,5 mM.
- La concentration en desthiobiotine dans le tampon d'élution est de 7,5 mM.
- Le dithiothréitol (DTT) n'est pas ajouté aux fractions d'élutions.

2.4.4. Purification de la ferrédoxine

Toutes les étapes sont réalisées dans l'enceinte anaérobie avec des tampons préalablement dégazés à l'azote.

Les cellules, aliquotées par fraction de 4 mL, sont soniquées 4 fois 30 secondes dans la glace avec 2 minutes de pause entre chaque sonication (Appareil Bioblock, muni d'une micro-sonde, puissance 30).

Les cellules sont centrifugées à 8500 g pendant 5 minutes.

Le surnageant, contenant l'extrait protéique est conservé alors que le culot cellulaire est éliminé.

Le sulfate de streptomycine (concentration finale 40 mg/mL) est ajouté à l'extrait protéique et il est incubé à 4°C pendant 15 minutes puis centrifugé à 8500 g pendant 5 minutes pour ne conserver que le surnageant contenant l'extrait protéique total.

De l'avidine (concentration finale 40 µg/mL) est ajouté à l'extrait protéique total ; les cellules sont incubées dans la glace pendant 30 minutes. Le sulfate de streptomycine et l'avidine sont introduits sous forme de poudre dans l'enceinte anaérobie et ajoutés directement à l'extrait protéique.

L'extrait protéique total est dilué avec du tampon Tris/HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8, jusqu'à un volume de 40 mL puis filtré à 5 µm.

L'extrait protéique total est déposé sur un gel de chromatographie StrepTrap GE prépackée de 5 mL préalablement équilibrée avec du tampon Tris/HCl 100 mM, NaCl 150 mM, pH 8. Après lavage de la colonne par 50 mL du même tampon, la ferrédoxine est éluée par du tampon Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM pH8, contenant 2,5 mM de desthobiotine. Des fractions d'un volume de 2 mL sont automatiquement collectées pendant la phase d'éluion à un débit de 1.5 mL/min. Lors des étapes de chargement, de lavage et d'éluion, la ferrédoxine est clairement détectable dans la colonne de par sa couleur brune caractéristique.

2.4.5. Analyse des protéines

2.4.5.1. Concentration en protéines

La concentration des enzymes purifiées ou la concentration protéique dans les extraits totaux est déterminée, en routine, par la méthode de Bradford (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis) à l'aide d'une courbe étalon réalisée avec une solution d'albumine bovine (BSA à des concentrations allant de 1 mg/L à 10 mg/L).

La concentration en protéine a également été déterminée par une analyse complète de tous les acides aminés (« AminoAcid Analysis »), réalisé par la société Bio-Syn (Lewisville, Texas, Etats-Unis) où la concentration de chacun des acides aminés (hormis la cystéine et le tryptophane) est dosée.

Dans le cas de la ferrédoxine recombinante, la concentration en protéine a été dosée initialement par « AminoAcid Analysis », permettant de définir un coefficient d'absorption molaire à 390 nm égal à 32,6 mM.cm⁻¹. Ce coefficient est ensuite utilisé pour la détermination de la concentration en ferrédoxine des autres fractions purifiées de ferrédoxine recombinante.

2.4.5.2. Analyse sur gel de polyacrylamide

2.4.5.2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons mélangés au tampon de dénaturation sont incubés à 100°C, pendant 10 minutes avant le dépôt sur gel de polyacrylamide. 5 à 10 µL d'échantillons protéiques sont déposés par puits. Le marqueur de taille utilisé est le marqueur précoloré Page Ruler de Fermentas.

Composition du tampon de dénaturation (5x) :

- | | |
|--|----------|
| • Tampon Tris-HCl 1M (pH 6,8) | 0,0625 M |
| • Glycérol | 10 % |
| • SDS | 10 % |
| • β -mercaptoéthanol (Sigma 07604) | 5 % |
| • Bleu de bromophénol (Sigma B0126) | 0,05 % |

Lorsque les gels sont réalisés en conditions non dénaturantes, le SDS et le β -mercaptoéthanol ne sont pas ajoutés au tampon de charge et les échantillons ne sont pas incubés à 100°C.

2.4.5.2.2. Analyse en conditions SDS-PAGE

Les protéines sont séparées sur des gels de polyacrylamide prêts à l'emploi contenant du SDS (SDS-PAGE) Mini-PROTEAN TGX 4-15% Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

Il est aussi possible de réaliser des gels dont la concentration en polyacrylamide est définie.

Gel de séparation SDS-PAGE :

- | | |
|---|---------------------------|
| • Mélange Acrylamide/bisacrylamide, (40%) | 10 % (Euromedex EU0062-C) |
| • Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 | 0,375 M |
| • SDS (20%) (Euromedex EU0460) | 0,1 % |
| • APS (10%) (Sigma A9164) | 0,05 % |
| • TEMED (Sigma T7024) | 0,05 % |

Gel d'alignement :

- | | |
|---|---------|
| • Mélange Acrylamide/bisacrylamide, (40%) | 4 % |
| • Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8 | 0,375 M |
| • SDS (20%) | 0,005 % |
| • APS (10%) | 0,05 % |
| • TEMED | 0,05 % |

Le persulfate d'ammonium (APS) ainsi que le TEMED (*N,N,N,N*-tétraméthylethylènediamine) sont ajoutés en dernier, au moment du conditionnement des gels.

La migration des gels est réalisée à 150 V, pendant 45 à 60 minutes, dans du tampon de migration (en condition dénaturantes) 1x de composition :

- | | |
|--------------------|--------------------------|
| • Tris base pH 8,3 | 3 g/L |
| • Glycine | 14,4 g/L |
| • SDS | 1 g/L (5 ml de SDS 20 %) |

Après migration les protéines sont détectées par coloration du gel (3h minimum) avec la solution Page Blue Protein Staining Solution (Thermo Scientific Waltham, Etats-Unis), ou environ une heure avec la solution Instant Blue (Expedeon, Royaume-Uni).

Lorsque cela est nécessaire, les protéines peuvent être détectées avec le kit de coloration au Nitrate d'argent Silver Stain Plus Bio-Rad selon les recommandations du fournisseur.

Par ailleurs, dans certains cas, les gels Mini-PROTEAN Stain-free TGX 4-15% Bio-Rad, qu'il n'est pas nécessaire de colorer et dont les protéines sont directement visualisées avec le système de révélation Chemidoc Touch Imaging System, ont également été utilisés.

2.4.5.2.3. Western-Blot

Les protéines de fusion possédant l'étiquette Strep-tag peuvent être spécifiquement détectées sur membrane en réalisant un Western-Blot révélé à l'aide d'anticorps anti-strepTag.

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 30 minutes à 10 V dans du tampon de transfert avec le système Bio-Rad TransBlot SD SemiDry Transfer cell.

Composition du tampon de transfert :

- Tris Base 25 mM
- Glycine 192 mM
- Ethanol 20 %

Composition du PBS :

- NaCl 137 mM
- KCl 2.7 mM
- Na₂HPO₄ 10 mM
- K₂HPO₄ 1.76 mM

Après l'électrotransfert, la membrane de nitrocellulose est saturée à l'aide de 20 mL d'une solution de BSA 3 % - PBS/Tween 20 0,5 % pendant 1 heure à température ambiante.

Trois lavages sont ensuite effectués pendant 5 minutes avec une solution PBS/Tween 0,5 %, pour rincer la membrane.

Après lavage, la membrane est incubée durant 1 heure avec 10 mL de solution contenant la Strep-Tactin conjuguée à la peroxydase (Strep-Tactin HPR) (IBA, GmbH, Göttingen, Allemagne) à la dilution 1:10000 dans la solution PBS/Tween 0,5 %.

Deux lavages de une minute sont effectués avec une solution de PBS/Tween 0,5 %, suivis de deux lavages de une minute avec une solution de PBS.

La membrane est révélée avec une solution de révélation, Chemoluminescence detection Kit (Amersham ECL Plus Western blotting detection reagents kit) qui permet de visualiser les bandes protéiques en violet-bleu selon les recommandations du fournisseur.

2.4.5.3. Analyse par Spectrophotométrie en ultra-violet

Pour l'acquisition des spectres UV des extraits protéiques totaux et des protéines purifiées, le spectrophotomètre SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation), placé dans l'enceinte anaérobie, est utilisé. Il est possible d'obtenir les absorbances des échantillons de 200 à 700 nm. Il est également possible d'utiliser un appareil Nanodrop (Thermo Scientific).

2.4.5.4. Dosage des atomes de fer

Le dosage des atomes de fer présents dans les hydrogénases et dans les ferrédoxines purifiées a été réalisé en collaboration avec le « Laboratoire Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues » au CEA de Cadarache. Le dosage est réalisé par ICP-AES (Torche à plasma couplée à une détection par spectroscopie d'émission optique). Cette méthode possède une très grande sensibilité, et la concentration en fer dans les échantillons peut être détectée de 0.5 à 0.05 mg/L, sans traitement particulier.

2.4.5.5. Analyse des protéines par dichroïsme circulaire

Du fait de la forte absorbance aux faibles longueurs d'ondes (autour de 200 nm) de certains composés du tampon contenant les enzymes purifiées, les échantillons sont dialysés, grâce à des colonnes PD-SpinTrap G-25 (GE Healthcare) dans du tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, 100 mM pH 7,2 avant l'analyse des protéines par dichroïsme circulaire. Les spectres sont enregistrés avec un spectromètre de dichroïsme circulaire Jasco J-815 en utilisant une cuve de 1 mm. Les spectres, représentant la moyenne de trois enregistrements se font sur une plage de longueur d'onde de 190 nm à 260 nm, avec une bande passante de 1 nm, à une vitesse de 50 nm par minute, à 20°C. L'analyse des spectres est réalisée grâce à l'outil internet Dichroweb [176] en utilisant le programme CDSSTR avec l'ensemble de référence 7.

2.4.6. Tests d'activités

2.4.6.1. Test d'activité de consommation du dihydrogène

Les dosages enzymatiques *in vitro* d'oxydation du dihydrogène suivent la réduction directe du méthyl viologène ou la réduction de la ferrédoxine, couplée à la réduction du métronidazole (Figure 34). Ils sont réalisés grâce à un spectrophotomètre SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation), placé dans l'enceinte anaérobie.

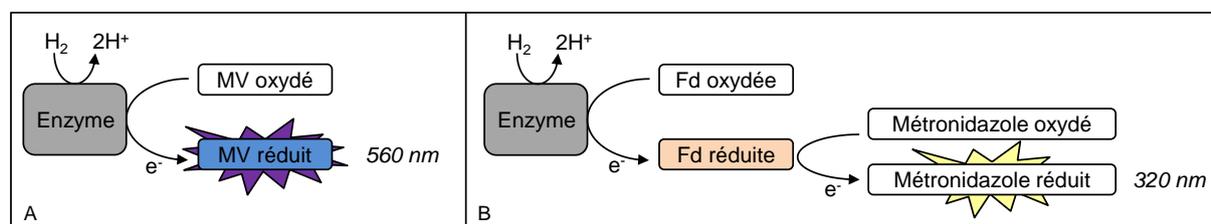


Figure 34: Représentation schématique des tests d'activité d'oxydation du dihydrogène. A : l'accepteur d'électrons est le méthylviologène ; B : l'accepteur final d'électrons est le métronidazole.

Les réactifs utilisés pour les dosages enzymatiques sont pesés et dissous dans l'enceinte anaérobie dans des tampons, décrits ci-après, préalablement dégazés à

chaud sous flux d'azote. Du dithiothréitol (DTT) à 2 mM est ensuite incorporé au tampon phosphate de potassium 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 de dihydrogène ultrapur (Alphagaz 2, Air Liquide), qui est utilisé comme substrat par l'enzyme.

2.4.6.1.1. Réduction du méthyl viologène

Composition du milieu réactionnel (concentration dans la cuve) :

- Tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 7,2 100 mM
- DTT 20 mM
- Quantité variable d'extrait protéique ou d'enzyme purifiée purs ou dilués
- Bullage d'hydrogène 1 atm
- Méthyl viologène 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 (ce qui explique le facteur « 2 » dans l'équation permettant le calcul de l'activité spécifique). Le spectrophotomètre permet d'obtenir des valeurs de $\Delta\text{DO}/\text{min}$.

La réaction est déclenchée par l'ajout de méthyl viologène. Les activités spécifiques sont déterminées dans une gamme où la linéarité avec la concentration protéique a été établie, avec une concentration en méthyl viologène de 20 mM. Une unité d'activité enzymatique est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la conversion de 1 μmole de substrat par minute. ($1 \text{ U}/\text{mg} = 1 \mu\text{molH}_2/\text{min}/\text{mg}$). Pour la détermination des paramètres cinétiques, la concentration en méthyl viologène varie de 0,1 à 40 mM.

Equation permettant le calcul des activités spécifiques des enzymes:

$$\text{AS} = \Delta\text{DO}/\text{min} / (7,71 \times 2) / (\text{vol prot.} \times [\text{prot.}])$$

AS correspond à l'activité spécifique exprimée en U/mg ($=\mu\text{molH}_2/\text{min}/\text{mg}$) ; « vol prot » correspond au volume d'échantillon protéique *pur* utilisé dans le milieu réactionnel, il est égal au volume utilisé divisé par le facteur de dilution de l'enzyme. « [prot.] » correspond à la concentration de l'échantillon protéique.

2.4.6.1.2. Réduction de la ferrédoxine couplée à la réduction du métronidazole

Composition du milieu réactionnel (concentration dans la cuve) :

- Tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,2, 100 mM,
- DTT 20 mM
- Quantité variable de ferrédoxine
- Bullage d'hydrogène 1 atm
- Métronidazole 0,1 mM
- Quantité variable d'enzyme purifiée

La réduction du métronidazole (Sigma M3761) est suivie via la diminution de l'absorbance à 320 nm ($\epsilon = 9,31 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). La réduction d'une molécule de ferrédoxine est couplée à la consommation d'une molécule d'hydrogène. Le spectrophotomètre permet d'obtenir des valeurs de $\Delta\text{DO}/\text{min}$.

La réaction est déclenchée par l'ajout de l'enzyme. 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 μmole de substrat par minute. (1 U/mg = 1 $\mu\text{molH}_2/\text{min}/\text{mg}$). Pour la détermination des paramètres cinétiques, la concentration en ferrédoxine varie de 0,15 à 12 μM .

Equation permettant le calcul des activités spécifiques des enzymes:

$$\text{AS} = \Delta\text{DO}/\text{min} / 9.31 / (\text{vol prot.} \times [\text{prot.}])$$

AS correspond à l'activité spécifique exprimée en U/mg ($=\mu\text{molH}_2/\text{min}/\text{mg}$) ; « vol prot » correspond au volume d'échantillon protéique *pur* utilisé dans le milieu réactionnel, il est égal au volume utilisé divisé par le facteur de dilution de l'enzyme. « [prot.] » correspond à la concentration de l'échantillon protéique.

2.4.6.2. Tests d'activité de production du dihydrogène

La production de dihydrogène est suivie grâce à l'utilisation d'un système de chromatographie en phase gazeuse (CPG). La production de dihydrogène est réalisée par l'enzyme en présence de protons et d'électrons qui proviennent du méthyl viologène réduit ou de la ferrédoxine réduite.

Les tests sont réalisés dans des fioles serties de 10 mL, préalablement dégazées à l'argon pur pendant trente secondes (Alphagaz 1 Air liquide). Le milieu réactionnel correspond à un volume de phase liquide de 2 mL dans la fiole. Les milieux réactionnels sont préparés et conservés dans la glace dans l'enceinte anaérobie, puis transférés dans les fioles dégazées, et enfin sortis de l'enceinte anaérobie, toujours dans la glace. La réaction est déclenchée par l'incubation à 37°C de la fiole sertie.

Des échantillons de phase gazeuse, d'un volume de 200 μL sont prélevés à la seringue de précision, toutes les cinq minutes environ pendant environ 20 minutes, et directement injectés sur la colonne intégrée dans un système de chromatographie en phase gazeuse Agilent GC7890A. La séparation des gaz des échantillons est réalisée en moins de trois minutes.

Le gaz porteur est de l'argon (Alphagaz 1, Air Liquide) utilisé à un débit de 5 mL/min. la séparation des différents gaz présents dans l'échantillon se fait grâce à une colonne HP-Molesieve 30 m x 0.535 mm x 25.00µm. La détection des gaz se fait grâce à un détecteur TCD (catharomètre) L'hydrogène produit est quantifié à l'aide d'une gamme étalon préalablement réalisée avec des injections successives de différents volumes d'hydrogène pur contenant entre 0.15 et 0.90 µmol d'H₂ (Alphagaz 2, Air Liquide)(Figure 35).

La seringue utilisée pour l'injection du gaz est une seringue « Hamilton SampleLock syringe » 1725 SL (Samle Lock) 81156 d'un volume total de 250 µL.

Paramètre de l'appareil de chromatographie en phase gazeuse :

- Température de l'injecteur 150 °C
- Température du four (de la colonne) 60 °C
- Température du détecteur 150 °C

Composition du milieu réactionnel (concentration dans les 2 mL de phase liquide de fiole) :

- Tampon Tris-HCl, pH 8, 100 mM,
- Dithionite de sodium 50 mM
- Quantité variable de méthyl viologène ou de ferrédoxine
- Quantité variable d'enzyme purifiée

Les activités spécifiques sont déterminées avec une concentration en méthyl viologène de 20 mM. Pour la détermination des paramètres cinétiques, la concentration en méthylviologène varie de 0,01 à 25 mM et la concentration en ferrédoxine varie de 0,15 à 12 µM. Les activités mesurées sont exprimées en µmoles de dihydrogène produit par minute et par milligramme d'enzyme purifiée ou d'extrait protéique total.

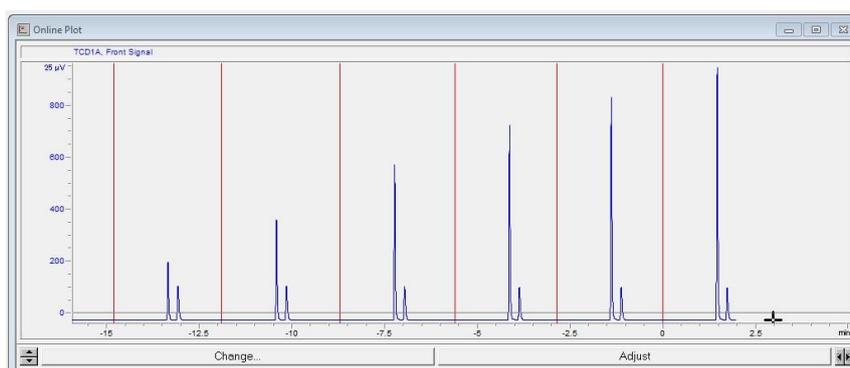


Figure 35: Exemple de chromatographe obtenu lors de tests d'activités de production de dihydrogène. Après chaque injection d'un échantillon de phase gazeuse (en rouge) la séparation des gaz est effective en deux minutes. Deux pics sont alors observés : le premier pic correspond au dihydrogène présente un temps de rétention de 1,45 minutes ; le second pic correspond à une faible quantité de diazote qui est inévitablement injecté avec les échantillons son temps de rétention est de 1,8 minutes. L'aire sous le pic de dihydrogène augmente au fur et à mesure des injections successives alors que l'aire sous le pic d'azote ne varie pas.

A partir des aires sous les pics pour différentes injections successives, des quantités de dihydrogène produites sont calculées et exprimées en $\mu\text{molH}_2/\text{min}$.

Equation permettant le calcul des activités spécifiques des enzymes:

$$\text{AS} = (\mu\text{molH}_2/\text{min} \times \text{FC}) / \text{Qté de prot.}$$

AS correspond à l'activité spécifique exprimée en U/mg ($=\mu\text{molH}_2/\text{min}/\text{mg}$); « FC » correspond au facteur correctif égal à 37.15, en effet, 200 μL sont prélevés de la phase gazeuse de la fiole qui possède un volume gazeux 37.15 fois plus élevé (200 μL prélevés dans une fiole d'un volume total d'environ 10 mL qui contient 2 mL de milieu réactionnel liquide) « Qté de prot. » correspond à la quantité de protéine utilisée dans le milieu réactionnel, qui est égal au volume d'extrait divisé par la concentration en protéine divisée par le facteur de dilution.

2.4.6.3. Réaction d'échange proton-deutérium

Ces mesures d'activité ont été réalisées en collaboration le « Laboratoire Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues » au CEA de Cadarache. La réaction d'échange proton/deutérium est suivie à 37°C, sous agitation dans 1,5 mL une phase aqueuse, composée de tampon phosphate de potassium 50 mM, pH7, et 1 mM de dithionite de sodium, dégazée à l'argon puis au deutérium. La réaction d'échange est initiée par l'addition de l'enzyme. L'évolution des concentrations en D_2 et en HD sont suivies en ligne par spectrométrie de masse. Les activités d'échange sont ensuite calculées à partir de ces évolutions.

2.4.6.4. Dosage des activités enzymatiques par électrochimie directe

La caractérisation électrochimique des enzymes est réalisée en collaboration l'équipe « [Dynamique réactionnelle des enzymes rédox multicentres, cinétique électrochimique](#) » au laboratoire de « Bioénergétique et Ingénierie des Protéines » (BIP) à Marseille. Les méthodes permettant les mesures d'activités et la détermination des paramètres cinétiques des enzymes ont été réalisées comme décrits précédemment par Baffert *et al.* [129], Fourmond *et al.* [177] et Orain *et al.* [130].

2.4.6.5. Tests de l'activité enzymatique de la thiolase

L'activité spécifique de la thiolase est mesurée dans le sens de la réaction de thiolase (sens non physiologique, qui correspond à la dissociation d'une molécule d'acétoacétyl-CoA) à l'aide d'un spectrophotomètre SAFAS HP8453A UV/Visible (Hewlett-Packard Chemstation), placé dans l'enceinte anaérobie.

Composition du milieu réactionnel (concentration dans la cuve) :

- Tampon Tris-HCl pH 8,0 100 mM
- CoASH 0,2 mM
- Acétoacétyl-CoA 60 μM
- MgCl_2 10 mM
- DTT 1 mM
- Quantité variable d'extrait à doser

La réaction est réalisée à 30 °C et est déclenchée par l'ajout de l'extrait brut. L'activité est évaluée par la diminution de l'absorbance de l'acétoacétyl-CoA (suivie à 303 nm ($\epsilon = 14 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)). La pente correspondant à l'hydrolyse naturelle de l'acétoacétyl-CoA (sans extrait) est également déterminée et est retranchée de l'activité mesurée.

Equation permettant le calcul des activités spécifiques des enzymes:

$$\text{AS} = \Delta\text{DO}/\text{min} / 14 / (\text{vol prot.} \times [\text{prot.}])$$

AS correspond à l'activité spécifique exprimée en U/mg; « vol prot » correspond au volume d'échantillon protéique *pur* utilisé dans le milieu réactionnel, il est égal au volume utilisé divisé par le facteur de dilution de l'enzyme. « [prot.] » correspond à la concentration de l'échantillon protéique.

2.5. Dosage des produits de fermentation

L'évolution des concentrations en substrats et produits de fermentations sont déterminés par HPLC. Des prélèvements de culture sont centrifugés puis filtrés sur 0,2 μm et analysés par chromatographie liquide à haute performance (HPLC). Le système HPLC utilisé (Agilent 1200 series) est équipé d'un passeur d'échantillons automatique (Agilent 1200 series), d'une pré-colonne (Microguard Bio-Rad) et d'une colonne de type H+ (HPX-87H, 300 nm x 7,8 mm) qui permet une séparation par exclusion d'ions. L'analyse des échantillons est réalisée à 14 °C, avec un débit d'éluant (H₂SO₄ 0,5 mM) de 0,5 ml/min. La détection des produits est assurée grâce à un spectrophotomètre UV (Agilent 1200 séries G1362A) à 210 nm et par un réfractomètre (Agilent 1200 series G1314B). Les concentrations des différents composés dans les échantillons analysés sont déterminées à l'aide d'une courbe de calibration établie à partir de solutions étalons.

2.6. Bio-informatique

Le logiciel « Serial Cloner » permet de réaliser les constructions plasmidiques in silico, le dessin des oligonucléotides et l'analyse des séquences d'ADN.

L'outil internet « Multalin » (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) permet de réaliser les alignements des séquences nucléotidiques et protéiques.

L'outil internet « PROTEIN CALCULATOR v3.4 » (<http://protcalc.sourceforge.net/>) permet de prédire à partir d'une séquence protéique, le poids moléculaire de la protéine ainsi que ces coefficients d'absorption à différentes longueurs d'ondes (comprise entre 278 et 282 nm).

L'outil internet « GCUA : graphical codon usage analyser » (<http://gcu.schoedl.de/>) permet d'analyser l'optimisation et l'harmonisation des séquences nucléotidiques en fonction des tables d'usage des codons, disponibles sur le site internet : <http://www.kazusa.or.jp/codon/>

Le logiciel Sigma plot 11.0, avec le module Enzyme Kinetics 1.3 permet de déterminer les paramètres cinétiques des enzymes (K_m et V_{max}) à partir des activités en fonction des concentrations en substrats.

2.7. Modélisation moléculaire

Le logiciel Pymol (DeLano Scientific) permet de visualiser et de traiter graphiquement les structures et les modèles de structure tridimensionnelles des protéines étudiés.

Les manipulations de modélisation moléculaire ont été réalisées en collaboration avec le Dr Isabelle André dans l'équipe CIME du Laboratoire **Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés**.

Les modèles de l'hydrogénase CaHydA et de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum* ont été générés grâce au serveur internet I-TASSER [178](ref). Les structures de l'enzyme Cpl de *C. pasteurianum* (Fichier PDB : 3C8Y, 71% d'identité avec CaHydA) et de la ferrédoxine de *C. pasteurianum* (Fichier PDB : 1CLF, 87% d'identité avec la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*) ont été utilisés pour corriger les contraintes spatiales des modèles. La conformation de chacun des centres fer-soufre a été validée, de même que la composition exacte du centre catalytique de l'enzyme [121]. Les modèles sont ensuite affinés par minimisation de l'énergie en utilisant le module DISCOVER du logiciel Insight II (Accelrys, San Diego).

Le docking des partenaires rédox est réalisé grâce au logiciel AutoDock4 [179], avec les paramètres de base, excepté le nombre de calculs de solutions qui est de 100 pour la ferrédoxine et de 256 pour le méthylviologène.

Résultats

3. Résultats

L'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* est une enzyme de type M3, constituée du Domaine H hébergeant le Cluster H catalytique, et d'un domaine accessoire appelé Domaine F comportant quatre centres fer-soufre.

Dans une première partie, les travaux présentés ci-après ont pour objectifs de déterminer l'implication des centres fer-soufre accessoires, d'une part dans les capacités catalytiques de l'hydrogénase à fer CaHydA de *C. acetobutylicum* et d'autre part dans le mécanisme d'interaction avec le partenaire physiologique, la ferrédoxine.

Pour répondre à ces questions, différents variants ont été construits par une approche de mutagenèse dirigée (Chapitre 3.1). Après une optimisation des techniques d'expression et de purification de l'hydrogénase CaHydA sauvage (Chapitre 3.2), et la mise au point d'une nouvelle méthode d'expression et de purification de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] (Chapitre 3.3), la caractérisation de différents variants de l'enzyme CaHydA est présentée (Chapitre 3.4). Enfin, la dernière partie des travaux s'intéresse au développement d'une souche modifiée de *C. acetobutylicum* chez laquelle la croissance serait dépendante de la production de dihydrogène, dans le but de disposer d'une souche outil pour le criblage *in vivo* d'hydrogénases variantes suffisamment actives pour assurer la survie de la souche (Chapitre 3.5).

Résultats

**Conception et synthèse des variants de
l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* et
d'hydrogénases chimériques**

3.1. Conception et synthèse des variants de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* et d'hydrogénases chimériques

3.1.1. Introduction

Plusieurs variants de l'hydrogénase à fer ont été conçus afin d'étudier d'une part, l'implication des centres fer-soufre du Domaine F dans l'activité catalytique des hydrogénases à fer, et, d'autre part, la contribution des centres fer-soufre de surface dans l'interaction avec le partenaire physiologique privilégié de l'enzyme, la ferrédoxine.

Certaines des hydrogénases à fer décrites jusqu'alors, appartenant à trois classes distinctes, ont le même rôle métabolique d'oxydation de la ferrédoxine réduite, menant à la réduction des protons et à la production de dihydrogène [11,111,180]. Toutefois les activités rapportées pour les enzymes de *C. acetobutylicum* (CaHydA), de *Megasphaera elsdenii* (MeHydA) et de *C. reinhardtii* (CrHydA1) varient d'un facteur 2 à 3 [48,111,181] (Figure 36).

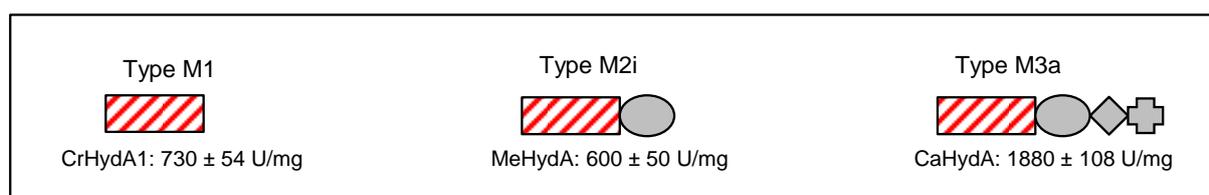


Figure 36: Conservation du Domaine H chez trois types d'hydrogénases à fer. Pour chaque enzyme caractéristique des trois types (M1, M2i et M3a), le Domaine H est représenté en rouge et blanc et les domaines contenant des centres fer-soufre accessoires sont représentés en gris. Les activités de réduction des protons avec le méthyl viologène sont données pour chaque enzyme.

Pourtant, ces trois enzymes présentent une grande conservation du Domaine H, contenant le site catalytique ainsi que les voies de transfert de protons et de diffusion des gaz, de l'enzyme. En effet, on retrouve au moins 30 % de résidus parfaitement identiques entre les trois enzymes étudiées (Figure 37). Ces enzymes diffèrent, de ce fait, majoritairement dans le contenu en domaines protéiques contenant des centres fer-soufre accessoires. Dès lors, l'implication de ces centres fer-soufre accessoires dans l'activité catalytique de l'enzyme reste à déterminer.

D'autre part, des hydrogénases chimériques de type M3 ont été créées à partir des domaines protéiques des enzymes CrHydA1 de *C. reinhardtii* et CaHydA de *C. acetobutylicum*.

cystéines. D'autre part, cette enzyme possède un domaine d'environ 50 acides aminés contenant un centre [4Fe-4S] dit atypique car il est coordonné par trois cystéine et une histidine, comme celui retrouvé à l'extrémité de la chaîne de transfert d'électrons des [Ni-Fe] hydrogénases [96,97]. Au sein de chacun de ces domaines, la position des centres fer-soufre respectifs, situés proches de la surface de la protéine, suggère qu'ils interviennent dans le transfert d'électrons depuis la ferrédoxine.

La première approche consiste à empêcher la formation de chacun des centres fer-soufre de surface dans le but de limiter le transfert d'électrons à l'une ou l'autre des voies potentielles.

La substitution d'un seul des acides aminés impliqués dans leur coordination a déjà été employée avec succès pour empêcher la formation des centres fer-soufre [2Fe-2S] et [4Fe-4S] [182–184]. La mutation des résidus cystéine en alanine est la substitution de choix pour que les centres ne soient pas formés, et qu'il n'y pas de conversion des centres [4Fe-4S] en [3Fe-4S], comme cela pourrait être le cas avec des mutations en sérine ou glycine [96,185]. La cystéine C48 est donc remplacée en alanine pour empêcher la formation du centre FS2, et, séparément, la cystéine C100 est substituée en alanine pour entraver la formation du centre FS4C. De ce fait, chez les enzymes HydA_C48A et HydA_C100A, la voie de transfert d'électrons doit donc être limitée au centre FS4C et au centre FS2, respectivement (Figure 38).

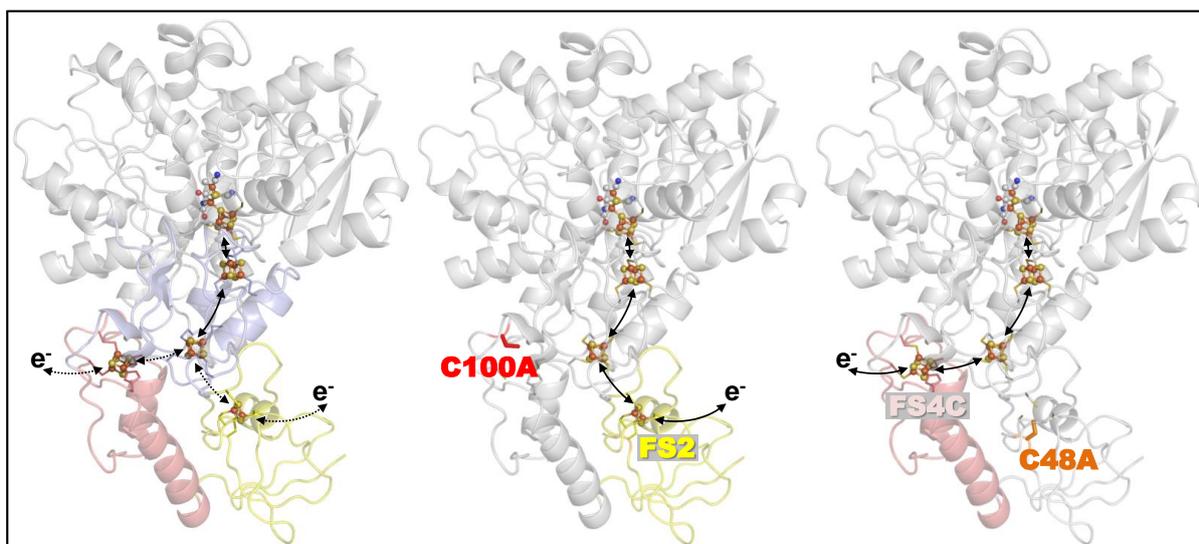


Figure 38: Voies de transfert d'électrons au sein des différentes enzymes. A : chez l'enzyme sauvage CaHydA, les électrons peuvent transiter, *a priori*, par les centres fer-soufre de surface FS2 et FS4C. Chez les enzymes HydA_C100A (B) et HydA_C48A (C), les voies de transfert d'électrons devraient être limitées au centres FS2 et FS4C, respectivement.

L'importance du centre fer-soufre [2Fe-2S] du domaine FS2 est également étudiée grâce à la création d'une deuxième enzyme. L'enzyme HydA_ΔFS2 correspond à l'enzyme CaHydA chez laquelle le domaine protéique permettant la coordination du centre fer-soufre FS2 a été délété. Toutefois, le domaine protéique n'est pas éliminé en totalité et une vingtaine d'acides aminés situés en partie N-terminale sont conservés dans le but de maintenir le repliement et la solubilité de l'enzyme (Figure 39).

Par ailleurs, l'importance du caractère atypique du centre fer-soufre FS4C, de même que ses capacités de modulation de l'activité de l'enzyme ont également été questionnées. L'histidine H93 a été remplacée par une cystéine afin de reconstituer un centre [4Fe-4S] typique comme cela a déjà été décrit chez les hydrogénases [NiFe] [96] (Figure 39).

En parallèle, à partir de l'enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum*, une enzyme HydA_ΔDA qui ne contient pas le Domaine F contenant les centres fer-soufre accessoires, et qui se rapproche donc d'une enzyme de structure minimale comme celle retrouvée chez *C. reinhardtii*, est conçue. A partir de l'enzyme CaHydA, l'élimination des acides aminés de la méthionine M1 à la cystéine C199 a permis l'obtention de l'enzyme HydA_ΔDA (Figure 39).

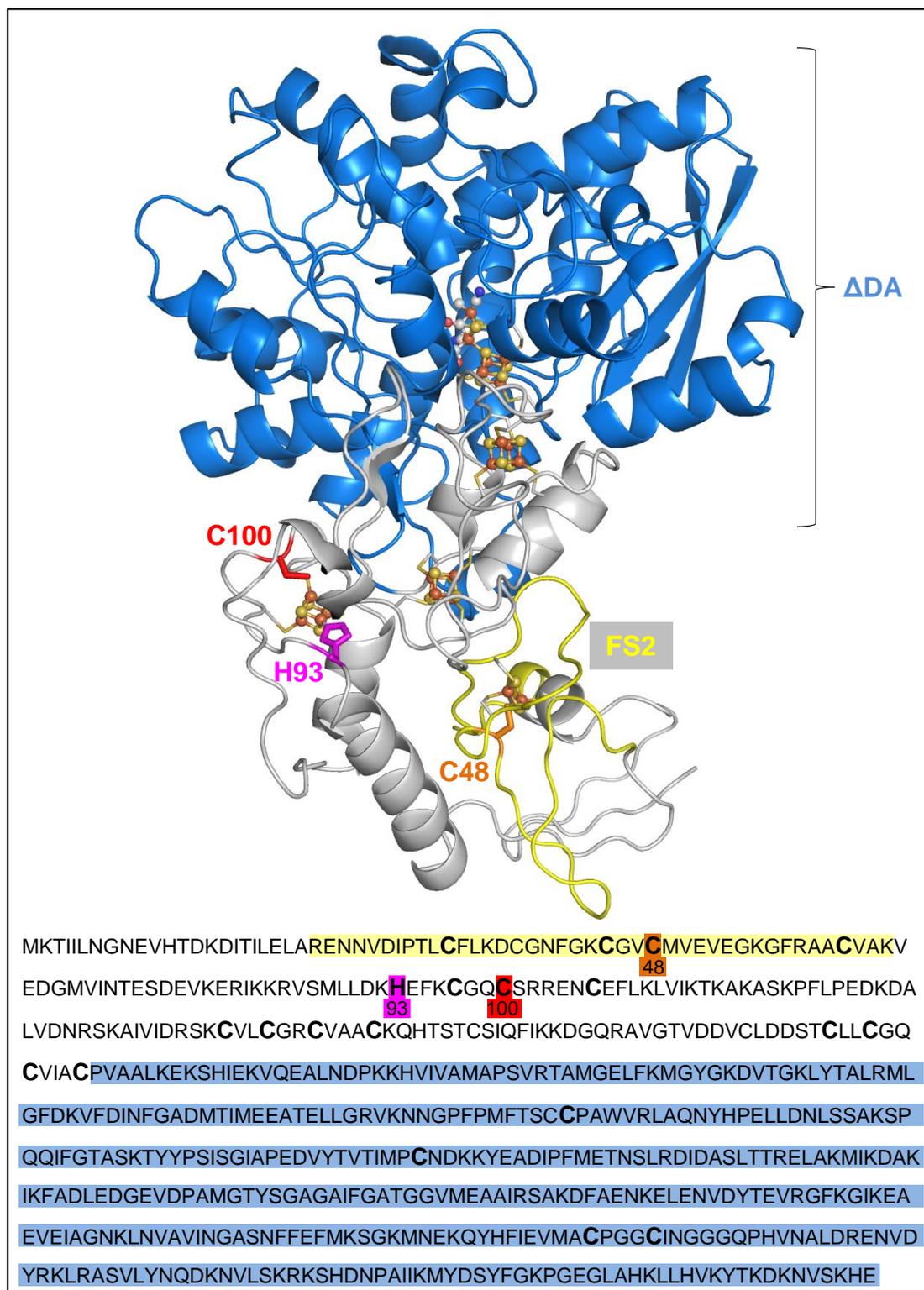


Figure 39: Modèle structural de l'enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum* et mise en évidence des différents variants des centres fer-soufre étudiés au niveau de la séquence protéique. L'enzyme HydA_{ΔDA} (en bleu) correspond au Domaine H de l'enzyme de *C. acetobutylicum*. Les acides aminés C48 (en orange) et C100 (en rouge) sont la cible de substitution en alanine. La partie protéique « FS2 » (en jaune) est éliminée chez l'enzyme HydA_{ΔFS2}. L'histidine H93 (en rose) est mutée en cystéine chez l'enzyme HydA_{H93C}.

3.1.3. Enzymes chimériques

Les séquences protéiques de deux enzymes chimériques, formées à partir des motifs structuraux des enzymes CaHydA de *C. acetobutylicum* et CrHydA1 de *C. reinhardtii*, sont fournis par les collaborateurs de l'équipe « Dynamique réactionnelle des enzymes rédox multicentres, cinétique électrochimique » à Marseille.

Le dessin et l'optimisation des séquences codant pour ces deux chimères en vue d'une expression dans des souches de *C. acetobutylicum* ont tout d'abord été réalisés. L'objectif consiste à déterminer la meilleure séquence codante pour chaque enzyme; il faut « corriger » la séquence codante en utilisant pour chaque acide aminé le « meilleur » codon, en fonction de la table d'usage des codons de l'organisme hôte. Le « meilleur » codon pour un acide aminé donné est déterminé en fonction de la fréquence d'usage des codons chez l'organisme dont provient la protéine; toutefois, il faut harmoniser la séquence en conservant en son sein la présence de codons rares qui permettent *a priori* des ralentissements des mécanismes de traduction associés à un meilleur repliement des protéines exprimées [186]. Les séquences optimisées ont été obtenues, puis analysées et validées.

3.1.3.1. Chimère HydX_1

La chimère HydX_1 correspond à l'enzyme CrHydA1 additionnée du Domaine F de l'enzyme CaHydA. Cependant, dans le but d'augmenter les interactions possibles entre ces deux domaines, au sein de la séquence correspondant à l'enzyme CrHydA1, une vingtaine d'acides aminés ont été mutés pour correspondre à ceux retrouvés dans la partie C-terminale de l'enzyme CaHydA (Figure 40). En effet, certains acides aminés retrouvés à la surface de l'hydrogénase CrHydA1 doivent être substitués par d'autres acides aminés puisqu'ils sont retrouvés enfouis dans la partie protéique de l'hydrogénase chimérique HydX_1.

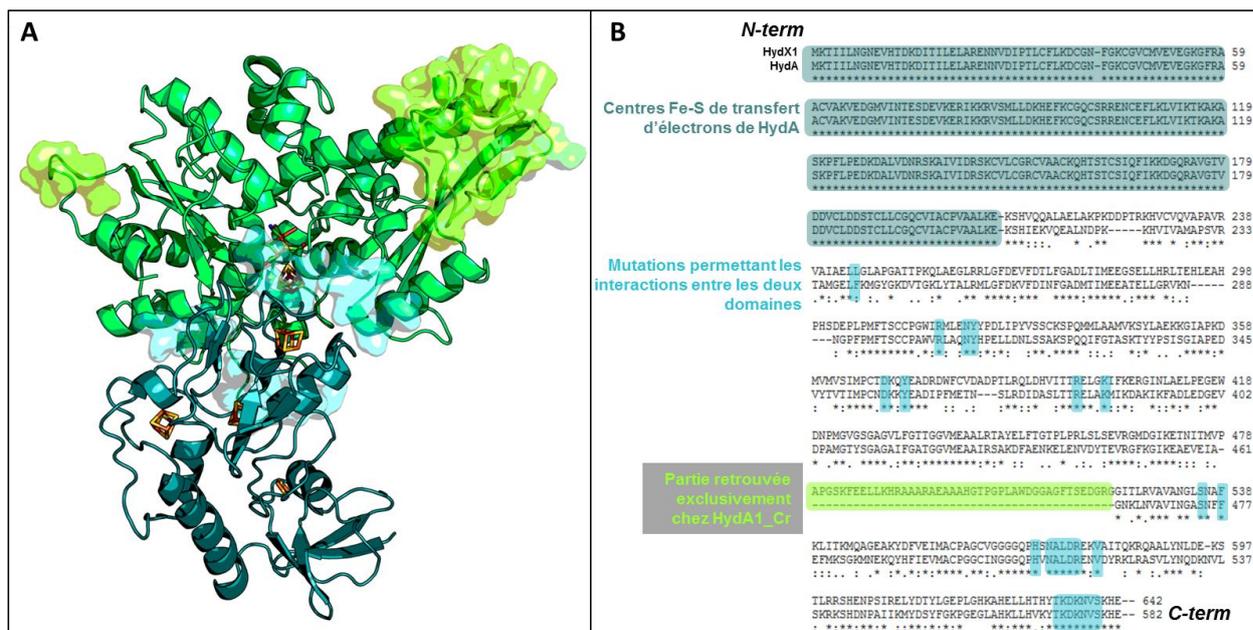


Figure 40: Modèle et séquence de l'enzyme HydX_1. A : Modèle structural de l'enzyme chimérique HydX_1, B : Alignement des séquences protéiques des enzymes HydX_1 et CaHydA avec la mise en évidence des mutations ponctuelles différenciant ces deux protéines.

La séquence nucléotidique codant pour la protéine chimère correspondant à la séquence de la partie N-terminale de l'enzyme comprenant les centres Fe-S de transfert d'électrons de l'enzyme CaHydA n'a pas été modifiée puisque l'expression de cette chimère sera réalisée chez *C. acetobutylicum*.

L'optimisation de la séquence de la partie C-terminale de la Chimère HydX1 se fait en deux temps. Dans un premier temps, la séquence sauvage de l'enzyme CrHydA1 est optimisée pour son expression chez *C. acetobutylicum*; et dans un deuxième temps, les mutations sont introduites dans la séquence optimisée pour les acides aminés impliqués dans les interactions entre les deux domaines de la chimère HydX_1. Faisant suite à l'harmonisation de l'usage des codons, la fréquence d'utilisation des codons mutés, doit être équivalente à celle des codons des acides aminés situés à la même position dans la séquence de l'enzyme de *C. reinhardtii*.

La séquence nucléotidique de la chimère HydX_1 est analysée; la tendance à l'utilisation des codons rares dans la séquence de l'enzyme HydX_1 est conservée par rapport à celle retrouvée pour l'enzyme CrHydA1; ceci pour une région optimisée, et pour dans une région optimisée dans laquelle des mutations ont été introduites (Figure 41).

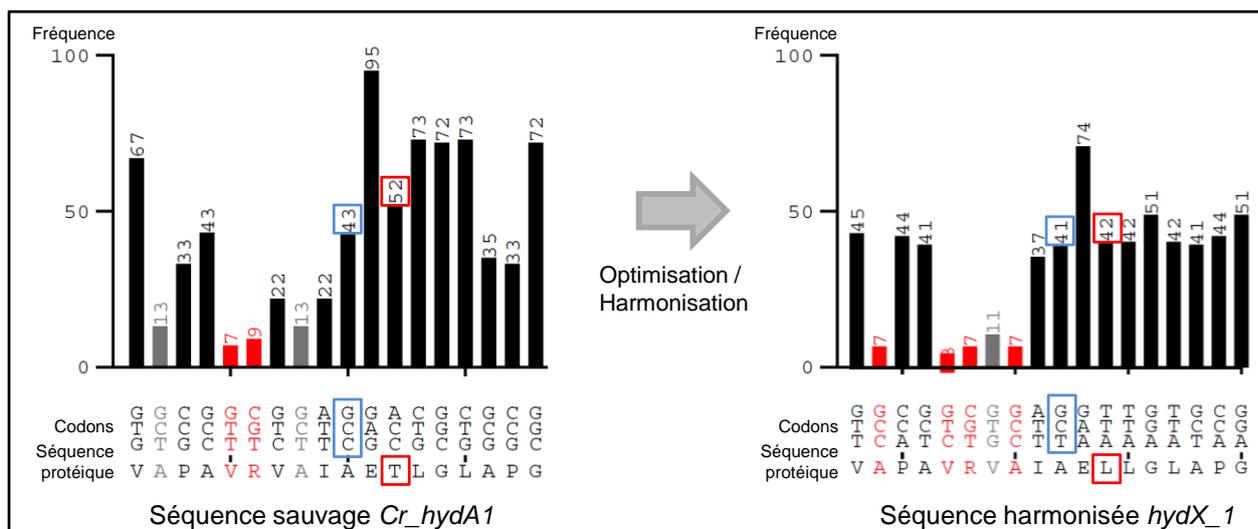


Figure 41: Harmonisation de la séquence codant l'enzyme HydX₁. La fréquence d'usage des codons est conservée de la même façon en l'absence (codons encadrés en bleu) ou suite à des substitutions de certains acides aminés (résidus encadrés en rouge).

3.1.3.2. Chimère HydX₃

L'enzyme chimérique HydX₃ correspond à l'enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum*, à l'exception des acides aminés retrouvés autour du site catalytique de l'enzyme qui sont ceux retrouvés chez l'enzyme CrHydA1 de *C. reinhardtii*.

Il n'y a en réalité que 22 acides aminés qui sont modifiés par rapport à la séquence de l'enzyme sauvage CaHydA (Figure 42).

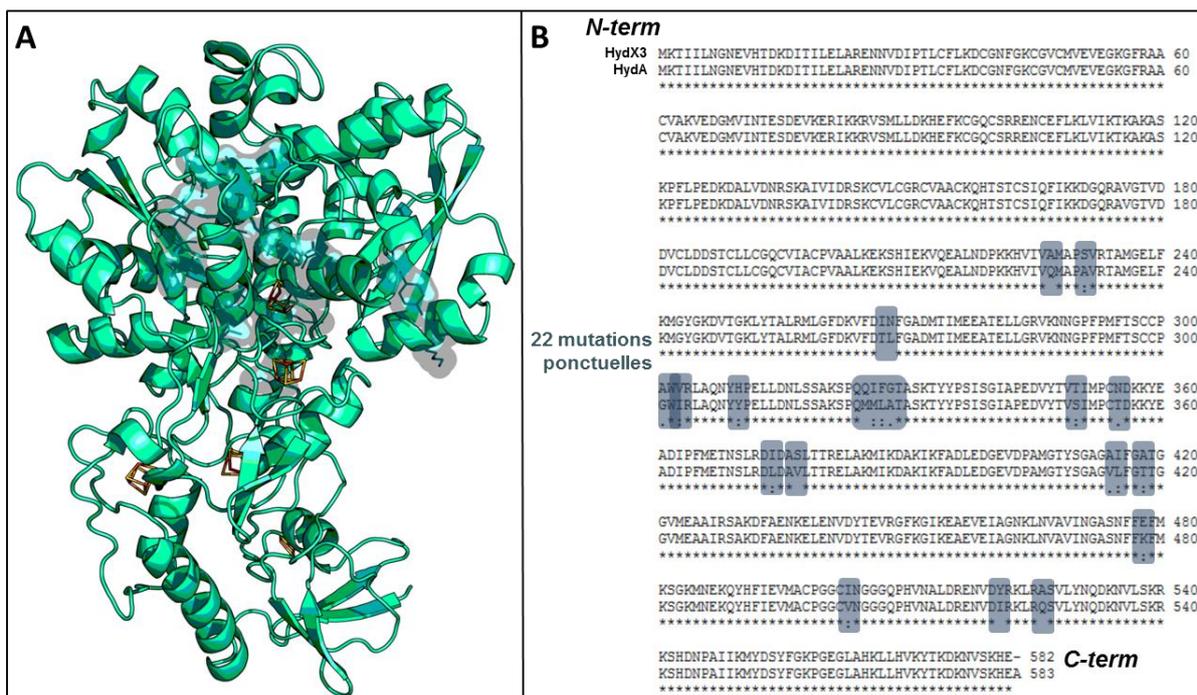


Figure 42: Modèle et séquence de l'enzyme HydX_3. A : Modèle structural de l'enzyme chimérique HydX_3, B : Alignement des séquences protéiques des enzymes HydX3 et CaHydA avec la mise en évidence des mutations ponctuelles différenciant ces deux protéines.

La séquence nucléotidique de la chimère HydX_3 correspond donc à la séquence de l'enzyme sauvage CaHydA dans laquelle 22 mutations ont été insérées. L'harmonisation de la séquence a pour but de se rapprocher le plus possible des fréquences des codons observées chez l'enzyme sauvage CaHydA exprimée chez *C. acetobutylicum*.

L'usage des codons dans la séquence nucléotidique obtenue est alors analysé et la fréquence d'usage des codons dans l'ensemble de la séquence de la chimère HydX_3 est comparée à celle de l'enzyme CaHydA. Il apparaît que l'insertion de ce petit nombre de mutations n'a que peu d'influence sur la répartition totale des codons rares au sein de la séquence, et que la présence des codons rares est bien conservée après insertion des mutations (Figure 43).

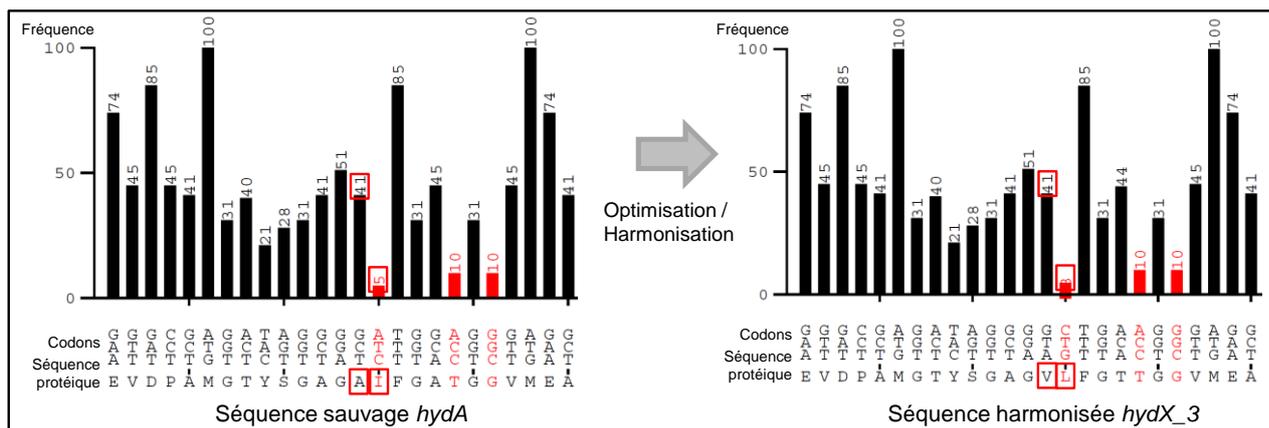


Figure 43: Harmonisation de la séquence codant l'enzyme HydX₃. La fréquence d'usage des codons est conservée alors que des mutations de certains acides aminés sont réalisées (résidus encadrés en rouge).

Résultats

**Purification de l'enzyme CaHydA
de *C. acetobutylicum***

3.2. Purification de l'enzyme CaHydA de *C. acetobutylicum*

3.2.1. Introduction

Au cours de ce travail de doctorat, une attention particulière a été portée à l'amélioration du système de purification des hydrogénases afin d'améliorer et de standardiser la qualité des enzymes purifiées. À partir du protocole initial de purification [108,116], des modifications ont été mise en place. Les protocoles de purification détaillés sont décrits en Matériel et Méthodes.

3.2.2. Système d'expression et de purification initial

Au sein du laboratoire, la purification et la caractérisation de l'hydrogénase CaHydA de *C. acetobutylicum* sont réalisées depuis de nombreuses années [107–109,116]. Toutes les étapes sont réalisées en conditions d'anaérobiose stricte. Le système couple l'expression de protéines de fusion portant une étiquette StrepTag suivie de la purification des enzymes en une étape.

L'expression des protéines d'intérêt est réalisée de façon homologue dans une souche de *C. acetobutylicum* ΔCA_C1502 [187], grâce à la présence d'un plasmide qui contient le gène *hydA* de l'hydrogénase CaHydA sous la dépendance du promoteur sauvage. Une séquence peptidique « linker » de onze acides aminés est située entre le gène d'intérêt et l'étiquette StrepTag en position C-terminale afin d'augmenter la reconnaissance entre la protéine et le support de chromatographie. Les cellules surexprimant les enzymes sont cultivées dans des bioréacteurs réalisés en mode discontinu et à pH régulé, jusqu'à la densité optique adéquate, puis collectées sous flux d'hydrogène, avant d'être centrifugées en anaérobiose stricte, Après extraction des protéines par sonication, celles-ci sont purifiées et la quantité et l'activité des enzymes purifiées sont enfin évaluées.

3.2.3. Identifications des sources de variation des activités spécifiques

Toutefois, au cours de la purification des enzymes, des variations inexplicables de la quantité de protéines et des activités spécifiques des enzymes purifiées ont été observées. L'analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE a montré que l'hydrogénase était bien présente à la taille attendue de 65 kDa, mais en faibles quantités, de plus une protéine de grande taille, identifiée comme étant la pyruvate carboxylase biotinylée [109], ainsi que des protéines, considérées comme étant des

formes de dégradation de la protéine d'intérêt ont été régulièrement observées (Figure 44).

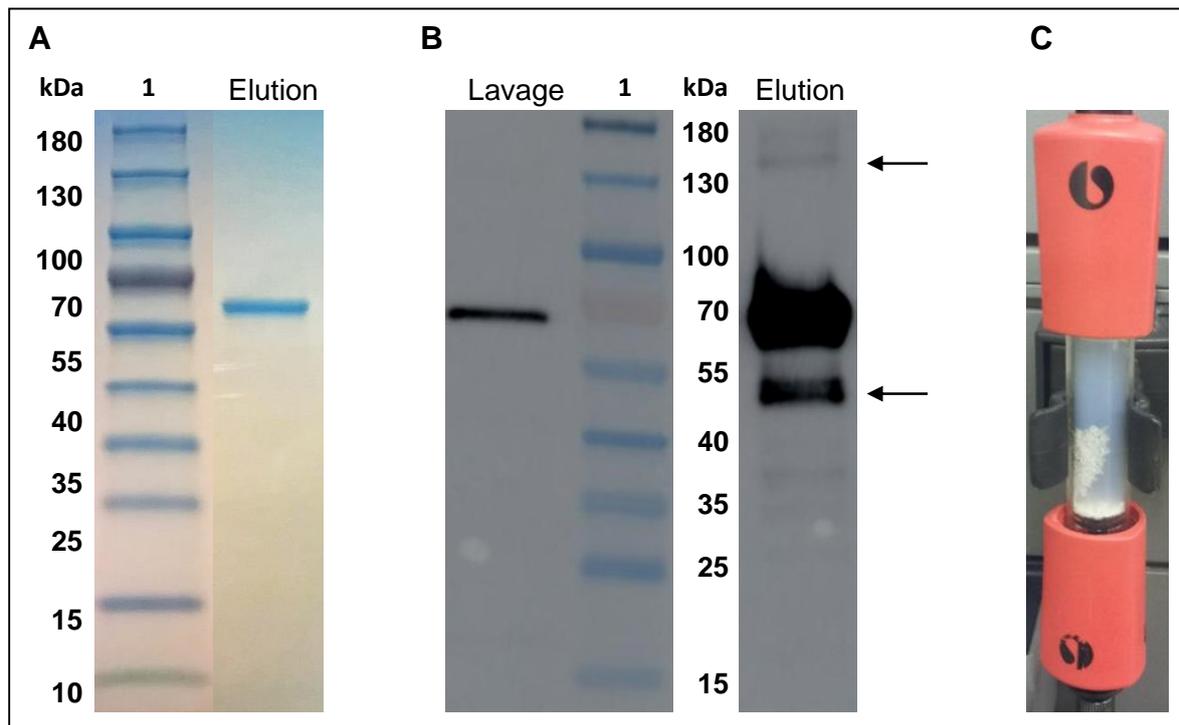


Figure 44: Purification des enzymes avec le protocole initial. A : Après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie, une faible quantité de protéine d'intérêt est observée. B : Après Western-Blot, la protéine d'intérêt est retrouvée dans la fraction de lavage, ce qui traduit une perte de protéine anormale ; des protéines de grandes tailles et des formes de dégradation sont également observées avec la protéine d'intérêt. C : formation de gaz d'hydrogène dans la colonne de purification (1 : marqueur de taille).

Des variations dans les quantités d'enzymes qui sont purifiées sont problématiques. La quantification difficile de faibles quantités d'enzymes purifiées entraîne inévitablement une erreur dans la détermination des activités spécifiques des enzymes. De la même façon, la présence de protéines non spécifiques (« contamination » ou formes de dégradation) empêche la détermination fiable de l'activité spécifique et des paramètres cinétiques des échantillons.

La quantité d'enzyme purifiée est liée premièrement à la quantité de cellules produites, liée en outre à la densité optique des cellules lors de la récolte. Le protocole de collecte des cellules est aussi déterminant, en particulier pour le maintien des conditions d'anaérobiose stricte lors du transfert des cellules depuis le bioréacteur jusqu'à l'enceinte anaérobie. En effet, une exposition des cellules à l'oxygène de l'air peut entraîner une dégradation d'une partie des protéines.

Bien que la quantification des effets observés soit difficile, l'étape de sonication des cellules est une étape critique. En effet, les cellules doivent être conservées à 4°C, dans la glace, afin d'éviter un échauffement susceptible d'entraîner une dégradation des protéines.

Au cours du chargement de l'extrait brut protéique sur la colonne, une formation de gaz est parfois observée et entraîne la formation de bulles dans la résine (Figure 44.C). La présence de gaz dans la matrice de purification est également observable sur les chromatogrammes permettant le suivi de la purification : les bulles qui passent devant le détecteur conduisent à la formation de pics artefactuels. Ceci pourrait être à l'origine d'une élution prématurée de la protéine d'intérêt et donc de diminution du rendement de purification.

La dithionite de sodium est utilisée pour l'élimination des traces potentielles d'oxygène. Toutefois, sa présence, dans les différents tampons de purification à la concentration de 2 mM, pourrait être à l'origine de la réduction des protons directement par l'hydrogénase (sauvage ou étiquetée), comme cela est observé pour l'enzyme de *Megasphaera elsdenii* [188] mais aussi de la réduction de la ferrédoxine présente dans l'extrait brut qui peut ensuite conduire à la formation de dihydrogène.

L'étape de lavage de la protéine fixée sur la colonne est importante car elle permet normalement d'éliminer les protéines fixées sur la colonne de façon non spécifiques, cependant, du fait la présence de gaz dans la colonne et d'une élution prématurée de la protéine d'intérêt, le volume de tampon utilisé pour le lavage est parfois réduit. Il semble également que lors de la phase d'élution, la protéine d'intérêt ne soit pas totalement décrochée de la colonne d'affinité, ce qui abaisserait le rendement de purification.

Les variations observées lors de la détermination des activités spécifiques peuvent aussi provenir de la méthode de dosage elle-même. En effet, au début de ce travail, l'évaluation de l'activité des enzymes se faisait uniquement par la mesure de l'activité d'oxydation du dihydrogène mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre avec le méthyl viologène comme partenaire d'oxydo-réduction artificiel.

D'autre part, les enzymes étudiées sont très actives et les échantillons doivent être grandement dilués (d'un facteur 1000 à 10000) pour être testés afin de se placer

dans la gamme de linéarité du dosage. Ceci entraîne donc également des variations dans la détermination des activités spécifiques.

Par ailleurs, la détermination de la concentration en protéine se fait par la méthode de Bradford en utilisant l'albumine comme standard. Cette technique n'est pas optimale et peut entraîner des variations. Cependant l'utilisation d'un coefficient d'absorption à 280 nm spécifique de l'hydrogénase CaHydA est difficile car le spectre d'absorption des enzymes purifiées est grandement dépendant de la présence des centres fer-soufre et de l'état oxydé ou réduit des échantillons [171].

De plus, la caractérisation complète des enzymes requiert plusieurs jours de travail et il est nécessaire de pouvoir conserver des enzymes actives durant cette période.

Le système de purification des enzymes utilisé au laboratoire est basé sur l'expression des enzymes chez *C. acetobutylicum*. Ceci entraîne inévitablement la présence de l'hydrogénase native dans l'extrait brut protéique.

De ce fait, des bilans de purification, permettant la détermination du rendement et du facteur de purification, basés sur les activités mesurées sur extrait brut et après purification, ne sont pas réalisables.

De plus, la présence de l'enzyme sauvage, même si elle ne se fixe pas sur la colonne, peut entraîner une formation de dihydrogène dans les conditions de purifications initiales.

3.2.4. Amélioration du système de production, extraction et purification

Pour obtenir des enzymes purifiées de meilleure qualité, une attention particulière a été portée aux conditions de culture en bioréacteur.

Outre les conditions d'anaérobiose et de reconstitution du milieu de culture qui doivent être convenablement réalisées, l'état des cellules amenant l'inoculation du bioréacteur doit être particulièrement considéré. En effet, les cellules doivent être en phase exponentielle de croissance (DO comprise entre 1 et 2) et il faut pouvoir inoculer le bioréacteur avec un volume de cellules suffisant pour pallier à une éventuelle latence dans la croissance dans le fermenteur.

La régulation du pH de la culture est aussi très importante, en effet il faut maintenir les conditions d'acidogénèse mais si la valeur de 6,5 est dépassée, une partie des

cellules peut être lysée ce qui entrainerait une grande latence dans la croissance. Par ailleurs, la qualité du gaz d'hydrogène (supérieur à 99.999 % de pureté) utilisé pour la collecte des cellules a été améliorée pour connaître et maîtriser le taux d'impureté.

Le protocole de lavage des cellules a également été modifié, le volume de tampon utilisé pour le lavage a été multiplié par deux et correspond désormais à la moitié du volume de cellules récoltées.

La réalisation des étapes de collecte des cellules, de récolte et de purification « en ligne » des enzymes a été abandonnée. Les cellules récoltées sont stockées sous flux de dihydrogène et conservées à -80°C.

Dans les étapes de purification, la concentration en dithionite de sodium dans les tampons a été réduite à 0,5 mM. De ce fait, la formation de gaz dans la colonne est grandement réduite et se limite à de très petites bulles (Figure 45.B), cependant des artefacts sont toujours observables sur les chromatogrammes. Par ailleurs, suite à cette diminution de la concentration en dithionite de sodium, les conditions réductrices des différents tampons de purification ont toutefois été contrôlées, sur un échantillon à l'aide d'un test de réduction du méthyl viologène entraînant l'apparition d'une coloration bleue caractéristique.

L'étape de lavage de la colonne se fait désormais systématiquement avec plus de 45 mL de tampon et l'élution se fait avec une concentration en desthiobiotine égale à 7,5 mM. Ceci permet à la fois l'élimination des protéines non spécifiques et la récupération de l'ensemble de la protéine d'intérêt. Des échantillons de protéines purifiés sans protéines contaminantes ou dégradées sont alors obtenus en routine (Figure 45.A)

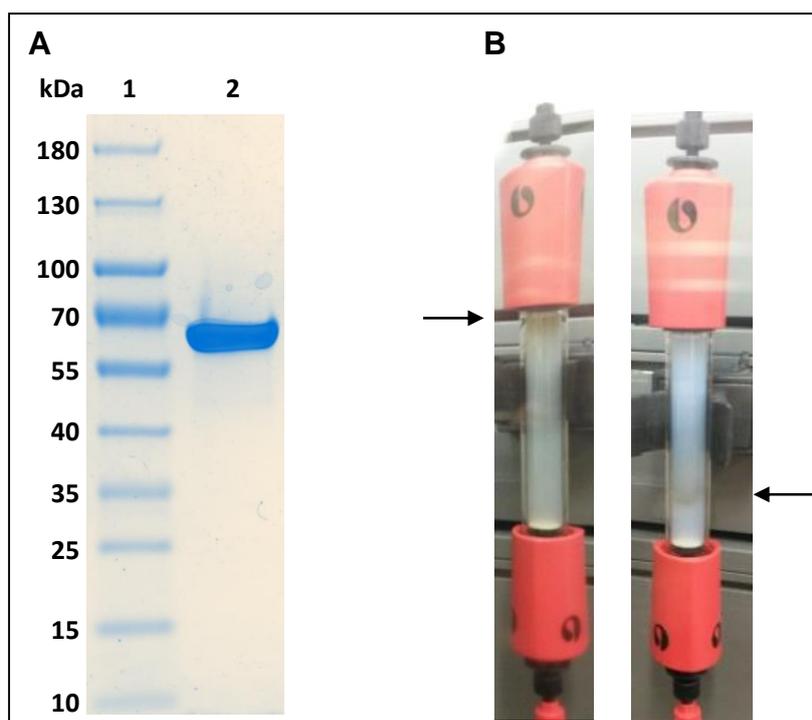


Figure 45: Résultats des purifications après modification du protocole. A : Une forte quantité d'enzyme est observée sur SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée). B : La protéine, de couleur dorée à brune, peut être suivie visuellement lors de la purification, soit en haut de la colonne lors du dépôt soit pendant l'élution.

Après la purification, le dithiothréitol (DTT) n'est plus ajouté aux fractions d'élutions, ces dernières sont désormais conservées à 4°C dans le réfrigérateur présent dans l'enceinte anaérobie suite au remplacement de la phase gazeuse des fioles par du dihydrogène dont la qualité est maîtrisée. De la même façon, la qualité du gaz d'hydrogène (supérieur à 99.999 % de pureté) utilisé pour les tests d'activité a été améliorée.

D'autre part, un système neuf de détermination de l'activité de production d'hydrogène, par chromatographie en phase gazeuse a été mis en place, et les activités obtenues avec l'enzyme CaHydA purifiées au laboratoire sont tout à fait comparables à celle rapportées dans la littérature, confirmant que la qualité des expérimentations réalisées [181].

Les différentes purifications réalisées permettent de déterminer des activités spécifiques de l'hydrogénase CaHydA sauvage moyenne d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons égales à 5945 ± 2104 U/mg et 2266 ± 816 U/mg, respectivement (Figure 46).

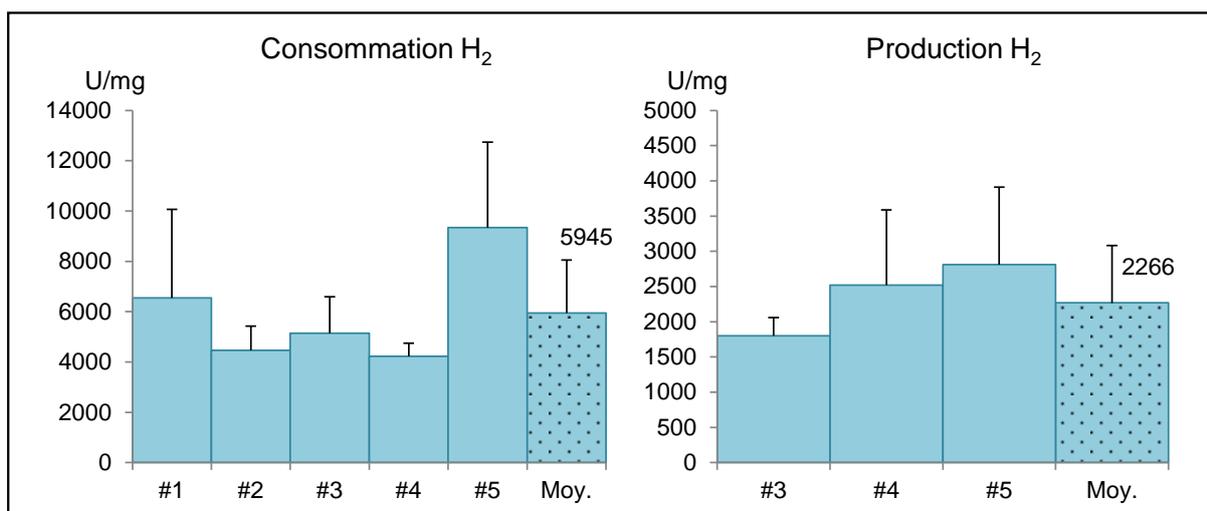


Figure 46: Activités spécifiques de l'enzyme CaHydA. Les activités spécifiques moyennes (motif à pois) représentent les activités de consommation et de production de dihydrogène mesurées pour chacune des différentes purifications

3.2.5. Conclusion

Outre l'expérience technique acquise au cours de ce travail de thèse, les modifications des protocoles d'expression, de production, d'extraction et de purification de l'hydrogénase à fer CaHydA de *C. acetobutylicum* ont conduit à purifier routinièrement des enzymes actives de grande pureté.

L'ensemble de ces travaux a été valorisé par plusieurs publications scientifiques avec nos partenaires.

En collaboration avec le Laboratoire de génie Chimique, eu sein de l'équipe « Bioprocédés et Systèmes microbiens », l'étude *in vitro* de la corrosion de l'acier doux par l'enzyme CaHydA purifiée a été étudiée [189,190]. Premièrement, l'effet des différents composés présents avec l'hydrogénase purifiée sur la corrosion de l'acier doux a été contrôlé. Deuxièmement, l'impact de l'hydrogénase purifiée sur la corrosion de l'acier doux a été démontré.

En collaboration avec l'équipe « Dynamique réactionnelle des enzymes rédox multacentres, cinétique électrochimique » au Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, l'enzyme CaHydA purifiée a été utilisée dans des études sur la sensibilité à l'oxygène des [FeFe] hydrogénases [5,130] et sur la photosensibilité du site catalytique de l'enzyme [128]. Ces études ont permis d'une part de proposer que la réversibilité de la sensibilité à l'oxygène des [FeFe] hydrogénases pouvait résulter de la réduction de l'oxygène en eau ; et d'autre part,

d'approfondir la compréhension des mécanismes d'inhibition de ces enzymes par le CO.

Résultats

**Production et purification de la
ferrédoxine de *C. acetobutylicum***

3.3. Production et purification de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*

3.3.1. Introduction

Le partenaire physiologique privilégié de l'hydrogénase CaHydA est la ferrédoxine 2[4Fe-4S]. L'étude *in vitro* de l'interaction permettant le transfert d'électrons entre ces deux protéines nécessite de disposer des deux partenaires sous forme purifiée.

A l'heure actuelle, la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum*, n'est plus commercialisée. De nombreux protocoles permettant conduisant à la purification de la ferrédoxine bactérienne ont été décrits mais ceux-ci présentent deux inconvénients majeurs qui sont le faible rendement de purification et la nécessité de passer par plusieurs étapes et de purifications et / ou une étape de reconstitution *in vitro* des centres fer-soufre des protéines [66,74,108].

Au cours de ce travail de thèse, une nouvelle méthode de production et de purification de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] a été mise au point dans le but d'obtenir, en routine, des protéines pures en quantités compatibles avec la caractérisation biochimique des variants des hydrogénases.

3.3.2. Construction d'une souche *E. coli* pour la production de ferrédoxine en anaérobiose stricte

3.3.2.1. Souche *E. coli* BL21 DE3 Δ iscR::*Kana Codon+* + pET21c_CAC0303_ST

La souche *E. coli* BL21 DE3 Δ iscR::*Kana Codon+* + pET21c_CAC0303_ST, disponible au laboratoire est issue d'une souche *E. coli* BL21 DE3 *Codon+* chez laquelle le gène *iscR* a été délété et remplacé par un marqueur de résistance à la kanamycine [47].

Cette souche porte le plasmide pET21c_CAC0303_ST qui porte le gène CA_C0303 natif (Figure 47) et permet l'expression de la ferrédoxine en fusion avec une étiquette StrepTag située en partie C-terminale (Figure 48).

L'utilisation de cette souche est validée par deux réactions de PCR qui permettent de valider le génotype Δ iscR et la présence du plasmide pET21c_CAC0303_ST ; ce plasmide ne peut pas être extrait seul de la souche pour être validé car cette souche contient également le plasmide *Codon+* permettant une expression optimisée des protéines hétérologues.

3.3.2.2. Souche *E. coli* MG1655 Δ iscR::*Kana pthI_Fd-LL-C-Tag*

La souche *E. coli* MG1655 Δ iscR::*Kana* est disponible au laboratoire et possède également la délétion du gène *iscR*, remplacé par un marqueur de résistance à la kanamycine.

Cette souche est transformée par le plasmide *pthI_Fd-LL-C-Tag* qui permet l'expression, sous la dépendance du promoteur constitutif *pthI* du gène *CA_C0303* de la ferrédoxine de *C. acetobutylicum* dont la séquence a été optimisée pour l'expression chez *E.coli*, en fusion avec une séquence « linker » et une étiquette StrepTag situé en partie C-terminale (Figure 48).

La modification de la séquence codant la ferrédoxine de *C. acetobutylicum* pour l'expression chez *E. coli* a permis une harmonisation qui se traduit, entre autres, par une augmentation du pourcentage en bases GC, qui est augmenté de 41% à 58% (Figure 47).

La souche finale *E. coli* MG1655 Δ iscR::*Kana + pthI_Fd-LL-C-Tag* a été obtenue et le génotype Δ iscR est validé par PCR. Le plasmide, extrait de cette dernière souche est validé par des réactions de digestions enzymatiques et par séquençage.

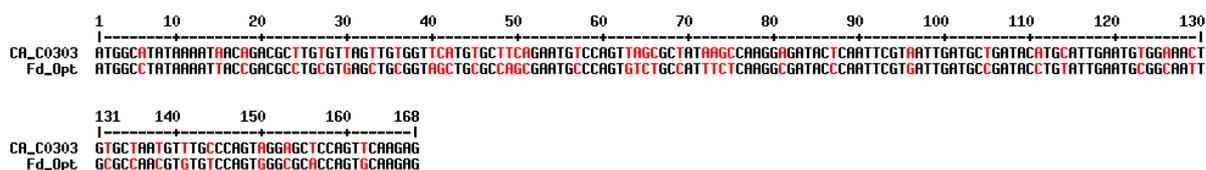


Figure 47: Alignement des séquences des gènes de la ferrédoxine sauvage (*CA_C0303*) et harmonisé (*Fd_Opt*).



Figure 48: Alignement des séquences protéiques des différentes ferrédoxines.

Deux souches sont alors disponibles pour la purification sur colonne d'affinité de la ferrédoxine, toutes deux possédant le génotype Δ iscR, permettant une incorporation optimisée des centres fer-soufre. Toutefois, la souche *E. coli* BL21 DE3 Δ iscR::*Kana Codon+ + pET21c_CAC0303_ST* permet l'expression inductible de la ferrédoxine codée par le gène sauvage de *C. acetobutylicum* alors que la souche *E. coli* MG1655

ΔiscR::Kana + pthI_Fd-LL-C-Tag permet l'expression constitutive de la ferrédoxine codée par un gène dont la séquence a été optimisée.

3.3.3. Résultats

3.3.3.1. Purification de la ferrédoxine Fd-LL-C-Tag

Après des premiers essais de purification avec les deux systèmes d'expression, il a été montré que la souche permettant l'expression constitutive permettait des manipulations plus aisées, ne nécessitant pas d'induction de l'expression protéique, le maintien d'un seul plasmide dans la souche bactérienne, et un rendement de purification augmenté par rapport au premier système.

L'expression et la purification de la ferrédoxine a été réalisée en routine à partir de la souche *E. coli* MG1655 *ΔiscR::Kana + pthI_Fd-LL-C-Tag*.

Au cours de la purification, grâce à sa couleur brune caractéristique, il est possible de « suivre » la fixation de la protéine au niveau de la colonne et sa présence dans les fractions d'élution (Figure 49).

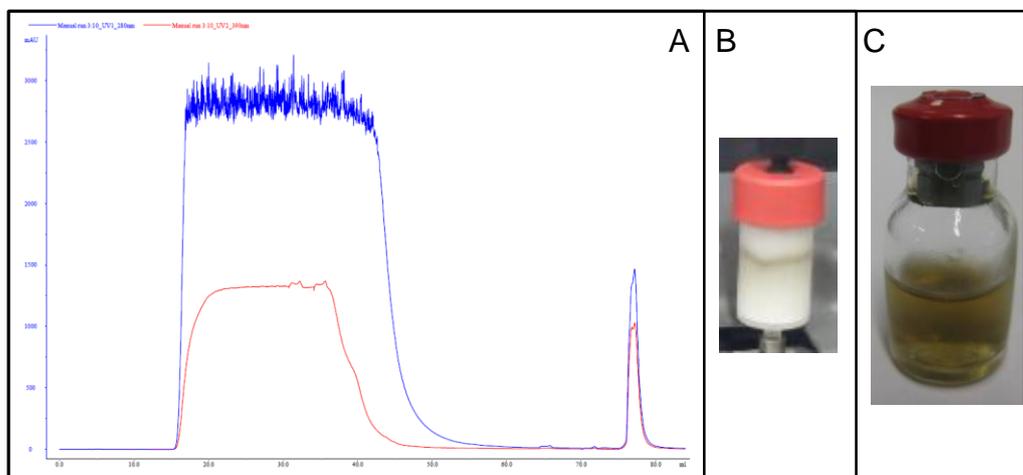


Figure 49: Chromatographie d'affinité de la ferrédoxine Fd-LL-C-Tag, visualisation de la protéine sur la colonne et dans les fractions d'élution. A : chromatogramme de purification de la ferrédoxine montrant les étapes de chargement, de lavage et d'élution. B : Visualisation de ferrédoxine lors de la phase d'élution ; C : ferrédoxine recombinante purifiée de couleur brune.

L'analyse de la protéine purifiée est réalisée par gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE soit suivi d'une coloration au nitrate d'argent soit après transfert sur membrane pour une détection spécifique avec de la Streptavidine marquée (Western-blot) (Figure 50).

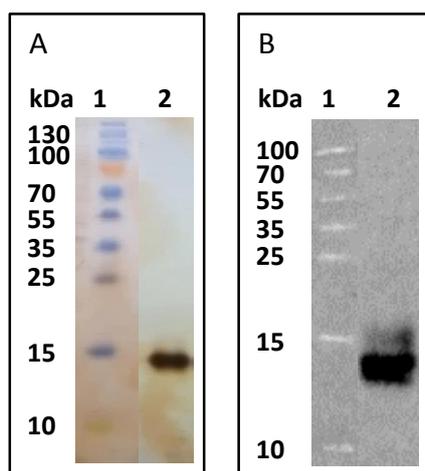


Figure 50: Purification de la ferrédoxine recombinante. Gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Nitrate d'argent (A) et Western Blot anti-StrepTag (B) des fractions d'élutions de la ferrédoxine purifiée (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée).

La protéine est retrouvée dans les fractions d'élution totalement pure, la présence de protéines contaminantes ou de forme de dégradation n'est pas observée. Cependant, en conditions dénaturantes, la ferrédoxine migre sur gel à une taille apparente (environ 14 kDa) différente de celle attendue (7.5 kDa). Ce phénomène, observée pour la ferrédoxine native de *C. acetobutylicum* [108] et pour d'autres protéines chargées négativement [67], pourrait être expliqué par une interaction inefficace entre la ferrédoxine et le SDS [191].

3.3.3.2. Validation de la fonctionnalité de la ferrédoxine Fd-LL-C-Tag

Afin de valider la fonctionnalité et la structure de la ferrédoxine recombinante, différents tests ont été mis en œuvre. Il est possible de mesurer les spectres d'absorption des préparations de ferrédoxine recombinante purifiée et d'établir un ratio entre les valeurs obtenues à 280 nm et 390 nm, représentant respectivement l'absorbance de la partie protéique et celle des centres fer-soufre. La figure 51 présente le spectre enregistré avec la ferrédoxine recombinante et le spectre de référence de la littérature. Le ratio d'absorbance A_{390}/A_{280} mesuré pour la ferrédoxine recombinante est de 0,70, ce qui est très proche de la valeur rapportée pour la ferrédoxine de *C. pasteurianum* [66]. De ce fait, la couleur de la protéine purifiée, son spectre d'absorption ainsi que la valeur du ratio A_{390}/A_{280} constituent des bons éléments en faveur d'une correcte incorporation des centres fer-soufre dans la protéine.

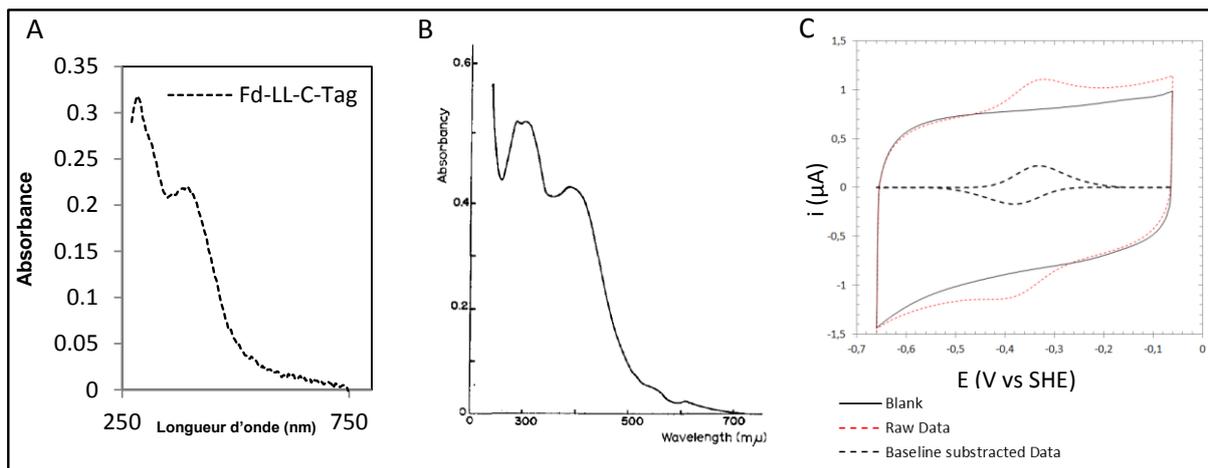


Figure 51: Spectres UV-Vis et voltammogrammes de la ferrédoxine. Spectres UV-Vis de la ferrédoxine recombinante (A) et de la ferrédoxine native (B, d'après Mortenson [66]), et mesure du potentiel d'oxydo-réduction de la ferrédoxine recombinante par électrochimie directe (C).

Par ailleurs, il est possible de mesurer à la fois le contenu en atome de fer et la concentration en acides aminés de la même préparation de ferrédoxine recombinante. Ces mesures ont permis de déterminer un contenu en atome de fer de 81,6 %, proche du contenu théorique, et également le coefficient d'extinction molaire, mesuré à 390 nm, de la ferrédoxine recombinante égal à $32639 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Ce dernier est très proche de celui de la ferrédoxine native de *C. acidi-urici* ($30600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) déterminé à la même longueur d'onde. A partir du ratio A_{390}/A_{280} et du coefficient d'extinction molaire déterminé, il est possible d'extrapoler un coefficient d'extinction molaire à 280 nm égal à environ $42000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; il est à noter que ce coefficient est très éloigné de celui qui peut être calculé uniquement sur la base de la séquence en acides aminés de la protéine ($7450 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

D'autre part, des expériences d'électrochimie directe ont permis d'étudier la ferrédoxine recombinante. La forme du voltammogramme n'est pas différente de celle obtenue avec la ferrédoxine reconstituée décrite par Guerrini *et al.* [74]. Le potentiel d'oxydoréduction est mesuré à $-350 \text{ mV}/\text{SHE}$ et la présence de centres $[3\text{Fe-4S}]$ n'est pas observée.

Enfin, il est nécessaire de valider la ferrédoxine recombinante d'un point de vue fonctionnel. Des tests d'activité d'oxydation du dihydrogène ont été réalisés avec l'hydrogénase sauvage CaHydA pour comparer la ferrédoxine recombinante à la

ferrédoxine native purifiée à partir de *C. acetobutylicum* [108]. Les activités d'oxydation du dihydrogène obtenues avec la ferrédoxine recombinante et la ferrédoxine native sont très proches (44 ± 6 U/g et 48 ± 7 U/mg, respectivement), dans une gamme où la concentration en substrat n'est pas saturante. De plus, les paramètres cinétiques pour la ferrédoxine recombinante ont été déterminés avec l'hydrogénase CaHydA dans les sens catalytiques de réduction des protons et d'oxydation de l'hydrogène (Figure 52).

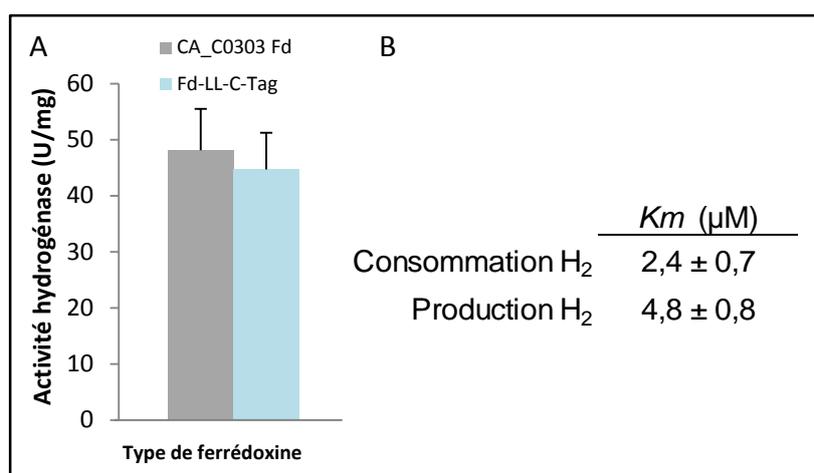


Figure 52: Validation fonctionnelle de la ferrédoxine recombinante. A : détermination des activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène de l'hydrogénase CaHydA avec la ferrédoxine native et recombinante. B : paramètres cinétiques de l'hydrogénase sauvage avec la ferrédoxine recombinante.

Les constantes de Michaëlis, déterminées avec la ferrédoxine recombinante et l'hydrogénase sauvage, dans les directions de réduction des protons et d'oxydation du dihydrogène sont de l'ordre du micromolaire. Les deux valeurs sont en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature [107,108] et permettent de valider la fonctionnalité de la ferrédoxine recombinante.

3.3.4. Conclusion

Durant ce travail de mise au point d'un système permettant la purification en grande quantité et grande pureté de ferrédoxine bactérienne fonctionnelle, des travaux basés sur une approche similaire ont été publiés par Huang *et al.* [49].

Les résultats publiés présentent un système d'expression hétérologue de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] de *C. pasteurianum*, dans une souche d'*E. coli* où l'opéron *isc* est surexprimé à partir d'un plasmide [76]. La ferrédoxine est exprimée,

grâce à un système inductible, sous forme de protéine de fusion avec une étiquette Strep-Tag en position N-terminale. La ferrédoxine purifiée présente un spectre d'absorption et un ratio de valeurs d'absorbance A_{390}/A_{280} , égal à 0,72, caractéristiques de la ferrédoxine contenant bien deux centres [4Fe-4S]. La fonctionnalité de la ferrédoxine est validée par des tests enzymatiques, comparant ferrédoxine recombinante et sauvage, pour lesquels les concentrations en substrat ne sont pas indiquées.

Cependant, il est à noter que la concentration des ferrédoxines est évaluée par la méthode de Bradford (avec l'albumine de sérum bovin comme standard) et que la coloration des gels d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE se fait avec le bleu de Coomassie, alors que la ferrédoxine recombinante ne contient aucun acide aminé permettant une interaction avec ces réactifs, si ce n'est le tryptophane présent dans l'étiquette Strep-Tag. Enfin, la détermination de la concentration des atomes de fer n'est pas réalisée.

Un système d'expression, de production et de purification de la ferrédoxine bactérienne $2[4\text{Fe-4S}]$ a été donc développé avec succès. La présence de deux centres [4fe-4S] au sein de la protéine purifiée a été validée. L'obtention en quantité importante de ferrédoxine fonctionnelle est une nouvelle étape atteinte pour réaliser la caractérisation biochimique de toutes les hydrogénases variantes que l'on souhaite étudier.

Résultats

Caractérisation des variants de l'enzyme

3.4. Caractérisation des variants de l'enzyme

3.4.1. Introduction

La caractérisation biochimique des différents variants de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* a été réalisée dans le but d'étudier d'une part l'implication des centres fer-soufre du Domaine F dans l'activité catalytique de l'enzyme et d'autre part de déterminer quel centre fer-soufre situé à la surface de l'enzyme est impliqué dans l'interaction avec la ferrédoxine.

La première approche réalisée consiste en la purification des enzymes suivie de l'évaluation de leurs activités catalytiques de consommation et de production de dihydrogène avec uniquement le méthyl viologène comme partenaire d'oxydoréduction artificiel.

Suite à différentes expérimentations complémentaires, pour certaines des hydrogénases étudiées, la caractérisation biochimique et électrochimique complète des enzymes a été réalisée. Les paramètres cinétiques ont été déterminés, dans les deux sens catalytiques, avec le méthyl viologène et la ferrédoxine comme partenaires d'oxydoréduction artificiels et physiologiques. Des études de modélisation moléculaire ont également été mise en place pour compléter et conforter les résultats expérimentaux obtenus.

3.4.2. Purifications et tests d'activité

3.4.2.1. L'hydrogénase HydA_ΔDA

Parmi les différentes enzymes variantes de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum*, le première enzyme dont l'activité est évaluée est le mutant HydA_ΔDA.

Plusieurs purifications de cette enzyme sont réalisées. Malgré certaines variations dans la quantité de protéines obtenues, après analyse par gels d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE (Figure 53), l'enzyme est retrouvée pure, à la taille attendue de 44,5 kDa.

Les activités spécifiques moyenne d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons ont été mesurées égales à 366 ± 132 U/mg et 272 ± 23 U/mg, respectivement. Cette enzyme variante présente donc une activité faible et très

éloignée de celle de l'enzyme CaHydA, ce qui suggère une grande influence des centres fer-soufre accessoires du Domaine F sur les activités catalytiques de l'enzyme.

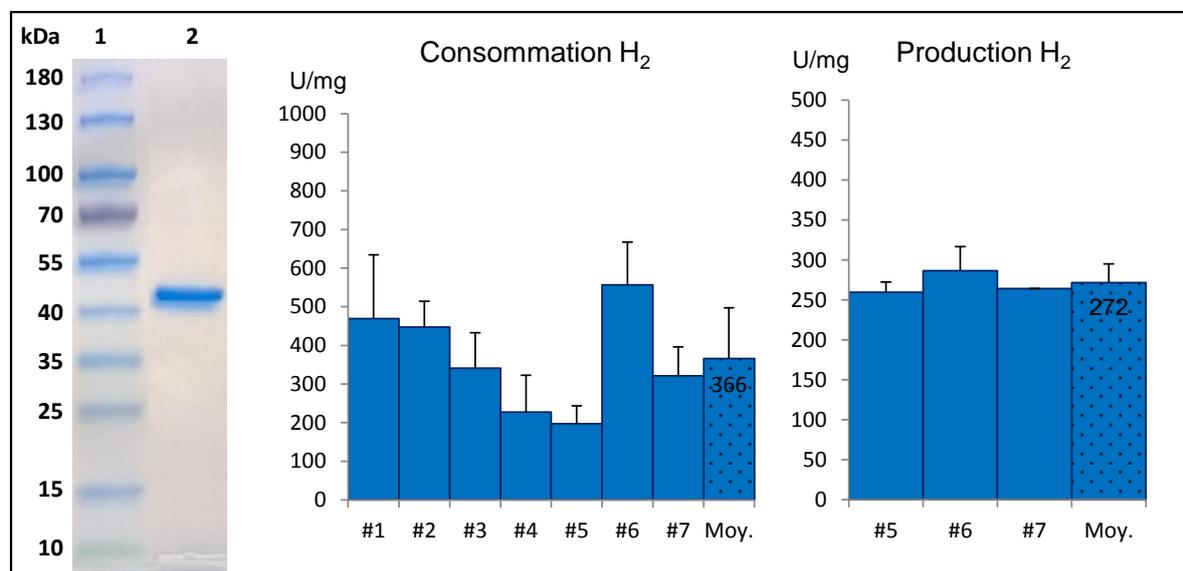


Figure 53: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA Δ DA. La pureté de la protéine purifiée est vérifiée sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée) où une bande unique à la taille attendue est révélée. Les activités spécifiques moyennes (motif à pois) représentent les activités de consommation et de production de dihydrogène mesurées pour chacun des différents lots d'enzymes purifiées.

3.4.2.2. L'hydrogénase HydA_C100A

L'enzyme variante HydA_C100A a également été purifiée plusieurs fois. Après chaque purification, la pureté de la fraction purifiée est vérifiée sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE, une bande unique à la taille attendue de 66 kDa est révélée (Figure 54). Les activités spécifiques moyennes mesurées sont égales à 2941 ± 633 U/mg et 1530 ± 570 U/mg, dans les directions d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons, respectivement. Ces activités enzymatiques correspondent à environ 50 % de celles mesurées avec l'enzyme sauvage CaHydA.

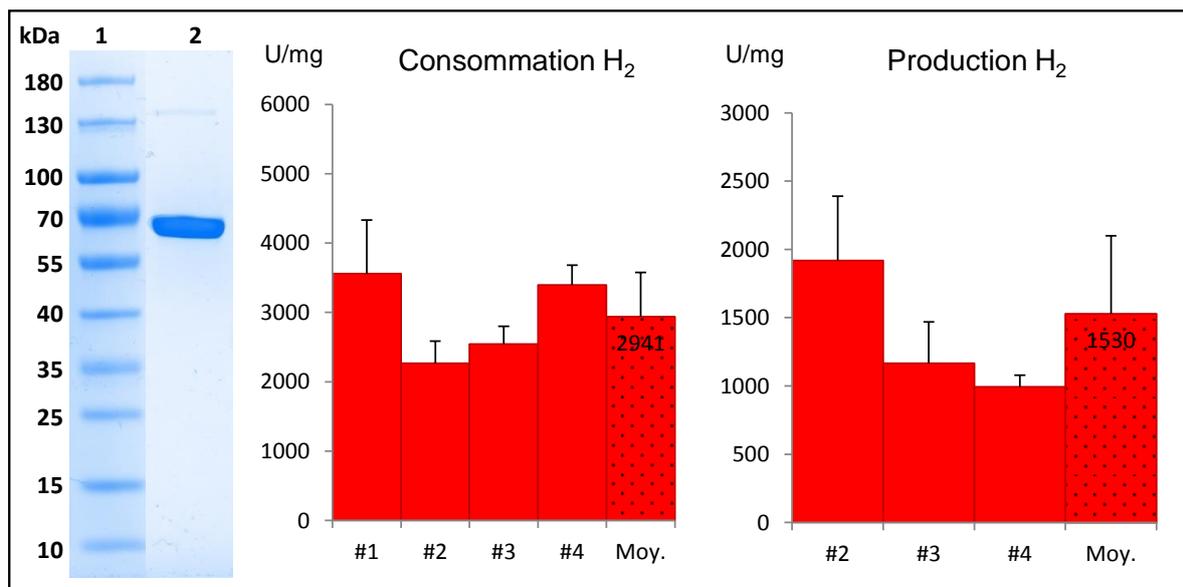


Figure 54: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_C100A. La pureté de la protéine purifiée est vérifiée sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée) où une bande unique à la taille attendue est révélée. Les activités spécifiques moyennes (motif à pois) représentent les activités de consommation et de production de dihydrogène mesurées pour chacun des différents lots d'enzymes purifiées.

3.4.2.3. L'hydrogénase HydA_C48A

Plusieurs purifications de l'enzyme HydA_C48A ont été réalisées. Après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE, la protéine apparaît pure et migre à la taille attendue de 66 kDa (Figure 55). Les activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons ont été mesurées. Il est à noter une variation dans la mesure des activités d'oxydation du dihydrogène entre les différents lots, toutefois, les activités spécifiques moyennes de cette enzyme ont été mesurées égales à 1861 ± 1200 U/mg et 544 ± 77 U/mg, pour la consommation et la production d'hydrogène respectivement.

Ces activités enzymatiques correspondent à environ 25 % de celles qui sont obtenues avec l'enzyme sauvage CaHydA.

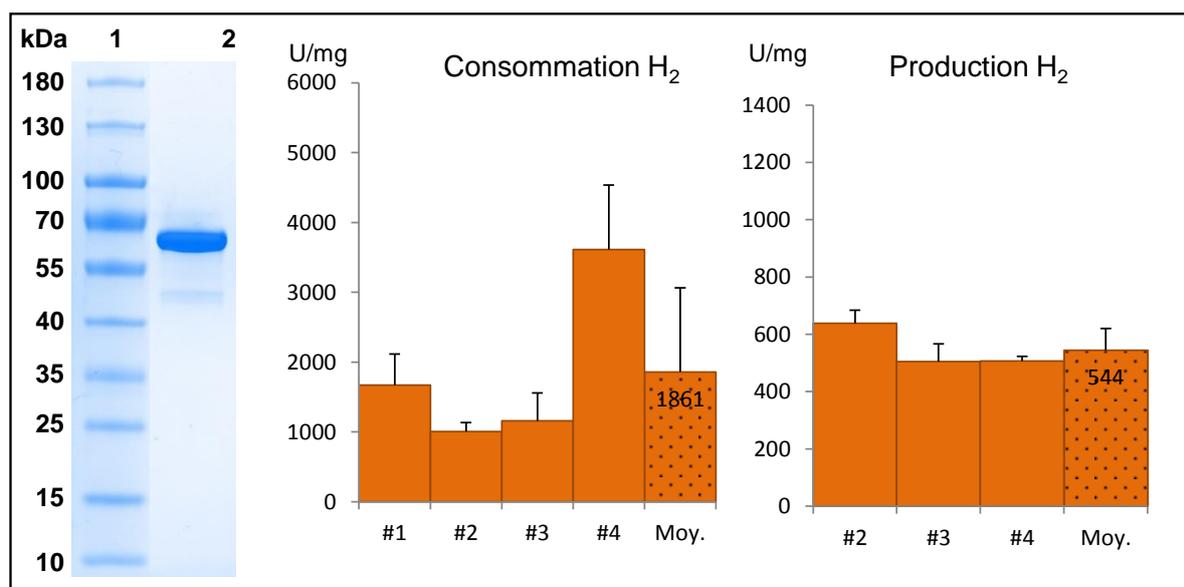


Figure 55: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_C48A. La pureté de la protéine purifiée est vérifiée sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée) où une bande unique à la taille attendue est révélée. Les activités spécifiques moyennes (motif à pois) représentent les activités de consommation et de production de dihydrogène mesurées pour chacun des différents lots d'enzymes purifiées.

3.4.2.4. L'hydrogénase HydA_H93C

L'enzyme HydA_H93C a été purifiée trois fois. Cependant, après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE de la fraction purifiée, la protéine migre à la taille attendue mais des protéines indésirables apparaissent également. Une protéine de grande taille est retrouvée, de même que des formes de dégradation de l'enzyme de taille inférieure à 66 kDa (Figure 56). Suite à la modification du protocole de purification, les formes de dégradation sont éliminées mais la protéine de grande taille est toujours retrouvée.

Par ailleurs, selon les différents lots, les quantités de protéine purifiée sont variables, en effet, les concentrations varient de plus de 650 µg/mL à environ 25 µg/mL. Ainsi les mesures d'activités spécifiques ont été rendues difficiles. Les moyennes des activités spécifiques de consommation et de production d'hydrogène, égales à 543 ± 250 U/mg et 380 ± 59 U/mg, respectivement, suggérant que l'activité catalytique de ce variant de l'hydrogénase est très affectée par rapport à l'enzyme sauvage et par rapport au variant de l'enzyme HydA_C100A pour lequel le même centre fer-soufre FS4C est atteint. Cependant, ces résultats sont inattendus au regard de la mutation introduite dont l'objectif était de reformer un centre [4Fe-4S] typique et doivent être

analysées avec prudence en raison du manque de pureté des fractions purifiées malgré plusieurs tests et des tentatives d'amélioration du protocole.

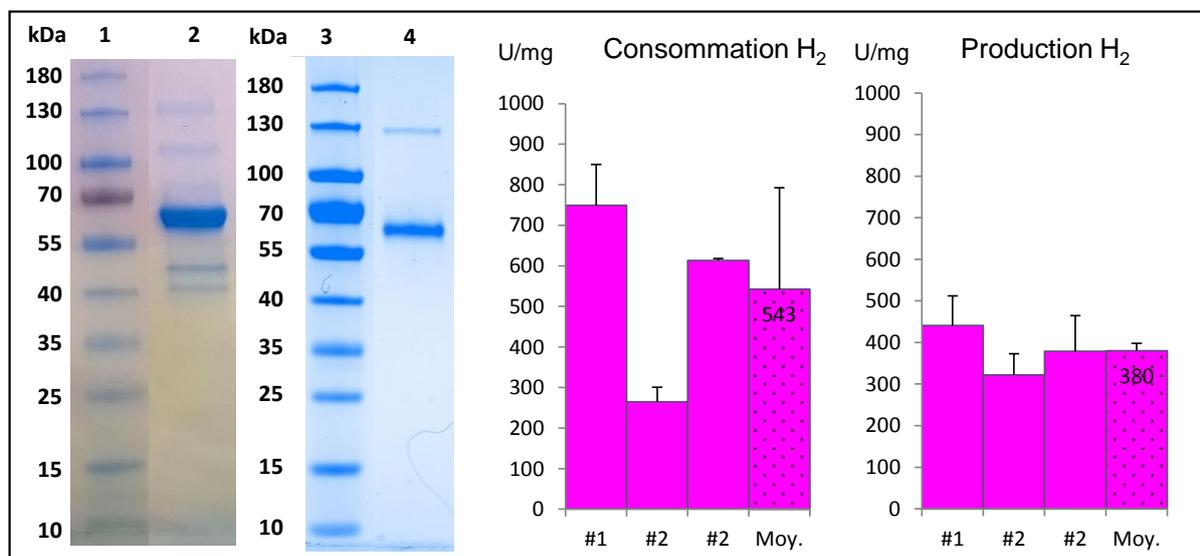


Figure 56: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_H93C. Suite à la première purification, la protéine purifiée est retrouvée à la taille attendue après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée), cependant, d'autres protéines sont également retrouvées. Après la deuxième purification, la protéine de grande taille est toujours retrouvée sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (3 : marqueur de taille, 4 : protéine purifiée). Les activités spécifiques moyennes (motif à pois) représentent les activités de consommation et de production de dihydrogène mesurées pour chacun des différents lots d'enzymes purifiées.

3.4.2.5. L'hydrogénase HydA_ΔFS2

Deux lots indépendants du variant de l'enzyme HydA_ΔFS2 purifié ont été réalisés. Après analyse par électrophorèse en conditions SDS-PAGE de la fraction purifiée, différentes formes de dégradation de la protéine d'intérêt sont observées (Figure 57). Cette impureté de la fraction purifiée entraîne des incertitudes dans la détermination des activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_ΔFS2. Les activités de consommation du dihydrogène mesurées varient grandement entre les deux purifications et s'avèrent de manière surprenante très élevées, en comparaison de celles de l'enzyme sauvage CaHydA et de l'enzyme HydA_C48A pour laquelle le même centre fer-soufre de surface FS2 est modifié.

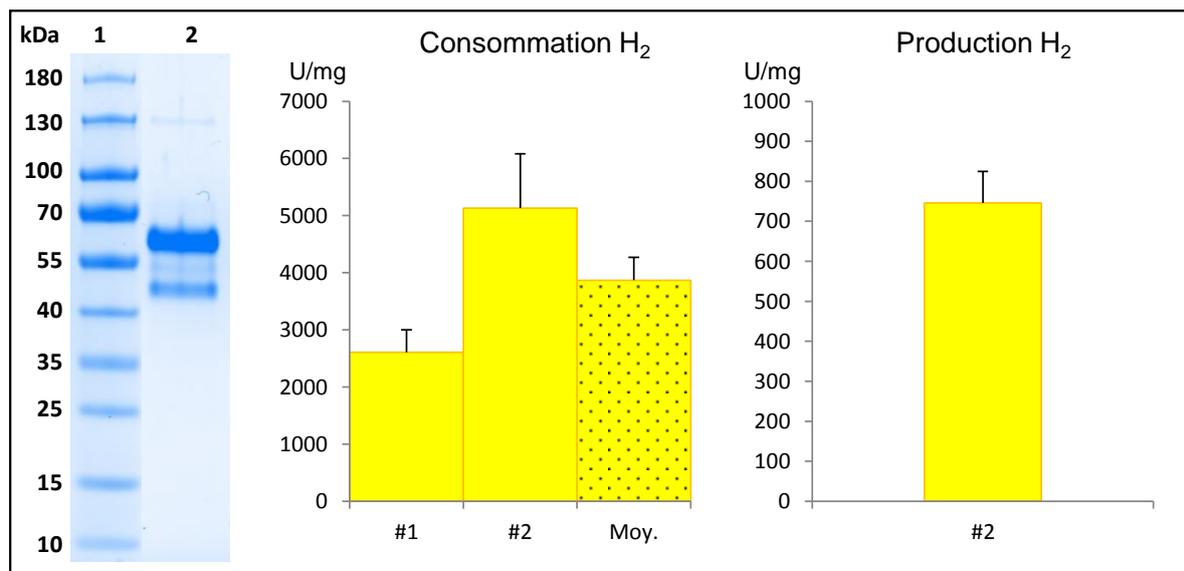


Figure 57: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_ΔFS2. La protéine purifiée est retrouvée à la taille attendue après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée), cependant, d'autres protéines sont également retrouvées. Les activités spécifiques moyennes (motif à pois) représentent les activités de consommation et de production de dihydrogène mesurées pour chacun des différents lots d'enzymes purifiées.

Toutefois, dans le but de séparer la protéine d'intérêt de ses formes de dégradation, des essais de chromatographie par perméation de gel sont réalisés (Figure 58). Deux problèmes majeurs sont rencontrés après ces tentatives. Premièrement, bien que la protéine soit concentrée avant d'être déposée sur la résine, seules de très faibles quantités d'enzymes sont récupérées après purification ; de plus, la protéine d'intérêt correctement isolée de la forme de dégradation n'apparaît que dans une seule fraction d'élution. Deuxièmement, les activités spécifiques de consommation du dihydrogène mesurées dans les fractions obtenues après perméation de gel sont au moins dix fois plus faibles (environ 300 U/mg) que celles mesurées avant chargement sur la colonne, alors même qu'elles devraient être augmentées si les formes de dégradation, *a priori* inactives, sont éliminées.

La perméation de gel appliquée aux hydrogénases purifiées n'a jamais été utilisée au laboratoire, où la purification des enzymes se fait en une seule étape de purification d'affinité. Cette technique est pourtant appliquée à certaines hydrogénases à fer [48] et dans le cas de l'hydrogénase de *C. acetobutylicum*, une perte d'activité inexplicable pourrait intervenir.

Ces essais n'ont pas permis d'obtenir de l'hydrogénase variante HydA_ΔFS2 protéines de qualité en quantité suffisante pour permettre la détermination des

paramètres cinétiques avec les partenaires d'oxydoréduction artificiels et physiologiques.

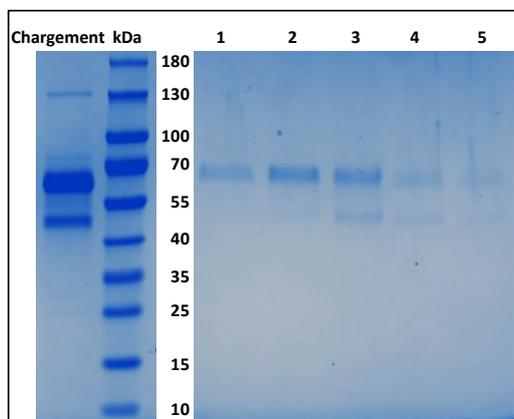


Figure 58: Essais de chromatographie de perméation de gel de l'hydrogénase variante HydA_ΔFS2. Analyse des fractions purifiées sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie présentant la protéine chargée sur la colonne (Chargement) et les différentes fractions d'éluion (1 – 5), (kDa : marqueur de taille).

3.4.2.6. L'hydrogénase HydX_1

L'hydrogénase chimérique HydX_1, formée à partir de domaines protéiques provenant des hydrogénases CaHydA de *C. acetobutylicum* et CrHydA1 de *C. reinhardtii*, a également été purifiée. Comme pour l'enzyme HydA_H93C, la protéine est purifiée en faibles quantités. Après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE (Figure 59), la protéine est révélée à la taille attendue de 72 kDa, sans forme de dégradation mais avec une protéine de grande taille identifiée comme étant la pyruvate carboxylase [109]. Des tests d'activité enzymatique avec le méthyl viologène ont été réalisés. Les activités de consommation et de production d'hydrogène mesurées sont égales à 71 ± 22 U/mg et 33 U/mg, respectivement (Figure 56), ce qui correspond aux activités enzymatiques les plus faibles jamais mesurées pour une enzyme variante de CaHydA. Toutefois, la caractérisation de l'enzyme HydX_1 n'a pu être réalisée qu'une seule fois dans le temps imparti, et la faible quantité purifiée n'a pas permis de réaliser des tests complémentaires de détermination des paramètres cinétiques. Ce résultat reste inattendu et aurait besoin d'être confirmé avant de pouvoir conclure sur l'approche de création d'une hydrogénase fonctionnelle, basée sur la construction rationnelle de l'enzyme. Si ces résultats sont confirmés, l'importance du Domaine F et des interactions entre le

Domaine F et le Domaine H dans le maintien de l'activité catalytique pourraient être mise en évidence.

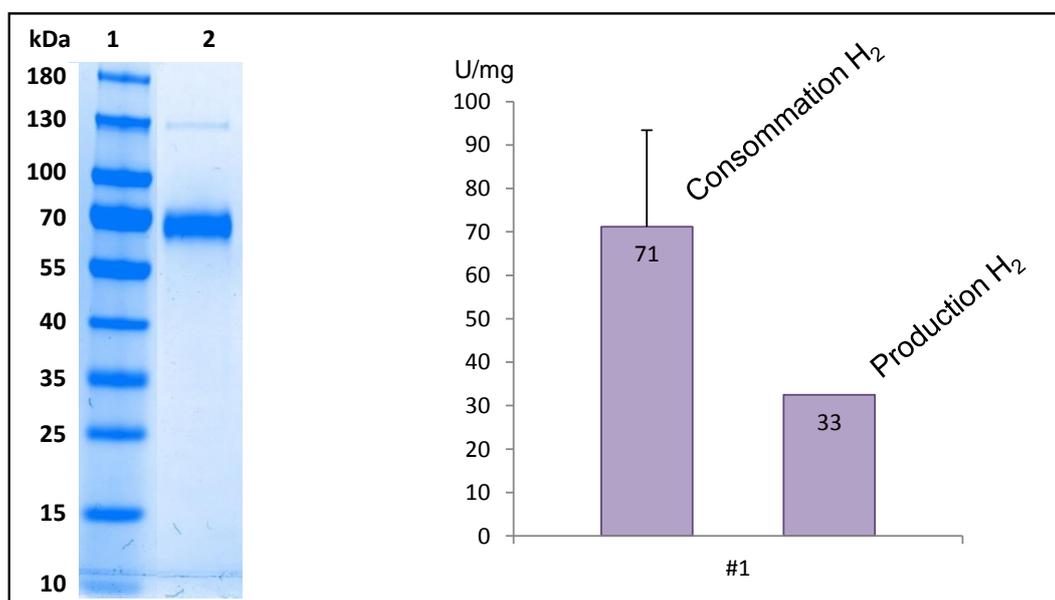


Figure 59: Purification et activités spécifiques de l'enzyme HydX_1. La protéine purifiée est retrouvée pure à la taille attendue après analyse sur gel d'électrophorèse en conditions SDS-PAGE coloré au Bleu de Coomassie (1 : marqueur de taille, 2 : protéine purifiée).

Compte tenu des difficultés rencontrées lors de la purification des enzymes HydA_H93C et HydA_ΔFS2 ainsi qu'avec l'enzyme chimérique HydX_1, des faibles quantités purifiées et du manque de pureté des lots, les paramètres cinétiques de caractérisation de ces enzymes n'ont pas été déterminés.

Toutefois, les résultats obtenus avec les trois enzymes HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA permettent de mettre en lumière un impact des centres fer-soufre du Domaine F sur l'activité catalytique de l'enzyme. Les manipulations additionnelles réalisées ainsi que les résultats obtenus avec l'enzyme sauvage et les trois enzymes modifiés font l'objet du paragraphe suivant.

3.4.3. Rôle du Domaine F chez les hydrogénases à fer

L'enzyme sauvage CaHydA ainsi que les enzymes HydA_C48A, HydA_C100A et HydA_ΔDA ont premièrement été caractérisées d'un point de vue biophysique.

3.4.3.1. Repliement des protéines et dosage du fer

La correcte conformation des enzymes a été étudiée à travers la présence des hélices α et des feuillets β dans chaque protéine par dichroïsme circulaire après dialyse des échantillons (Figure 60).

Bien qu'ils ne soient pas parfaitement superposés, du fait de différences de concentration des échantillons, les spectres obtenus pour chacun des variants de l'enzyme ne montrent pas de différences significatives avec ceux obtenus avec l'enzyme sauvage. Ces spectres correspondent à ceux de protéines correctement repliées et ressemblent à ceux des hydrogénases à fer de type M3 décrits dans la littérature [132,171]. Le spectre obtenu pour l'enzyme HydA_ΔDA est légèrement différent de celui de l'enzyme sauvage CaHydA, mais cela était attendu, du fait de la grande différence de ces deux protéines, liée à l'absence du Domaine F chez l'enzyme HydA_ΔDA.

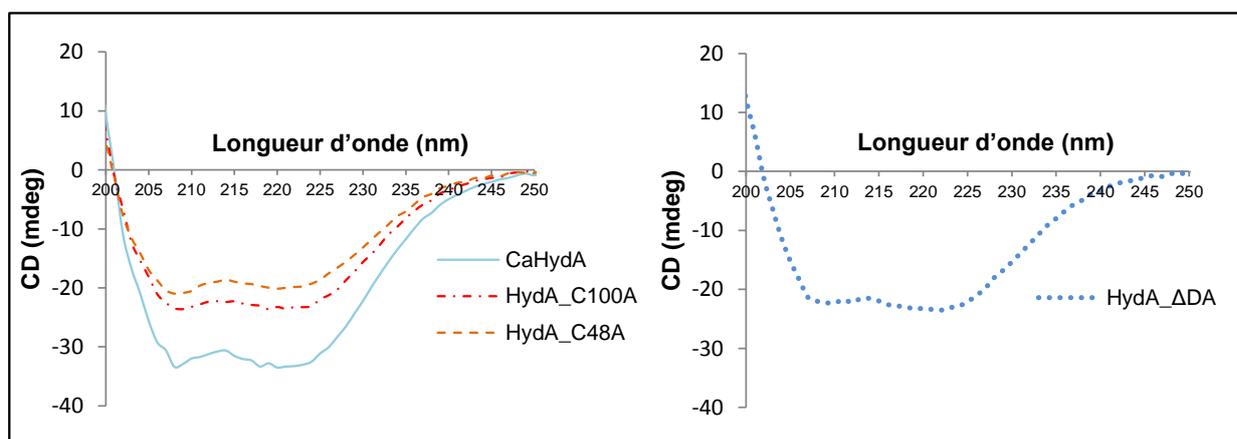


Figure 60: Spectres en dichroïsme circulaire des enzymes sauvages et variantes. Le spectre obtenu pour l'enzyme HydA_ΔDA est présenté séparément de ceux obtenus pour les enzymes CaHydA, HydA_C100A et HydA_C48A.

De plus, à partir des spectres obtenus il est possible de calculer la composition en structures secondaires des différentes enzymes purifiées.

Le tableau 5 montre que pour chacun des variants de l'enzyme le contenu en hélice α et en feuillets β est très proche de celui de l'enzyme sauvage et correspond à celui rapporté pour l'enzyme Cpl.

	Enzymes				
	CaHydA	HydA_C100A	HydA_C48A	HydA_DeltaDA	Cpl
Hélices α (%)	39	39	40	39	42
Feuillets β (%)	13	13	12	13	16
Nbe d'atomes de fer attendus	20	16	18	6	/
Nbe d'atomes de fer mesurés par ICP-AES	20 ± 1.8	16 ± 0.5	18 ± 0.7	$6,1 \pm 0,1$	/

Tableau 5 : Composition en structures secondaires et contenu en fer des différentes hydrogénases purifiées. La composition en structure secondaire de chaque enzyme est obtenue à partir des spectres CD. La concentration en atomes de fer est déterminée par ICP-AES et comparée à la concentration de la fraction protéique déterminée par dosage en acide aminés.

De ce fait, bien que le rôle des centres fer-soufre dans le repliement des protéines ne doit pas être négligé, il semble que leur absence, en particulier pour les variants de l'enzyme HydA_C100A et HydA_C48A, ne produise pas de changements conformationnels importants susceptibles d'être responsables des faibles activités enzymatiques observées. Par ailleurs, il a récemment été montré que l'hydrogénase MeHydA retrouvée chez *M. elsdenii* pouvait être purifiée en conditions réductrices sous forme soluble, sans centres fer-soufre [48]. Ceci peut être interprété comme le fait que les centres fer-soufre ne sont pas indispensables au repliement des enzymes.

Par ailleurs, la détermination du nombre d'atomes de fer présent dans chacune des enzymes purifiées a été réalisée. Le dosage du fer dans les échantillons a été réalisé par ICP-AES en collaboration avec le Laboratoire Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues au CEA de Cadarache. La concentration en atome de fer est comparée à la concentration en protéine de chaque échantillon (Tableau 5).

Les résultats obtenus montrent que la teneur en fer pour chacune des enzymes purifiées est très proche de celle attendue. Ces résultats permettent d'une part, de valider la stratégie de mutation ponctuelle empêchant la formation des centres fer-soufre chez les variants HydA_C100A et HydA_C48A ; et d'autre part de valider la présence du site catalytique complet chez le variant HydA_ΔDA.

3.4.3.2. Spectres UV-visible

Les spectres UV-visibles des différentes enzymes concentrés ont été enregistrés pour les enzymes concentrées oxydées (Figure 61).

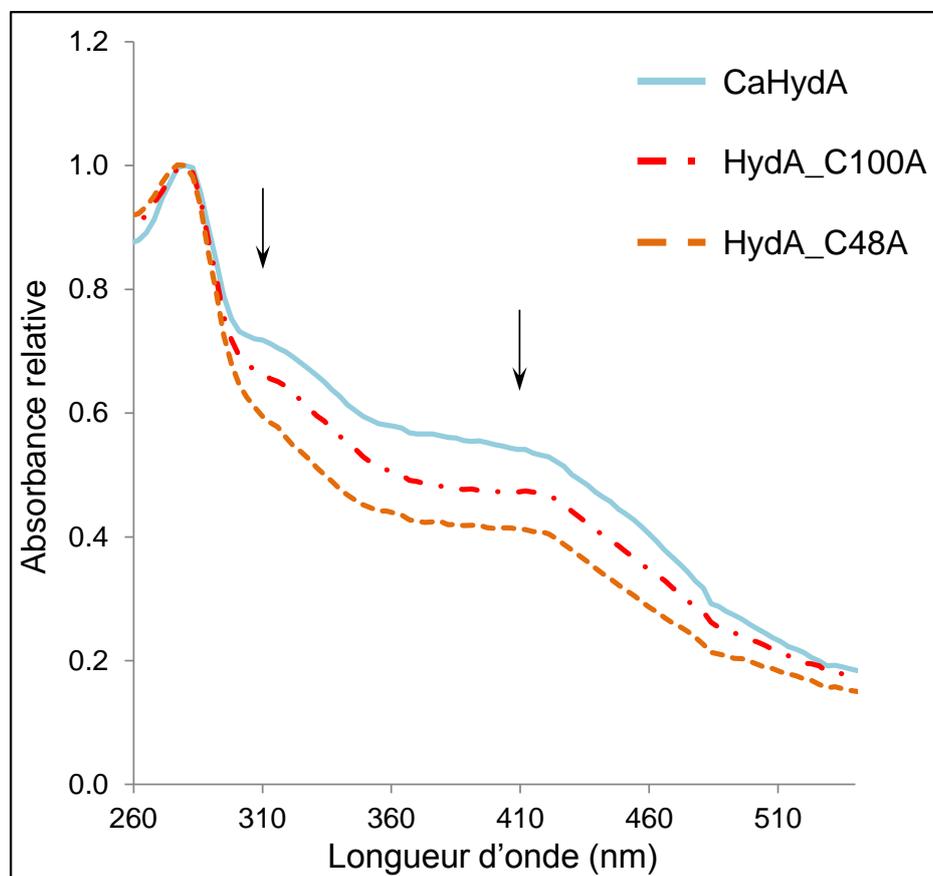


Figure 61: Spectres UV-Vis des enzymes. Spectres UV-Vis des différentes enzymes normalisés par rapport à l'absorbance maximale à 280 nm.

Le spectre UV-Vis de l'enzyme sauvage CaHydA présente, en plus du pic à 280 nm, deux pics d'absorption à 310 nm et 410 nm caractéristiques. Ce spectre est parfaitement comparable aux spectres rapportés dans la littérature [132,171], validant encore la qualité de la préparation d'enzyme. Les variants de l'enzyme présentent des spectres UV-Vis altérés ce qui confirme l'absence de centres fer-soufre au sein de ces enzymes. Toutefois, le spectre obtenu pour l'enzyme HydA_C48A est plus altéré, à 310 nm et 410 nm, que celui obtenu pour l'enzyme HydA_C100A alors que c'est seulement un centre de type [2Fe-2S] est qui éliminé. Il est à noter que les spectres UV-Vis sont complexes et que la contribution de chacun des centres fer-soufres accessoires dans l'absorbance à 310 nm ou 410 nm n'a pas été définie. Pour exemple, la ferrédoxine PetF retrouvée chez *C. reinhardtii*, qui

comprend un unique centre [2Fe-2S], présente un spectre d'absorption complexe avec des pics d'absorption à 330 nm, 422 nm et 465 nm [56,192].

3.4.3.3. Caractérisation électrochimique

En collaboration avec l'équipe « Dynamique réactionnelle des enzymes rédox multi centres, cinétique électrochimique » de Marseille, les différentes enzymes ont été caractérisées par électrochimie directe, où il est possible d'évaluer l'activité d'enzymes adsorbées sur une électrode par la mesure d'un courant électrique.

Les caractéristiques des enzymes peuvent être analysées d'après les voltammogrammes obtenus et il est également possible d'obtenir des données sur le transfert de différents gaz au sein des enzymes.

L'enzyme sauvage CaHydA purifiée possède des caractéristiques déjà décrites dans la littérature et permet la comparaison avec les différents variants [5,130].

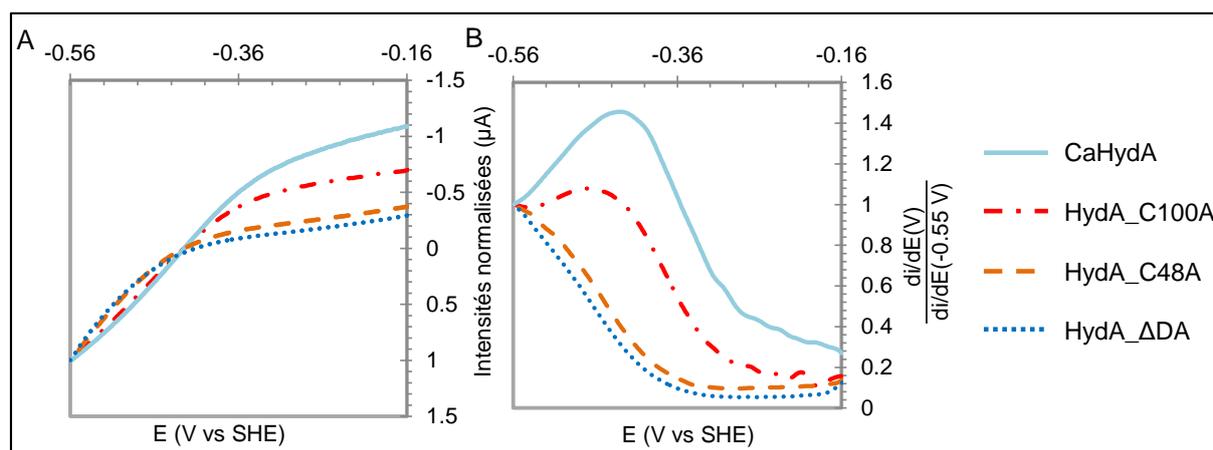


Figure 62: Caractérisation électrochimique des différentes hydrogénases. Les signaux catalytiques, normalisés par la valeur du courant au plus bas potentiel pour chaque enzyme, sont présentés sur les voltammogrammes (A) ou sur leurs dérivés premiers (B).

La Figure 62.A montre que les mutations ont un effet plus marqué sur les activités d'oxydation du dihydrogène (à haut potentiel), que sur les activités de réduction des protons (à bas potentiel). Il est alors mis en évidence des différences de biais catalytique entre les enzymes [83], ce dernier étant biaisé en faveur de la production de dihydrogène.

A l'heure actuelle, il n'est pas possible de déterminer quelle est la cause de la distorsion des voltammogrammes, mais il apparaît clairement que ceux obtenus avec

les variants HydA_C48A et HydA_ΔDA sont déformés ; ceci étant particulièrement visible sur les dérivés des voltammogrammes (Figure 59.B) où les enzymes HydA_C48A et HydA_ΔDA ne montrent pas de point d'infection dans la courbe alors que c'est le cas pour les enzymes CaHydA et HydA_C100A.

Par ailleurs, les paramètres cinétiques liés au site catalytique de l'enzyme comme l'affinité pour le dihydrogène et la sensibilité au monoxyde de carbone et à l'oxygène ont été déterminés (Tableau 6).

Gaz Enzyme	H ₂ ^a		CO ^b		O ₂ ^c		
	K _m (bar)	k _i (bar)	k _i (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	k _a (s ⁻¹)	k _i (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	k _a (s ⁻¹)	k ₃ (s ⁻¹)
CaHydA	0.8	26	16	0.015	1.1	0.04	0.003
HydA_C100A	1.5 ± 0.5	35	6.5	0.016	1 ± 0.3	0.035 ± 0.01	0.006
HydA_C48A	1.5 ± 0.5	35	10	0.017	0.85 ± 0.2	0.03 ± 0.01	0.01
HydA_ΔDa	1	35	15	0.03	0.7	0.06	0.008

Tableau 6 : Paramètres cinétiques de diffusion des gaz déterminés chez les différentes enzymes. a : paramètres déterminés pour le dihydrogène selon Fourmond *et al.* [177], b : paramètres déterminés pour le monoxyde de carbone selon Baffert *et al.* [129], c : paramètres déterminés pour l'oxygène selon Orain *et al.* [130].

Il apparaît que bien qu'il y ait de légères différences, les paramètres cinétiques sont conservés chez les variants de l'enzyme et de ce fait, la diffusion des gaz n'est pas perturbée. L'environnement du site catalytique de l'hydrogénase ne semble donc pas être affecté par les mutations réalisées au niveau des centres fer-soufre de surface ou par la délétion du Domaine F contenant les centres fer-soufre accessoire.

D'autre part, à partir des voltammogrammes obtenus, les intensités de courant ont été premièrement normalisées par rapport à l'intensité du courant au plus bas potentiel pour chaque enzyme et deuxièmement normalisés par rapport à l'intensité du courant obtenu pour l'enzyme sauvage à chaque potentiel testé (Figure 63).

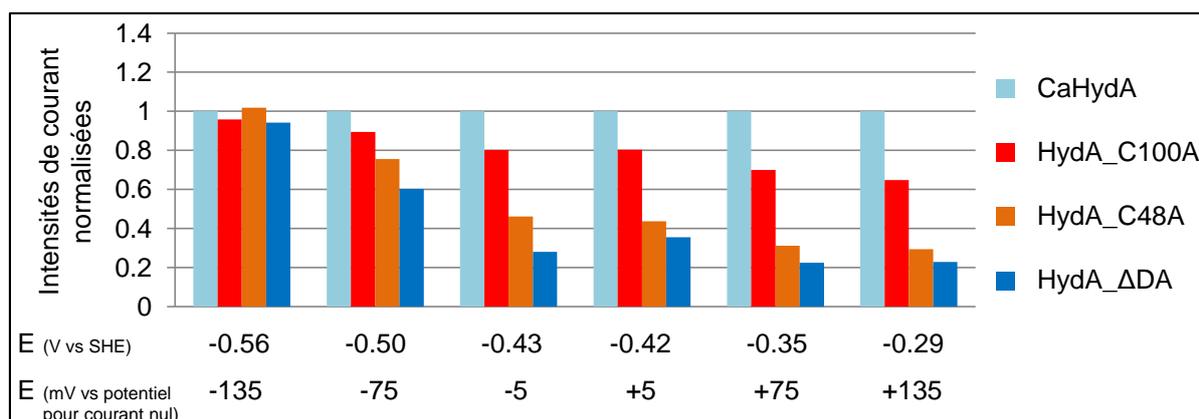


Figure 63: Intensités relatives des courants catalytiques des enzymes sauvages et variantes à différents potentiels. Les intensités des courants sont normalisées par rapport à l'intensité du courant obtenu pour l'enzyme sauvage CaHydA.

Aux plus bas potentiels testés, les différentes enzymes semblent se comporter de façon semblable, avec des activités de réductions de protons qui ne semblent pas être affectées chez les enzymes variantes. Ceci met en évidence que la présence du Domaine F n'a pas d'incidence sur la capacité des enzymes à produire de l'hydrogène, dès lors que des électrons de bas potentiels leur sont fournis.

Toutefois, pour des potentiels approchant et dépassant le potentiel d'équilibre $2\text{H}^+/\text{H}_2$, les enzymes se trouvent affectés pour la production et la consommation de dihydrogène.

Les résultats obtenus par électrochimie sont à comparer à ceux obtenus pour les différentes enzymes dont les activités ont été évaluées en solution.

3.4.3.4. Activité des enzymes en solution

3.4.3.4.1. Activité de consommation et de production du dihydrogène

Par rapport à l'enzyme sauvage CaHydA, les activités spécifiques de ces variants sont diminuées, d'un facteur 2, 5 et 10, lorsqu'elles sont mesurées dans les sens de l'oxydation de l'hydrogène ou la réduction des protons (Figure 64).

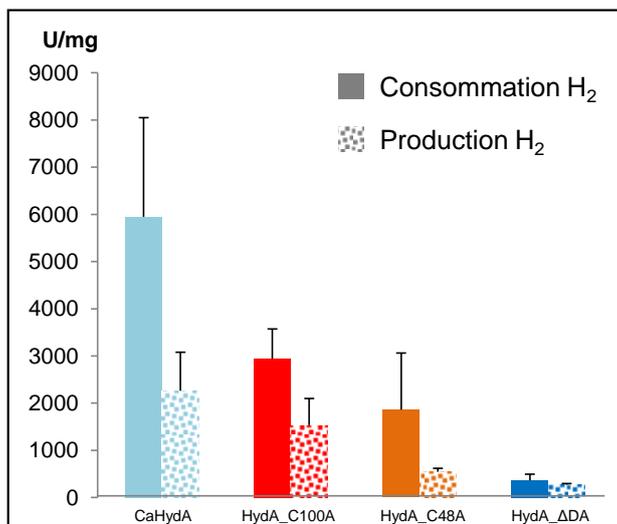


Figure 64: Comparaison des activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons des variants HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA avec l'enzyme CaHydA sauvage. Les activités spécifiques moyennes de consommation ou de production de dihydrogène (motif à pois) sont données pour chaque hydrogénase.

Les activités spécifiques mesurées dans le sens de la consommation ou de la production de dihydrogène suivent qualitativement la même tendance.

Les tests d'activités réalisés lors de cette première caractérisation utilisent le méthyl viologène comme partenaire d'oxydoréduction artificiel. Les activités catalytiques mesurées avec cette molécule de petite taille (257,16 g/mol) devrait donc impliquer les transferts d'électrons qui se produisent entre l'enzyme et cette molécule (transfert inter-moléculaire) et également au sein de l'enzyme (transfert intra-moléculaire).

3.4.3.4.2. Activités d'échange proton/deutérium en solution

Des mesures activités d'échange proton/deutérium des différentes enzymes ont été réalisées dans le but d'évaluer l'activité du site catalytique des hydrogénases lorsqu'il n'y a pas de transfert vers un accepteur d'électrons externe [167].

Ces expérimentations ont été menées en collaboration avec le CEA de Cadarache. Les éventuelles pertes d'activité des hydrogénases durant le stockage et le transport des enzymes ont alors été prises en considération.

Le deutérium (D₂) initialement à saturation est irréversiblement transformé en HD puis en H₂ avec le très large excès de protons du milieu réactionnel. La disparition du D₂, de même que l'apparition du HD et du H₂ sont suivi par spectrométrie de masse.

Les activités d'échange d'isotope ont été mesurées pour l'enzyme sauvage CaHydA et les trois enzymes variants HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA et sont présentées en figure 65. Ces activités sont comparées aux activités spécifiques de consommation du dihydrogène mesurées avec le méthyl viologène comme accepteur d'électrons. La détermination des ratio k_{out}/k permettant la comparaison des activités d'échange proton/deutérium des enzymes n'est pas utilisable dans le cas des hydrogénases à fer [83]. En effet, ce ratio est utilisable dans le cas des hydrogénases [NiFe] qui possèdent des valeurs de K_m pour le dihydrogène très faibles (de l'ordre du micro-molaire), ce qui n'est pas le cas chez les hydrogénases à fer ou les valeurs de K_m pour le dihydrogène sont de l'ordre du milli-molaire [130,170].

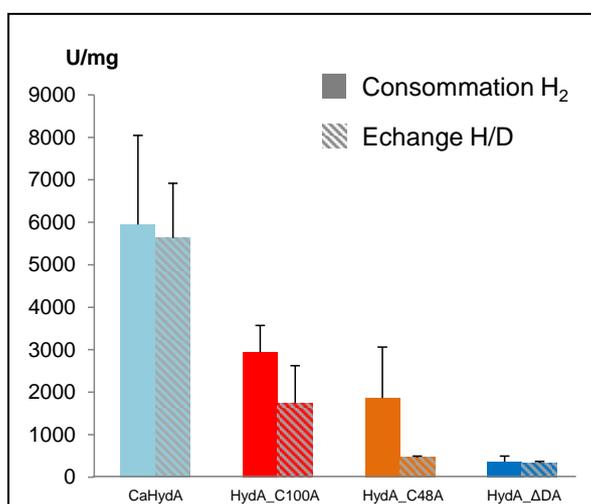


Figure 65: Activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène et d'échange proton/deutérium des hydrogénases CaHydA, HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA. Les activités spécifiques moyennes de consommation de dihydrogène ou d'échange isotopique (motif hachuré) sont données pour chaque hydrogénase.

Sur la figure 62, on observe que les activités d'échange proton/deutérium suivent la même tendance que les activités d'oxydation du dihydrogène.

3.4.3.4.3. Voies de transfert des protons.

Les activités spécifiques d'échanges d'isotopes des hydrogénases mesurées sont indépendantes des mécanismes de transfert d'électrons mais restent liés au transfert des protons et à la diffusion des gaz dans les enzymes. La voie de transfert des protons, très conservée au sein des hydrogénases à fer, a été largement étudiée [118]. Le transfert des protons fait intervenir des résidus appartenant exclusivement

au Domaine H de l'enzyme. Par l'ajout de certains composés dans les tests d'activités de réduction des protons, il est possible d'évaluer si la voie de transfert des protons est affectée. En effet, la présence de chlorure de zinc inhibe spécifiquement le transfert des protons et entraîne la diminution des activités des enzymes ; d'autre part les activités d'enzymes affectées dans la voie de transfert des protons peuvent être restaurées après ajout d'azide de sodium [136]. Des tests d'activités d'oxydation du dihydrogène, adaptés de ceux rapportés dans la littérature, ont été réalisés (Figure 66) [118,136].

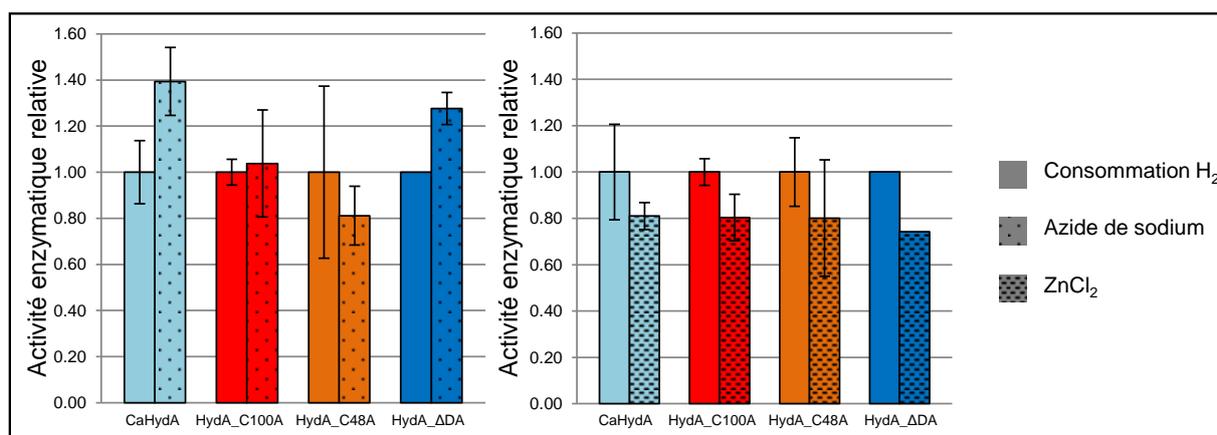


Figure 66: Tests d'activités permettant l'étude de la conservation de la voie de transfert de protons. Les activités enzymatiques relatives de chaque hydrogénase sont mesurées en l'absence ou en présence d'azide de sodium (motif à pois) ou de chlorure de zinc (motif à tirets).

Les résultats obtenus montrent que les activités relatives mesurées en présence d'azide de sodium ou en présence de chlorure de zinc ne sont pas différentes chez l'enzyme sauvage ou chez les différents variants. De ce fait, il est mis en évidence que la voie de transfert des protons n'est pas affectée chez les différents variants testés. Ceci exclue cette hypothèse comme la cause possible de la diminution des activités catalytiques observées.

3.4.3.5. Rôle du Domaine F dans l'activité des hydrogénases à fer

L'ensemble des caractérisations biophysiques de l'enzyme sauvage CaHydA ainsi que des trois variants de l'enzyme HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA permet de valider la qualité des enzymes produites. Les protéines purifiées sont correctement repliées et comportent le nombre d'atomes attendus, les mutations ponctuelles réalisées ont donc permis d'abolir la formation des centres fer-soufre ciblés. Par ailleurs, l'enzyme HydA_ΔDA possède un site catalytique complet. De plus, il a été mis en évidence que la voie de transfert de protons, de même que la diffusion des gaz et l'environnement complet du site catalytique n'était pas affecté par les modifications introduites.

Il est possible de comparer les constantes catalytiques des différentes enzymes pour les différentes activités évaluées en solutions (Figure 67).

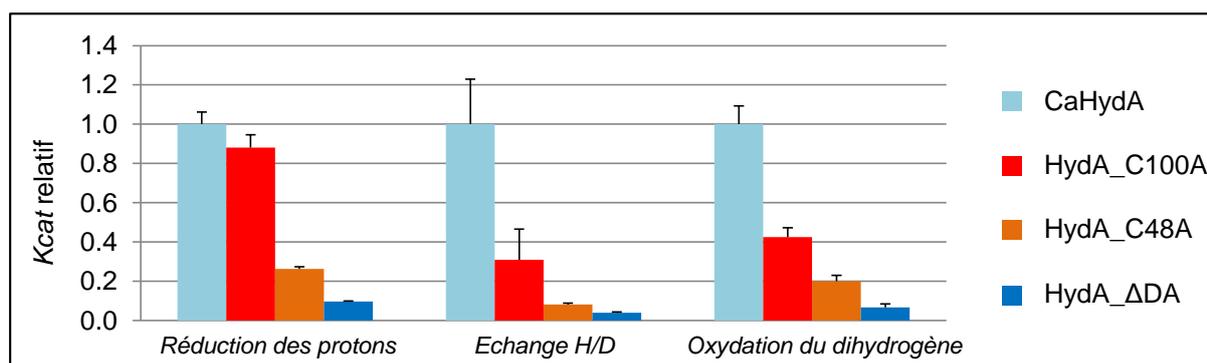


Figure 67: Comparaison des constantes catalytiques des différentes enzymes pour les activités de réductions des protons, d'échange proton/deutérium et d'oxydation du dihydrogène. Les constantes catalytiques sont normalisées par rapport aux activités mesurées pour l'enzyme sauvage CaHydA.

Ces résultats montrent que les enzymes se comportent qualitativement de la même façon premièrement pour toutes les activités mesurées en solutions à des potentiels proches de celui de l'équilibre $2\text{H}^+/\text{H}_2$, et deuxièmement que le comportement en solution est très proche de celui observé en électrochimie à des potentiels proches de celui de l'équilibre $2\text{H}^+/\text{H}_2$. De ce fait, il est montré que l'altération de la composition du Domaine F de l'enzyme entraîne une diminution de la constante catalytique indépendamment des mécanismes de transfert d'électrons intermoléculaire.

Dès lors, l'implication des centres fer-soufre accessoires pour le maintien de l'activité catalytique de l'enzyme est démontrée. Par ailleurs, des manipulations de modélisation moléculaire (QM/MM) ont montré, chez l'hydrogénase de type M2 retrouvée chez *Desulfovibrio desulfuricans*, que les centres fer-soufre accessoires pouvaient avoir un impact sur l'état d'oxydoréduction du site catalytique de l'enzyme [148]. De la même façon, il est envisageable que les centres fer-soufre accessoires présent dans l'enzyme CaHydA puissent intervenir dans la modulation de l'état rédox du Cluster H et modifier son potentiel redox. En effet, le mécanisme catalytique de l'enzyme est basé sur un phénomène de bascule entre différents états d'oxydoréduction du site catalytique et les centres fer-soufre accessoires pourraient alors influencer ces différents états rédox. Les centres fer-soufre du Domaine F pourraient intervenir en augmentant le potentiel du Cluster H (c'est-à-dire en le rendant moins électronégatif). De ce fait une altération de la composition du Domaine F entrainerait une diminution du potentiel du Cluster H, observable par une diminution des activités d'oxydation du dihydrogène, mais dont les activités de réduction de protons seraient compensables si des électrons de potentiels suffisamment bas pouvaient être fournis, comme observé en électrochimie.

3.4.4. Paramètres cinétiques des différents variants de l'enzyme et interactions avec les partenaires d'oxydoréduction physiologiques et artificiels

Les paramètres cinétiques des trois variants de l'enzyme HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA ont ensuite été déterminés et comparés à ceux obtenus avec l'enzyme sauvage CaHydA. Les tests d'activités ont été réalisés dans les sens de l'oxydation du dihydrogène et de la réduction des protons avec le méthyl viologène et la ferrédoxine recombinante validée précédemment (voir Chapitre 3.3) ; les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 7.

Enzyme	Consommation H ₂							
	MV				Ferrédoxine			
	Vmax	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Vmax	Km (μM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ .s ⁻¹)
CaHydA	12000 ± 1000	19 ± 3	13000 ± 1200	7.1 × 10 ⁷ ± 1.8 × 10 ⁵	300 ± 50	2.4 ± 0.7	380 ± 60	1.6 × 10 ⁸ ± 7.2 × 10 ⁷
HydA_C100A	5000 ± 500	19 ± 4	6000 ± 600	3.1 × 10 ⁵ ± 1 × 10 ⁵	150 ± 10	4.2 ± 0.7	160 ± 15	3.8 × 10 ⁷ ± 1.0 × 10 ⁷
HydA_C48A	2400 ± 300	14 ± 4	2600 ± 400	1.9 × 10 ⁵ ± 8 × 10 ⁴	45 ± 5	7.2 ± 1.1	50 ± 5	7.0 × 10 ⁶ ± 1.8 × 10 ⁶
HydA_ΔDA	1200 ± 300	31 ± 13	900 ± 200	2.9 × 10 ⁴ ± 2.0 × 10 ⁴	15 ± 1	4.8 ± 0.5	10 ± 1	2.2 × 10 ⁶ ± 3.4 × 10 ⁵

Enzyme	Production H ₂							
	MV				Ferrédoxine			
	Vmax	Km (mM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ .s ⁻¹)	Vmax	Km (μM)	Kcat (s ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ .s ⁻¹)
CaHydA	2200 ± 100	1.8 ± 0.5	2400 ± 150	1.3 × 10 ⁶ ± 4.7 × 10 ⁵	310 ± 30	4.8 ± 0.8	350 ± 35	7.2 × 10 ⁷ ± 2.0 × 10 ⁷
HydA_C100A	1900 ± 150	4.7 ± 1.3	2100 ± 150	4.5 × 10 ⁵ ± 1.6 × 10 ⁵	70 ± 5	2.6 ± 0.4	70 ± 6	3.0 × 10 ⁷ ± 7.2 × 10 ⁷
HydA_C48A	550 ± 20	2.1 ± 0.4	600 ± 20	3.1 × 10 ⁵ ± 6.4 × 10 ⁴	50 ± 6	10.5 ± 2.0	50 ± 7	5.3 × 10 ⁶ ± 1.7 × 10 ⁶
HydA_ΔDA	320 ± 8	2.6 ± 0.3	230 ± 6	9.0 × 10 ⁴ ± 1.2 × 10 ⁴	30 ± 10	17.3 ± 7.0	20 ± 7	1.3 × 10 ⁶ ± 9.6 × 10 ⁵

Tableau 7 : Paramètres cinétiques des différentes enzymes avec les partenaires d'oxydoréduction artificiels et physiologiques. Les paramètres de V_{max} calculés sont exprimés en $\mu\text{mol H}_2 \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Les efficacités catalytiques ($Kcat/Km$) avec les deux partenaires d'oxydoréduction de chaque enzyme peuvent être comparées (Figure 68).

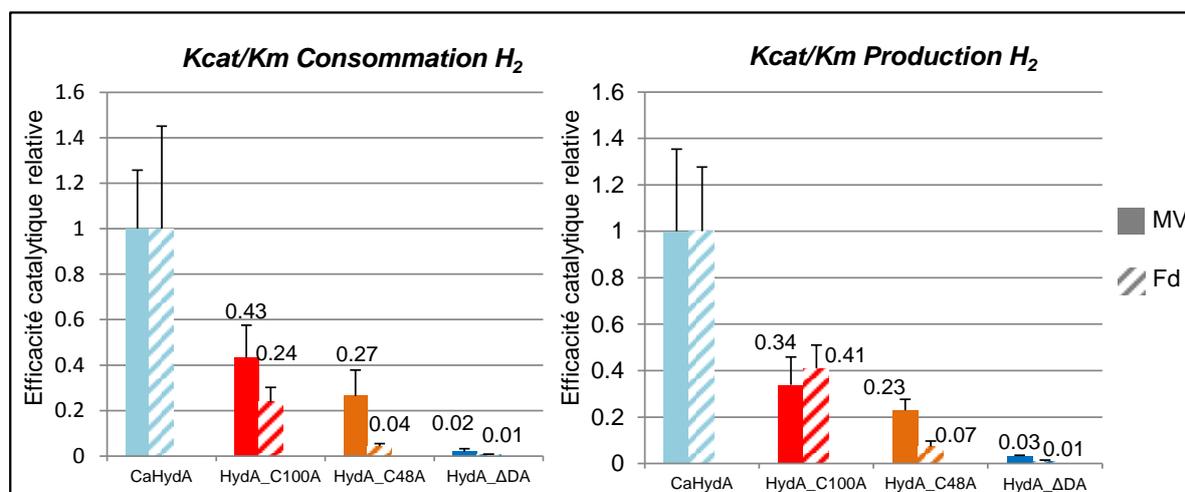


Figure 68: Comparaison des efficacités catalytiques des enzymes dans les réactions de consommation et de production de dihydrogène.

Pour tous les variants de l'enzyme, les efficacités catalytiques sont affectées, cependant certaines différences sont notables et ces valeurs ne permettent pas de distinguer si les activités des enzymes sont altérées à la suite des modifications du Domaine F ou si ce sont les interactions avec les partenaires rédox qui entrent en jeu.

3.4.4.1. Enzyme HydA_ΔDA et impact du Domaine F

L'efficacité catalytique de l'enzyme HydA_ΔDA est fortement affectée. En effet, elle n'est égale qu'à environ 3% de celle de l'enzyme sauvage CaHydA, quel que soit le partenaire d'oxydoréduction ou le sens catalytique.

L'absence du Domaine F, contenant l'ensemble des centres fer-soufre accessoires, entraîne une diminution d'un facteur 10 des activités enzymatiques de consommation ou de production du dihydrogène lorsque le méthyl viologène est utilisé. L'enzyme HydA_ΔDA est a priori structuralement très proche de l'enzyme CrHydA1 retrouvée chez *C. reinhardtii*. L'activité de réduction des protons avec le méthyl viologène de l'enzyme HydA_ΔDA est égale à 317 ± 8 U/mg, donc uniquement deux fois plus faibles que celle rapportée pour l'enzyme CrHydA1 (730 ± 8 U/mg). De ce fait, à partir de l'enzyme CaHydA, la création d'une hydrogénase à fer minimale, constituée uniquement du Domaine H contenant le Cluster H catalytique, se révèle possible : en effet, une enzyme active, correctement repliée a été obtenue.

Toutefois, les efficacités catalytiques de cette enzyme sont drastiquement affectées, d'un facteur 50 à 70, par rapport à celle de l'enzyme sauvage lorsque la ferrédoxine bactérienne $2[4\text{Fe-4S}]$ est utilisée, même si le transfert d'électrons apparaît toujours possible. De la même façon, des activités enzymatiques très faibles ont été obtenue lorsque la ferrédoxine $[2\text{Fe-2S}]$ est utilisée. Ce résultat n'est pas surprenant pour deux raisons : premièrement, les acides aminés, qui sont normalement situés à l'intérieur de la protéine chez l'enzyme sauvage CaHydA, se retrouvent exposés à la surface de la protéine HydA_ΔDA et peuvent perturber les possibles interactions avec la ferrédoxine ; deuxièmement, les résidus impliqués spécifiquement dans la liaison de la ferrédoxine $[2\text{Fe-2S}]$ avec l'enzyme CrHydA1 sont simplement absent chez l'enzyme HydA_ΔDA (Figure 69).

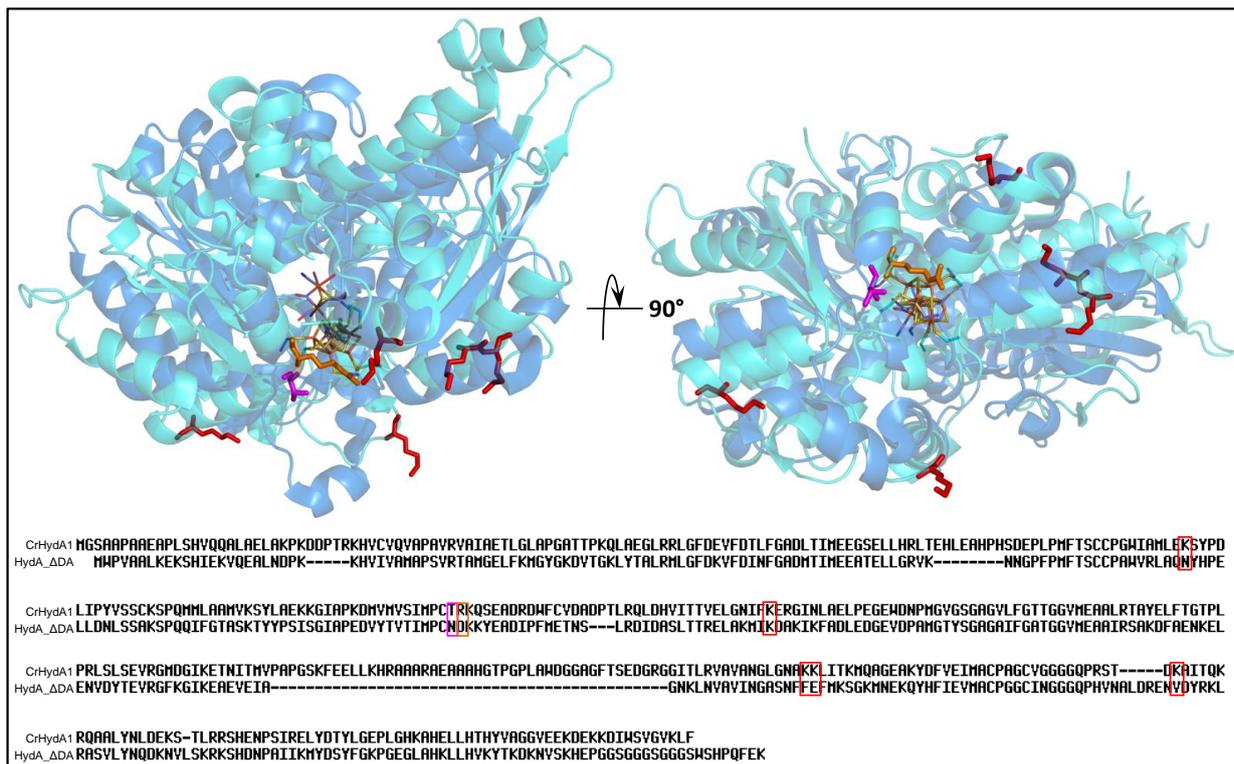


Figure 69: Visualisation des résidus spécifiquement impliqués dans l'interaction entre l'enzyme CrHydA1 (en bleu ciel) et la ferrédoxine [2Fe-2S] de type plante. Ces résidus sont absent de l'enzyme HydA_ΔDA (en bleu) ; les acides aminés lysines décrits par Winkler *et al.* [111] sont colorés en rouge, l'arginine 171 décrit par Sybirna *et al.* [119] est coloré en orange et l'acide aminé thréonine 170 décrit par Rumpel *et al.* [56] est coloré en rose.

En complément, les expérimentations d'électrochimie ont montré que l'enzyme HydA_ΔDA présentait des paramètres cinétiques de sensibilité à l'oxygène proche de celle de l'enzyme sauvage CaHydA. Des résultats similaires ont déjà été décrits dans la littérature où un mutant de l'hydrogénase délété du Domaine F possédait une résistance à l'oxygène à la fois proche de celle de l'enzyme sauvage et différente de celle de l'hydrogénase de type M1 retrouvée chez *C. reinhardtii* [138,151,193].

3.4.4.2. Interaction avec le partenaire rédox physiologique : la ferrédoxine

L'impact de chacun des centres fer-soufre de surface dans l'interaction avec la ferrédoxine a également été étudié.

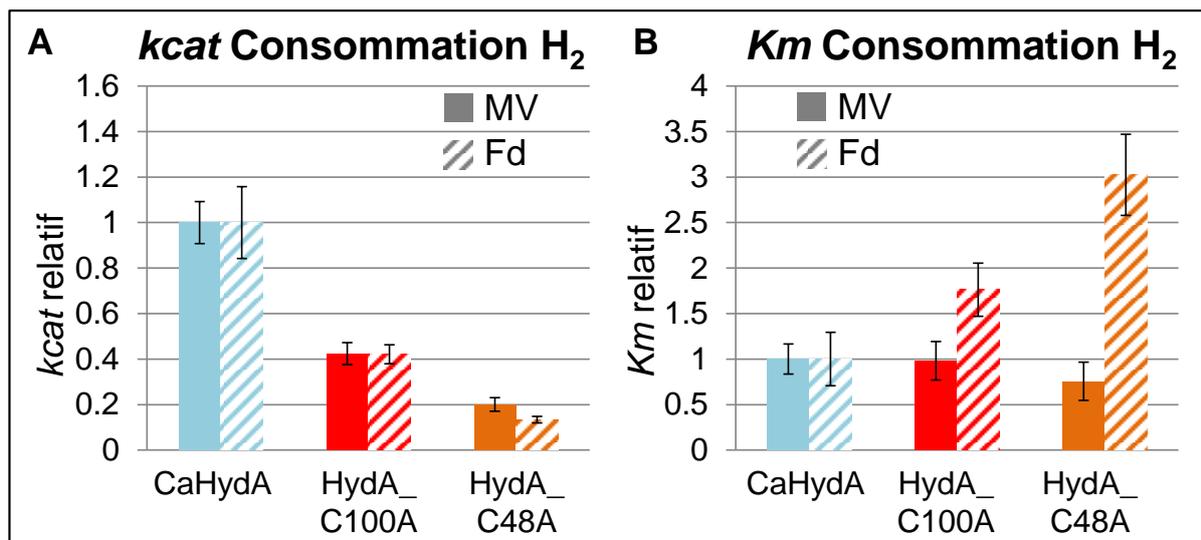


Figure 70: Comparaison des constantes catalytiques et des constantes de Michaëlis des enzymes CaHydA, HydA_C48A et HydA_C100A obtenues dans les conditions de consommation d'hydrogène. Pour chacun des paramètres cinétiques, les valeurs pour les variants de l'enzyme sont normalisés par rapport aux valeurs obtenues pour l'enzyme sauvage.

Quel que soit le partenaire rédox utilisé, méthyl viologène ou ferrédoxine, il apparaît que les valeurs de *kcat* suivent qualitativement les valeurs obtenues en l'absence d'accepteur externe d'électrons (Figure 70.A et 67). Ceci confirme l'importance des centres fer-soufre du Domaine F pour le maintien d'une activité catalytique complète. Par ailleurs, alors même que les valeurs de *Km* pour le méthyl viologène des différents variants de l'enzyme testés varient peu par rapport à l'enzyme sauvage, la valeur de *Km* pour la ferrédoxine est augmentée d'un facteur 1,7 dans le cas de l'enzyme HdyA_C100A et jusqu'à un facteur 3 dans le cas de l'enzyme HydA_C48A.

La diminution des efficacités catalytiques observées pour les variants de l'enzyme (Figure 70.A) avec l'utilisation du méthyl viologène est donc principalement due à l'impact négatif des modifications du Domaine F, suggérant une interaction possible du méthyl viologène avec le Cluster H de l'enzyme. D'autre part, l'efficacité catalytique de consommation de dihydrogène observée pour l'enzyme HydA_C100A, liée à l'utilisation de la ferrédoxine à la place du méthyl viologène, est réduite d'un facteur 1,8 seulement alors qu'elle est réduite d'un facteur supérieur à 6.5 dans le cas de l'enzyme HydA_C48A.

Ainsi, l'abolition de la formation du centre fer-soufre de surface FS2 a un plus grand effet sur l'efficacité catalytique de l'enzyme que l'abolition de la formation du centre FS4C. Il est donc mis en évidence l'importance du centre fer-soufre de surface FS2 dans le maintien d'un transfert d'électrons efficace entre l'enzyme et son partenaire rédox physiologique.

3.4.4.3. Biais catalytique

La caractérisation biochimique et électrochimique des différentes enzymes met en évidence une « asymétrie » dans les activités des hydrogénases. Les hydrogénases à fer étudiées possèdent un rôle métabolique parfaitement défini de réduction des protons. Or, ces enzymes possèdent aussi une activité *in vitro* d'oxydation du dihydrogène ; de plus, ces activités sont plus élevées que celles de réduction des protons. D'après les résultats obtenus, le ratio $K_{cat_{\text{Conso}}}/K_{cat_{\text{Prod}}}$ pour l'enzyme sauvage CaHydA est égal à 5,5.

Ce phénomène, largement étudié chez les hydrogénases [Fe-Fe] et [Ni-Fe], est décrit sous le nom de « biais catalytique ». Plusieurs observations peuvent être réalisées à partir des résultats de la caractérisation des différentes enzymes.

La modulation du biais catalytique a été décrite chez l'hydrogénase [NiFe] de *Desulfovibrio desulfuricans* où les réactions de consommation et de production du dihydrogène sont limitées par la diffusion du dihydrogène et le transfert d'électrons, respectivement [83]. La modification du centre fer-soufre atypique distal a permis de biaiser l'activité catalytique de l'enzyme vers la production du dihydrogène.

Un mécanisme similaire est observé avec l'enzyme HydA_C100A, où le centre atypique FS4C est absent, lorsque le méthyl viologène est utilisé. En effet, le ratio $K_{cat_{\text{Conso}}}/K_{cat_{\text{Prod}}}$ est deux fois plus faible que celui de l'enzyme sauvage, car l'activité de réduction des protons est très proche de celle de l'enzyme sauvage. Le même phénomène est observé par la caractérisation électrochimique des enzymes CaHydA et HydA_C100A. Bien que les activités enzymatiques ne puissent pas être déterminées de façon absolue car la quantité de protéine adsorbée sur l'électrode n'est pas déterminable, il apparaît que l'enzyme HydA_C100A affiche un signal proche de celui de l'enzyme CaHydA à bas potentiel alors que la forme du signal est différente dans les conditions d'oxydation du dihydrogène; mettant en évidence le biais vers la production de dihydrogène (Figure 62).

Il est assez surprenant que chez les hydrogénases [Fe-Fe] et [Ni-Fe], éloignées phylogénétiquement et dans leur rôle métabolique, le même type de centre fer-soufre [4Fe-4S] atypique soit retrouvé à la surface de l'enzyme et puisse être impliqué dans le biais catalytique. Toutefois, les causes du biais catalytique ne sont pas dues uniquement aux états rédox des centres fer-soufre accessoires ; la liaison des partenaires d'oxydoréduction et des substrats (protons ou dihydrogène) doit être prise en compte. De ce fait, un mécanisme concerté impliquant les deux centres fer-soufre de surface FS4C et FS2 pourrait être proposé, en particulier car aucune hydrogénase contenant uniquement l'un ou l'autre des centres fer-soufre n'a été décrite.

3.4.5. Modélisation moléculaire et interaction avec les partenaires d'oxydoréduction

Les interactions entre l'enzyme CaHydA et les partenaires d'oxydoréduction artificiels et physiologiques ont également été étudiées par une approche de modélisation moléculaire. Des modèles de l'enzyme CaHydA et de la ferrédoxine 2[4Fe-4S] ont tout d'abord été élaborés et des manipulations de « docking » avec les deux partenaires d'oxydoréduction ont été réalisées.

3.4.5.1. Méthyl viologène

La modélisation de l'association du méthyl viologène avec l'hydrogénase montre que celui-ci est retrouvé de façon dispersée sur toute la surface de l'enzyme, ce qui révèle une liaison peu spécifique de ce partenaire. De façon surprenante, plus de la moitié des solutions obtenues sont retrouvées autour de la partie N-terminale de l'enzyme. Parmi ces solutions, pour lesquelles le méthyl viologène est toujours situé à moins de 14 Å d'un centre fer-soufre, deux d'entre elles représentent plus de 48% de l'ensemble des solutions. Dans la première solution, le méthyl viologène est retrouvé dans une cavité proche du centre fer-soufre FS4C ; alors que dans la deuxième, le partenaire d'oxydoréduction est retrouvé dans une cavité large et profonde, à proximité du centre fer-soufre FS2. (Figure 71 et 72)

Par ailleurs, 17% des solutions placent le méthyl viologène à proximité du Cluster H. Dans ces solutions, le partenaire est situé à moins de 14 Å du centre [4Fe-4S] ou de

l'atome de fer proximal Fe_p du site catalytique, ce qui suggère une interaction directe avec le Cluster H.

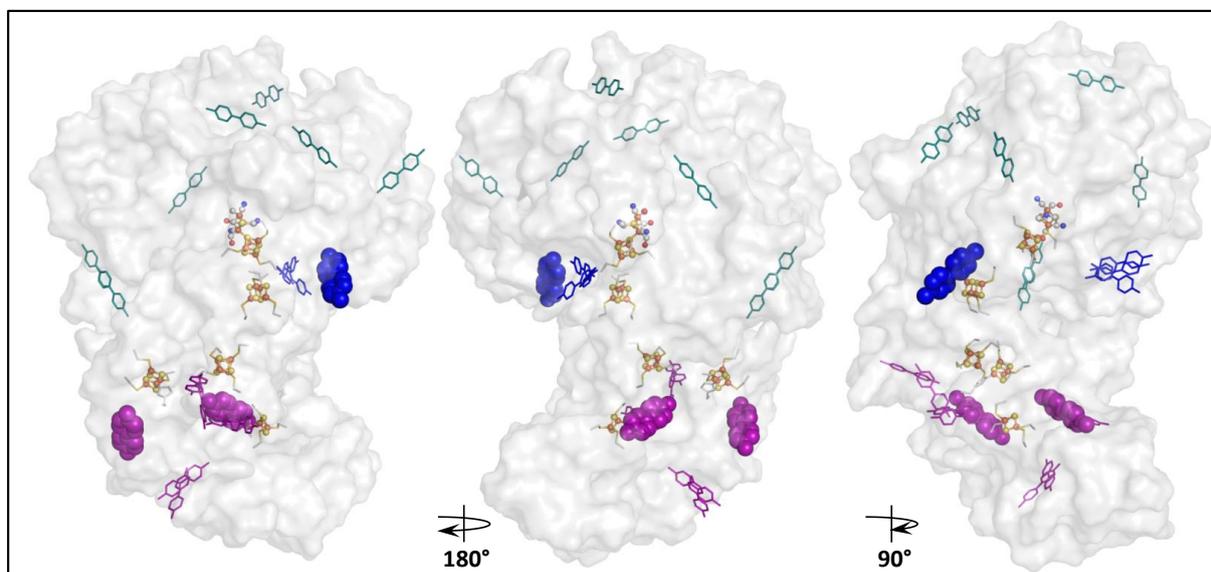


Figure 71: Visualisation des possibilités de liaison du méthyl viologène à la surface de l'enzyme CaHydA. Les solutions colorées en rose correspondent aux liaisons du MV au niveau de la partie N-terminale de l'enzyme. Les solutions colorées en bleu permettent un transfert d'électron directement au site catalytique de l'enzyme. Les solutions colorées en vert sont dispersées à la surface de l'enzyme mais ne permettent pas de transfert d'électrons à priori.

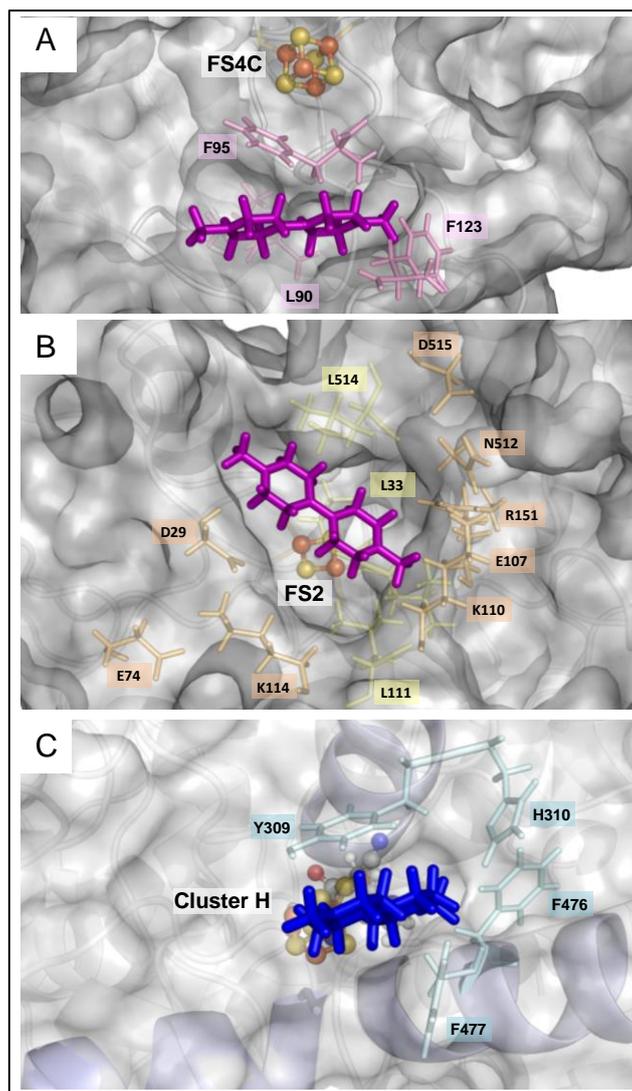


Figure 72: Représentation de certaines possibilités de liaison du méthyl viologène à la surface de l'enzyme CaHydA. A : le méthyl viologène est retrouvé au sein d'une cavité, à proximité du centre FS4C, coordonné par les résidus aromatiques F95 et F123 ainsi que par la leucine L90. B : le méthyl viologène est retrouvé au sein d'une cavité profonde, à proximité du centre FS2, coordonnée par de nombreux résidus aliphatiques (colorés en jaune) ou formant des ponts-salins (colorés en orange). C : le méthyl viologène est placé à proximité du centre [4Fe-4S] du site catalytique dans une cavité coordonné par trois hélices et quatre résidus aromatiques (colorés en bleu ciel).

Ces résultats obtenus par modélisation moléculaire sont en accord avec ceux obtenus lors de la caractérisation biochimique des enzymes.

En effet, les variations de K_m mesurées entre les différentes hydrogénases avec le méthyl viologène sont très faibles, en particulier pour la réaction de réduction des protons. De plus, les concentrations en substrat sont de l'ordre du millimolaire et lors des réactions, un grand nombre de molécules de méthyl viologène sont disponibles pour effectuer des transferts d'électrons (Tableau 7). De ce fait, il semble très

probable que, comme cela a déjà été proposé [108], le transfert d'électrons puisse se faire directement entre le méthyl viologène et le site catalytique de l'enzyme.

3.4.5.2. Ferrédoxine

L'interaction entre la ferrédoxine bactérienne $2[4\text{Fe-4S}]$ avec l'hydrogénase a également été étudiée par modélisation moléculaire. Les résultats obtenus suggèrent une distribution de la ferrédoxine sous forme d'une couronne autour de l'enzyme (Figure 73.A) avec des interactions possible au niveau des centres FS4C ou FS2. Plusieurs positions du partenaire d'oxydoréduction ont été obtenues sur la surface de l'enzyme et toutes font intervenir des acides aminés appartenant au Domaine F de l'hydrogénase (Figure 73.A).

Parmi la moitié des solutions présentant les énergies de liaison les plus faibles, la grande majorité place la ferrédoxine plus proche du centre fer-soufre FS2 que du centre FS4C (Figure 73.B). Parmi les quatre groupes de solutions les plus peuplés, montrant les énergies de liaison les plus faibles, 75 % des possibilités orientaient la ferrédoxine plus proche du centre FS2 que du centre FS4C. La distance moyenne entre le centre $[4\text{Fe-4S}]$ de la ferrédoxine le plus proche était 1,7 fois plus courte pour le centre FS2 que pour le centre FS4C (Figure 73.C et 73.D).

De plus, il est mis en évidence trois parties de l'enzyme qui sont systématiquement impliquées dans les surfaces d'interaction avec la ferrédoxine. Les deux premières parties de l'enzyme sont la première hélice α de l'enzyme constituée par les acides aminés I19 à E25 et par les acides aminés V153 à H159 formant également une hélice α . La troisième partie correspond à une grande boucle formée par les acides aminés C34 à C45 qui contient deux résidus cystéines qui coordonnent le centre fer-soufre FS2, des résidus chargés positivement (lysines K37 et K44) et des acides aminés aromatiques (phénylalanines F35 et F44) ainsi qu'une des deux uniques cystéines libres de l'enzyme (C39) (Figure 74).

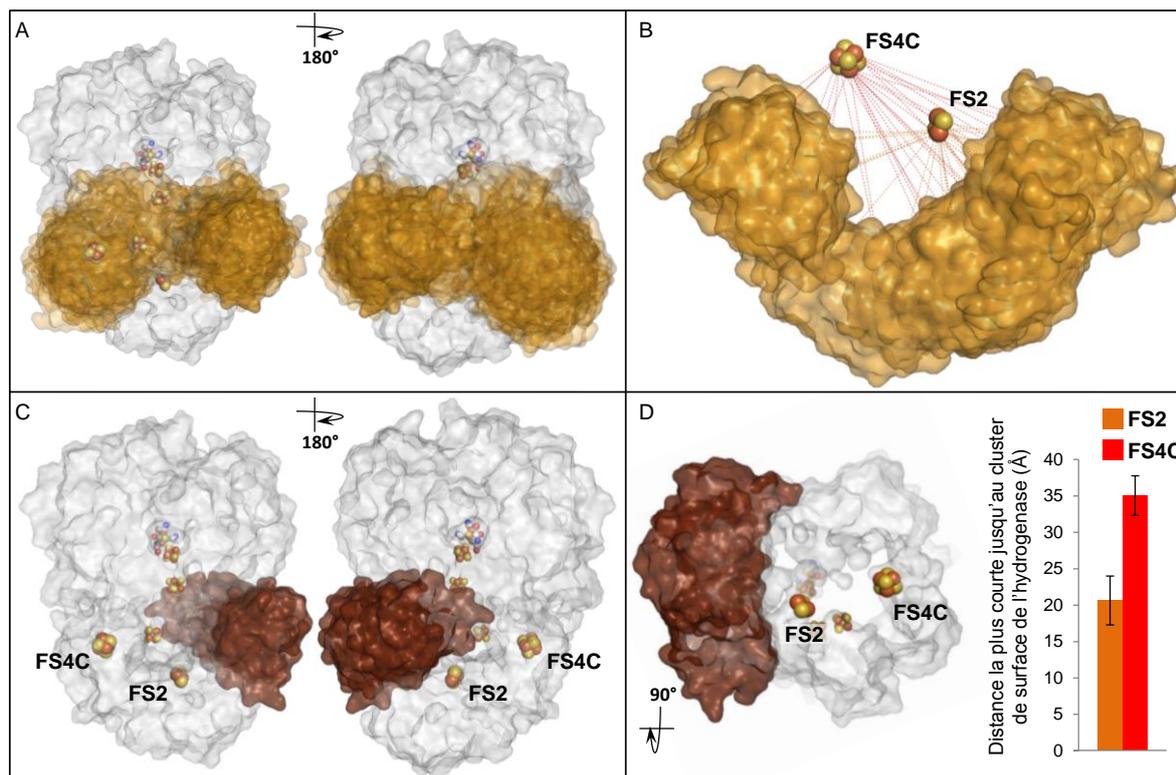


Figure 73: Distribution des solutions de « docking » de la ferrédoxine sur l'enzyme CaHydA. A : l'ensemble de toutes les solutions forment une couronne autour de l'enzyme. B : la moitié des solutions présentant les énergies de liaison les plus faibles se trouvent le plus proche du centre FS2 que du centre FS4C. C : 75% des solutions retrouvées parmi les quatre groupes de solutions les plus peuplés sont représentés. D : la distance moyenne du centre [4Fe-4S] de la ferrédoxine le plus proche du centre de surface de l'enzyme est 1.7 fois plus courte vers le centre FS2 que vers le centre FS4C.

Les valeurs de K_m pour la ferrédoxine de l'enzyme HydA_C48A comparées à celles obtenues avec l'enzyme sauvage, de même que la comparaison des efficacités catalytiques des enzymes avec les différents partenaires rédox ont montré l'importance du centre fer-soufre FS2 dans l'interaction avec la ferrédoxine. En parallèle, il a été montré que la flexibilité de la partie N-terminale de l'enzyme CaHydA augmente en fonction de l'état de protonation, suggérant un mécanisme couplé de transfert des protons et de liaison du partenaire d'oxydoréduction [135]. Par ailleurs, des interactions protéiques dépendantes des états rédox ont été décrites, en particulier entre la putidaredoxine de *Pseudomonas putida* et son partenaire. De grandes similarités structurales existent entre la putidaredoxine et le domaine FS2 de l'enzyme CaHydA en particulier au niveau de la coordination du centre [2Fe-2S] [58]. La forme oxydée de la putidaredoxine montre une grande flexibilité. Il est possible qu'un mécanisme similaire soit observé chez l'hydrogénase,

en effet, la flexibilité de la partie N-terminale de l'enzyme est maximum lors de la libération du dihydrogène, où le centre fer-soufre FS2 peut être considéré comme oxydé et prêt pour la liaison d'un nouveau partenaire [135].

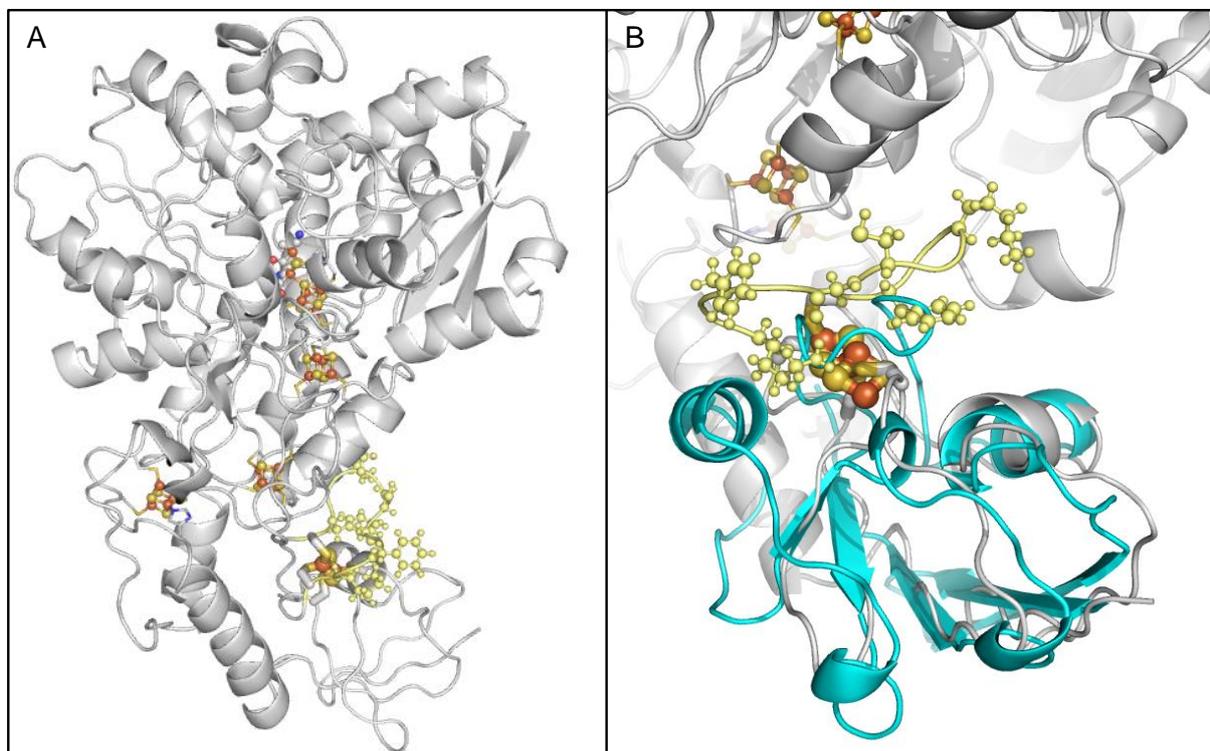


Figure 74: Boucle du domaine du centre FS2 et similarité structurale du domaine du centre FS2 avec la putidaredoxine. La boucle formée par les acides aminés C34 à C45 est colorée en jaune. La structure de la putidaredoxine (issue du fichier PDB :) alignée sur le modèle de structure de l'enzyme CaHydA est colorée en bleu.

3.4.6. Conclusion

L'expression, la production, la purification, la détermination des activités spécifiques et des paramètres cinétiques des variants HydA_ΔDA, HydA_C100A et HydA_C48A ont montré l'implication des centres fer-soufre accessoires dans les capacités du site catalytique de l'enzyme, et ceci même en l'absence de transfert d'électrons. A l'heure actuelle, les raisons d'un tel phénomène ne sont pas clairement élucidées mais un effet de modulation du potentiel du Cluster H par les centres fer-soufre du Domaine F a été proposé. Des études de QM/MM appliquées à l'hydrogénase CaHydA pourraient permettre d'étayer cette hypothèse. Ce mécanisme pourrait également être exploré par la création de nouveaux variants ciblés ou par une étude approfondie de certaines des enzymes pour lesquelles la caractérisation biochimique

complète n'a pas pu être réalisée dans le temps imparti (HydA_H93C et HydA_ΔFS2).

Par ailleurs, la caractérisation biochimique et les expérimentations de modélisation moléculaire réalisées sur les enzymes HydA_C48A et HydA_C100A, modifiées au niveau des centres fer-soufre de surface, ont montré l'implication privilégiée du centre FS2 dans l'interaction avec la ferrédoxine.

Résultats

**Dessin, conception et développement d'une
souche de *C. acetobutylicum* dont la
croissance est dépendante de la surexpression
de l'hydrogénase**

3.5. Dessin, conception et développement d'une souche de *C.*

acetobutylicum dont la croissance est dépendante de la surexpression de l'hydrogénase

3.5.1. Introduction

La stratégie développée jusqu'à présent repose sur la création de mutants dirigés de l'hydrogénase qui doivent être purifiés afin d'évaluer leur capacités catalytiques. Une autre approche de l'étude de l'hydrogénase CaHydA serait de créer de souches modifiées permettant de sélectionner directement *in vivo* chez *C. acetobutylicum* des enzymes modifiées fonctionnelles catalysant la production d'hydrogène.

Une telle souche pourrait être utilisée pour étudier l'impact des centres fer-soufre accessoires sur les capacités catalytiques de l'enzyme, mais aussi pour évaluer les activités enzymatiques de nouvelles hydrogénases notamment issues de bibliothèques d'enzymes.

Chez la bactérie *C. acetobutylicum*, la ferrédoxine réduite générée lors de la décarboxylation du pyruvate est oxydée en très grande majorité par l'hydrogénase [11]. Par conséquent, une souche sauvage de *C. acetobutylicum* est incapable de survivre en l'absence d'une hydrogénase fonctionnelle et toutes les stratégies menées pour inactiver ou déléter le gène *hydA* n'ont pas abouti. La création d'une souche-outil pour criblage d'hydrogénases fonctionnelles doit comporter trois éléments essentiels : une altération dans le gène *hydA* chromosomique, un gène conférant à la souche une résistance à un antibiotique et un système de pression de sélection pour les enzymes mutantes.

En effet, les souches construites seront transformées par des plasmides contenant les gènes codants pour des enzymes mutantes, puis une pression de sélection sera appliquée afin d'évaluer si les hydrogénases exprimées sont suffisamment fonctionnelles pour permettre la survie de la souche, en l'absence de l'hydrogénase sauvage.

3.5.2. Stratégie et conception de la souche

La souche *C. acetobutylicum* $\Delta cac1502\Delta upp\Delta buk$ *hydA60s::IT* + *pCONSintronhydAs* (*hydA60s::IT* + *pCONSintronhydAs*), disponible au laboratoire, possède un intron d'environ 1000 pb intégré en partie 5' du gène *hydA*. Une hydrogénase sauvage fonctionnelle ne peut donc pas être directement exprimée à partir de ce gène. Toutefois, la souche contient le plasmide *pCONSintronhydAs* qui permet l'épissage

de l'intron au niveau de l'ARN messenger transcrit à partir du gène *hydA* contenant l'intron. Une hydrogénase fonctionnelle peut donc être finalement obtenue après traduction de l'ARN messenger mûri. La survie de la souche est donc possible tant que la souche *C. acetobutylicum* $\Delta cac1502\Delta upp\Delta buk$ *hydA60s::IT* (*hydA60s::IT*) contient bien le plasmide pCONSIntronhydAs.

Cette souche a été transformée par le plasmide pTLS-hydA qui contient une copie sauvage du gène *hydA*. Le plasmide pCONSIntronhydAs a été perdu et la souche ne contient plus que le plasmide pTLS-hydA. La survie de la souche n'est alors plus assurée par la maturation de l'intron au niveau du gène *hydA* chromosomique mais par la seule présence d'une copie du gène *hydA* sauvage porté par le plasmide pTLS-hydA.

La souche-outil que l'on souhaite obtenir correspond à la souche *hydA60s::IT* qui contient le plasmide pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP (CrHydA1_catP-UPP). La souche *hydA60s::IT* + CrHydA1_catP-UPP contiendrait alors les trois éléments nécessaires à l'établissement d'une souche-outil de criblage d'hydrogénases : 1) une altération sur le gène *hydA* sauvage correspondant à l'intron présent sur le gène *hydA* sauvage chromosomique, 2) le plasmide CrHydA1_catP-UPP possédant le gène codant pour l'hydrogénase CrHydA1 de *C. reinhardtii*, comme hydrogénase fonctionnelle, et le gène *catP* conférant la résistance au thiamphénicol et 3) le plasmide CrHydA1_catP-UPP contenant également le gène *upp* qui, combinaison avec le 5-Fluoro-Uracile (5-FU), correspond au système de pression de sélection. En effet, le gène *upp* code pour une uracile-phosphoribosyl transférase (UPRTase) qui entraîne la phosphorylation du 5-FU en 5-fluoro-UMP, un inhibiteur de la thymidylate synthase, toxique pour les cellules de *Clostridium acetobutylicum* [187].

L'outil de criblage désiré correspond donc à la souche *hydA60s::IT* + CrHydA1_catP-UPP et doit permettre de sélectionner des enzymes dont l'activité est au moins supérieure à celle de l'enzyme de *C. reinhardtii* (Figure 75).

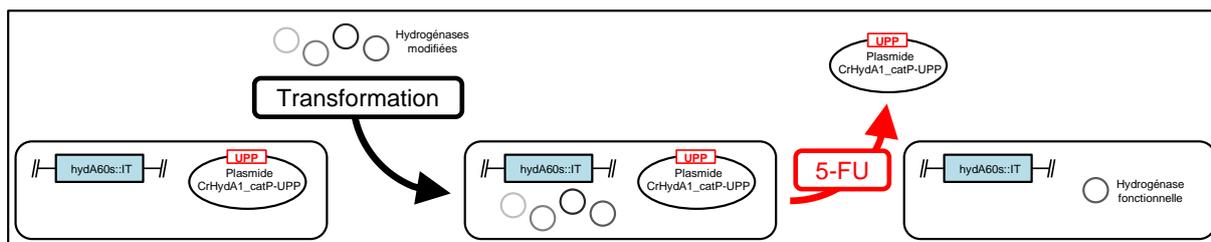


Figure 75: Stratégie d'utilisation de l'outil de criblage. La souche *hydA60s::IT* + *CrHydA1_catP-UPP* correspondant à l'outil de criblage, est transformée par les plasmides codant pour des hydrogénases modifiées. Après obtention de transformants, la pression de sélection est appliquée par ajout de 5-FU dans le milieu. Si l'enzyme modifiée possède une activité hydrogénase suffisante, le plasmide *CrHydA1_catP-UPP* est alors perdu. Une nouvelle souche contenant l'enzyme sélectionnée est alors obtenue.

Des lors, il sera possible de transformer cette souche par des plasmides permettant l'expression des séquences codantes des enzymes mutantes, et il sera possible de remplacer de ces souches le plasmide *CrHydA1_catP-UPP* en appliquant la pression de sélection par l'ajout de 5-FU dans le milieu. En effet, pour permettre la survie de la souche, la stratégie la plus simple consiste à perdre le plasmide possédant une copie du gène *upp*. Il ne restera alors dans les souches que les plasmides codants pour les variants des enzymes, parmi celles-ci seules les enzymes suffisamment actives *in vivo* pour permettre la croissance de la souche permettront l'obtention de colonies et seront donc sélectionnées (Figure 75).

La création d'un outil de criblage *in vivo* d'enzymes mutantes passe par le remplacement, au sein de la souche *hydA60s::IT*, du plasmide *pTLS-hydA* par le plasmide *pTSH-CrHydA1_Opt_C-Tag_catP-UPP* (*CrHydA1_catP-UPP*), pour obtenir la souche *hydA60s::IT* + *CrHydA1_catP-UPP*.

3.5.3. Résultats

3.5.3.1. Construction de la souche-outil de criblage

La souche *C. acetobutylicum* $\Delta cac1502\Delta upp\Delta buk$ *hydA60s::IT* + *pTLS_hydA* a été transformée par le plasmide *pPH-CaHydA-LL-C-Tag_catP-UPP* (*CaHydA_catP-UPP*). Des transformants ont été obtenus puis repiqués en cultures liquides successives, en présence de thiamphénicol, ceci permettant de perdre le plasmide *pTLS_hydA* au profit du plasmide *CaHydA_catP-UPP*, les deux plasmides ayant la même origine de répllication. La souche *C. acetobutylicum* $\Delta cac1502\Delta upp\Delta buk$ *hydA60s::IT* + *CaHydA_catP-UPP* (*hydA60s::IT* + *CaHydA_catP-UPP*) a donc été obtenue. Chez cette souche, l'hydrogénase chromosomique est inactivée et la

croissance est dépendante de l'hydrogénase portée par le plasmide CaHydA_catP-UPP.

Une stratégie identique a été mise en place pour obtenir la souche *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* à partir de la souche *hydA60s::IT + pTLS_hydA* ; cependant, après plusieurs repiquages en cultures liquides successives, il n'a pas été possible de perdre le plasmide pTLS_hydA, au profit du plasmide CrHydA1_catP-UPP, sans appliquer une pression de sélection.

La souche *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* a donc alors été utilisée comme un premier outil de criblage : cette souche a été transformée par le plasmide pTSH_CrHydA1_Opt_C-Tag (CrHydA1), des transformants ont été obtenus et la pression de sélection à l'aide du 5-FU a été utilisée pour éliminer le plasmide CaHydA_catP-UPP.

La souche *C. acetobutylicum Δcac1502ΔuppΔbuk hydA::intron + pTSH_CrHydA1_Opt_C-Tag (hydA60s::IT + CrHydA1)* a donc été obtenue. Il semblerait donc que l'hydrogénase de *C. reinhardtii* permet de restaurer une activité hydrogénase fonctionnelle suffisante pour la survie de la souche chez *C. acetobutylicum*, même s'il n'a pas été possible de remplacer le plasmide codant pour l'hydrogénase CaHydA par celui codant pour l'hydrogénase de *C. reinhardtii* en l'absence de système de pression de sélection.

L'obtention de cette souche permet en outre une première validation de la fonctionnalité de la souche *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* comme outil de criblage.

Enfin, la souche *hydA60s::IT + CrHydA1* a été transformée par le plasmide CrHydA1_catP-UPP, et en utilisant la stratégie de repiquage successifs en milieu liquide contenant du thiamphénicol, il est possible de perdre le plasmide CrHydA1 au profit du plasmide CrHydA1_catP-UPP. On valide alors l'obtention la souche *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP*, qui correspond à l'outil de criblage désiré.

3.5.3.2. Utilisation et validation de l'outil de criblage

En suivant la stratégie établie lors de la conception de l'outil de criblage (Figure 75), à partir de la souche *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP*, cinq nouvelles souches

exprimant les différentes enzymes variantes précédemment dessinées (Chapitre 3.1.2, Figure 39) ont été construites (Figure 76).

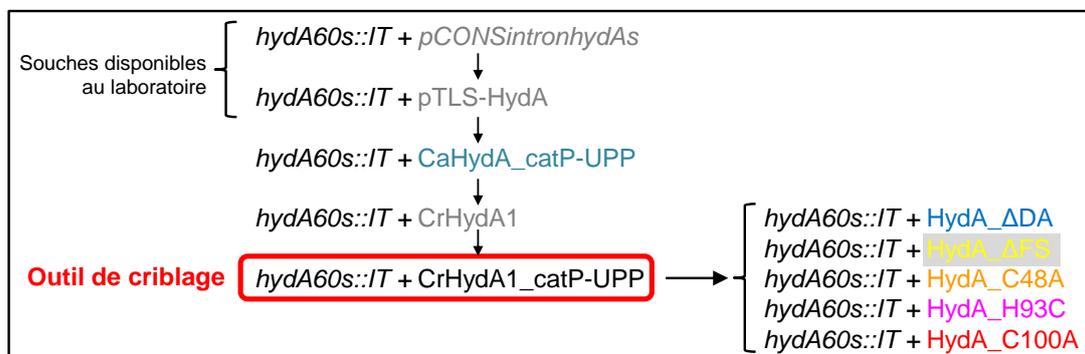


Figure 76: Généalogie des souches. A partir des souches disponibles au laboratoire, les souches *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* et *hydA60s::IT + CrHydA1* ont permis l'obtention de l'outil de criblage (souche *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP*), qui a permis ensuite l'obtention de différentes souches.

Les souches obtenues ont été validées par des réactions de PCR réalisées directement sur les cellules. Trois réactions de PCR différentes sont systématiquement utilisées : la première réaction permet de valider la présence de l'intron sur le gène *hydA* porté par le chromosome bactérien ; la deuxième réaction permet de valider la présence du plasmide codant pour l'hydrogénase variante (il est possible d'utiliser des oligonucléotides spécifiques d'une hydrogénase ou de réaliser des digestions enzymatiques des produits de réactions de PCR pour valider la présence de mutations ponctuelles) ; la troisième réaction permet de valider la perte du plasmide *CrHydA1_catP-UPP* (Figure 77).

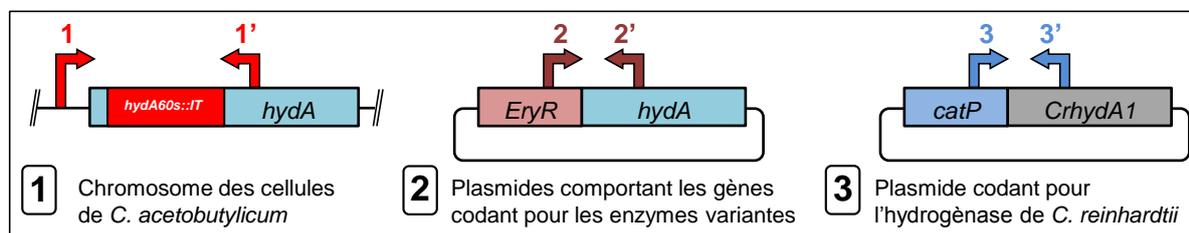


Figure 77: Validation génotypique des souches utilisées. La réaction de PCR 1 permet de valider la présence de l'intron sur le gène *hydA* chromosomique. La réaction de PCR 2 permet de valider et de séquencer les gènes des enzymes portés par les plasmides. La réaction de PCR 3 permet d'évaluer la présence de plasmide *CrHydA1_catP-UPP*.

Selon l'outil de criblage tel qu'il a été défini initialement et utilisé, toutes les enzymes présentes au sein des nouvelles souches obtenues semblent capables de restaurer

une activité hydrogénase suffisante à la survie de la souche. Ces résultats, de même que l'obtention de la souche possédant l'hydrogénase CrHydA1, sont surprenants, en particulier pour des hydrogénases dont l'activité est *a priori* très affectée comme l'enzyme HydA_ΔDA. Pour confirmer cette observation, les activités des différentes enzymes ont été évaluées.

3.5.3.3. Tests d'activités des enzymes

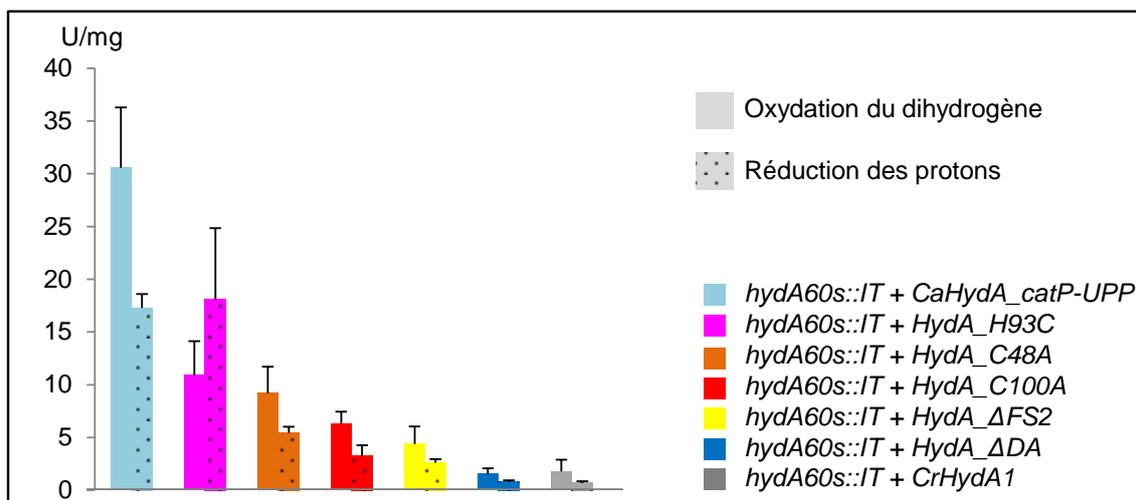


Figure 78: Tests d'activité des hydrogénases, évaluées sur extraits protéiques totaux obtenus à partir des cultures des différentes souches. Les activités d'oxydation du dihydrogène ou de réduction des protons des enzymes sont évaluées sur les extraits protéiques des différentes souches.

La figure 78 présente les activités d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons des différentes enzymes évaluées sur les extraits protéiques totaux. Par rapport à l'enzyme CaHydA, les activités de toutes les enzymes sont diminuées, hormis l'activité de production du dihydrogène de l'enzyme HydA_H93C. Il est difficile de conclure sur l'impact des différentes modifications réalisées, en particulier pour les mutations des centres fer-soufre de surface. Par ailleurs, les activités des enzymes CrHydA1 et HydA_ΔDA sont à la fois très proches et très faibles, ce qui correspond à ce qui était attendu. Toutefois, ces résultats semblent mettre en évidence l'implication de la présence des centres fer-soufre accessoires dans le maintien des capacités catalytiques sauvages de l'enzyme ; bien qu'il soit difficile de déterminer par quel phénomène.

3.5.3.4. Contrôle de la souche-outil

Du fait des résultats obtenus, il est primordial que plusieurs éléments de l'outil de criblage soient contrôlés. En effet, il semble étonnant que des souches avec des activités hydrogénases très faibles (activités de réduction des protons mesurées sur extraits protéiques totaux autour de 0.7 U/mg, pour les hydrogénases CrHydA1 et HydA_ΔDA) puissent survivre. Une cinétique de culture a permis de déterminer les profils de produits de fermentation des différentes souches afin d'évaluer l'impact phénotypique d'une modulation de l'activité hydrogénase au sein des souches *C. acetobutylicum* Δ*cac1502*Δ*upp*Δ*buk hydA60s::IT*.

3.5.3.4.1. Profils de fermentation des différentes souches

Les profils de fermentation obtenus pour les souches issues de la souche *hydA60s::IT* + *CaHydA_catP-UPP*, y compris, montrent le même profil de fermentation. Un rendement de production d'éthanol très élevée (autour de 1,4 mol/mol de glucose consommées) et un rendement de production de butanol (autour de 0,1 mol/ mol de glucose consommées) très faible sont déterminés. Ceci est surprenant, car même dans le cas où l'enzyme CaHydA est exprimée, il n'est pas possible de retrouver les rendements de production d'éthanol et de butanol (0.25 et 0.6 mol/mol de glucose consommées, respectivement) de la souche sauvage.

D'autre part, les profils de fermentation des nouvelles souches obtenues sont très homogènes avec uniquement de faibles variations observables alors même que les activités hydrogénase sont largement différentes.

Enfin, la modification des rendements de production en faveur des produits en C2 (éthanol) au détriment des produits en C4 (butanol) suggère une altération possible de l'activité de la thiolase.

Il paraît important de valider que la souche *hydA60s::IT* + *CrHydA1_catP-UPP* qui correspond à l'outil de criblage ne peut réellement survivre sans activité hydrogénase.

3.5.3.4.2. Tests 5-FU

Afin de vérifier que la présence d'une hydrogénase est indispensable au sein des souches, des tests de pression de sélection à l'aide de 5-FU ont été réalisés.

Il est nécessaire de valider que pour les trois souches *hydA60s::IT* + *pCONSIntronhydAs*, *hydA60s::IT* + *CaHydA_catP-UPP*, et *hydA60s::IT* + *CaHydA1_catP-UPP*, il est impossible de perdre le plasmide contenant à la fois le gène codant pour l'hydrogénase et le gène *upp*.

Les différentes cellules sont cultivées, diluées et étalées sur des boîtes de Pétri de milieu RCA contenant ou non du 5-FU. Un ratio est établi entre le nombre de clones obtenus sur les deux types de boîtes (Figure 79).

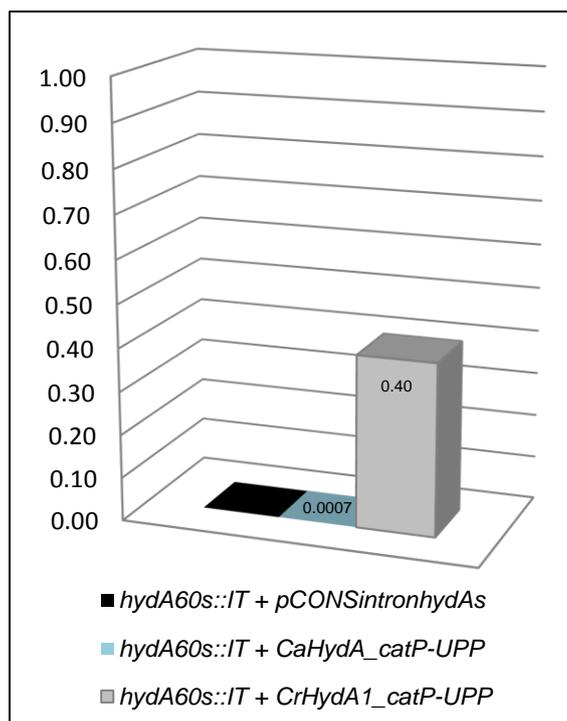


Figure 79: Contrôle de l'outil de criblage. Ratio du nombre de clones présents sur des boîtes de Pétri contenant ou non du 5-FU, déterminée pour les trois souches testées. Le ratio égal à 1 correspondrait à une souche pour laquelle, on retrouve autant de clones sur les boîtes contenant ou non du 5-FU ; et dont la croissance ne serait donc absolument pas dépendante de la présence d'une hydrogénase fonctionnelle.

Dans le cas de la souche *hydA60s::IT + pCONSintronhydAs*, aucun clone n'est obtenu sur boîte contenant du 5-FU ; la perte du plasmide est donc impossible. Dans le cas de la souche *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP*, le ratio est extrêmement faible, mais des clones sont pourtant obtenus ; enfin, dans le cas de la souche *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* de nombreux sont obtenus, avec un ratio élevé. Dans ces deux derniers cas, il est validé que les clones apparaissent car il ont perdu le plasmide contenant le gène *upp* ; cet évènement est aisément obtenu dans le cas de la souche *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* alors qu'il reste exceptionnel pour la souche *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP*.

Ces résultats montrent que la présence d'une hydrogénase fonctionnelle n'est pas nécessaire à la survie de la souche. Ceci remet en cause l'utilisation des souches construites et développées pour une utilisation en tant qu'outil de criblage d'enzymes mutantes *in vivo*. Enfin, une souche *C. acetobutylicum Δcac1502ΔuppΔbuk hydA60s::IT* n'exprimant plus d'hydrogénase fonctionnelle a été obtenue. Ceci est

contraire à ce qui a été décrit précédemment et laisse supposer qu'une modification du métabolisme connu de la bactérie *C. acetobutylicum* est intervenue.

3.5.3.4.3. Tests d'activité thiolase

La thiolase permet la condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétyl-CoA et conduit à l'orientation du flux métabolique vers la production de composés en C4, est évaluée. C'est une enzyme clé du métabolisme de *C. acetobutylicum* et il a récemment été montré que l'obtention d'une souche de *C. acetobutylicum* sans activité hydrogénase ne pouvait être obtenue qu'avec l'inactivation concomitante de l'activité thiolase. En effet, il a récemment été proposé qu'une souche mutante sans activité hydrogénase ne puisse pas rediriger le flux de carbone (inhibition simultanée des voies de production de l'acétate, du butyrate, de l'acétone et de l'acétoïne) pour ajuster le flux d'électrons et ne produire que de l'éthanol, du butanol et du lactate. De manière similaire, il est proposé qu'une souche mutante sans activité thiolase ne puisse pas rediriger le flux d'électrons pour s'adapter au flux de carbone vers la production d'éthanol uniquement. C'est pourquoi l'activité de la thiolase a été évaluée chez les différentes souches mutantes obtenues.

Toutefois, la production de glycérol pourrait permettre une consommation de l'excès de NADH produit lors de la formation de biomasse.

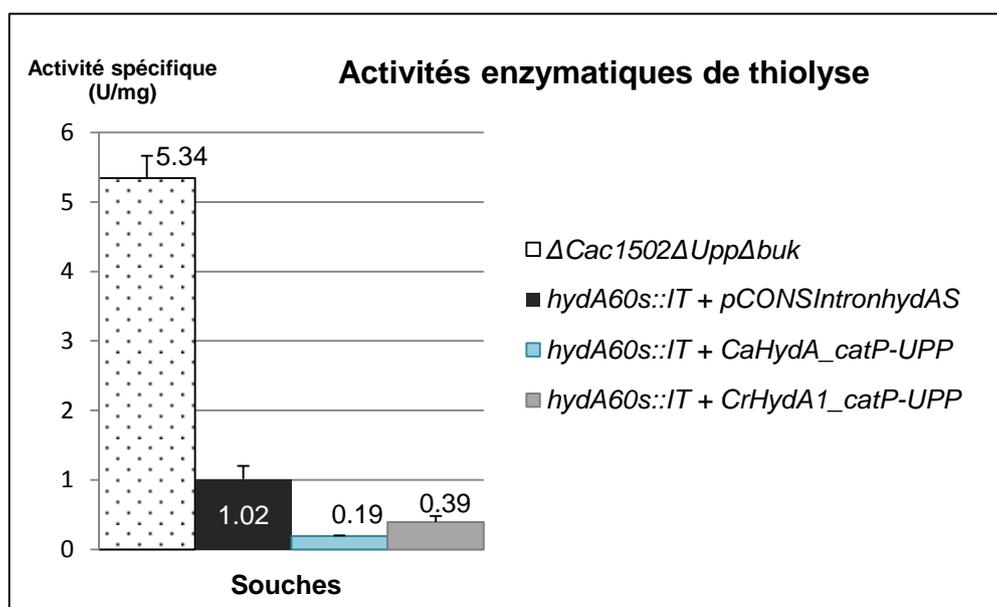


Figure 80: Evaluation de l'activité de la thiolase. Les activités de thiolase (dissociation de la molécule d'acétoacétyl-Co) sont évaluées sur les extraits protéiques totaux des différentes souches.

Une diminution de l'activité de thiolase d'un facteur 5 au minimum, est observée pour les trois souches *hydA60s::IT* testées par rapport à la souche contrôle. D'autre part, l'activité pour les souches *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* et *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* est encore abaissée, d'un facteur 2 à 5, par rapport à celle de la souche *hydA60s::IT + pCONSIntronhydAs*

Un séquençage du gène *thIA* chromosomique a alors été réalisé. Une mutation ponctuelle au niveau de la partie codante du gène *thIA* a alors été identifiée, chez les trois souches *hydA60s::IT + pCONSIntronhydAs*, *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* et *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* mais pas chez la souche contrôle.

Il est donc fortement probable que la mutation A9E observée, bien que n'étant pas située au niveau du site catalytique de l'enzyme, puisse être responsable des différences d'activité observées.

L'ensemble de ces résultats suggère donc, comme dans ce qui est rapporté dans la littérature, que l'obtention de souches pour lesquelles la croissance n'est plus dépendante de l'activité hydrogénase soit corrélée à une diminution d'activité thiolase. L'activité de la thiolase n'a pas été évaluée dans la souche *hydA60s::IT*, mais le profil de produits de fermentation a été déterminé.

3.5.3.5. Profils produits de la nouvelle souche

La nouvelle souche *hydA60s::IT* qui ne contient pas de plasmide a été cultivée et les produits de fermentation ont été déterminés. Cette souche produit une forte concentration de lactate qui conduit à une acidification rapide du milieu de culture et provoque l'arrêt des cultures. De nouvelles cultures, où le pH a été ajusté ont été réalisées et les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus pour les souches *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* et *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* (Figure 81).

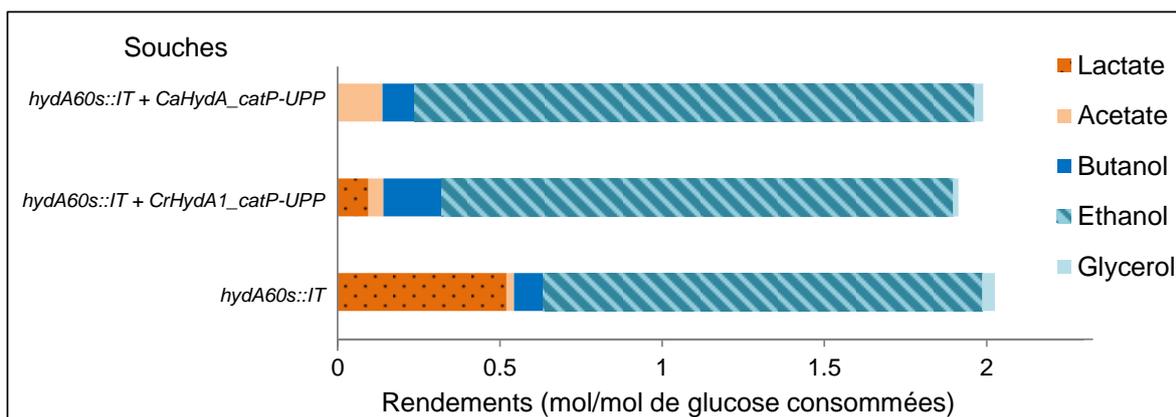


Figure 81: Profils des produits de fermentation des souches *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP*, *hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP* et *hydA60s::IT*.

Il est à noter que ces trois souches montrent le maintien d'une faible production de butanol malgré la diminution de l'activité thiolase. Ces souches présentent également une production de glycérol, qui correspond à une voie métabolique permettant la consommation d'un excès de NADH issus de la formation de biomasse.

Cependant la souche *hydA60s::IT* produit, comme la souche dont elle est issue, majoritairement de l'éthanol mais aussi de grande quantité de lactate. Un effet phénotypique de la présence d'activités hydrogénases variables au sein des souches *hydA60s::IT* est donc observé. Dans la souche *hydA60s::IT*, la production de lactate mesurée correspond avec la production d'éthanol à la seule voie possible de consommation de l'excès de NADH issu de la glycolyse en l'absence d'une activité de la thiolase normale. Toutefois, la production d'éthanol n'est que faiblement abaissée par rapport à la souche *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* qui possède la plus forte activité hydrogénase, mesurée *in vitro*. Une grande production d'éthanol est observée dans cette dernière souche ; ce phénotype ressemble au profil de fermentation en situation d'alcoologénèse. L'état d'alcoologénèse correspond à un état physiologique stable, obtenu artificiellement, caractérisé par une grande disponibilité en NADH, qui peut être atteint lorsque l'activité hydrogénase est diminuée [10].

Dès lors, la part de la ferrédoxine réduite, issue majoritairement de la décarboxylation du pyruvate, qui est théoriquement régénérée par l'hydrogénase, devrait être questionnée ; de même que les mécanismes de régulation de la thiolase.

à l'enzyme sauvage. Des contraintes métaboliques imprévisibles et inconnues au début de ces travaux n'ont pas permis de développer la souche-outil pour le criblage d'hydrogénases mutantes fonctionnelles *in vivo*. En effet, les souches de travail construites et finalement isolées n'ont plus une croissance dépendante de l'activité hydrogénase. Toutefois, des contrôles ont permis de mettre en évidence différentes caractéristiques des souches.

Une mutation retrouvée systématiquement au niveau du gène de la thiolase chez les souches *hydA60s::IT* et entraînant une diminution de l'activité a été identifiée. Il semble que cet évènement ait permis par la suite l'obtention d'une souche dans laquelle l'activité hydrogénase n'est plus indispensable. Toutefois, une faible production de butanol est toujours observée, ce qui traduit une activité thiolase résiduelle. La diminution des activités observées pourrait également être due à des défauts de régulation de l'activité thiolase, éventuellement par la protéine Rex qui réprime normalement l'expression de la thiolase dans des conditions d'excès en cofacteur réduits [18,34].

Deuxièmement, bien que les activités des hydrogénases ne soient pas indispensables à la croissance des souches, on observe des effets phénotypiques de leur présence, en particulier en termes de production de lactate. Chez les souches *hydA60s::IT*, les rendements de production d'éthanol sont mesurés proche de 2 mol/mol de glucose consommées, en particulier dans le cas de la souche possédant le plasmide CaHydA_catP-UPP. Ceci est très proche du rendement théorique maximum qui est possible uniquement si deux moles de NADH « supplémentaires » sont produites par mole de glucose consommée.

Etant donné que la décarboxylation du pyruvate produit de la ferrédoxine réduite, l'unique solution est l'intervention d'une ferrédoxine-NAD⁺ réductase pour la régénération de ces deux moles de NADH à partir de ferrédoxine réduite. A l'heure actuelle, l'enzyme possédant l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase n'a pas été spécifiquement identifiée bien que son intervention dans l'obtention de l'état d'alcoologénèse ait été proposée.

Mise à part la faible production de glycérol et la production de lactate, réalisées indépendamment de la ferrédoxine, il est très surprenant que les phénotypes

observés soient liés à la présence d'une hydrogénase alors même que cette enzyme est impliquée dans l'élimination du pouvoir réducteur à partir de ferrédoxine réduite.

De travaux complémentaires sont nécessaires pour approfondir l'étude des mécanismes métaboliques mis en jeu en particulier pour ce qui est de la modulation des activités hydrogénases et des conditions de cultures des souches.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les travaux réalisés dans le cadre de ce doctorat visaient à répondre à deux objectifs. Dans le premier temps, ils avaient pour but d'étudier l'implication des centres fer-soufre accessoires du Domaine F, d'une part, dans les capacités catalytiques de l'hydrogénase CaHydA de *C. acetobutylicum*, et, d'autre part, dans le transfert d'électrons avec le partenaire rédox physiologique, la ferrédoxine. Dans un deuxième temps, ces travaux visaient également à créer et développer une souche-outil de *C. acetobutylicum* dont le métabolisme réorienté était dépendant de l'activité de l'hydrogénase afin de permettre le criblage *in vivo* d'enzymes actives.

Pour répondre à ces objectifs rarement étudiés, une première approche de caractérisation de différents variants de l'hydrogénase a été développée. Différentes hydrogénases ont été rationnellement conçues : des hydrogénases variantes de l'enzyme sauvage CaHydA, altérées dans leur composition en centres fer-soufre et des hydrogénases chimériques élaborées à partir de domaines protéiques des enzymes CaHydA et CrHydA1 de *C. reinhardtii*.

Les travaux réalisés ont permis d'une part, d'optimiser le protocole de purification de l'enzyme sauvage CaHydA afin d'améliorer la reproductibilité des manipulations, la qualité et la quantité des enzymes purifiées. L'utilisation de l'enzyme purifiée a pu être valorisée par la publication de quatre articles scientifiques en collaboration avec le Laboratoire de Génie Chimique de Toulouse et le Laboratoire de Bioénergétique et Ingénierie des protéines de Marseille [5,128,130,189].

D'autre part, les expérimentations réalisées ont permis de mettre au point une nouvelle méthode d'expression, de production et de purification de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] dont la pureté, la qualité et la fonctionnalité ont été validées. L'obtention de grandes quantités de ferrédoxine était le prérequis permettant la caractérisation biochimique complète de toutes les hydrogénases.

Plusieurs hydrogénases variantes ont été purifiées et la détermination des activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons avec le méthyl viologène (MV) comme partenaire rédox a systématiquement été réalisée. Il est à noter cependant que pour les enzymes HydA_H93C et HydA_ΔFS2, de trop grandes

variations ont été observées dans la pureté et dans la détermination des activités spécifiques, ce qui n'a pas permis de poursuivre la caractérisation biochimique complète de ces hydrogénases.

Les enzymes purifiées CaHydA, HydA_ΔDA, HydA_C48A et HydA_C100A ont été caractérisées en détail par des méthodes spectroscopiques et biophysiques.

L'enregistrement des spectres UV-Visibles et des spectres RPE, de même que la mesure de la composition en atomes de fer de chaque enzyme a permis de valider la stratégie employée et la qualité des enzymes. La conservation des éléments de structure secondaire, de la voie de transfert de protons, ou de l'environnement du site catalytique a été validée chez les différentes enzymes à l'aide de techniques appropriées. Les activités des enzymes ont ensuite été explorées par électrochimie sur une grande gamme de potentiels et par des tests d'activité en solution. Pour des potentiels proches du potentiel du couple $2\text{H}^+/\text{H}_2$, les diminutions des activités des enzymes variantes mesurées sont qualitativement les mêmes pour des activités mesurées en présence ou en l'absence de donneur ou d'accepteur d'électrons.

Jusqu'à présent une telle approche expérimentale afin de définir l'implication des centres fer-soufre du Domaine F sur les capacités catalytiques de l'enzyme n'a jamais été réalisée.

Il serait intéressant de compléter cette étude par des expérimentations de QM/MM pour étudier l'augmentation possible du potentiel du Cluster H due à la présence des centres fer-soufre du Domaine F. En effet des études précédentes ont pu mettre en évidence que les états rédox du Cluster H pouvaient varier en fonction de ceux des centres fer-soufre accessoires [148]

Enfin, la comparaison des paramètres cinétiques k_{cat} et K_m des hydrogénases CaHydA, HydA_C100A et HydA_C48A, mesurées dans les deux sens catalytiques, avec le méthyl viologène et la ferrédoxine comme partenaires rédox, a permis de mettre en évidence l'implication privilégiée du centre fer-soufre FS2 dans l'interaction avec la ferrédoxine $2[4\text{Fe-4S}]$. Ce mécanisme d'interaction démontré pour la première fois expérimentalement par l'approche biochimique a pu être confirmé par une approche de modélisation moléculaire. Celle-ci qui a permis également de proposer l'implication de certains acides aminés dans la liaison entre les deux partenaires et de suggérer la possibilité de changements conformationnels de l'enzyme liés à l'état rédox du centre fer-soufre FS2 [58,59,135].

L'ensemble de ces résultats ont conduit à la rédaction et à la soumission d'un article scientifique à la revue BBA Bioenergetics, actuellement en révision..

Les résultats obtenus ont permis d'obtenir des informations sur l'interaction directe du méthyl viologène avec le site catalytique de l'enzyme. En effet, les activités d'oxydation du dihydrogène ou de réduction des protons mesurées avec le méthyl viologène nécessitent un transfert d'électrons. Ces activités varient de la même façon que celles mesurées par la réaction d'échange proton/deutérium et renseignent donc assez justement sur les capacités catalytiques du site actif de l'enzyme. De ce fait, il a été proposé une interaction directe du méthyl viologène avec le Cluster H de l'enzyme, confirmé par la suite par une l'approche de modélisation moléculaire. D'autre part, l'implication des centres fer-soufre de surface, et du centre FS4C en particulier, dans le phénomène de biais catalytique a également pu être proposée.

L'étude du variant HydA_ΔDA a permis d'une part de mettre en évidence que la sensibilité à l'oxygène différente retrouvée chez les hydrogénase de type M1 et M3 ne semble pas être liée uniquement à la présence des centres fer-soufre accessoires [137], et d'autre part de confirmer la spécificité des partenaires d'oxydoréduction des hydrogénases. En effet, les efficacités catalytiques de l'hydrogénase HydA_ΔDA avec la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] sont drastiquement diminuées par rapport à l'enzyme CaHydA sauvage. D'autre part, l'absence, chez l'enzyme HydA_ΔDA, de certains résidus retrouvés chez l'enzyme CrHydA1, limite grandement l'interaction entre la ferrédoxine de plante [2Fe-2S] et ce variant de l'hydrogénase.

La deuxième partie de l'étude était basée sur la création d'une souche de *C. acetobutylicum* dont la croissance serait dépendante de l'activité d'une hydrogénase exprimée à partir d'un plasmide. L'utilisation d'une telle souche-outil permettrait le criblage direct *in vivo* d'hydrogénases variantes fonctionnelles. En effet, une souche ingénierée de *C. acetobutylicum* chez laquelle le gène chromosomique codant pour l'hydrogénase serait inactivé, devait permettre le criblage d'hydrogénases surexprimées à partir d'un plasmide, capables de l'oxydation de la ferrédoxine réduite et possédant une activité de réduction des protons au moins égale à celle de l'hydrogénase CrHydA1 retrouvée chez *C. reinhardtii*.

La souche outil de sélection a pu être obtenue comme initialement conçue. Toutefois elle n'a pu être utilisée uniquement pour la détermination des activités d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons de certaines hydrogénases variantes. En effet, les stratégies de sélection d'enzymes variantes n'ont pas pu être réalisées : une adaptation inattendue du métabolisme de la souche a été observé, celle-ci étant capable de se développer même en absence d'une activité hydrogénase. Plusieurs résultats ont cependant pu être obtenus suite aux expérimentations réalisées à partir de cette souche

Les tests d'activité d'oxydation du dihydrogène et réduction des protons, réalisés sur les extraits bruts protéiques totaux de souches exprimants différents variants de l'hydrogénase ont permis de mettre en évidence un impact de la présence des centres fer-soufre sur les capacités des enzymes. Néanmoins, ces résultats sont en partie différents de ceux obtenus suite à la purification et la caractérisation de certains variants de l'hydrogénase. Dans le cas des variants HydA_C48A et HydA_ΔDA, les activités obtenues par les deux approches sont homogènes alors que des grandes variations sont observées dans le cas des hydrogénases HydA_H93C, HydA_C100A et HydA_ΔFS2. Des défauts d'expression de certaines enzymes, dans l'un ou l'autre des systèmes pourraient expliquer en partie les différences des activités mesurées par les deux approches.

En effet, la mesure des activités des hydrogénases sur extraits protéiques totaux est une méthode comparative qui peut être utilisée uniquement si les différentes enzymes sont exprimées de manière similaire dans les différentes souches et les problèmes d'expression, de repliement et de dégradation prématurée de certaines enzymes ne peuvent pas être pris en compte.

Bien que la souche-outil soit inutilisable pour la sélection d'enzymes actives, les travaux ayant menés à sa conception et à son obtention ont permis d'obtenir des résultats intéressants concernant les mécanismes des enzymes et le métabolisme de la bactérie *C. acetobutylicum*.

Le développement de la souche outil était basé sur l'utilisation de l'hydrogénase CrHydA1 de *C. reinhardtii* comme hydrogénase fonctionnelle minimale au sein d'une souche ingénierée de *C. acetobutylicum*. L'activité de réduction des protons, mesurée *in vitro* avec le méthyl viologène comme partenaire rédox, de l'enzyme CrHydA1 de *C. reinhardtii* n'est que trois fois plus faible que celle de l'enzyme

CaHydA de *C. acetobutylicum*. Ceci aurait permis de sélectionner des enzymes dont l'activité est au moins égale à celle de l'enzyme retrouvée chez *C. reinhardtii* (et potentiellement inférieure à celle de l'enzyme CaHydA). Toutefois, il aurait fallu pour cela que l'enzyme CrHydA1 puisse maintenir une activité *in vivo* d'oxydation de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] chez *C. acetobutylicum* correcte. Il semble que cela soit la limite majeure au développement de la souche-outil telle qu'elle fut conçue à l'origine. En effet, la caractérisation biochimique de certains variants de hydrogénase, et en particulier de l'enzyme HydA_ΔDA, réalisée lors de la première approche, a montré l'importance de la spécificité des interactions entre la ferrédoxine et l'hydrogénase. De plus, les mécanismes de liaison et de transfert d'électrons entre l'hydrogénase CrHydA1 de *C. reinhardtii* et la ferrédoxine [2Fe-2S] sont également très particuliers. De ce fait, il semble que l'enzyme CrHydA1 ne puisse pas avoir une activité d'oxydation de la ferrédoxine bactérienne 2[4Fe-4S] suffisante à la survie d'une souche de *C. acetobutylicum* présentant un métabolisme classique.

De ce fait, *a posteriori*, l'obtention même de la souche-outil s'avère déconcertante. Il a récemment été montré que l'inactivation totale de l'activité hydrogénase au sein d'une souche de *C. acetobutylicum*, ne pouvait être obtenue qu'avec l'inactivation concomitante de l'activité thiolase [194]. Des tests d'activité sur extraits protéique totaux ont montré que l'activité thiolase était déjà affectée dans la souche de travail initiale *hydA60s::IT + pCONSIntronhydAs*, ceci en lien avec une mutation présente au niveau du gène de l'enzyme. Il est possible de proposer, qu'au sein de la souche *hydA60s::IT + pCONSIntronhydAs*, le maintien d'une activité hydrogénase sauvage ne soit pas possible par l'unique maturation de l'intron sur le gène *hydA* sauvage grâce au plasmide *pCONSIntronhydAs* et que la souche ait alors évolué pour diminuer l'activité de thiolase. Ce dernier évènement aurait alors permis ensuite de diminuer les niveaux d'activité hydrogénase dans la souche pour, premièrement obtenir la souche-outil telle que conçue initialement, et deuxièmement obtenir une souche de *C. acetobutylicum* où l'activité hydrogénase n'est absolument plus indispensable.

Par ailleurs, les profils de fermentation des souches, présentant trois niveaux d'activité hydrogénase croissants (pas d'enzyme, hydrogénase CrHydA1 et hydrogénase CaHydA), sont particulièrement intéressants. Les productions d'acétate, de butanol et de glycérol sont assez homogènes entre les trois souches et les différences majeures sont observées pour les productions d'éthanol et de lactate.

Ces deux dernières voies de production sont consommatrices de NADH et la différence majeure concerne la production de ferrédoxine réduite. En effet, la production de lactate se fait directement à partir du pyruvate alors que la production d'éthanol implique la production d'acétyl-CoA, réalisée par la Pfor qui génère de la ferrédoxine réduite qui doit être re-oxydée.

Le rendement théorique maximum de production d'éthanol chez *C. acetobutylicum* est de deux moles d'éthanol par moles de glucose consommées ; mais cela est possible uniquement si toute la ferrédoxine réduite conduit à la production de NADH, par l'action d'une ferrédoxine-NAD⁺ réductase. Ce rendement de production est quasiment atteint avec la souche *hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP* qui présente la plus forte activité hydrogénase mesurée *in vitro* ; alors qu'au sein des autres souches, la production de lactate permet une consommation du NADH indépendamment de la production de ferrédoxine réduite. Il semble alors très inattendu que l'augmentation l'activité ferrédoxine-NAD⁺ réductase puisse être liée à l'augmentation théorique de l'activité hydrogénase, puisque l'hydrogénase est métaboliquement impliquée dans l'oxydation de la ferrédoxine réduite conduisant à la réduction des protons et la formation de dihydrogène.

Ces différences dans les profils de produits de fermentation pourraient également être liées à la surexpression d'une flavodoxine multimérique récemment décrite impliquée dans le transfert d'électrons [11]. Cette protéine, codée par le gène *CA_C3486* est retrouvée surexprimée dans des conditions d'alcoologénèse où il y a une forte disponibilité du NADH. Elle pourrait alors permettre un transfert d'électrons facilité entre la ferrédoxine réduite et la ferrédoxine-NAD⁺ réductase.

Finalement, ce travail a permis de mettre en évidence, par la caractérisation de variants de l'hydrogénase de *C. acetobutylicum*, l'implication des centres fer-soufre du domaine F dans les capacités catalytiques de l'enzyme. La prolongation des travaux sur certains variants de l'hydrogénase (*HydA_ΔFS2* et *HydA_H93C*), de nouveaux variants, ou des enzymes chimériques, pourraient permettre d'affiner les résultats obtenus en particulier pour ce qui est de l'interaction entre la ferrédoxine et l'hydrogénase ou la question du biais catalytique. L'établissement au sein du laboratoire d'un système d'expression hétérologue des hydrogénases chez *E. coli*, proche du système qui a permis la purification de la ferrédoxine recombinante devrait

permettre de gagner un temps précieux sur les manipulations. Ceci pourrait permettre d'augmenter encore les quantités de protéines purifiées afin d'accéder à des techniques de caractérisation des enzymes nécessitant beaucoup de matériel biologique (Spectroscopie RPE et FTIR par exemple).

La souche-outil de sélection d'enzymes actives chez *C. acetobutylicum* n'a finalement pas été obtenue mais les travaux réalisés ont permis de révéler certains mécanismes métaboliques de la souche, en particulier les capacités de la bactérie à mettre en place différents moyens pour réguler les flux d'électrons. Un nouvel outil de criblage d'enzymes actives chez *C. acetobutylicum* pourrait être développé avec l'utilisation de plasmides non-réplicatifs permettant l'inactivation de gènes récemment décrits [194]. Ce système pourrait être utilisé uniquement si le métabolisme des souches construites est parfaitement validé ; en effet, il a été montré que la bactérie faisait preuve de flexibilité métabolique, ce qui entraînait l'obtention de phénotypes non désirés. Un système de criblage d'hydrogénases pourrait également être mis au point chez *E. coli*. Il faudrait pour cela, après avoir délété les gènes codant pour des enzymes responsables de la consommation du pyruvate en anaérobiose introduire chez cette bactérie la Pfor et la ferrédoxine de *C. acetobutylicum*. En conditions de culture strictement anaérobies, sur milieu synthétique, les voies de production et la croissance de la souche seraient alors dépendantes de l'oxydation de la ferrédoxine réduite, produite lors de la décarboxylation du pyruvate par la Pfor, par une hydrogénase fonctionnelle.

Ce système pourrait également être couplé avec des méthodes de détection du dihydrogène produit *in vivo*, qui pourraient être mis en relation avec les différents niveaux d'efficacité catalytiques d'hydrogénases purifiées caractérisées *in vitro*.

Références bibliographiques

- [1] S. Sharma, S.K. Ghoshal, Hydrogen the future transportation fuel: From production to applications, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 43 (2015) 1151–1158. doi:10.1016/j.rser.2014.11.093.
- [2] B. Soni, P. Soucaille, G. Goma, Continuous acetone-butanol fermentation - influence of vitamins on the metabolic-activity of *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1987) 1–5.
- [3] J. Meyer, [FeFe] hydrogenases and their evolution: A genomic perspective, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1063–1084. doi:10.1007/s00018-007-6477-4.
- [4] J. Esselborn, C. Lambertz, A. Adamska-Venkatesh, T. Simmons, G. Berggren, J. Noth, J.F. Siebel, A. Hemschemeier, V. Artero, E. Reijerse, M. Fontecave, W. Lubitz, T. Happe, Spontaneous activation of [FeFe]-hydrogenases by an inorganic [2Fe] active site mimic., *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 607–9. doi:10.1038/nchembio.1311.
- [5] A. Kubas, C. Orain, D. De Sancho, L. Saujet, M. Sensi, C. Gauquelin, P.S. Isabelle Meynial-Salles, H. Bottin, C. Baffert, V. Fourmond, R. Best, J. Blumberger, C. Léger, Mechanism of O₂ diffusion and reduction in FeFe hydrogenase, *Nat. Chem.* (2016). doi:10.1038/nchem.2592.
- [6] B.P. Tracy, S.W. Jones, A.G. Fast, D.C. Indurthi, E.T. Papoutsakis, Clostridia: The importance of their exceptional substrate and metabolite diversity for biofuel and biorefinery applications, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2012) 364–381. doi:10.1016/j.copbio.2011.10.008.
- [7] J. Nölling, 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, D.R. Smith, Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*, *J. Bacteriol.* 183 (2001) 4823–4838. doi:10.1128/JB.183.16.4823-4838.2001.
- [8] E. Cornillot, C. Croux, P. Soucaille, Physical and genetic map of the *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 chromosome, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 7426–7434.
- [9] I. Vasconcelos, L. Girbal, P. Soucaille, Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of Regulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* Grown in Chemostat Culture at Neutral pH on Mixtures of Gluco, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 1443–1450.
- [10] S. Peguin, P. Soucaille, Modulation of Carbon and Electron Flow in *Clostridium acetobutylicum* by Iron Limitation and Methyl Viologen Addition, 61 (1995) 403–405.
- [11] M. Yoo, G. Bestel-Corre, C. Croux, A. Riviere, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, A Quantitative System-Scale Characterization of the Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*., *MBio.* 6 (2015) e01808–15. doi:10.1128/mBio.01808-15.
- [12] B. Meinecke, J. Bertram, G. Gottschalk, Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*, *Arch. Microbiol.* 152 (1989) 244–250. doi:10.1007/BF00409658.
- [13] M.S. Mann, T. Lütke-Eversloh, Thiolase engineering for enhanced butanol production in *Clostridium acetobutylicum*, *Biotechnol. Bioeng.* 110 (2013) 887–897. doi:10.1002/bit.24758.
- [14] C.M. Cooksley, Y. Zhang, H. Wang, S. Redl, K. Winzer, N.P. Minton, Targeted mutagenesis of the *Clostridium acetobutylicum* acetone-butanol-ethanol fermentation pathway, *Metab. Eng.* 14 (2012) 630–641. doi:10.1016/j.ymben.2012.09.001.
- [15] D.P. Wiesenborn, F.B. Rudolph, E.T. Papoutsakis, Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents., *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 2717–22. /pmc/articles/PMC204361/?report=abstract.

- [16] D.P. Wiesenborn, F.B. Rudolph, E.T. Papoutsakis, Thiolase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and Its Role in the Synthesis of Acids and Solvents., *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 2717–22. /pmc/articles/PMC204361/?report=abstract.
- [17] Y. Zheng, L. Li, M. Xian, Y. Ma, J. Yang, X. Xu, D. He, Problems with the microbial production of butanol, (2009) 1127–1138. doi:10.1007/s10295-009-0609-9.
- [18] S. Kim, Y.-S. Jang, S.-C. Ha, J.-W. Ahn, E.-J. Kim, J. Hong Lim, C. Cho, Y. Shin Ryu, J.H. Lim, S.K. Lee, S.Y. Lee, K.-J. Kim, Redox-switch regulatory mechanism of thiolase from *Clostridium acetobutylicum*, *Nat. Commun.* 6 (2015) 8410. doi:10.1038/ncomms9410.
- [19] B. Sommer, D. Garbe, P. Schrepfer, T. Brück, Characterization of a highly thermostable β -hydroxybutyryl CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 98 (2013) 138–144. doi:10.1016/j.molcatb.2013.10.014.
- [20] D. Lehmann, T. Lütke-Eversloh, Switching *Clostridium acetobutylicum* to an ethanol producer by disruption of the butyrate/butanol fermentative pathway, *Metab. Eng.* 13 (2011) 464–473. doi:10.1016/j.ymben.2011.04.006.
- [21] E.-J. Kim, J. Kim, J.-W. Ahn, Y.-J. Kim, J.H. Chang, K.-J. Kim, Crystal Structure of (s) 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium butyricum* and its mutations that enhance reaction kinetics, *J. Microbiology Biotechnol.* 24 (2014) 1636–1643. doi:10.4014/jmb.1407.07027.
- [22] V.K. Madan, P. Hillmer, G. Gottschalk, Purification and properties of NADP-dependent L(+)-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium kluveri*., *Eur. J. Biochem.* 32 (1973) 51–6. doi:10.1016/S0076-6879(05)03035-1.
- [23] F. Li, J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel, R.K. Thauer, Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluveri*, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 843–850. doi:10.1128/JB.01417-07.
- [24] W. Buckel, R.K. Thauer, Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827 (2013) 94–113. doi:10.1016/j.bbabi.2012.07.002.
- [25] Z.L. Boynton, G.N. Bennett, F.B. Rudolph, Cloning, sequencing, and expression of clustered genes encoding beta-hydroxybutyryl-coenzyme A (CoA) dehydrogenase, crotonase, and butyryl-CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824, *J. Bacteriol.* 178 (1996) 3015–3024.
- [26] Z.L. Boynton, G.N. Bennett, F.B. Rudolph, Cloning, sequencing, and expression of genes encoding phosphotransacetylase and acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC Cloning, Sequencing, and Expression of Genes Encoding Phosphotransacetylase and Acetate Kinase from *Clostridium acetobu*, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 2758–2766.
- [27] K. Winzer, K. Lorenz, P. Dürre, Acetate kinase from *Clostridium acetobutylicum*: A highly specific enzyme that is actively transcribed during acidogenesis and solventogenesis, *Microbiology.* 143 (1997) 3279–3286. doi:10.1099/00221287-143-10-3279.
- [28] J.W. Cary, D.J. Petersen, E.T. Papoutsakis, G.N. Bennett, Cloning and Expression of *Clostridium acetobutylicum* Phosphotransbutyrylase and Butyrate Kinase Genes in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 4613–4618.
- [29] L. Sullivan, M.S. Cates, G.N. Bennett, Structural correlations of activity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butyrate kinase isozymes, *Enzyme Microb. Technol.* 46 (2010) 118–124. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.10.001.
- [30] E.M. Green, Z.L. Boynton, L.M. Harris, F.B. Rudolph, E.T. Papoutsakis, G.N. Bennett, Genetic manipulation of acid formation pathways by gene inactivation in, (2016) 2079–2086.

- [31] N.R. Palosaari, P. Rogers, Purification and properties of the inducible coenzyme A-linked butyraldehyde dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2971–2976.
- [32] M. Yoo, C. Croux, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, Elucidation of the roles of adhE1 and adhE2 in the primary metabolism of *Clostridium acetobutylicum* by combining in-frame gene deletion and a quantitative system-scale approach, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016) 92. doi:10.1186/s13068-016-0507-0.
- [33] L. Fontaine, I. Meynial-salles, L. Girbal, X. Yang, C. Croux, P. Soucaille, 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, 184 (2002) 821–830. doi:10.1128/JB.184.3.821.
- [34] M. Wietzke, H. Bahl, The redox-sensing protein Rex, a transcriptional regulator of solventogenesis in *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 749–761. doi:10.1007/s00253-012-4112-2.
- [35] D. Liu, Y. Chen, F. Ding, T. Guo, J. Xie, W. Zhuang, H. Niu, X. Shi, C. Zhu, H. Ying, Simultaneous production of butanol and acetoin by metabolically engineered *Clostridium acetobutylicum*, *Metab. Eng.* 27C (2014) 107–114. doi:10.1016/j.ymben.2014.11.002.
- [36] J. Meyer, [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1063–1084. doi:10.1007/s00018-007-6477-4.
- [37] B.M. Hoffman, D. Lukoyanov, Z.Y. Yang, D.R. Dean, L.C. Seefeldt, Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: The next stage, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4041–4062. doi:10.1021/cr400641x.
- [38] J.-S. Chen, Nitrogen Fixation in the Clostridia, in: *Genet. Regul. Nitrogen Fixat. Free. Bact.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2005: pp. 53–64. doi:10.1007/1-4020-2179-8_3.
- [39] H. Schindelin, C. Kisker, J.L. Schlessman, J.B. Howard, D.C. Rees, Structure of ADP·AIF₄ — stabilized nitrogenase complex and its implications for signal transduction, *Nature.* 387 (1997) 370–376. doi:10.1038/387370a0.
- [40] P.C. Dos Santos, 14 Fe-S assembly in Gram-positive bacteria, (2014). doi:10.1515/9783110308426.347.
- [41] E.S. Boyd, G.J. Schut, E.M. Shepard, J.B. Broderick, M.W.W. Adams, J.W. Peters, Origin and evolution of Fe-S proteins and enzymes, *Iron Sulfur Clust. Chem. Biol.* (2014).
- [42] H. Beinert, Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises., *J. Biol. Inorg. Chem.* 5 (2000) 2–15. doi:10.1007/s007750050002.
- [43] C. Kennedy, P. Bishop, Genetics of Nitrogen Fixation and Related Aspects of Metabolism in Species of *Azotobacter*: History and Current Status, in: *Genet. Regul. Nitrogen Fixat. Free. Bact.*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2005: pp. 27–52. doi:10.1007/1-4020-2179-8_2.
- [44] B. Blanc, C. Gerez, S. Ollagnier de Choudens, Assembly of Fe/S proteins in bacterial systems. Biochemistry of the bacterial ISC system, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1436–1447. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.12.009.
- [45] B. Roche, L. Aussel, B. Ezraty, P. Mandin, B. Py, F. Barras, Reprint of: Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827 (2013) 923–937. doi:10.1016/j.bbabi.2013.05.001.
- [46] F. Wayne Outten, Recent advances in the Suf Fe-S cluster biogenesis pathway: Beyond the Proteobacteria, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1464–1469. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.001.

- [47] M.K. Akhtar, P.R. Jones, Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H₂-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78 (2008) 853–62. doi:10.1007/s00253-008-1377-6.
- [48] G. Caserta, A. Adamska-venkatesh, L. Pecqueur, M. Atta, V. Artero, S. Roy, E. Reijerse, W. Lubitz, M. Fontecave, Chemical assembly of multiple metal cofactors : The heterologously expressed multidomain [FeFe] -hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*, *BBA - Bioenerg.* 1857 (2016) 1734–1740. doi:10.1016/j.bbabi.2016.07.002.
- [49] H. Huang, L. Hu, W. Yu, H. Li, F. Tao, H. Xie, S. Wang, Heterologous overproduction of 2[4Fe4S]- and [2Fe2S]-type clostridial ferredoxins and [2Fe2S]-type agrobacterial ferredoxin, *Protein Expr. Purif.* 121 (2016) 1–8. doi:10.1016/j.pep.2015.12.019.
- [50] G. André, E. Haudecoeur, E. Courtois, M. Monot, B. Dupuy, D.A. Rodionov, I. Martin-Verstraete, G. Andr??, E. Haudecoeur, E. Courtois, M. Monot, B. Dupuy, D.A. Rodionov, I. Martin-Verstraete, *Cpe1786/IscR* of *Clostridium perfringens* represses expression of genes involved in Fe-S cluster biogenesis, *Res. Microbiol.* (2016) 1–11. doi:10.1016/j.resmic.2016.03.002.
- [51] R.C. Valentine, Bacterial ferredoxin, *Bacteriol. Rev.* 28 (1964) 497–517.
- [52] L.E. Mortenson, R.C. Valentine, J. Carnahan, An electron transport factor from *Clostridium pasteurianum*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7 (1962) 448–452.
- [53] J. Meyer, Iron-sulfur protein folds, iron-sulfur chemistry, and evolution, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 157–170. doi:10.1007/s00775-007-0318-7.
- [54] J. Meyer, Ferredoxins of the third kind, *FEBS Lett.* 509 (2001) 1–5. doi:10.1016/S0014-5793(01)03049-6.
- [55] A. Sawyer, M. Winkler, Evolution of *Chlamydomonas reinhardtii* ferredoxins and their interactions with [FeFe] -hydrogenases, *Photosynth. Res.* 0 (2017) 0. doi:10.1007/s11120-017-0409-4.
- [56] A.S. Rumpel, J.F. Siebel, M. Diallo, C. Far, E.J. Reijerse, W. Lubitz, S. Rumpel, J.F. Siebel, M. Diallo, C. Farès, E.J. Reijerse, Structural Insight into the Complex of Ferredoxin and [FeFe] Hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *ChemBioChem.* (2015) 1663–1669. doi:10.1002/cbic.201500130.
- [57] K.M. Ewen, M. Kleser, R. Bernhardt, Adrenodoxin: The archetype of vertebrate-type [2Fe-2S] cluster ferredoxins, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics.* 1814 (2011) 111–125. doi:10.1016/j.bbapap.2010.06.003.
- [58] T.C. Pochapsky, M. Kostic, N. Jain, R. Pejchal, Redox-dependent conformational selection in a Cys4Fe2S2 ferredoxin, *Biochemistry.* 40 (2001) 5602–5614. doi:10.1021/bi0028845.
- [59] T.A. Lyons, G. Ratnaswamy, T.C. Pochapsky, Redox-dependent dynamics of putidaredoxin characterized by amide proton exchange, *Protein Sci.* 5 (1996) 627–639. doi:10.1002/pro.5560050407.
- [60] Y. Hiruma, M.A.S. Hass, Y. Kikui, W.M. Liu, B. ??lmez, S.P. Skinner, A. Blok, A. Kloosterman, H. Koteishi, F. L??hr, H. Schwalbe, M. Nojiri, M. Ubbink, The structure of the cytochrome P450cam-putidaredoxin complex determined by paramagnetic NMR spectroscopy and crystallography, *J. Mol. Biol.* 425 (2013) 4353–4365. doi:10.1016/j.jmb.2013.07.006.
- [61] R. Kümmerle, M. Atta, J. Sculler, J. Gaillard, J. Meyer, Structural similarities between the N-terminal domain of *Clostridium pasteurianum* hydrogenase and plant-type ferredoxins, *Biochemistry.* 38 (1999) 1938–1943. doi:10.1021/bi982416j.
- [62] M. Atta, M.E. Lafferty, M.K. Johnson, J. Gaillard, J. Meyer, Heterologous biosynthesis and characterization of the [2Fe-2S]-containing N-terminal domain of *Clostridium pasteurianum* hydrogenase1941, *Biochemistry.* 37 (1998) 15974–15980.

- [63] R.E. Hansen, H. Beinert, IDENTIFICATION BY ISOTOPIC SUBSTITUTION OF THE EPR SIGNAL AT $g = 1.94$ IN A NON-HEME IRON PROTEIN FROM AZOTOBACTER*, 52 (1964) 1263–1271.
- [64] J. Meyer, M.H. Bruschi, J.J. Bonicel, Amino Acid Sequence of [2Fe-2S] Ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*, (1986) 6054–6061.
- [65] a P. Yeh, C. Chatelet, S.M. Soltis, P. Kuhn, J. Meyer, D.C. Rees, Structure of a thioredoxin-like [2Fe-2S] ferredoxin from *Aquifex aeolicus*., J. Mol. Biol. 300 (2000) 587–595. doi:10.1006/jmbi.2000.3871.
- [66] L.E. Mortenson, Purification and analysis of ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*, Biochim. Biophys. Acta - Spec. Sect. Enzymol. Subj. 81 (1964) 71–77. doi:10.1016/0926-6569(64)90336-0.
- [67] B. Darimont, R. Sterner, Sequence, assembly and evolution of a primordial ferredoxin from *Thermotoga maritima*., EMBO J. 13 (1994) 1772–1781.
- [68] R. V Eck, M.O. Dayhoff, Evolution of the Structure of Ferredoxin Based on Living Relics of Primitive Amino Acid Sequences, Science. (1966) 363–366.
- [69] I. Bertini, A. Donaire, B.A. Feinberg, C. Luchinat, M. Piccioli, H. Yuan, Solution structure of the oxidized 2[Fe₄S₄] ferredoxin from *Clostridium pasteurianum*., Eur. J. Biochem. 232 (1995) 192–205.
- [70] B.S. Perrin, T. Ichiye, Identifying sequence determinants of reduction potentials of metalloproteins, J. Biol. Inorg. Chem. 18 (2013) 599–608. doi:10.1007/s00775-013-1004-6.
- [71] B.S. Perrin, S. Niu, T. Ichiye, Calculating standard reduction potentials of [4Fe-4S] proteins, J. Comput. Chem. 34 (2013) 576–582. doi:10.1002/jcc.23169.
- [72] I. Daizadeh, D.M. Medvedev, A. a Stuchebrukhov, Electron transfer in ferredoxin: are tunneling pathways evolutionarily conserved?, Mol. Biol. Evol. 19 (2002) 406–15. doi:daizadeh.
- [73] J.S. Chen, D. Kay Blanchard, A simple hydrogenase-linked assay for ferredoxin and flavodoxin, Anal. Biochem. 93 (1978) 216–222. doi:10.1016/S0003-2697(79)80140-2.
- [74] O. Guerrini, B. Burlat, C. Léger, B. Guigliarelli, P. Soucaille, L. Girbal, Characterization of two 2[4Fe4S] ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*, Curr. Microbiol. 56 (2008) 261–267. doi:10.1007/s00284-007-9072-x.
- [75] J.M. Moulis, V. Davasse, Probing the role of electrostatic forces in the interaction of *Clostridium pasteurianum* ferredoxin with its redox partners, Biochemistry. 34 (1995) 16781–16788. doi:10.1021/bi00051a028.
- [76] M. Nakamura, K. Saeki, Y. Takahashi, Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscC-fdx-ORF3 gene cluster., J. Biochem. 126 (1999) 10–18.
- [77] C.J. Schwartz, J.L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F.J. Ruzicka, H. Beinert, P.J. Kiley, 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 (2001) 14895–14900. doi:10.1073/pnas.251550898.
- [78] S. Iwata, M. Saynovits, T.A. Link, H. Michel, Structure of a water soluble fragment of the “Rieske” iron – sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex determined by MAD phasing at 1.5 Å resolution, (n.d.) 567–579.
- [79] L. Liu, T. Nogi, M. Kobayashi, K. Miki, Ultrahigh-resolution structure of high-potential iron \pm sulfur protein from *Thermochromatium tepidum* research papers, (2002) 1085–1091.
- [80] M.J. Maher, M.C.J. Wilce, J.M. Guss, G. Anthony, Rubredoxin from *Clostridium pasteurianum*. Structures of G10A, G43A and G10VG43A mutant proteins. Mutation of conserved glycine 10

- to valine causes the 9 ± 10 peptide link to invert research papers, (1999) 962–968. doi:10.1107/S0907444999001900.
- [81] W. Lubitz, H. Ogata, O. Rudiger, E. Reijerse, Hydrogenases, *Chem. Rev.* 114 (2014) 4081–4148. doi:10.1021/cr4005814.
- [82] H. Eilenberg, I. Weiner, O. Ben-Zvi, C. Pundak, A. Marmari, O. Liran, M.S. Wecker, Y. Milrad, I. Yacoby, The dual effect of a ferredoxin-hydrogenase fusion protein in vivo: successful divergence of the photosynthetic electron flux towards hydrogen production and elevated oxygen tolerance, *Biotechnol. Biofuels.* 9 (2016) 182. doi:10.1186/s13068-016-0601-3.
- [83] A. Abou-Hamdan, S. Dementin, P.-P. Liebgott, O. Gutierrez-Sanz, P. Richaud, A.L. De Lacey, M. Rousset, P. Bertrand, L. Cournac, C. Léger, Understanding and Tuning the Catalytic Bias of Hydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 8368–8371. doi:10.1021/ja301802r.
- [84] C. Greco, V. Fourmond, C. Baffert, P. Wang, S. Dementin, P. Bertrand, M. Bruschi, J. Blumberger, L. De Gioia, C. Leger, Combining experimental and theoretical methods to learn about the reactivity of gas-processing metalloenzymes, *Energy Environ. Sci.* (2014) -. doi:10.1039/C4EE01848F.
- [85] A.-K. Kaster, J. Moll, K. Parey, R.K. Thauer, Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 (2011) 2981–2986, S2981/1–S2981/6. doi:10.1073/pnas.1016761108.
- [86] M.F.J.M. Verhagen, T.O. Rourke, M.W.W. Adams, The hyperthermophilic bacterium , *Thermotoga maritima* , contains an unusually complex iron-hydrogenase : amino acid sequence analyses versus biochemical characterization 1, *Biochim. Biophys. Acta.* 1412 (1999) 212–229.
- [87] G.J. Schut, M.W.W. Adams, The Iron-Hydrogenase of *Thermotoga maritima* Utilizes Ferredoxin and NADH Synergistically : a New Perspective on Anaerobic Hydrogen Production □ †, 191 (2009) 4451–4457. doi:10.1128/JB.01582-08.
- [88] J.W. Peters, A.-F. Miller, A.K. Jones, P.W. King, M.W.W. Adams, Electron bifurcation, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 31 (2016) 146–152. doi:10.1016/j.cbpa.2016.03.007.
- [89] M. Winkler, J. Esselborn, T. Happe, Molecular basis of [FeFe]-hydrogenase function An insight into the complex interplay between protein and catalytic cofactor, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1827 (2013) 974–985. doi:10.1016/j.bbabi.2013.03.004.
- [90] S. Shima, O. Pilak, S. Vogt, M. Schick, M.S. Stagni, W. Meyer-Klaucke, E. Warkentin, R.K. Thauer, U. Ermler, The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site., *Science.* 321 (2008) 572–5. doi:10.1126/science.1158978.
- [91] S. Vogt, E.J. Lyon, S. Shima, R.K. Thauer, The exchange activities of [Fe] hydrogenase (iron-sulfur-cluster-free hydrogenase) from methanogenic archaea in comparison with the exchange activities of [FeFe] and [NiFe] hydrogenases, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 97–106. doi:10.1007/s00775-007-0302-2.
- [92] J.W. Peters, G.J. Schut, E.S. Boyd, D.W. Mulder, E.M. Shepard, J.B. Broderick, P.W. King, M.W.W. Adams, [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1350–1369. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.021.
- [93] M. Horch, L. Lauterbach, O. Lenz, P. Hildebrandt, I. Zebger, NAD(H)-coupled hydrogen cycling - Structure-function relationships of bidirectional [NiFe] hydrogenases, *FEBS Lett.* 586 (2012) 545–556. doi:10.1016/j.febslet.2011.10.010.
- [94] A. Volbeda, M. Charon, C. Piras, E.C. Hatchikian, M. Frey, J.C. Fontecilla-camps, Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas.*, *Nature.* 373 (1995) 580–587. doi:10.1038/373580a0.

- [95] A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, E.C. Hatchikian, M. Frey, J.C. Fontecilla-camps, I.D.B.S. Cea-cnrs, A. V Martyrs, Structure of the [NiFe] Hydrogenase Active Site : Evidence for Biologically Uncommon Fe Ligands \perp , J. Am. Chem. Soc. 7863 (1996) 12989–12996.
- [96] S. Dementin, V. Belle, P. Bertrand, B. Guigliarelli, G. Adryanczyk-Perrier, A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, M. Rousset, C. Léger, Changing the Ligation of the Distal [4Fe4S] Cluster in NiFe Hydrogenase Impairs Inter- and Intramolecular Electron Transfers, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 5209–5218. doi:10.1021/ja060233b.
- [97] S. Dementin, B. Burlat, V. Fourmond, F. Leroux, P.-P. Liebgott, A. Abou-Hamdan, C. Leger, M. Rousset, B. Guigliarelli, P. Bertrand, Rates of intra- and intermolecular electron transfers in hydrogenase deduced from steady-state activity measurements, J. Am. Chem. Soc. 133 (2011) 10211–10221. doi:10.1021/ja202615a.
- [98] T. Goris, A.F. Wait, M. Saggu, J. Fritsch, N. Heidary, M. Stein, I. Zebger, F. Lenzian, F.A. Armstrong, B. Friedrich, O. Lenz, A unique iron-sulfur cluster is crucial for oxygen tolerance of a [NiFe]-hydrogenase., Nat. Chem. Biol. 7 (2011) 310–318. doi:10.1038/nchembio0911-648a.
- [99] M. Rousset, Y. Montet, B. Guigliarelli, N. Forget, M. Asso, P. Bertrand, J.C. Fontecilla-camps, E.C. Hatchikian, [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (1998) 11625–30. doi:10.1073/pnas.95.20.11625.
- [100] M. Guiral, L. Prunetti, C. Aussignargues, A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, E. Lojou, M.-T.T. Giudici-Ortoni, The Hyperthermophilic Bacterium Aquifex aeolicus. From Respiratory Pathways to Extremely Resistant Enzymes and Biotechnological Applications, 2012. doi:10.1016/B978-0-12-394423-8.00004-4.
- [101] P. Tamagnini, E. Leitão, P. Oliveira, D. Ferreira, F. Pinto, D.J. Harris, T. Heidorn, P. Lindblad, Cyanobacterial hydrogenases: Diversity, regulation and applications, FEMS Microbiol. Rev. 31 (2007) 692–720. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00085.x.
- [102] F. Roncaroli, E. Bill, B. Friedrich, O. Lenz, W. Lubitz, M.-E. Pandelia, Cofactor composition and function of a H₂ -sensing regulatory hydrogenase as revealed by Mössbauer and EPR spectroscopy, Chem. Sci. 6 (2015) 4495–4507. doi:10.1039/C5SC01560J.
- [103] S. Vitt, K. Ma, E. Warkentin, J. Moll, A.J. Pierik, S. Shima, U. Ermler, The F420-reducing [NiFe]-Hydrogenase complex from Methanothermobacter marburgensis, the first X-ray structure of a group 3 family member, J. Mol. Biol. 426 (2014) 2813–2826. doi:10.1016/j.jmb.2014.05.024.
- [104] R.C. Hopkins, J. Sun, F.E. Jenney, S.K. Chandrayan, M. Patrick, M.W.W. Adams, Homologous Expression of a Subcomplex of Pyrococcus furiosus Hydrogenase that Interacts with Pyruvate Ferredoxin Oxidoreductase, 6 (2011). doi:10.1371/journal.pone.0026569.
- [105] M. Boll, O. Einsle, U. Ermler, P.M.H. Kroneck, G.M. Ullmann, Structure and Function of the Unusual Tungsten Enzymes Acetylene Hydratase and Class II Benzoyl-Coenzyme A Reductase, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 26 (2016) 119–137. doi:10.1159/000440805.
- [106] S. Poudel, M. Tokmina-Lukaszewska, D.R. Colman, M. Refai, G.J. Schut, P.W. King, P.-C. Maness, M.W.W. Adams, J.W. Peters, B. Bothner, E.S. Boyd, Unification of [FeFe]-hydrogenases into Three Structural and Functional Groups, Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj. 1860 (2016) 1910–1921. doi:10.1016/j.bbagen.2016.05.034.
- [107] L. Girbal, G. Von Abendroth, M. Winkler, P.M.C. Benton, I. Meynial-Salles, C. Croux, J.W. Peters, T. Happe, P. Soucaille, 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 (2005) 2777–2781. doi:10.1128/AEM.71.5.2777-2781.2005.
- [108] M. Demuez, L. Cournac, O. Guerrini, P. Soucaille, L. Girbal, Complete activity profile of

- Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners, *FEMS Microbiol. Lett.* 275 (2007) 113–121. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00868.x.
- [109] G. Von Abendroth, S.T. Stripp, A. Silakov, C. Croux, P. Soucaille, L. Girbal, T. Happe, Optimized over-expression of [FeFe] hydrogenases with high specific activity in *Clostridium acetobutylicum*, *Int. J. Hydrogen Energy.* 33 (2008) 6076–6081. doi:10.1016/j.ijhydene.2008.07.122.
- [110] Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, E.C. Hatchikian, J.C. Fontecilla-camps, *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: The structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center, *Structure.* 7 (1999) 13–23. doi:10.1016/S0969-2126(99)80005-7.
- [111] M. Winkler, S. Kuhlert, M. Hippler, T. Happe, Characterization of the key step for light-driven hydrogen evolution in green algae, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36620–36627. doi:10.1074/jbc.M109.053496.
- [112] P.M. Vignais, B. Billoud, J. Meyer, Classification and phylogeny of hydrogenases 1, *FEMS Microbiol. Rev.* 25 (2001).
- [113] S. Wang, H. Huang, H.H. Kahnt, A.P. Mueller, M. Kpke, R.K. Thauer, NADP-Specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional complex with formate dehydrogenase in *clostridium autoethanogenum* grown on CO, *J. Bacteriol.* 195 (2013) 4373–4386. doi:10.1128/JB.00678-13.
- [114] J.E. Meuser, E.S. Boyd, G. Ananyev, D. Karns, R. Radakovits, U.M.N. Murthy, M.L. Ghirardi, G.C. Dismukes, J.W. Peters, M.C. Posewitz, Evolutionary significance of an algal gene encoding an [FeFe]-hydrogenase with F-domain homology and hydrogenase activity in *Chlorella variabilis* NC64A, *Planta.* 234 (2011) 829–843. doi:10.1007/s00425-011-1431-y.
- [115] S. D'Adamo, R.E. Jinkerson, E.S. Boyd, S.L. Brown, B.K. Baxter, J.W. Peters, M.C. Posewitz, Evolutionary and biotechnological implications of robust hydrogenase activity in halophilic strains of *tetraselmis*, *PLoS One.* 9 (2014). doi:10.1371/journal.pone.0085812.
- [116] T. Lautier, P. Ezanno, C. Baffert, V. Fourmond, L. Cournac, J.C. Fontecilla-camps, P. Soucaille, P. Bertrand, I. Meynial-Salles, C. Léger, The quest for a functional substrate access tunnel in FeFe hydrogenase., *Faraday Discuss.* 148 (2011) 385–407; discussion 421–441. doi:10.1039/c004099c.
- [117] J.W. Peters, W.N. Lanzilotta, B.J. Lemon, L.C. Seefeldt, X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution., *Science.* 282 (1998) 1853–8.
- [118] A.J. Cornish, K. Gartner, H. Yang, J.W. Peters, E.L. Hegg, Mechanism of proton transfer in [FeFe]-hydrogenase from *Clostridium pasteurianum*, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38341–38347. doi:10.1074/jbc.M111.254664.
- [119] K. Sybirna, P. Ezanno, C. Baffert, C. Léger, H. Bottin, Arginine171 of *Chlamydomonas reinhardtii* [Fe-Fe] hydrogenase HydA1 plays a crucial role in electron transfer to its catalytic center, *Int. J. Hydrogen Energy.* 38 (2013) 2998–3002. doi:10.1016/j.ijhydene.2012.12.078.
- [120] U. Ryde, C. Greco, L. De Gioia, Quantum Refinement of [FeFe] Hydrogenase Indicates a Dithiomethylamine Ligand, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4512–4513. doi:10.1021/ja909194f.
- [121] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, (14)N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009) 6592–9. doi:10.1039/b905841a.
- [122] G. Berggren, A. Adamska-Venkatesh, C. Lambertz, T.R. Simmons, J. Esselborn, M. Atta, S. Gambarelli, J.M. Mouesca, E. Reijerse, W. Lubitz, T. Happe, V. Artero, M. Fontecave, Biomimetic assembly and activation of [FeFe]-hydrogenases, *Nature.* 499 (2013) 66–69. doi:10.1038/nature12239.

- [123] J.F. Siebel, A. Adamska-Venkatesh, K. Weber, S. Rumpel, E. Reijerse, W. Lubitz, Hybrid [FeFe]-hydrogenases with modified active sites show remarkable residual enzymatic activity, *Biochemistry*. 54 (2015) 1474–1483. doi:10.1021/bi501391d.
- [124] A. Adamska-Venkatesh, A. Silakov, C. Lambertz, O. Rüdiger, T. Happe, E. Reijerse, W. Lubitz, Identification and characterization of the “super-reduced” state of the H-cluster in [FeFe] hydrogenase: A new building block for the catalytic cycle?, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 51 (2012) 11458–11462. doi:10.1002/anie.201204800.
- [125] V. Hajj, C. Baffert, K. Sybirna, I. Meynial-salles, P. Soucaille, H. Bottin, V. Fourmond, C. Léger, FeFe hydrogenase reductive inactivation and implication for catalysis, *Energy Environ. Sci.* (2014) 715–719. doi:10.1039/c3ee42075b.
- [126] D.W. Mulder, Y. Guo, M.W. Ratzloff, P.W. King, Identification of a Catalytic Iron- Hydride at the H-cluster of [FeFe] -hydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.* (2016). doi:10.1021/jacs.6b11409.
- [127] C. Sommer, A. Adamska-venkatesh, K. Pawlak, J.A. Birrell, O. Rüdiger, E.J. Reijerse, W. Lubitz, C. Sommer, A. Adamska-venkatesh, K. Pawlak, J.A. Birrell, O. Rüdiger, Proton Coupled Electronic Rearrangement within the H-Cluster as an Essential Step in the Catalytic Cycle of [FeFe] Hydrogenases Proton Coupled Electronic Rearrangement within the H-Cluster as an Essential Step in the Catalytic Cycle of [FeFe] Hydrogen, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 1440–1443. doi:10.1021/jacs.6b12636.
- [128] M. Sensi, C. Baffert, C. Greco, G. Caserta, C. Gauquelin, M. Fontecave, S. Roy, V. Artero, P. Soucaille, I. Meynial-Salles, H. Bottin, L. De Gioia, V. Fourmond, C. Léger, L. Bertini, Reactivity of the excited states of the H-cluster of FeFe hydrogenases, *J. Am. Chem. Soc.* (2016). doi:10.1021/jacs.6b06603.
- [129] C. Baffert, L. Bertini, T. Lautier, C. Greco, K. Sybirna, P. Ezanno, E. Etienne, P. Soucaille, P. Bertrand, H. Bottin, I. Meynial-Salles, L. De Gioia, C. Léger, CO disrupts the reduced H-cluster of FeFe hydrogenase. A combined DFT and protein film voltammetry study, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 2096–2099. doi:10.1021/ja110627b.
- [130] C. Orain, L. Saujet, C. Gauquelin, P. Soucaille, I. Meynial-Salles, C. Baffert, V. Fourmond, H. Bottin, C. Leger, C. Léger, Electrochemical Measurements of the Kinetics of Inhibition of Two FeFe Hydrogenases by O₂ Demonstrate That the Reaction Is Partly Reversible, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 12580–12587. doi:10.1021/jacs.5b06934.
- [131] P. Knörzer, A. Silakov, C.E. Foster, F.A. Armstrong, W. Lubitz, T. Happe, Importance of the protein framework for catalytic activity of [FeFe]-hydrogenases, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 1489–1499. doi:10.1074/jbc.M111.305797.
- [132] S. Morra, A. Giraud, G. Di Nardo, P.W. King, G. Gilardi, F. Valetti, Site Saturation Mutagenesis Demonstrates a Central Role for Cysteine 298 as Proton Donor to the Catalytic Site in CaHydA [FeFe]-Hydrogenase, *PLoS One*. 7 (2012) 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0048400.
- [133] S. Morra, S. Maurelli, M. Chiesa, D.W. Mulder, M.W. Ratzloff, E. Giamello, P.W. King, G. Gilardi, F. Valetti, The effect of a C298D mutation in CaHydA [FeFe] -hydrogenase : Insights into the protein-metal cluster interaction by EPR and FTIR spectroscopic investigation, *BBA - Bioenerg.* 1857 (2016) 98–106. doi:10.1016/j.bbabi.2015.10.005.
- [134] G. Hong, A.J. Cornish, E.L. Hegg, R. Pachter, On understanding proton transfer to the biocatalytic [Fe - Fe]H sub-cluster in [Fe-Fe]H₂ases: QM/MM MD simulations, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1807 (2011) 510–517. doi:10.1016/j.bbabi.2011.01.011.
- [135] B. Ginovska-Pangovska, M.-H. Ho, J.C. Linehan, Y. Cheng, M. Dupuis, S. Raugei, W.J. Shaw, Molecular dynamics study of the proposed proton transport pathways in [FeFe]-hydrogenase., *Biochim. Biophys. Acta.* 1837 (2014) 131–8. doi:10.1016/j.bbabi.2013.08.004.
- [136] A.J. Cornish, B. Ginovska-Pangovska, A. Thelen, J.C.S. Da Silva, T.A. Soares, S. Raugei, M. Dupuis, W.J. Shaw, E.L. Hegg, Single Amino Acid Modifications Reveal Additional Controls on

- the Proton Pathway of [FeFe]-Hydrogenase, *Biochemistry*. (2016) *acs.biochem*.5b01044. doi:10.1021/acs.biochem.5b01044.
- [137] J. Cohen, K. Kim, M.C. Posewitz, M.L. Ghirardi, K. Schulten, M. Seibert, P.W. King, Molecular dynamics and experimental investigation of H(2) and O(2) diffusion in [Fe]-hydrogenase, *Biochem.Soc.Trans.* 33 (2005) 80–82.
- [138] J. Cohen, K. Kim, P.W. King, M. Seibert, K. Schulten, Finding gas diffusion pathways in proteins: Application to O₂ and H₂ transport in Cpl [FeFe]-hydrogenase and the role of packing defects, *Structure*. 13 (2005) 1321–1329. doi:10.1016/j.str.2005.05.013.
- [139] J. Noth, R. Kositzki, K. Klein, M. Winkler, M. Haumann, T. Happe, Lyophilization protects [FeFe]-hydrogenases against O₂-induced H-cluster degradation, *Sci. Rep.* 5 (2015) 13978. doi:10.1038/srep13978.
- [140] A.S. Bingham, P.R. Smith, J.R. Swartz, Evolution of an [FeFe] hydrogenase with decreased oxygen sensitivity, *Int. J. Hydrogen Energy*. 37 (2012) 2965–2976. doi:10.1016/j.ijhydene.2011.02.048.
- [141] J. Koo, S. Shiigi, M. Rohovie, K. Mehta, J.R. Swartz, Characterization of [FeFe] Hydrogenase O₂ Sensitivity Using a New, Physiological Approach, *J. Biol. Chem.* 2 (2016) jbc.M116.737122. doi:10.1074/jbc.M116.737122.
- [142] I. Yacoby, S. Pochekailov, H. Toporik, M.L. Ghirardi, P.W. King, S. Zhang, Photosynthetic electron partitioning between [FeFe] - hydrogenase and ferredoxin : NADP p -oxidoreductase (FNR) enzymes in vitro, *Pnas*. 108 (2011) 9396–9401. doi:10.1073/pnas.1103659108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1103659108.
- [143] G. Goldet, C. Brandmayr, S.T. Stripp, T. Happe, C. Cavazza, J.C. Fontecilla-camps, F.A. Armstrong, Electrochemical kinetic investigations of the reactions of [FeFe]-hydrogenases with carbon monoxide and oxygen: Comparing the importance of gas tunnels and active-site electronic/redox effects, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 14979–14989. doi:10.1021/ja905388j.
- [144] C.C. Page, C.C. Moser, P.L. Dutton, Mechanism for electron transfer within and between proteins, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7 (2003) 551–556. doi:10.1016/j.cbpa.2003.08.005.
- [145] L.E. Nagy, J.E. Meuser, Æ.S. Plummer, M. Seibert, M.L. Ghirardi, P.W. King, D. Ahmann, M.C. Posewitz, Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel [FeFe] -hydrogenase libraries, (2007) 421–430. doi:10.1007/s10529-006-9254-9.
- [146] A. Silakov, C. Kamp, E. Reijerse, T. Happe, W. Lubitz, Spectroelectrochemical characterization of the active site of the [FeFe] hydrogenase HydA1 from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochemistry*. 48 (2009) 7780–7786. doi:10.1021/bi9009105.
- [147] C. Greco, M. Bruschi, P. Fantucci, U. Ryde, L. De Gioia, Probing the effects of one-electron reduction and protonation on the electronic properties of the Fe-S clusters in the active-ready form of [FeFe]-hydrogenases. A QM/MM investigation., *ChemPhysChem*. 12 (2011) 3376–3382. doi:10.1002/cphc.201100498.
- [148] C. Greco, M. Bruschi, P. Fantucci, U. Ryde, L. De Gioia, Mechanistic and Physiological Implications of the Interplay among Iron À Sulfur Clusters in [FeFe] -Hydrogenases . A QM / MM Perspective, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 18742–18749.
- [149] M.C. Posewitz, P.W. King, S.L. Smolinski, L. Zhang, M. Seibert, M.L. Ghirardi, Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 25711–25720. doi:10.1074/jbc.M403206200.
- [150] M.C. Posewitz, P.W. King, S.L. Smolinski, R.D. Smith, A.R. Ginley, M.L. Ghirardi, M. Seibert, Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 102–104. doi:10.1042/BST0330102.
- [151] P.W. King, M.C. Posewitz, M.L. Ghirardi, M. Seibert, Functional Studies of [FeFe]

- Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an Escherichia coli Biosynthetic System, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 2163–2172. doi:10.1128/JB.188.6.2163.
- [152] J.B. Broderick, A.S. Byer, K.S. Duschene, B.R. Duffus, J.N. Betz, E.M. Shepard, J.W. Peters, H-Cluster assembly during maturation of the [FeFe]-hydrogenase, *J. Biol. Inorg. Chem.* 19 (2014) 747–757. doi:10.1007/s00775-014-1168-8.
- [153] D.W. Mulder, E.S. Boyd, R. Sarma, R.K. Lange, J. a Endrizzi, J.B. Broderick, J.W. Peters, Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydA(DeltaEFG)., *Nature.* 465 (2010) 248–251. doi:10.1038/nature08993.
- [154] E.M. Shepard, A.S. Byer, J.N. Betz, J.W. Peters, J.B. Broderick, A Redox Active [2Fe-2S] Cluster on the Hydrogenase Maturase HydF, *Biochemistry.* (2016) acs.biochem.6b00528. doi:10.1021/acs.biochem.6b00528.
- [155] L. Cendron, P. Berto, S. D'Adamo, F. Vallese, C. Govoni, M.C. Posewitz, G.M. Giacometti, P. Costantini, G. Zanotti, Crystal structure of HydF scaffold protein provides insights into [FeFe]-hydrogenase maturation, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 43944–43950. doi:10.1074/jbc.M111.281956.
- [156] N. Joshi, E.M. Shepard, A.S. Byer, K.D. Swanson, J.B. Broderick, J.W. Peters, Iron-sulfur cluster coordination in the [FeFe]-hydrogenase H cluster biosynthetic factor HydF, *FEBS Lett.* 586 (2012) 3939–3943. doi:10.1016/j.febslet.2012.09.028.
- [157] G. Caserta, L. Pecqueur, A. Adamska-venkatesh, C. Papini, S. Roy, V. Artero, M. Atta, E. Reijerse, W. Lubitz, M. Fontecave, Structural and functional characterization of the hydrogenase-maturation HydF protein, *Nat. Chem. Biol.* (2017). doi:10.1038/nchembio.2385.
- [158] E.M. Shepard, F. Mus, J.N. Betz, A.S. Byer, B.R. Duffus, J.W. Peters, J.B. Broderick, [FeFe]-Hydrogenase Maturation, *Biochemistry.* 53 (2014) 4090–4104. doi:10.1021/bi500210x.
- [159] V. Artero, G. Berggren, M. Atta, G. Caserta, S. Roy, L. Pecqueur, M. Fontecave, From Enzyme Maturation to Synthetic Chemistry: The Case of Hydrogenases, *Acc. Chem. Res.* 48 (2015) 2380–2387. doi:10.1021/acs.accounts.5b00157.
- [160] I. Czech, S.T. Stripp, O. Sanganas, N. Leidel, T. Happe, M. Haumann, The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF contains a H-cluster like [4Fe4S]-2Fe site, *FEBS Lett.* 585 (2011) 225–230. doi:10.1016/j.febslet.2010.11.052.
- [161] E.M. Shepard, S.E. McGlynn, A.L. Bueling, C.S. Grady-Smith, S.J. George, M. a Winslow, S.P. Cramer, J.W. Peters, J.B. Broderick, Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 10448–10453. doi:10.1073/pnas.1001937107.
- [162] J.M. Kuchenreuther, The HydG Enzyme Generates an, *Science.* 343 (2014) 424. doi:10.1126/science.1246572.
- [163] Y. Nicolet, J.C. Fontecilla-camps, M. Fontecave, Maturation of [FeFe]-hydrogenases: Structures and mechanisms, *Int. J. Hydrogen Energy.* 35 (2010) 10750–10760. doi:10.1016/j.ijhydene.2010.02.056.
- [164] Y. Nicolet, P. Amara, J.M. Mousesca, J.C. Fontecilla-camps, Unexpected electron transfer mechanism upon AdoMet cleavage in radical SAM proteins., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 14867–14871. doi:10.1073/pnas.0904385106.
- [165] J.N. Betz, N.W. Boswell, C.J. Fugate, G.L. Holliday, E. Akiva, A.G. Scott, P.C. Babbitt, J.W. Peters, E.M. Shepard, J.B. Broderick, Hydrogenase maturation: Insights into the role hydE plays in dithiomethylamine biosynthesis, *Biochemistry.* 54 (2015) 1807–1818. doi:10.1021/bi501205e.
- [166] J. Noth, J. Esselborn, J. Güldenhaupt, A. Brünje, A. Sawyer, U. Apfel, K. Gerwert, E. Hofmann,

- M. Winkler, T. Happe, [FeFe]-Hydrogenase with Chalcogenide Substitutions at the H-Cluster Maintains Full H₂ Evolution Activity, (2016) 1–6. doi:10.1002/anie.201511896.
- [167] P.M. Vignais, H/D exchange reactions and mechanistic aspects of the hydrogenases, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 1677–1690. doi:j.ccr.2005.01.026.
- [168] V. Fourmond, C. Greco, K. Sybirna, C. Baffert, P.-H. Wang, P. Ezanno, M. Montefiori, M. Bruschi, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, J. Blumberger, H. Bottin, L. De Gioia, C. Léger, The oxidative inactivation of FeFe hydrogenase reveals the flexibility of the H-cluster., *Nat. Chem.* 6 (2014) 336–42. doi:10.1038/nchem.1892.
- [169] C. Baffert, M. Demuez, L. Cournac, B. Burlat, B. Guigliarelli, P. Bertrand, L. Girbal, C. Léger, Hydrogen-activating enzymes: Activity does not correlate with oxygen sensitivity, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 47 (2008) 2052–2054. doi:10.1002/anie.200704313.
- [170] P.-P. Liebgott, F. Leroux, B. Burlat, S. Dementin, C. Baffert, T. Lautier, V. Fourmond, P. Ceccaldi, C. Cavazza, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, J.C. Fontecilla-camps, B. Guigliarelli, P. Bertrand, M. Rousset, C. Léger, Relating diffusion along the substrate tunnel and oxygen sensitivity in hydrogenase., *Nat. Chem. Biol.* 6 (2010) 63–70. doi:10.1038/nchembio.276.
- [171] J.S. Multani, L.E. Mortenson, Circular dichroism spectra of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 256 (1972) 66–70. doi:10.1016/0005-2728(72)90163-6.
- [172] D. Vinella, F. Fischer, E. Vorontsov, J. Gallaud, C. Malosse, V. Michel, C. Cavazza, M. Robbe-Saule, P. Richaud, J. Chamot-Rooke, C. Brochier-Armanet, H. De Reuse, Evolution of *Helicobacter*: Acquisition by Gastric Species of Two Histidine-Rich Proteins Essential for Colonization, *PLoS Pathog.* 11 (2015) 1–32. doi:10.1371/journal.ppat.1005312.
- [173] W. w Fish, Rapid colorimetricmicromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples, *Methods Enzym.* 54 (1988) 357–364.
- [174] G. Bertani, Bertani G. STUDIES ON LYSOGENESIS I. : The Mode of Phage Liberation by Lysogenic *Escherichia coli.*, *J. Bacteriol.* 62 (1951) 293–300.
- [175] H. Inoue, H. Nojima, H. Okoyama, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene.* 96 (1990) 23–28.
- [176] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases, *Biopolymers.* 89 (2008) 392–400. doi:10.1002/bip.20853.
- [177] V. Fourmond, C. Baffert, K. Sybirna, S. Dementin, A. Abou-Hamdan, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, H. Bottin, C. Léger, The mechanism of inhibition by H₂ of H₂-evolution by hydrogenases, *Chem. Commun.* 49 (2013) 6840. doi:10.1039/c3cc43297a.
- [178] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 725–738. doi:10.1038/nprot.2010.5.
- [179] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791. doi:10.1002/jcc.21256.
- [180] R. Prabhu, E. Altman, M.A. Eiteman, Lactate and Acrylate Metabolism by *Megasphaera elsdenii* under Batch and Steady-State Conditions, 78 (2012) 8564–8570. doi:10.1128/AEM.02443-12.
- [181] S. Morra, A. Cordara, G. Gilardi, F. Valetti, Atypical effect of temperature tuning on the insertion of the catalytic iron–sulfur center in a recombinant [FeFe]-hydrogenase, *Protein Sci.* 24 (2015) 2090–2094. doi:10.1002/pro.2805.
- [182] V. Augier, M. Asso, B. Guigliarelli, C. More, P. Bertrand, C.-L. Santini, F. Blasco, M. Chippaux,

- G. Giordano, Removal of the high-potential iron-sulfur [4Fe-4S] center of the .beta.-subunit from Escherichia coli nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutated enzymes, *Biochemistry*. 32 (1993) 5099–5108. doi:10.1021/bi00070a018.
- [183] M.T. Werth, H. Sices, G. Cecchini, I. Schröder, S. Lasage, R.P. Gunsalus, M.K. Johnson, Evidence for non-cysteiny coordination of the [2Fe-2S] cluster in Escherichia coli succinate dehydrogenase, *FEBS Lett.* 299 (1992) 1–4. doi:10.1016/0014-5793(92)80086-V.
- [184] Y. Zhang, C. Yang, A. Dancis, E. Nakamaru-Ogiso, Electron paramagnetic spectroscopic studies of wild type and mutant Dre2 identify essential [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters and their Cysteine ligands, *J. Biochem.* (2016).
- [185] J.M. Moulis, V. Davasse, M.-P. Golinelli, J. Meyer, I. Quinkal, The coordination sphere of iron-sulfur clusters: lessons from site-directed mutagenesis experiments, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* 1 (1996) 2–14. doi:10.1007/s007750050017.
- [186] E. Angov, C.J. Hillier, R.L. Kincaid, J.A. Lyon, Heterologous protein expression is enhanced by harmonizing the codon usage frequencies of the target gene with those of the expression host, *PLoS One*. 3 (2008) 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0002189.
- [187] P. Soucaille, R. Figge, C. Croux, PROCESS FOR CHROMOSOMAL INTEGRATION AND DNA SEQUENCE REPLACEMENT IN CLOSTRIDIA, Patent WO2006EP66997 20061003, 2006.
- [188] C. VAN DIJK, S.G. Mayhew, H.J. Grande, C. Veeger, Purification and properties of hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*., *Eur. J. Biochem.* 102 (1979) 317–330.
- [189] I. Rouvre, C. Gauquelin, I. Meynial-Salles, R. Basseguy, Impact of the chemicals, essential for the purification process of strict Fe-hydrogenase, on the corrosion of mild steel., *Bioelectrochemistry*. 109 (2016) 9–23. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.12.006.
- [190] I. Rouvre, R. Basseguy, Exacerbation of the mild steel corrosion process by direct electron transfer between [Fe-Fe] -hydrogenase and material surface, *Corros. Sci.* 111 (2016) 199–211. doi:10.1016/j.corsci.2016.05.005.
- [191] S. Yang, L.G. Ljungdahl, J. Legall, A Four-Iron , Four-Sulfide Ferredoxin with High Thermostability from *Clostridium thermoaceticum*, 130 (1977) 1084–1090.
- [192] K. Tagawa, D. Arnon, Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas, *Nature*. 195 (1962) 537–543. doi:10.1038/195537a0.
- [193] J. Cohen, K. Kim, M.C. Posewitz, M.L. Ghirardi, K. Schulten, M. Seibert, P.W. King, Molecular dynamics and experimental investigation of H₂ and O₂ diffusion in [Fe]-hydrogenase, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 80–82. doi:10.1042/BST0330080.Molecular.
- [194] P. SOUCAILLE, N.-P.-T. NGUYEN, B. PERCHERON, C. Croux, I. Meynial-salles, CLOSTRIDIUM ACETOBUTYLICUM STRAINS UNABLE TO PRODUCE HYDROGEN AND USEFUL FOR THE CONTINUOUS PRODUCTION OF CHEMICALS AND FUELS, WO2016/042160, n.d.

Liste des abréviations

Å : angström

°C : Degré Celsius

A

AA : Acide amine

Aad : Aldehyde-alcools déshydrogénase

ABE : Acétone-Butanol-Ethanol

Ack : Acétate kinase

Adc : Acétoacétate décarboxylase

Adh : Alcool déshydrogénase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADP : Adenosine-5' diphosphate

ADT : Azadithiolate

APS : Ammonium per-sulfate

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adenosine-5' triphosphate

ATC : A-type carriers

B

pb, kb, mb : paire de base, kilo-base, méga-base

Bcd : Butyryl-CoA déshydrogénase

BET : Bromure d'ethidium

BSA : Bovin Albumin Serum

Buk : Butyrate kinase

C

C. acetobutylicum : *Clostridium acetobutylicum*

CaHydA : [FeFe] Hydrogénase de *C. acetobutylicum*

CD : "Circular dichroism" (dichroïsme circulaire)

CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

CGM : Clostridial Growth Medium

CO : Monoxyde de carbone

CO₂ : Dioxyde de carbone

CoA-SH : Coenzyme A réduit

CoAT : CoA transferase

CPG : Chromatographie en phase gazeuse

CrHydA1 : Hydrogénase de *C. reinhardtii*

Crt : Crotonase

D

Da, kDa : Dalton, kilo-Dalton

Dd : Hydrogénase de *Desulfovibrio desulfuricans*

DHG : déhydroglycine

dNTPs : Desoxyribonucleotides-5'-triphosphate

DO : Densité optique

DTT : Dithioerythriol

E

E. coli : *Escherichia coli*

ECH : Electron conserving hydrogenase

EDTA : Éthylène Diamine Tétracétique

Etf : Electron transferring flavoprotein

F

FMN : Flavo-mono-nucléotide

5-FU : 5-Fluoro-Uracile

5-fluoro-UMP : 5-fluoro-uridine- monophosphate

FAD : Flavine adénine di-nucléotide

FADH₂ : Flavine adénine di-nucléotide réduit

FITR : Fourier Transform InfraRed

G

Gapdh : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

H**H⁺**: proton**H₂**: Dihydrogène**Hbd**: β-hydroxybutyryl-CoA déshydrogénase**HCl**: Acide chlorydrique**Hipips**: High Potentials Iron Protein**HPLC**: High Performance Liquid Chromatography**I****ICP AES**: Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Torche à plasma couplée à une détection par spectroscopie d'émission optique)**IPTG**: isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside**IR**: Infra-Rouge**K****K_m**: Constante de Michaëlis**L****LB**: Lysogeny broth**Ldh**: Lactate déshydrogénase**M****M, mM**: molaire (mol.L⁻¹), milli-molaire**Mbh**: membrane bound hydrogenase**MeHyd_a**: [FeFe] Hydrogénase de *Megasphaera elsdenii***MES**: Acide 2-(N-morpholino)ethanesulfonique**mg**: milligramme**mol, mmol, μmol, nmol**: Mole, millimole, micromole, nanomole**MS**: milieu synthétique**mV**: millivolt**MV**: méthyl viologène**MvH**: méthyl viologen hydrogenase**μF**: Microfaraday**N****Na⁺**: sodium**NAD⁺**: Nicotinamide adenine dinucleotide oxydé**NADH**: Nicotinamide adenine dinucleotide réduit**NADP⁺**: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydé**NADPH**: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate réduit**Nfor**: NAD(P) ferrédoxine oxydo-réductase**nm**: Nanomètre**NTA**: Acide nitrilotriacétique**O****O₂**: oxygène**ORF**: Open reading frame**P****P**: Phosphate**PDB**: protein databank**PCR**: Polymerase chain reaction**PEP**: Phosphoenolpyruvate**Pfk**: Phosphofructokinase**Pfor**: Pyruvate ferrédoxine oxydo-réductase**PFV**: Protein film Voltametry**Pgk**: Phosphoglycerate kinase**PLP**: pyridoxal-5'-phosphate PLP**PPP**: Pentoses-phosphate pathway**Pta**: Phosphotransacetylase**Ptb**: Phosphotransbutyrylase**pthl**: Promoteur de la thiolase de *C. acetobutylicum***Pyk**: Pyruvate kinase**Q****QM/MM**: Quantic Mechanics / Molecular Mechanic

R

RBS : Ribosome binding site
RPE : résonance paramagnétique électronique
rpm : Rotations par minute

S

Sadh : Secondary alcohol dehydrogenase
SAM : S-adénosylméthionine
SDB : Substrate Binding Domain
SDS : dodécylsulfate de sodium
SHE : Standard hydrogen electrode
SOC : Super optimal broth with catabolite repression

T

TAE : Tris, Acétate, EDTA
TCD : thermal conductivity detector
Thl : Thiolase
TTP : Thiamine-pyrophosphate
Tris : trishydroxyméthylaminométhane

U

UV : Ultra Violet
UPRTase : uracile-phosphoribosyl transférase

V

V_{max} : Vitesse maximale
V, kV : Volt, kilo-volt

W

WT : Wild type

Liste des figures

Figure 1: Schéma simplifié de la voie de la glycose, mettant également en évidence la voie d'utilisation possible du glycérol comme source de carbone.....	19
Figure 2 : Voies métaboliques et enzymes impliquées dans la formation des acides et des solvants chez <i>C. acetobutylicum</i>	22
Figure 3 : Fonctionnement théorique du complexe Bcd-EtfA/B d'après Buckel et Thauer [23]..	23
Figure 4: Complexe de la nitrogenase de <i>Azotobacter vinelandii</i>	31
Figure 5: Représentation des certains types de centres fer-soufre, impliqués ou non dans des sites catalytiques.	35
Figure 6: Fonctionnement simplifié des protéines du système ISC.....	37
Figure 7: Fonctionnement simplifié des protéines du système SUF.....	39
Figure 8 : Organisation des gènes dans les opérons ISC et SUF et régulation par les deux formes de la protéine IscR.....	40
Figure 9 : Représentation tridimensionnelle des différentes ferrédoxines contenant des centres [2Fe-2S].....	44
Figure 10: Phylogénie des ferrédoxines bactériennes d'après Meyer [52].	46
Figure 11 : Représentation tridimensionnelle, schématique et séquence protéique de la ferrédoxine 2[4Fe-4S] bactérienne type.....	47
Figure 12 : Représentation tridimensionnelle des protéines de transfert d'électrons : HIPIPs, Protéine de Rieske et Rubrédoxine.	50
Figure 13: Structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à nickel-fer « standard » à deux sous unités retrouvée chez <i>Desulfovibrio gigas</i> . (Fichier PDB : 2FRV [92])	55
Figure 14: Représentation tridimensionnelle et schématique du site catalytique des [NiFe] hydrogénases.....	56
Figure 15: Représentation schématique des trois états principaux du cycle catalytique des [NiFe] hydrogénases, d'après Ogata <i>et al.</i> [93].....	56
Figure 16: Centres fer-soufre de la petite sous unité de l'hydrogénase [NiFe] permettant le transfert des électrons depuis le site actif.....	57
Figure 17: Représentation schématique des différentes [NiFe] hydrogénases appartenant aux trois premiers groupes.	61

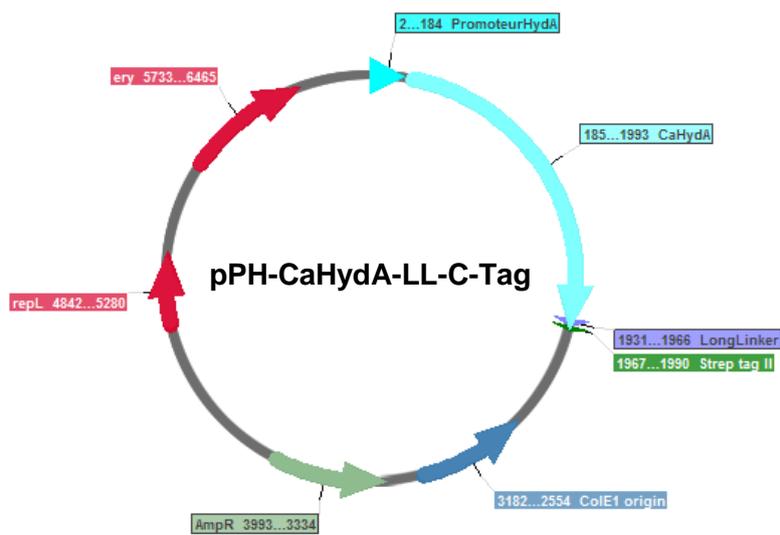
Figure 18: Schéma général de la maturation de la [NiFe] hydrogénase type, d'après Lubitz <i>et al.</i> [79].	63
Figure 19: Diversité structurale des hydrogénases à fer, d'après Meyer [2] et Poudel <i>et al.</i> [104].	66
Figure 20: Schéma de l'évolution phylogénétique potentielle des [FeFe] hydrogénases.	68
Figure 21: Structure globale de l'hydrogénase à fer de <i>C. acetobutylicum</i> .	70
Figure 22 : Représentation tridimensionnelle et schématique du site catalytique des [FeFe] hydrogénases.	71
Figure 23: Représentation des différents états du site catalytique des [FeFe] hydrogénases.	74
Figure 24: Modèle de cycle catalytique des hydrogénases à fer faisant intervenir tous les états rédox proposés.	75
Figure 25 : Environnement du site catalytique et mise en évidence des résidus (baguettes colorées en rouge) interagissant directement avec le site binucléaire (baguettes multicolore).	76
Figure 26: Mise en évidence de la voie de transfert des protons jusqu'au site catalytique de l'enzyme.	78
Figure 27: Mise en évidence des voies possibles de transfert des gaz jusqu'au site catalytique au sein du Domaine H.	79
Figure 28: Mise en évidence des distances entre les différents centres fer-soufre.	81
Figure 29: Coordination des centres fer-soufre [4Fe-4S] atypique par les résidus histidine.	83
Figure 30: Mécanisme global de maturation des hydrogénases à fer.	88
Figure 31: Représentation schématique des centres catalytiques binucléaires retrouvés au sein des enzymes (A) et des centres synthétiques avant activation (B).	89
Figure 32: Représentation schématique du site catalytique des [FeFe] hydrogénases dans l'état H _{ox} et pics d'absorption caractéristiques obtenus en spectroscopie Infra-rouge.	93
Figure 33: Position des pics pour chacun des états rédox du centre binucléaire (d'après Sommer <i>et al.</i> [126]).	94
Figure 34: Représentation schématique des tests d'activité d'oxydation du dihydrogène.	112
Figure 35: Exemple de chromatographe obtenu lors de tests d'activités de production de dihydrogène.	115

Figure 36: Conservation du Domaine H chez trois types d'hydrogénases à fer.	122
Figure 37: Conservation des acides aminés au sein du Domaine H de trois types d'hydrogénases à fer.	123
Figure 38: Voies de transfert d'électrons au sein des différentes enzymes.	124
Figure 39: Modèle structural de l'enzyme CaHydA de <i>C. acetobutylicum</i> et mise en évidence des différents variants des centres fer-soufre étudiés au niveau de la séquence protéique.	126
Figure 40: Modèle et séquence de l'enzyme HydX_1.	128
Figure 41: Harmonisation de la séquence codant l'enzyme HydX_1.	129
Figure 42: Modèle et séquence de l'enzyme HydX_3.	130
Figure 43: Harmonisation de la séquence codant l'enzyme HydX_3. La fréquence d'usage des codons est conservée alors que des mutations de certains acides aminés sont réalisées (résidus encadrés en rouge).	131
Figure 44: Purification des enzymes avec le protocole initial.	134
Figure 45: Résultats des purifications après modification du protocole.	138
Figure 46: Activités spécifiques de l'enzyme CaHydA.	139
Figure 47: Alignement des séquences des gènes de la ferrédoxine sauvage (<i>CA_C0303</i>) et harmonisé (<i>Fd_Opt</i>).	143
Figure 48: Alignement des séquences protéiques des différentes ferrédoxines.	143
Figure 49: Chromatographie d'affinité de la ferrédoxine Fd-LL-C-Tag, visualisation de la protéine sur la colonne et dans les fractions d'élution.	144
Figure 50: Purification de la ferrédoxine recombinante.	145
Figure 51: Spectres UV-Vis et voltammogrammes de la ferrédoxine.	146
Figure 52: Validation fonctionnelle de la ferrédoxine recombinante.	147
Figure 53: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_ΔDA.	151
Figure 54: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_C100A.	152
Figure 55: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_C48A.	153

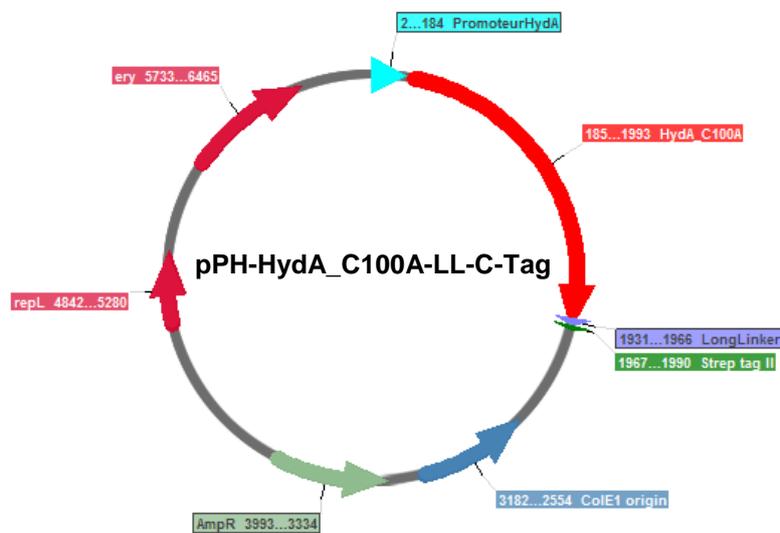
Figure 56: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_H93C.....	154
Figure 57: Purification et activités spécifiques de l'hydrogénase HydA_ΔFS2.	155
Figure 58: Essais de chromatographie de perméation de gel de l'hydrogénase variante HydA_ΔFS2.	156
Figure 59: Purification et activités spécifiques de l'enzyme HydX_1.....	157
Figure 60: Spectres en dichroïsme circulaire des enzymes sauvages et variantes.	158
Figure 61: Spectres UV-Vis des enzymes.	160
Figure 62: Caractérisation électrochimique des différentes hydrogénases..	161
Figure 63: Intensités relatives des courants catalytiques des enzymes sauvages et variantes à différents potentiels.	163
Figure 64: Comparaison des activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène et de réduction des protons des variants HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA avec l'enzyme CaHydA sauvage.	164
Figure 65: Activités spécifiques d'oxydation du dihydrogène et d'échange proton/deutérium des hydrogénases CaHydA, HydA_C100A, HydA_C48A et HydA_ΔDA.	165
Figure 66: Tests d'activités permettant l'étude de la conservation de la voie de transfert de protons.	166
Figure 67: Comparaison des constantes catalytiques des différentes enzymes pour les activités de réductions des protons, d'échange proton/deutérium et d'oxydation du dihydrogène.	167
Figure 68: Comparaison des efficacités catalytiques des enzymes dans les réactions de consommation et de production de dihydrogène.	169
Figure 69: Visualisation des résidus spécifiquement impliqués dans l'interaction entre l'enzyme CrHydA1 (en bleu ciel) et la ferrédoxine [2Fe-2S] de type plante.....	171
Figure 70: Comparaison des constantes catalytiques et des constantes de Michaëlis des enzymes CaHydA, HydA_C48A et HydA_C100A obtenues dans les conditions de consommation d'hydrogène.....	172
Figure 71: Visualisation des possibilités de liaison du méthyl viologène à la surface de l'enzyme CaHydA.....	175
Figure 72: Représentation de certaines possibilités de liaison du méthyl viologène à la surface de l'enzyme CaHydA.	176

Figure 73: Distribution des solutions de « docking » de la ferrédoxine sur l'enzyme CaHydA	178
Figure 74: Boucle du domaine du centre FS2 et similarité structurale du domaine du centre FS2 avec la putidaredoxine..	179
Figure 75: Stratégie d'utilisation de l'outil de criblage.	184
Figure 76: Généalogie des souches.	186
Figure 77: Validation génotypique des souches utilisées.....	186
Figure 78: Tests d'activité des hydrogénases, évaluées sur extraits protéiques totaux obtenues à partir des cultures des différentes souches.	187
Figure 79: Contrôle de l'outil de criblage.	190
Figure 80: Evaluation de l'activité de la thiolase.	191
Figure 81: Profils des produits de fermentation des souches <i>hydA60s::IT + CaHydA_catP-UPP</i> , <i>hydA60s::IT + CrHydA1_catP-UPP</i> et <i>hydA60s::IT</i>	193
Figure 82: Voies métaboliques simplifiées impliquées dans la formation des acides et des solvants chez <i>C. acetobutylicum</i>	194

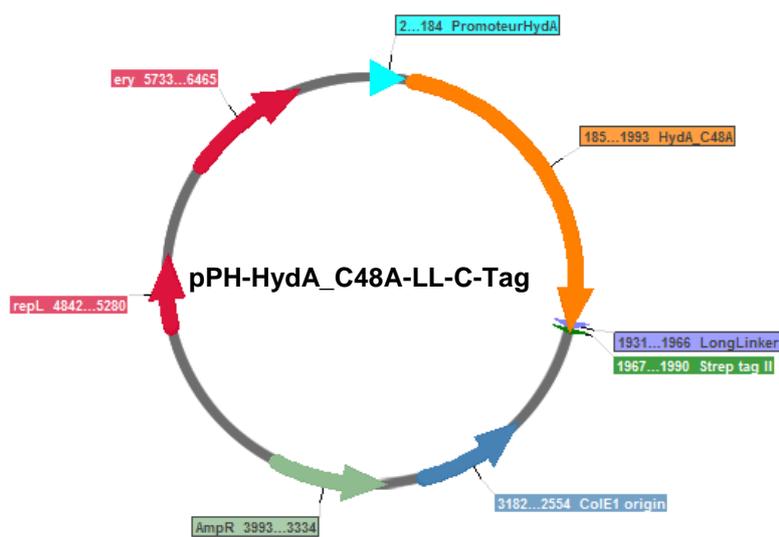
Cartes des plasmides



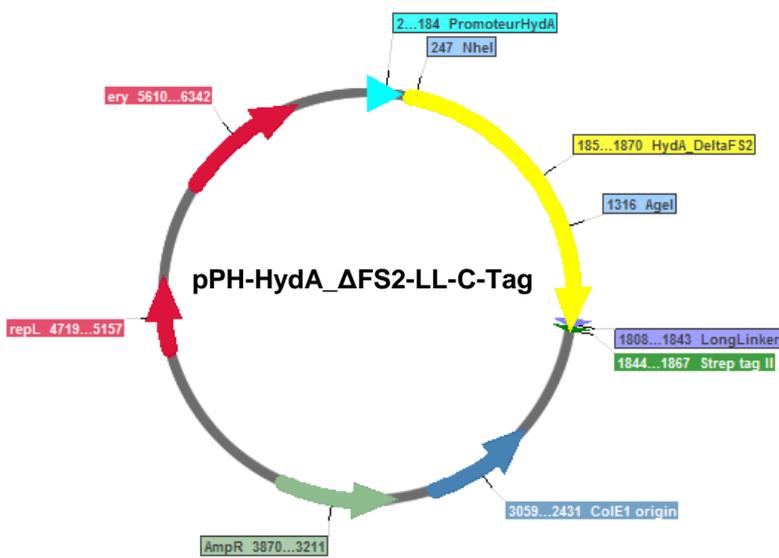
Plasmide pPH-CaHydA-LL-C-Tag



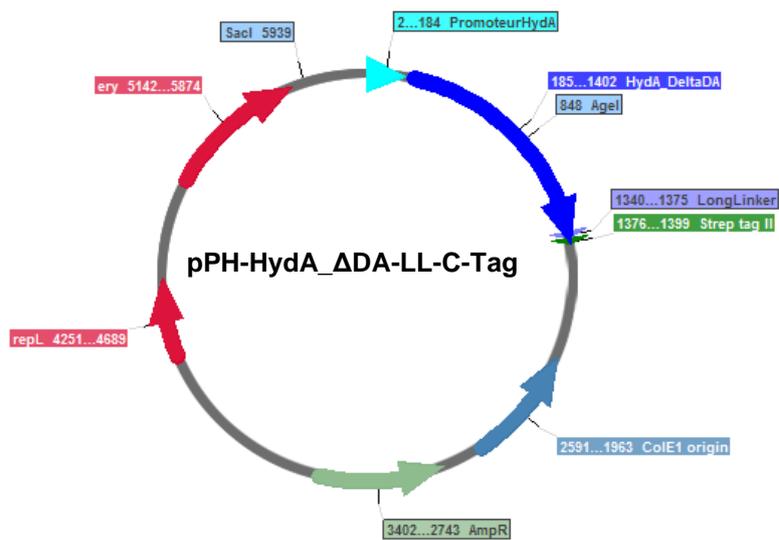
Plasmide pPH-HydA_C100A-LL-C-Tag



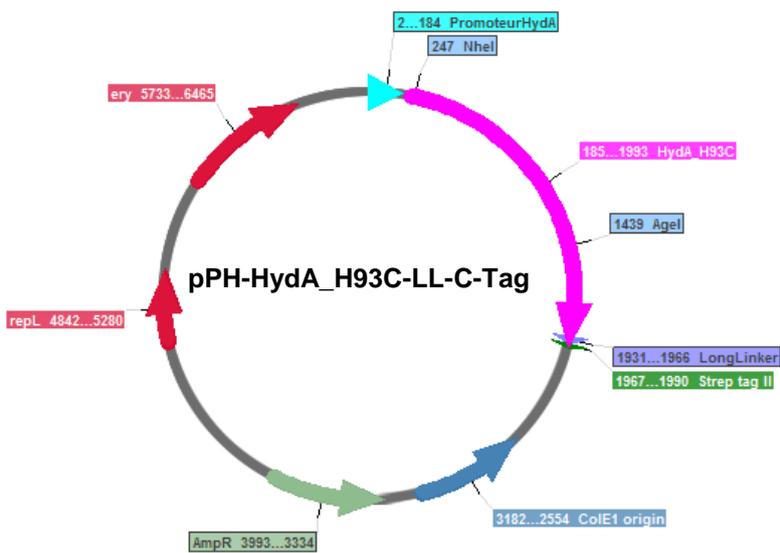
Plasmide pPH-HydA_C100A-LL-C-Tag



Plasmide pPH-HydA_ΔFS2-LL-C-Tag



Plasmide pPH-HydA_ΔDA-LL-C-Tag



Plasmide pPH-HydA_H93C-LL-C-Tag



Roles of the F-domain in [FeFe] hydrogenase



Charles Gauquelin^a, Carole Baffert^b, Pierre Richaud^c, Emma Kamionka^a, Emilien Etienne^b, David Guieysse^a, Laurence Girbal^a, Vincent Fourmond^b, Isabelle André^a, Bruno Guigliarelli^b, Christophe Léger^b, Philippe Soucaille^a, Isabelle Meynial-Salles^{a,*}

^a LISBP, Université de Toulouse, CNRS, INRA, INSA, Toulouse, France

^b Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, Marseille, France

^c CEA, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut de Biosciences et Biotechnologies Aix-Marseille, UMR 7265, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance F-13108, France

ARTICLE INFO

Keywords:

[Fe-Fe] hydrogenase
H-cluster
Electron transfer pathway
Accessory domains
Ferredoxin

ABSTRACT

The role of accessory Fe-S clusters of the F-domain in the catalytic activity of M3-type [FeFe] hydrogenase and the contribution of each of the two Fe-S surface clusters in the intermolecular electron transfer from ferredoxin are both poorly understood. We designed, constructed, produced and spectroscopically, electrochemically and biochemically characterized three mutants of *Clostridium acetobutylicum* CaHydA hydrogenase with modified Fe-S clusters: two site-directed mutants, HydA_C100A and HydA_C48A missing the FS4C and the FS2 surface Fe-S clusters, respectively, and a HydA_ΔDA mutant that completely lacks the F-domain. Analysis of the mutant enzyme activities clearly demonstrated the importance of accessory clusters in retaining full enzyme activity at potentials around and higher than the equilibrium $2\text{H}^+/\text{H}_2$ potential but not at the lowest potentials, where all enzymes have a similar turnover rate. Moreover, our results, combined with molecular modelling approaches, indicated that the FS2 cluster is the main gate for electron transfer from reduced ferredoxin.

1. Introduction

The anaerobic bacterium *Clostridium acetobutylicum* is known to exhibit a high rate of hydrogen production, with a productivity in chemostat of $2.4 \text{ L H}_2\text{L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ [1]. In vivo H_2 production is catalyzed by the [FeFe]-hydrogenase CaHydA (encoded by the *CA_C0028* gene), a 64-kDa monomeric cytoplasmic protein with > 70% identity to the hydrogenase Cpl from *C. pasteurianum* [2]. In vivo, CaHydA is involved in the reoxidation of ferredoxin, leading to proton reduction and dihydrogen formation [3]. The 2[4Fe-4S] ferredoxin encoded by the *CA_C0303* gene is therefore the key redox partner of hydrogenase, and electron transfer between these two proteins is an essential step in the mechanism of biological hydrogen production [4].

The catalytic sites of [FeFe] hydrogenases possess a unique architecture: an organometallic di-iron subsite, in which the two Fe atoms are linked by an azadithiolate bridge and coordinated by CO and CN ligands, is linked to a [4Fe-4S] subcluster, which is itself coordinated by four cysteine residues [5,6]. The physiological reduction of protons, based on a switching mechanism between the redox states of the catalytic site, requires attendant proton and electron transfer to the catalytic H-cluster site [7–11].

According to Meyer's classification [12], M1-type [Fe-Fe]

hydrogenases such as CrHydA1 from *Chlamydomonas reinhardtii* are limited to the highly-conserved H-domain containing the H-cluster.

CaHydA is an M3-type bacterial hydrogenase that harbors the H-domain and an F-domain composed of three accessory domains, including four Fe-S clusters, which are putatively involved in electron transfer to (or from) the catalytic site (Fig. 1A) [13].

The F-domain contains an internal domain with similarities to bacterial-type ferredoxin possessing two classic [4Fe-4S] clusters, termed FS4A and FS4B. In addition to this internal electron transfer domain (ETD), two additional accessory ETDs have been identified near the protein surface [13]. The 74-amino-acid N-terminal FS2 ETD contains a [2Fe-2S] cluster that is homologous to plant- and mammalian-type ferredoxins [14]. Finally, the 50-amino acid FS4C ETD contains an atypical [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine and one histidine residue, as also occurs in [NiFe] hydrogenases [15,16]. The relative position of each Fe-S cluster between the protein surface and the H-cluster strongly suggests that they serve as conduits for electron transfer and as initial electron acceptors from protein partners, especially for the FS4C and FS2 surface domains (Fig. 1A) [7,13,16].

Although M3-type hydrogenases exhibit hydrogen-evolving turnover rates that are 2- to 3-fold higher than those of M1-type hydrogenases [17,18], the role of each of the Fe-S clusters of the F-domain in

* Corresponding author.

E-mail address: meynial@insa-toulouse.fr (I. Meynial-Salles).

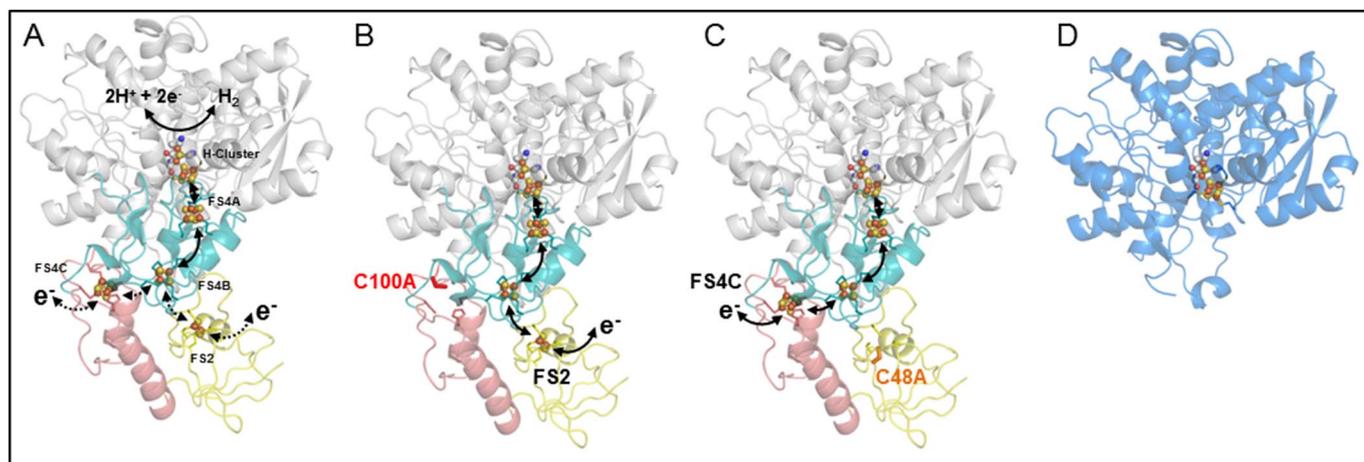


Fig. 1. Structure of [Fe-Fe]-hydrogenases. A: Structural model of *C. acetobutylicum* [FeFe] hydrogenase presenting the putative electron transfer pathways as dotted lines. B: In the HydA_C100A mutant enzyme, the electron transfer pathway should be limited to the [2Fe-2S] FS2 cluster. C: In the HydA_C48A mutant enzyme, the electron transfer pathway should be limited to the [4Fe-4S] FS4C cluster. D: The HydA_ΔDA mutant enzyme lacking the entire F-domain. The H-domain containing the catalytic site is depicted in gray in A, B and C and in blue in D; the FS4A and FS4B cluster domains are shown in light green, the FS4C cluster domain containing an atypical Fe-S cluster in pink, and the N-terminal [2Fe-2S] FS2 cluster domain in yellow.

catalytic performance has not yet been assessed. Furthermore, only a few studies have addressed intermolecular electron transfer, and these are limited and have focused on the interaction interface between the PetF ferredoxin and the CrHydA1 M1-type hydrogenase, which lacks the F domain [19–22]. The interaction between M3-type hydrogenases such as CaHydA and its main physiological redox partner has not been characterized. Both the FS4C and FS2 ETDs could potentially be involved in the interaction with 2[4Fe-4S] ferredoxin, but the precise role of each cluster has not been studied. A more detailed understanding of the mechanism and kinetics of the CaHydA/ferredoxin association would be of major importance to improve our understanding and to develop metabolic engineering strategies [23] for new strains with more efficient H₂ production.

In this work, to investigate both the importance of the F-domain in M3-type enzyme catalytic efficiency and the interaction between CaHydA and its main redox partner, an experimental approach was developed to design, construct, produce, purify and characterize new hydrogenase mutants for which accessory Fe-S cluster formation was hampered or completely abolished. The originality of the approach is to combine spectroscopical, biochemical and electrochemical characterization with the use of structural and computational methods. We report the impact of deleting F-domain Fe-S clusters on the activity of the H-cluster as a function of the potential. Moreover, we also identify the main gate of the F-domain for electron transfer from reduced ferredoxin.

2. Material and methods

Chemicals and bacterial strains are detailed in the Supplementary material.

2.1. Plasmids expressing mutant enzyme constructs and strain transformation

Site-directed mutagenesis was performed directly on the *hydA* gene cloned into the pPH_HydA-LL-C-Tag vector, which was described previously by Lautier et al. [24], to generate the pPH_HydA_C48A-LL-C-Tag and pPH_HydA_C100A-LL-C-Tag plasmids. To construct the HydA_ΔDA mutant, the N-terminal region (from M1 to C199) of the *hydA* gene was removed by mutagenesis using both the deltaDA_F and deltaDA_R primers directly on the pPH_HydA-LL-C-Tag vector (Table S2). All plasmids were introduced into *C. acetobutylicum* ATCC824ΔCAC15 by electroporation, as previously described, using erythromycin as the

selection marker [25]. After enzyme production and prior to purification, hydrogenase gene expression from the plasmids was validated directly by PCR profiling and sequencing.

2.2. Hydrogenase expression, recovery and purification

Anaerobic conditions (100% nitrogen) were maintained throughout the protein production and purification procedure. Wild-type CaHydA, HydA_C100A, HydA_C48A or HydA_ΔDA enzyme production and purification, in the form of Strep-tag II fused proteins, were performed as described previously by Lautier et al. [24], with the following modifications: based on recent work by Rouvre et al. [26], the sodium dithionite concentration in the buffer was reduced to 0.5 mM, the desthiobiotin concentration in the elution buffer was 7.5 mM, and DTT was not added to the elution fractions. The purity of the different enzyme preparations was verified by 4–15% SDS-PAGE (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) stained with Coomassie Blue (Instant Blue).

The same stock of enzyme preparation was first validated by proton reduction and hydrogen oxidation activities in solution and then used for circular dichroism (CD) spectroscopy, Fe content determination and protein film voltammetry experiments, as described below.

2.3. UV and EPR spectroscopy

Purified enzymes were anaerobically concentrated using 10 kDa MWCO Vivaspin centrifuge filters (Sartorius, Göttingen, Germany), and the buffer was exchanged with 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10% glycerol buffer to remove trace dithionite and desthiobiotin and to reach the enzyme concentration needed for spectroscopic analysis (> 50 μM). The absorbance spectra of concentrated enzymes were acquired aerobically with a Nanodrop (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) spectrophotometer between 250 and 700 nm.

EPR experiments were performed on a Bruker ELEXSYS E500 spectrometer equipped with an ER4102ST standard rectangular Bruker EPR cavity fitted to an Oxford Instruments ESR 900 helium flow cryostat.

The same stock of enzyme preparation was first validated by proton reduction and hydrogen oxidation activities in solution and then used for UV-Vis and EPR spectroscopy.

2.4. Circular dichroism

Prior to the circular dichroism experiments, the purified proteins

were dialyzed in 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer, pH 7.2. Circular dichroism spectra were acquired with a Jasco J-815 CD spectrometer, using a 1-mm path cell (190–260 nm), with a bandwidth of 1.00 nm at 50 nm/min scanning speed at 20 °C. The spectra presented are the average of triplicate accumulations. Analysis was performed with the Dichroweb interface [27] using the CDSSTR program with reference data set 7.

2.5. Determination of protein and iron concentrations

The hydrogenase protein concentration was first determined by amino acid analysis performed by Bio-Synthesis Inc. (Lewisville, TX, USA) and was routinely determined by the Bradford assay (Bio-Rad) with bovine serum albumin as the standard thereafter. The iron content of the recombinant hydrogenases was measured by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) analysis as described by Vinella et al. [28]. The iron content of the purified proteins was determined by the ratio between the molar iron concentration and the molar protein concentration of the same sample.

The full procedure for recombinant 2[4Fe-4S] ferredoxin gene design, cloning, expression, purification and validation is described in the Supplementary material.

2.6. Enzyme biochemical assays

In vitro hydrogen uptake assays, coupled with MV and Fd reduction, were performed as described previously by Demuez et al. [2].

In vitro hydrogen evolution activity was assayed by gas chromatography. Reactions were set up in anaerobic vials previously flushed with pure argon (10 mL) filled with 2 mL reaction mixture. The reaction mixture containing 50 mM Tris HCl, pH 7.0, 50 mM sodium dithionite and reduced MV or Fd was prepared under strict anaerobic conditions in a glove box and kept on ice. The reaction was initiated by incubating the reaction vial under agitation at 37 °C. The head space gas phase was sampled every 5 min using a SampleLock Gastight syringe (Hamilton, USA) and analyzed by gas chromatography. The gas chromatograph (Agilent Technologies 7890A, USA) was equipped with a Molesieve 5 Å column (30 m × 0.53 mm × 25 µm) and a thermal conductivity detector (TCD). Pure argon was used as the carrier gas (5 mL/min flow). Efficient separation was achieved in < 3 min at 60 °C (oven temperature), and quantitative detection was performed at 150 °C (TCD temperature). The hydrogen produced was quantified in comparison to the standard range of pure hydrogen (0.1 to 0.9 µmol H_2).

To determine the kinetic parameters, the MV concentration was varied from 0.1 mM to 40 mM, and the concentration of recombinant Fd was varied from 0.15 µM to 12 µM.

Isotope exchange activity was measured as described previously by Abou Hamdan et al. [29].

Biochemical enzyme assays in solution were performed immediately after production and purification using several (≥ 3) biological replicates for each enzyme. The enzyme samples were handled in the anaerobic chamber, stored at 4 °C, and never frozen as the enzyme activity decreased over time.

2.7. Electrochemical experiments

Electrochemical experiments and protein film voltammetry were performed as described previously by Orain et al. [5], Fourmond et al. [30] and Baffert et al. [31]. The data were baseline-subtracted and analyzed using the open source program QSoas (www.qsoas.org) [32].

2.8. Computational methods

2.8.1. Protein 3D modelling

The sequences of CaHydA and *Clostridium acetobutylicum* Fd were submitted to the I-TASSER server for automated protein structure and

function prediction [33]. The homologous *Clostridium pasteurianum* (CpI) (PDB ID: 3C8Y, 71% sequence identity with HydA) and *Clostridium pasteurianum* Fd (PDB ID: 1CLF, 87% sequence identity with ferredoxin from *Clostridium acetobutylicum*) structures were used to provide spatial restraints for CaHydA and *Clostridium acetobutylicum* ferredoxin, respectively. We then ensured that the correct conformation for each Fe-S cluster and the correct atomic compositions of the catalytic site were used [34].

The 3D models predicted by I-TASSER were then further refined by energy minimization using the CFF91 force field implementation in the DISCOVER module of the Insight II software suite (Accelrys, San Diego). The CFF91 cross-terms, a harmonic bond potential, and a dielectric constant of 1.0 were specified in the energy function. An initial minimization was performed with positional restraints on the protein backbone using a steepest descent algorithm followed by conjugated gradient minimization until the maximum RMS energy gradient was < 0.5 kcal mol⁻¹ Å⁻¹. The systems were then fully relaxed with no positional restraints.

2.9. Molecular docking

Redox partners were then docked on the surface of CaHydA and HydA_ΔDA. AutoDock4 was used for all dockings in this study, with parameters generally kept at their default values with the exception of the number of genetic algorithm (GA) runs, which was set to 100 for Fd and 256 for MV, and the grid spacing, which was changed to 0.55 [35]. The maximum number of grid points (126) was used for the docking grid, which encompassed the entire CaHydA structure. The independent GA runs (300 individuals in the population, 25,000,000 maximum energy evaluations, 27,000 maximum number of generations) were processed using the built-in clustering analysis with a 2.0-Å cutoff.

3. Results and discussion

3.1. Design and construction of hydrogenase mutants

Three different mutant enzymes were designed to assess the role of accessory Fe-S clusters of the F-domain on the catalytic activity of CaHydA [FeFe] hydrogenase in the absence and presence of electron transfer, as well as the contribution of each of the two Fe-S surface clusters to the intermolecular electron transfer from reduced ferredoxin (Fig. 1).

To determine the involvement of either the FS2 or FS4C cluster domains, two independent site-directed mutant enzymes were designed and constructed. Exchanging the direct ligands of Fe-S clusters has been widely employed [36] but has not been applied to entire M3-type bacterial [FeFe] hydrogenases. The substitution of only one cysteine residue has been successfully used to impair Fe-S cluster assembly [37,38], and the choice of alanine residue replacement prevents possible ligand exchange (as observed with a serine or glycine residue, for example) or cluster inter-conversion (from [4Fe-4S] to [3Fe-4S]) [15,16,36]. Two target residues were chosen to independently hamper Fe-S cluster formation: cysteine 48 was replaced with alanine to prevent correct FS2 formation and cysteine C100 was separately replaced with alanine to alter FS4C formation. As shown in Fig. 1B and C, in the two independent HydA_C100A and HydA_C48A mutant enzymes, the putative electron transfer pathways are thus limited to the FS2 and FS4C clusters, respectively.

Another mutant enzyme, HydA_ΔDA, in which the F domain containing the FS4A, FS4B, FS4C and FS2 clusters was deleted, was also designed and constructed (Fig. 1D). HydA_ΔDA hydrogenase is similar to the well-characterized CrHydA1 hydrogenase of *C. reinhardtii*, and the deletion led to the production of a minimal M1-type hydrogenase [39,40].

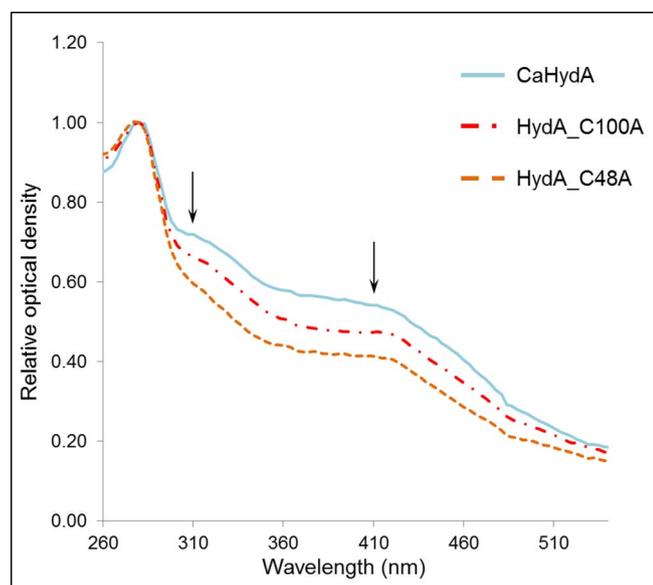


Fig. 2. UV-visible spectra of CaHydA, HydA_C48A and HydA_C100A enzymes. Spectra of concentrated ($> 50 \mu\text{M}$) enzymes were normalized to the maximal absorbance at 280 nm.

3.2. Enzyme purification and spectroscopical and biophysical characterization

The four hydrogenase enzymes, wild-type CaHydA and the HydA_C48A, HydA_C100A and HydA_ΔDA mutants were produced in a soluble form in *C. acetobutylicum*, purified in one step by affinity chromatography, and analyzed by SDS-PAGE. Each independently purified enzyme exhibited high purity, and the apparent molecular masses were consistent with the expected values (Fig. S1). Each enzyme was analyzed by a combination of several methods: i) iron content determination, ii) UV-visible spectroscopy, iii) EPR spectroscopy and iv) circular dichroism.

As indicated in Table S3, the expected numbers of iron atoms per molecule were measured.

UV-visible absorbance spectra further validated the quality of the samples (Fig. 2). Oxidized CaHydA enzyme exhibited very high absorbance at 280 nm and at both 310 nm and 410 nm, consistent with the presence of all expected Fe-S clusters [41,42]. HydA_C48A and HydA_C100A enzymes showed lowered absorbance at both 310 nm and 410 nm, clearly confirming the alteration in Fe-S cluster composition. However, the determination of the quantitative contribution at 310 nm and/or 410 nm of each of the targeted [2Fe-2S] or [4Fe-4S] accessory Fe-S clusters on the UV-visible complex spectra was not possible, as there are no comparable previous results. For example, the oxidized monomeric plant-type PetF ferredoxin, which contains only one [2Fe-2S], exhibits a very complex UV-vis spectrum with peaks at 280 nm, 330 nm, 422 nm and 465 nm [20,43]. Thus, the present work represents a good starting point for the interpretation of Fe-S cluster-modified enzyme complex spectra.

EPR experiments were performed on different redox states of wild-type CaHydA and HydA_C48A and HydA_C100A mutant enzymes. In the first step, these enzymes were H_2 -reduced and studied by EPR in different temperature conditions. When measured at 15 K, the wild-type enzyme exhibits a broad and complex spectrum typical of several paramagnetic interacting Fe-S clusters (Fig. 3a). Prominent features around $g = 2.019$ and 1.936 are indicative of the reduced [2Fe-2S] surface cluster signals [44], which can be selectively observed upon increasing temperature. Thus, at 70 K, the much faster relaxation properties of the reduced [4Fe-4S] clusters lead to the full disappearance of their corresponding EPR signals due to relaxation broadening (Fig. 3d). As for the wild-type enzyme, the low temperature

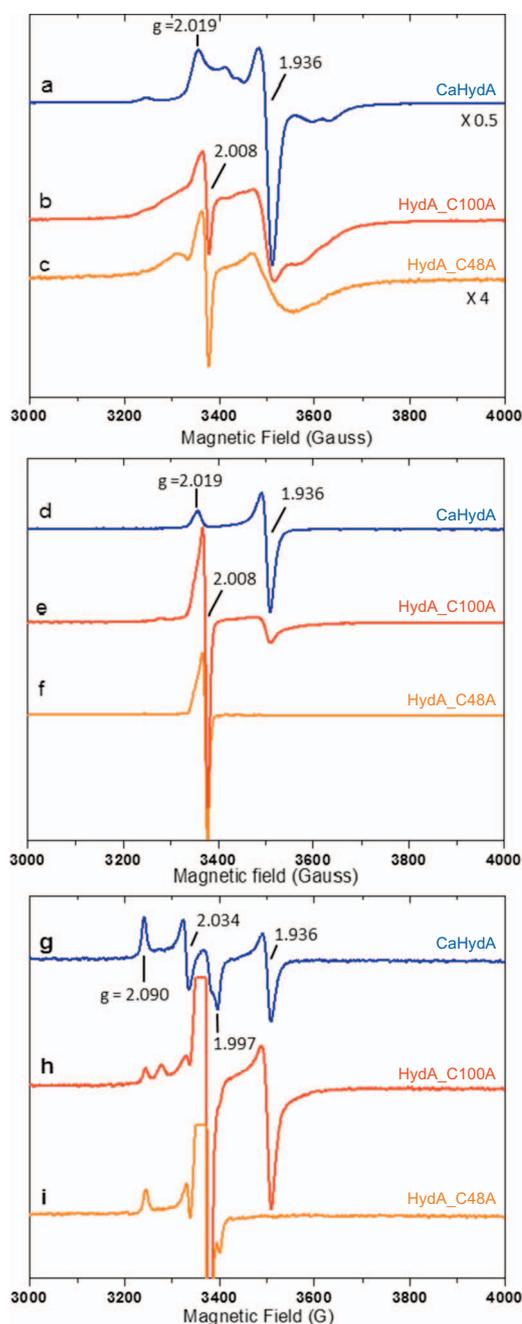


Fig. 3. EPR spectra given by CaHydA, HydA C100A and HydA C48A in different redox states. a, d, g: CaHydA; b, e, h: HydA C100A; c, f, i: HydA C48A. H_2 -reduced state (a–f); partial reoxidation under Ar flow (g–i). Experimental conditions: temperature, 15 K (a–c) or 70 K (d–i); microwave frequency, 9.482 GHz; microwave power, 10 mW; modulation amplitude, 0.5 mT at 100 kHz.

spectrum of the HydA_C100A mutant showed a complex spectrum but with a different shape, the major difference being the presence of an additional radical type signal around $g = 2.008$ (Fig. 3b). The slow relaxation properties of this species enabled to observe more clearly its signal at 70 K together with that of the reduced [2Fe-2S] surface center (Fig. 3e). The partial resolution of its g -tensor at $g = 2.02$ and 2.008 suggests that it could arise from sulfur-based radicals of free cysteine residues appearing as a result of targeted Fe-S loss [45,46]. In the HydA_C48A mutant, the low temperature spectrum exhibits a broad and featureless spectrum at $g = 2.04$ and 1.93, typical of reduced [4Fe-4S] clusters. In contrast with oxidoreductase carrying FeS center with different redox properties [47] and due to magnetic coupling between

paramagnetic clusters, it is difficult to attribute the low temperature EPR spectral shape variations to the simple loss of targeted Fe-S clusters. However, it appears clearly that the [2Fe-2S] surface signal is no longer visible in the 70 K EPR spectrum of this mutant, while the radical is present as for the other mutant (Fig. 3f). In a second step, H₂-reduced enzymes were partly reoxidized by thawing and briefly flushing EPR tubes with argon in anaerobic conditions. For the three enzymes, oxidized samples exhibit the classical H_{Ox} signal corresponding to the oxidized form of the H-Cluster with principal g values $g_1 = 2.090$, $g_2 = 2.034$, and $g_3 = 1.997$, confirming the presence of a correct catalytic H-Cluster for all enzymes. It is worth noting that due to the partial oxidation of these samples, the signal arising from the reduced [2Fe-2S] surface cluster is still detectable at $g = 1.936$ for CaHydA and HydA_C100A samples but is not present for HydA_C48A.

To determine if changes in the F-domain composition could induce structural changes in the protein, the purified hydrogenases were dialyzed and assayed by far-UV CD spectroscopy. No significant differences were observed between the wild-type and mutant enzymes, and all the spectra were consistent with those obtained previously for clostridial hydrogenases (Fig. S2) [41,42]. Moreover, analysis of the spectra showed that the overall secondary structure elements were conserved in all enzymes (Table S3) [13] and that, although the importance of Fe-S clusters in protein folding should not be neglected, their loss in our variant enzymes did not appear to result in structural changes.

All together, the biophysical and spectroscopical characterization of the purified wild-type and mutant enzymes validated i) the correct formation of the H-cluster in the HydA_ΔDA mutant and ii) the strategy of Fe-S cluster disruption for HydA_C48A and HydA_C100A, as already observed in ferredoxins or in other proteins possessing the same corresponding [2Fe-2S] and [4Fe-4S] cluster coordination patterns [48].

3.3. Protein film voltammetry experiments

Voltammetry experiments were performed on the native and mutant hydrogenases adsorbed on a carbon electrode surface to explore the catalytic electrochemistry of the hydrogenases. The steady-state catalytic current changes direction sharply on either side of the equilibrium 2H⁺/H₂ potential (−0.425 V), confirming that [FeFe]-hydrogenases are reversible electrocatalysts (Fig. 4).

Fig. 4A shows that the mutation have a larger effect on H₂ oxidation than on H₂ production, and result in an increased catalytic bias towards H₂ production. The C48A and ΔDA mutations have the most significant effects. Furthermore, this behavior was associated with a change in the shape of the signals not due to enzyme instability (data not shown) [30]: the CaHydA and HydA_C100A derivative signals present an inflection point, while the slopes of the HydA_C48A and HydA_ΔDA signals are constantly decreasing with increasing potential (Fig. 4B).

Applying previously reported methods [5,30,49] enabled us to also

determine the enzymatic and kinetic parameters linked to active-site properties. Table 1 presents the constants related to H₂ binding, H₂ inhibition for proton reduction, CO binding and release and O₂ sensitivity. Despite some small differences, the kinetic constants related to ligand binding were similar for all four enzymes; thus, gas diffusion to the H-cluster is not affected by the suppression of the accessory Fe-S clusters.

3.4. Role of the F-domain on the potential dependent catalytic properties of the hydrogenase

From Fig. 4A, the current intensities for each enzyme normalized to the current intensities of the wild-type hydrogenase at different potentials are plotted (Fig. 5).

This clearly shows that all mutations affecting the composition in Fe-S clusters of the F-domain increase the bias towards H₂ production. To analyze how the different F-domain mutants behave in solution compared to wired to an electrode, *k*_{cat} values were determined at pH 7 for hydrogen uptake (at a potential of −0.425 V, using 1 atm H₂ as a reductant and MV as electron acceptor), for hydrogen production (at a potential of −0.415 V using 50 mM sodium dithionite [50] as a reductant and MV as an electron donor for the hydrogenases) and for proton-deuterium exchange (at a potential of −0.425 V, using 1 atm D₂ as a reductant and no external electron acceptor/donor) (Fig. 6).

All enzymes behave qualitatively the same i) for all the activities measured in solution and ii) when compared to the relative activities of the enzymes wired to an electrode at the same potential: at potentials surrounding the equilibrium 2H⁺/H₂ potential, altering the composition of the F-domain decreases the turnover of the hydrogenase with and without intermolecular electron transfer [51].

To complete this study, chemical reductants of potentials lower than dithionite would be needed to evaluate in solution how the F-domain affects the catalytic activity of H₂ production if electrons of low potentials are provided to the H-cluster.

What can explain the contribution of the accessory Fe-S clusters present in the F-domain of CaHydA to the catalytic behavior of the H-clusters at potentials around the equilibrium 2H⁺/H₂ potential both in solution and wired to an electrode? Fe-S clusters function as a system of arrays in interaction, and it is plausible that decreasing the number of Fe-S clusters in the F-domain could have a long-range thermodynamic effect on the H-clusters, i.e., decrease (make more negative) the potential of the H-cluster. This would explain why for H₂ oxidation, a more negative potential of the H-cluster leads to a lower turnover, as the rate would be limited by the potential of the 2H⁺/H₂ couple, while for H₂ production it would be possible to compensate this lower potential of the H-cluster by providing electrons of lower potential. This positive effect of the F-domain on H₂ production at “physiological potential”, i.e., near the equilibrium 2H⁺/H₂ potential, would explain

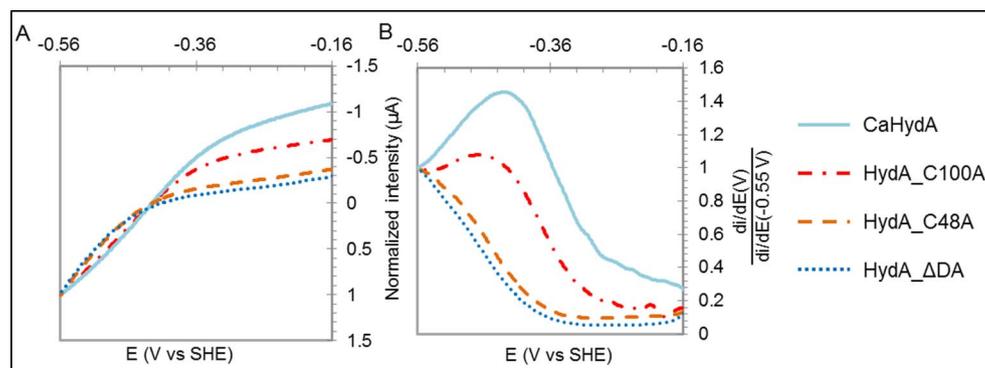


Fig. 4. Catalytic signals of wild-type and mutant enzymes. Panel A shows the current intensities normalized to the absolute value of the current intensity at the lowest potential for each enzyme, and panel B shows the first derivative of the data normalized to the absolute value of the derivative current intensity at the lowest potential for each enzyme. CaHydA is shown as a solid cyan line, HydA_C100A as a red dashed line, HydA_C48A as an orange dashed line and HydA_ΔDA as a blue dotted line.

Table 1
Kinetic parameters for wild-type and mutant hydrogenases.

Gaz enzyme	H ₂ ^a		CO ^b		O ₂ ^c		
	<i>K_m</i> (bar)	<i>k_i</i> (bar)	<i>k_i</i> (s ⁻¹ ·mM)	<i>k_a</i> (s ⁻¹)	<i>k_i</i> (s ⁻¹ ·mM)	<i>K_a</i> (s ⁻¹)	<i>k₃</i> (s ⁻¹)
CaHydA	0.8	26	8	0.015	1.1	0.04	0.003
HydA_C100A	1.5 ± 0.5	35	6.5	0.016	1 ± 0.3	0.035 ± 0.01	0.006
HydA_C48A	1.5 ± 0.5	35	10	0.017	0.85 ± 0.2	0.03 ± 0.01	0.01
HydA_ΔDa	1	35	15	0.03	0.7	0.06	0.008

^a Kinetic constants relative to H₂ were measured as described in [30] (T = 30 °C, 1 bar H₂, pH 7, E = -0,16V/SHE).

^b Kinetic constants relative to CO were measured as described in [31] (T = 30 °C, 1 bar H₂, pH 7, E = -0,16V/SHE). Values not corrected for the small protective effect of H₂.

^c Kinetic constants relative to O₂ were measured as described in [5] (T = 12 °C, 1 bar H₂, pH 7, E = 0,04V/SHE).

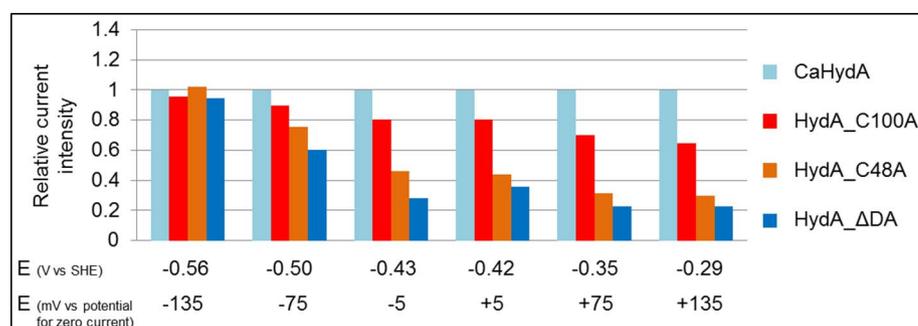


Fig. 5. Relative catalytic current of the wild-type and mutant enzymes at different potentials. The current values are normalized to the wild-type current at each potential (versus SHE or versus potential for zero current).

why M3-type hydrogenases exhibit a higher turnover rate than M1-type hydrogenases.

3.5. Kinetic properties of the different hydrogenase mutants with artificial and physiological redox partners

The main objective of this part of the study was to evaluate, based on an in-depth kinetic analysis of the different mutants, if one of the surface Fe-S clusters (FS2 or FS4C) was potentially the preferential site for electron transfer from ferredoxin. The prerequisite for this study was the production of ferredoxin in amounts sufficient for complete biochemical characterization and in-depth kinetic analysis. The main ferredoxin in *C. acetobutylicum* is encoded by the *CA_C0303* gene [4,52]. This protein was anaerobically produced as a fusion with a Strep-Tag II C-terminal linker in the *E. coli* *MG1655 ΔiscR* strain and purified in one step using a Strep-Tactin affinity column under strictly anaerobic conditions. The correct formation of the 2[4Fe-4S] clusters was validated by determining i) the absorption spectra and ii) the iron content, as well as by the electrochemical characterization of the recombinant protein (see Supplementary material). Finally, similar specific hydrogenase CaHydA activities were measured (approximately 45 U/mg) with both recombinant and native Fd, validating that this recombinant ferredoxin could be used for kinetic studies in place of native ferredoxin (Fig. S3 and Table S4).

Enzyme kinetic parameters were then explored in the hydrogen uptake direction, with both artificial (MV) and physiological

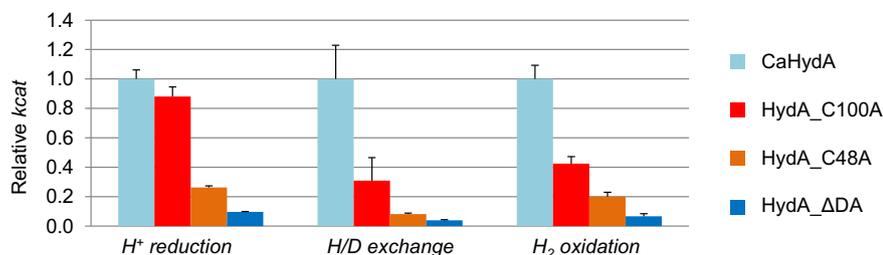


Fig. 6. Comparison of *k_{cat}* of wild-type and mutant hydrogenase for proton reduction, proton-deuterium exchange and di-hydrogen oxidation. The values of the mutant enzymes are expressed as the ratio of the native enzyme value for each reaction. Error bars represent the STD from experiments performed on at least three enzyme stocks purified independently (T = 37 °C, pH 7, for H⁺ reduction and H₂ oxidation, T = 30 °C, pH 7.2, for H/D exchange).

(ferredoxin; Fd) redox partners. Michaelis-Menten kinetic parameters are presented in the Supplementary material (Table S5, Figs. S4 and S5). As the deletion of the surface Fe-S clusters negatively affected the activity of the H-cluster independent of the presence of a redox partner (see above), the *k_{cat}* and *K_m* values of each of the mutants for both MV and Fd were first analyzed (Fig. 7) separately before examining the catalytic efficiencies.

For all redox partners, the normalized (to the wild-type enzyme) *k_{cat}* values followed qualitatively the same trend as the normalized proton-deuterium exchange rate (Figs. 6 and 7A). Quantitatively, the normalized *k_{cat}* value was constant for both redox partners for the HydA_C100A (lacking the FS4C Fe-S surface center) mutant, and the normalized *k_{cat}* value of the HydA_C48A (lacking the FS2 surface center) mutant was only slightly lower with ferredoxin than with MV (Fig. 7A). However, although the *K_m* value normalized to the wild-type enzyme was nearly unchanged with MV for both Fe-S surface mutants, the normalized *K_m* values with Fd increased 1.7-fold for HydA_C100A and by > 3-fold for HydA_C48A (Fig. 7B). Thus, the decreased catalytic efficiency for MV of both surface mutants was quasiexclusive due to the negative effect of the deletion of the surface Fe-S clusters on the activity of the H-cluster and was not associated with the use of MV as a redox partner, suggesting that MV can directly transfer electrons to the H-cluster. By contrast, the dihydrogen oxidation catalytic efficiency for Fd compared to MV was reduced 1.8-fold for the HydA_C100A mutant and 6-fold for the HydA_C48A mutant (Fig. S6A and Table S5); the same trend was observed for proton reduction catalytic efficiency (Fig. S6B).

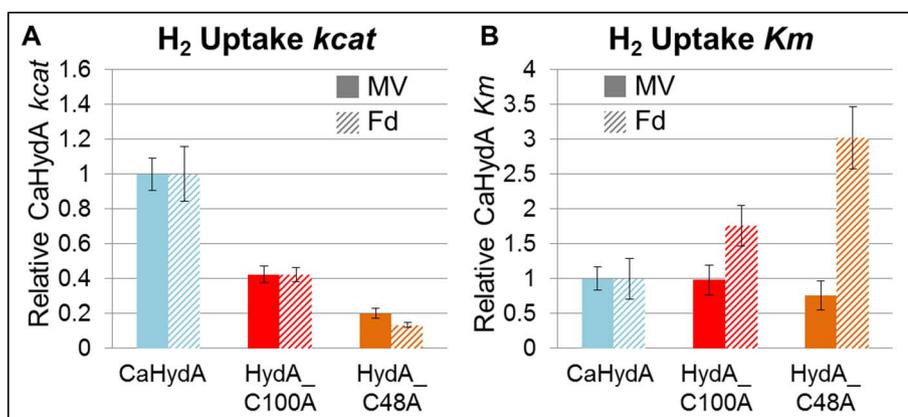


Fig. 7. Comparison of k_{cat} and K_m of the wild-type and mutant hydrogenases. The values of the mutant enzymes are expressed as the ratio of the native enzyme value for hydrogen uptake with MV (full boxes) or Fd (striped boxes) as the redox partner. Error bars represent STD from experiments performed on at least three enzyme stocks purified independently.

Thus, impairing the formation of the FS2 cluster had a greater effect on the catalytic efficiency for Fd than impairing the formation of the FS4C cluster. This result highlights the importance of the FS2 cluster in maintaining efficient electron transfer between the two partners.

In addition, the complete deletion of the F-domain of CaHydA led to a drastic decrease in the normalized (to the wild-type enzyme) k_{cat} values for hydrogen uptake using either MV or Fd as the redox partners (Fig. 4 and Table S5). Furthermore, compared to the wild-type enzyme, a 70-fold decrease in the catalytic efficiency of the HydA $_{\Delta}$ DA enzyme for ferredoxin was measured, indicating that this mutant enzyme was a poor catalyst when bacterial Fd was used, even if electron transfer was still possible (Fig. S6 and Table S5). This case also held when the plant-type Fd was used (Supplementary material), as expected for the following two reasons. First, residues buried in CaHydA become surface-exposed in the HydA $_{\Delta}$ DA mutant, thereby disrupting possible interactions with Fd; second, residues specifically involved in the interaction between CrHydA1 and plant-type Fd are absent from the HydA $_{\Delta}$ DA mutant [19,40]. In addition, as previously reported [53,54], the HydA $_{\Delta}$ DA enzyme retains oxygen tolerance characteristics similar to those of the original bacterial-type enzyme (Table 1), offering great possibilities for further enzyme-engineering strategies. Furthermore, the HydA $_{\Delta}$ DA enzyme retained approximately half of the reported hydrogen-evolving activity with MV of the structurally similar *C. reinhardtii* CrHydA1 hydrogenase: $V_{max} = 317 \pm 8 \mu\text{mol} \cdot \text{H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ for HydA $_{\Delta}$ DA compared with $730 \pm 8 \mu\text{mol} \cdot \text{H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ for CrHydA1 [40]. Thus, the production of a minimal hydrogenase from the *C. acetobutylicum* enzyme is achievable; indeed, a correctly folded enzyme with a functional catalytic site was obtained.

3.6. Insight into the interaction with redox partners

To investigate the interaction between the CaHydA enzyme and both its physiological and artificial redox partners at the atomic level, a three-dimensional (3D) model of our enzyme was generated using the X-ray structure of the *Clostridium pasteurianum* enzyme (PDB ID: 3C8Y) (13) as a template.

Automated molecular docking software was then used to explore the binding of MV to CaHydA. The docking of this molecule appeared scattered across the protein surface, suggesting non-specific binding most likely due to its conjugated planar molecular structure (Fig. S7). Approximately half of the solutions showed unexpectedly favorable binding of MV to the N-terminal part of the protein. Less populated docking clusters also revealed binding modes near the H-cluster and a conserved possibility of the direct interaction of this artificial redox partner with the catalytic domain, as previously proposed [2] in agreement with the conservation of the K_m value for MV determined in solution (Figs. 7 and S8).

In parallel, to investigate complex formation between HydA and its

physiological redox partner, we built a 3D structural model of *C. acetobutylicum* Fd with proper incorporation of the two [4Fe-4S] clusters. Fd was then docked onto CaHydA. As shown in Fig. 8A, all docking solutions were found to form a belt around part of the enzyme. Different docking modes were observed, but they all involved interactions with amino acid residues belonging, in a large majority, to the F-domain, with possible binding of Fd near FS4C or FS2 clusters. Among the half of top solutions ranked by the lowest binding energy, > 70% were found 1.4-fold closer to the FS2 cluster domain than to the FS4C cluster domain (Fig. 8B). Finally, among the four highly populated solution clusters of lowest binding energy, 75% of the Fd binding modes were closer to the FS2 cluster than to the FS4C cluster (Fig. 8C), and the average distance between the Fd cluster closest to either of the hydrogenase surface clusters was 1.7-fold shorter to the FS2 cluster than to the FS4C cluster (Fig. 8D). These data from molecular modelling clearly support the kinetic data demonstrating the importance of the FS2 cluster for efficient electron transfer from ferredoxin.

Moreover, we analyzed the amino acid residues of CaHydA involved in the interaction with Fd in more detail. Consistently, three surface-exposed regions of the enzyme appeared systematically engaged. Two of these regions consist of residues belonging to the first N-terminal α -helix of the enzyme, from I19 to E25, and of residues of the helix formed by residues V153 to H159. The third region corresponds to a large loop formed by amino acid residues C34 to C45 (Fig. S9). This loop contains two of the four cysteine residues that coordinate the FS2 cluster, as well as positively charged residues (K37 and K44), aromatic residues (F35 and F42) and one free cysteine residue (C39). Conformational rearrangements of this loop could play a major role in the redox mechanism of CaHydA and might be of prime interest for further investigation by molecular dynamics simulations.

4. Conclusion

Considering the high catalytic activity of M3-type [Fe-Fe] hydrogenases compared with that of the simplest M1-type enzymes, the original aim of our experimental approach was to assess the impact of some of the Fe-S clusters of the F-domain on H-cluster performance. This work presented the spectroscopical, biochemical and electrochemical characterizations of the three active mutants of CaHydA that were impaired in their catalytic activity in solution and whose catalytic bias is modified in favour of H_2 production when wired to an electrode. Our results suggest that the Fe-S clusters of the F-domain have a long-range thermodynamic effect on the H-cluster, i.e., an increase (make less negative) in the potential of the H-cluster favoring H_2 production activity at the “physiological value” of the potential. Moreover, the experimental results, combined with molecular modelling studies, indicated the key involvement of the FS2 cluster in electron transfer with the physiological redox partner Fd.

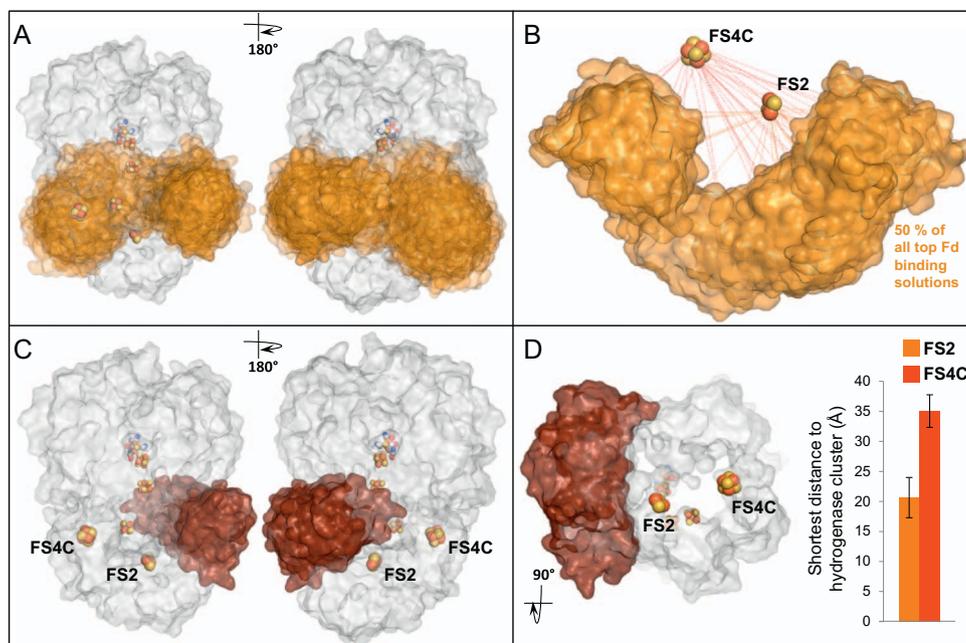


Fig. 8. Distribution of ferredoxin docking solutions on the surface of CaHydA. A: View of all the docking solutions, represented in orange, form a belt around CaHydA. B: Among half of the top binding solutions, Fd is found closer to the FS2 cluster than to the FS4C cluster. C: The docking solutions, represented in brown, correspond to 75% of the solutions found among the four most highly populated clusters with the lowest binding energy. D: As shown in the histogram, the distance between closest Fd cluster is 1.7-fold shorter to FS2 than to FS4C.

Transparency document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found, in the online version.

Acknowledgments

The authors thank Marie Demuez and Antoine Rivière for their contributions to this work and Luca de Gioia and Claudio Greco for helpful discussions. This work was financially supported by the Agence Nationale de la Recherche (contract ANR 12-BS08-0014-03). Support was also provided by the national French EPR network (RENARD, IR3443, <http://renard.univ-lille1.fr>). PR was supported by HelioBiotec, EU Grant 1944-32670, Provence Alpes Côte d'Azur (PACA) DEB 09-621, and Commissariat à l'Énergie Atomique. The group in Marseille is part of the FrenchBIC network (<http://www.frenchbic.cnrs.fr>).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2017.08.010>.

References

- B. Soni, P. Soucaille, G. Goma, Continuous acetone-butanol fermentation — influence of vitamins on the metabolic-activity of *Clostridium acetobutylicum*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 (1987) 1–5.
- M. Demuez, L. Cournac, O. Guerrini, P. Soucaille, L. Girbal, Complete activity profile of *Clostridium acetobutylicum* [FeFe]-hydrogenase and kinetic parameters for endogenous redox partners, *FEMS Microbiol. Lett.* 275 (2007) 113–121, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00868.x>.
- J.W. Peters, G.J. Schut, E.S. Boyd, D.W. Mulder, E.M. Shepard, J.B. Broderick, P.W. King, M.W.W. Adams, [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation, *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 1350–1369, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.021>.
- M. Yoo, G. Bestel-Corre, C. Croux, A. Riviere, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, A quantitative system-scale characterization of the metabolism of *Clostridium acetobutylicum*, *MBio* 6 (2015) e01808–e01815, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.01808-15>.
- C. Orain, L. Saujet, C. Gauquelin, P. Soucaille, I. Meynial-Salles, C. Baffert, V. Fourmond, H. Bottin, C. Léger, Electrochemical measurements of the kinetics of inhibition of two FeFe hydrogenases by O₂ demonstrate that the reaction is partly reversible, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 12580–12587, <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.5b06934>.
- U. Ryde, C. Greco, L. De Gioia, Quantum refinement of [FeFe] hydrogenase indicates a dithiomethylamine ligand, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 4512–4513, <http://dx.doi.org/10.1021/ja909194f>.
- M. Winkler, J. Esselborn, T. Happe, Molecular basis of [FeFe]-hydrogenase function, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1827 (2013) 974–985, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabo.2013.03.004>.
- V. Fourmond, C. Greco, K. Sybirna, C. Baffert, P.H. Wang, P. Ezanno, M. Montefiori, M. Bruschi, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, J. Blumberger, H. Bottin, L. De Gioia, C. Léger, The oxidative inactivation of FeFe hydrogenase reveals the flexibility of the H-cluster, *Nat. Chem.* 6 (2014) 336–342, <http://dx.doi.org/10.1038/nchem.1892>.
- B. Ginovska-Pangovska, S. Raugei, W.J. Shaw, Molecular dynamics studies of proton transport in hydrogenase and hydrogenase mimics, *Methods Enzymol.* 578 (2016) 73–101, <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2016.05.044>.
- D.W. Mulder, Y. Guo, M.W. Ratzloff, P.W. King, Identification of a catalytic iron-hydride at the H-cluster of [FeFe]-hydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 83–86, <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b11409>.
- C. Sommer, A. Adamska-Venkatesh, K. Pawlak, J.A. Birrell, O. Rüdiger, E.J. Reijerse, W. Lubitz, Proton coupled electronic rearrangement within the H-cluster as an essential step in the catalytic cycle of [FeFe] hydrogenases, *J. Am. Chem. Soc.* 139 (2017) 1440–1443, <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.6b12636>.
- J. Meyer, [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective, *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) 1063–1084, <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-007-6477-4>.
- J.W. Peters, W.N. Lanzilotta, B.J. Lemon, L.C. Seefeldt, X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom resolution, *Science* 282 (1998) 1853–1858, <http://dx.doi.org/10.1126/science.282.5395.1853>.
- R. Kümmerle, M. Atta, J. Sculler, J. Gaillard, J. Meyer, Structural similarities between the N-terminal domain of *Clostridium pasteurianum* hydrogenase and plant-type ferredoxins, *Biochemistry* 38 (1999) 1938–1943, <http://dx.doi.org/10.1021/bi982416j>.
- S. Dementin, V. Belle, P. Bertrand, B. Guigliarelli, G. Adryanczyk-Perrier, A.L. De Lacey, V.M. Fernandez, M. Rousset, C. Léger, Changing the ligation of the distal [4Fe4S] cluster in NiFe hydrogenase impairs inter- and intramolecular electron transfers, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 5209–5218, <http://dx.doi.org/10.1021/ja060233b>.
- J.W. Peters, Structure and mechanism of iron-only hydrogenases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 670–676, [http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00028-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00028-7).
- S. Morra, A. Cordara, G. Gilardi, F. Valetti, Atypical effect of temperature tuning on the insertion of the catalytic iron-sulfur center in a recombinant [FeFe]-hydrogenase, *Protein Sci.* 24 (2015) 2090–2094, <http://dx.doi.org/10.1002/pro.2805>.
- J. Esselborn, C. Lambert, A. Adamska-Venkatesh, T. Simmons, G. Berggren, J. Noth, J.F. Siebel, A. Hemschemeier, V. Artero, E. Reijerse, M. Fontecave, W. Lubitz, T. Happe, Spontaneous activation of [FeFe]-hydrogenases by an inorganic [2Fe] active site mimic, *Nat. Chem. Biol.* 9 (2013) 607–609, <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1311>.
- K. Sybirna, P. Ezanno, C. Baffert, C. Léger, H. Bottin, Arginine171 of *Chlamydomonas reinhardtii* [Fe–Fe] hydrogenase HydA1 plays a crucial role in electron transfer to its catalytic center, *Int. J. Hydrog. Energy* 38 (2013) 2998–3002, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.078>.
- S. Rumpel, J.F. Siebel, M. Diallo, C. Farès, E.J. Reijerse, W. Lubitz, Structural insight into the complex of ferredoxin and [FeFe] hydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chembiochem* 16 (2015) 1663–1669, <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201500130>.

- [21] H. Long, C.H. Chang, P.W. King, M.L. Ghirardi, K. Kim, Brownian dynamics and molecular dynamics study of the association between hydrogenase and ferredoxin from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biophys. J.* 95 (2008) 3753–3766, <http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.107.127548>.
- [22] M. McCullagh, G.A. Voth, Unraveling the role of the protein environment for [FeFe]-hydrogenase: a new application of coarse-graining, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 4062–4071, <http://dx.doi.org/10.1021/jp402441s>.
- [23] M. Yoo, C. Croux, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, Elucidation of the roles of adhE1 and adhE2 in the primary metabolism of *Clostridium acetobutylicum* by combining in-frame gene deletion and a quantitative system-scale approach, *Biotechnol. Biofuels* 9 (2016) 92, <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-016-0507-0>.
- [24] T. Lautier, P. Ezanno, C. Baffert, V. Fourmond, L. Cournac, J.C. Fontecilla-camps, P. Soucaille, P. Bertrand, I. Meynial-Salles, C. Léger, The quest for a functional substrate access tunnel in FeFe hydrogenase, *Faraday Discuss.* 148 (2011) 385–407, <http://dx.doi.org/10.1039/c004099c> (discussion 421–441).
- [25] S. Dusséaux, C. Croux, P. Soucaille, I. Meynial-Salles, Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for the high-yield production of a biofuel composed of an isopropanol/butanol/ethanol mixture, *Metab. Eng.* 18 (2013) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mbs.2013.03.003>.
- [26] I. Rouvre, C. Gauquelin, I. Meynial-Salles, R. Basseguy, Impact of the chemicals, essential for the purification process of strict Fe-hydrogenase, on the corrosion of mild steel, *Bioelectrochemistry* 109 (2016) 9–23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.12.006>.
- [27] L. Whitmore, B.A. Wallace, Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases, *Biopolymers* 89 (2008) 392–400, <http://dx.doi.org/10.1002/bip.20853>.
- [28] D. Vinella, F. Fischer, E. Vorontsov, J. Gallaud, C. Malosse, V. Michel, C. Cavazza, M. Robbe-Saule, P. Richaud, J. Chamot-Rooke, C. Brochier-Armanet, H. De Reuse, Evolution of *Helicobacter*: acquisition by gastric species of two histidine-rich proteins essential for colonization, *PLoS Pathog.* 11 (2015) e1005312, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1005312>.
- [29] A. Abou Hamdan, S. Dementin, P.P. Liebgott, O. Gutierrez-Sanz, P. Richaud, A.L. De Lacey, M. Rousset, P. Bertrand, L. Cournac, C. Léger, Understanding and tuning the catalytic bias of hydrogenase, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 8368–8371, <http://dx.doi.org/10.1021/ja301802r>.
- [30] V. Fourmond, C. Baffert, K. Sybirna, T. Lautier, A. Abou Hamdan, S. Dementin, P. Soucaille, I. Meynial-Salles, H. Bottin, C. Léger, Steady-state catalytic wave-shapes for 2-electron reversible electrocatalysts and enzymes, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 3926–3938, <http://dx.doi.org/10.1021/ja311607s>.
- [31] C. Baffert, L. Bertini, T. Lautier, C. Greco, K. Sybirna, P. Ezanno, E. Etienne, P. Soucaille, P. Bertrand, H. Bottin, I. Meynial-Salles, L. De Gioia, C. Léger, CO disrupts the reduced H-cluster of FeFe hydrogenase. A combined DFT and protein film voltammetry study, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 2096–2099, <http://dx.doi.org/10.1021/ja110627b>.
- [32] V. Fourmond, QSoas: a versatile software for data analysis, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5050–5052, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00224>.
- [33] A. Roy, A. Kucukural, Y. Zhang, I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 725–738, <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
- [34] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, ¹⁴N HYSCORE investigation of the H-cluster of [FeFe] hydrogenase: evidence for a nitrogen in the dithiol bridge, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11 (2009), <http://dx.doi.org/10.1039/b905841a>.
- [35] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstrom, M.F. Sanner, R.K. Belew, D.S. Goodsell, A.J. Olson, AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 2785–2791, <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [36] J.-M. Moulis, V. Davasse, M.-P. Golinelli, J. Meyer, I. Quinkal, The coordination sphere of iron–sulfur clusters: lessons from site-directed mutagenesis experiments, *J. Biol. Inorg. Chem.* 1 (1996) 2–14, <http://dx.doi.org/10.1007/s007750050017>.
- [37] V. Augier, M. Asso, B. Guigliarelli, C. More, P. Bertrand, C.L. Santini, F. Blasco, M. Chippaux, G. Giordano, Removal of the high-potential [4Fe-4S] center of the beta-subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutated enzymes, *Biochemistry* 32 (1993) 5099–5108, <http://dx.doi.org/10.1021/bi00070a018>.
- [38] M.T. Werth, H. Sices, G. Cecchini, I. Schröder, S. Lasage, R.P. Gunsalus, M.K. Johnson, Evidence for non-cysteiny coordination of the [2Fe-2S] cluster in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase, *FEBS Lett.* 299 (1992) 1–4, [http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80086-V](http://dx.doi.org/10.1016/0014-5793(92)80086-V).
- [39] T. Happe, J.D. Naber, Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur. J. Biochem.* 214 (1993) 475–481, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb17944.x>.
- [40] M. Winkler, S. Kuhlert, M. Hippler, T. Happe, Characterization of the key step for light-driven hydrogen evolution in green algae, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 36620–36627, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.053496>.
- [41] J.S. Multani, L.E. Mortenson, Circular dichroism spectra of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5, *Biochim. Biophys. Acta* 256 (1972) 66–70, [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728\(72\)90163-6](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728(72)90163-6).
- [42] S. Morra, A. Giraudo, G. Di Nardo, P.W. King, G. Gilardi, F. Valetti, Site saturation mutagenesis demonstrates a central role for cysteine 298 as proton donor to the catalytic site in CaHydA [FeFe]-hydrogenase, *PLoS One* 7 (2012) e48400, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048400>.
- [43] K. Tagawa, D.I. Arnon, Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in the biological production and consumption of hydrogen gas, *Nature* 195 (1962) 537–543, <http://dx.doi.org/10.1038/195537a0>.
- [44] S. Morra, S. Maurelli, M. Chiesa, D.W. Mulder, M.W. Ratzloff, E. Giamello, P.W. King, G. Gilardi, F. Valetti, The effect of a C298D mutation in CaHydA [FeFe]-hydrogenase: insights into the protein-metal cluster interaction by EPR and FTIR spectroscopic investigation, *Biochim. Biophys. Acta* 1857 (2016) 98–106, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.005>.
- [45] U. Schmidt, Free radicals and free-radical reactions of monovalent and divalent sulfur, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* 3 (1964) 602–608, <http://dx.doi.org/10.1002/ange.196406021>.
- [46] J. Coves, H. De Fallois, L. Le Pape, Inactivation of *Escherichia coli* ribonucleotide reductase by evidence for a transient protein perthyl radical, *Biochemistry* 35 (1996) 8595–8602.
- [47] B. Guigliarelli, A. Magalon, M. Asso, P. Bertrand, C. Frixon, G. Giordano, F. Blasco, Complete coordination of the four Fe-S centers of the beta subunit from *Escherichia coli* nitrate reductase. Physiological, biochemical, and EPR characterization of site-directed mutants lacking the highest or lowest potential [4Fe-4S] clusters, *Biochemistry* 35 (1996) 4828–4836, <http://dx.doi.org/10.1021/bi952459p>.
- [48] Y. Zhang, C. Yang, A. Dancis, E. Nakamaru-Ogiso, EPR studies of wild type and mutant Dre2 identify essential [2Fe–2S] and [4Fe–4S] clusters and their cysteine ligands, *J. Biochem.* 161 (2017) 67–78, <http://dx.doi.org/10.1093/jb/mv054>.
- [49] V. Fourmond, C. Baffert, K. Sybirna, S. Dementin, A. Abou-Hamdan, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, H. Bottin, C. Léger, The mechanism of inhibition by H₂ of H₂-evolution by hydrogenases, *Chem. Commun. (Camb.)* 49 (2013) 6840–6842, <http://dx.doi.org/10.1039/c3cc43297a>.
- [50] S.G. Mayhew, The redox potential of dithionite and SO₂ from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase, *Eur. J. Biochem.* 85 (1978) 535–547, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1978.tb12269.x>.
- [51] P.M. Vignais, H/D exchange reactions and mechanistic aspects of the hydrogenases, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 1677–1690 (j.ccr.2005).
- [52] O. Guerrini, B. Burlat, C. Léger, B. Guigliarelli, P. Soucaille, L. Girbal, Characterization of two 2[4Fe4S] ferredoxins from *Clostridium acetobutylicum*, *Curr. Microbiol.* 56 (2008) 261–267, <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-007-9072-x>.
- [53] J. Cohen, K. Kim, M. Posewitz, M.L. Ghirardi, K. Schulten, M. Seibert, P. King, Molecular dynamics and experimental investigation of H(2) and O(2) diffusion in [Fe]-hydrogenase, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 80–82, <http://dx.doi.org/10.1042/BST0330080>.
- [54] P.W. King, M.C. Posewitz, M.L. Ghirardi, M. Seibert, Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 2163–2172, <http://dx.doi.org/10.1128/JB.188.6.2163-2172.2006>.

