



**Le 2<sup>ème</sup> Séminaire International sur les Energies  
Nouvelles et Renouvelables**  
**The 2<sup>nd</sup> International Seminar on New and Renewable  
Energies**

Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables,  
Ghardaïa - Algérie 15, 16 et 17 Octobre 2012



# Utilisation du Métabolisme des Bactérie Sulfatoréductrices dans l'Environnement

Bachira ABADA HAOUCHI, Amina SAIDI BOULAHIA, Souad CHERGUI BOUAFIA

Centre de Développement des Energies Renouvelables (CDER)

B.P 62 route de l'observatoire, Bouzareah.

Tel : 021 90.14.46/ 021 90.15.03 Fax : 021 90.16.54

[abadabachira@gmail.com](mailto:abadabachira@gmail.com)

[aminagenibio@gmail.com](mailto:aminagenibio@gmail.com)

[schergui@cder.dz](mailto:schergui@cder.dz)

## Résumé

La réduction microbienne des sulfates est un processus ancien datant de 3.4 Giga-années. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont donc les représentants actuels d'organismes primitifs ayant développé des systèmes cellulaires critiques maintenant partagés par leurs descendants modernes. Les BSR sont des micro-organismes anaérobies stricts qui, bien qu'unis par la possibilité d'effectuer la réduction dissimilatrice des sulfates, présentent une importante diversité écologique et nutritionnelle. De plus, bien qu'étant définies comme des bactéries anaérobies, les BSR se retrouvent très souvent dans des biotopes oxiques et ont donc dû développer des mécanismes cellulaires pour éliminer l'oxygène et se protéger de ces effets toxiques. Alors que l'analyse de ces mécanismes fait l'objet de nombreuses études dans le cas des organismes aérobies et anaérobies facultatifs, très peu de données proviennent de l'étude des organismes anaérobies stricts. Les BSR sont donc des modèles intéressants pour mettre en évidence des

mécanismes cellulaires spécifiques mis en place aux origines de la vie.

Une bactérie sulfato-réductrice du genre *Desulfovibrio*, *Desulfovibrio vulgaris*

Hildenborough dont le génome ont été séquencé, sert de base à une analyse de cette diversité métabolique et écologique par une approche génétique et protéomique.

Dans le présent travail nous nous intéressons plus particulièrement au métabolisme énergétique et aux systèmes cellulaires liés au stress oxydatif. Une première analyse des données du génome met en évidence une redondance importante des systèmes enzymatiques pouvant être impliqués dans ces mécanismes. La fonction physiologique de certains de ces systèmes a pu être mise en évidence par délétion des gènes correspondants sur le chromosome (1-3). Une approche de protéomique différentielle est actuellement développée dans le but de caractériser les systèmes



cellulaires mis en place en réponse à diverses conditions de croissance ou de stress oxydatifs.

**Mots Clefs :** *Desulfovibrio*, sulfatoréductrice, Hydrogénase, opéronhydrogénase .

## Introduction

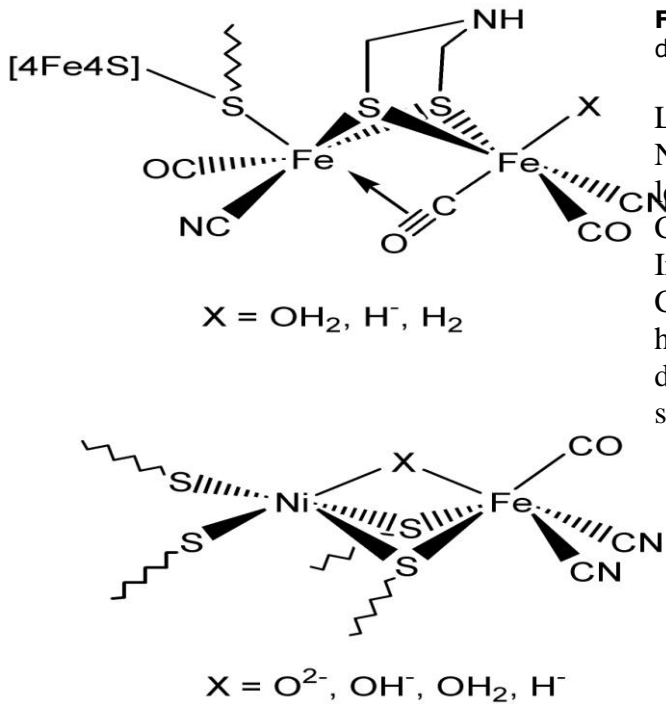
Les hydrogénases, enzymes qui catalysent la production et la consommation d'hydrogène, occupent une place centrale dans le métabolisme énergétique des bactéries anaérobies, qui vivent en milieux exempts d'oxygène, comme les sédiments lacustres, les sources hydrothermales sous marines, ou encore les intestins de certains animaux et de l'homme. Elles permettent la réaction chimique la plus simple qui soit :  $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$ , et pourtant leur structure est extrêmement complexe.

La réduction microbienne des sulfates est un processus ancien datant de 3.4 Giga-années. Les bactéries sulfato-réductrices (BSR) sont donc les représentants actuels d'organismes primitifs ayant développé des systèmes cellulaires critiques maintenant partagés par leurs descendants modernes. Les BSR sont des micro-organismes anaérobies stricts qui, bien qu'unis par la possibilité d'effectuer la réduction dissimilatrice des sulfates, présentent une importante diversité écologique et nutritionnelle. De plus, bien qu'étant définies comme des bactéries anaérobies, les BSR se retrouvent très souvent dans des biotopes oxiques et ont donc dû développer des mécanismes cellulaires pour éliminer l'oxygène et se protéger de ces effets toxiques. Alors que

l'analyse de ces mécanismes fait l'objet de nombreuses études dans le cas des organismes aérobies et anaérobies facultatifs, très peu de données proviennent de l'étude des organismes anaérobies stricts. Les BSR sont donc des modèles intéressants pour mettre en évidence des mécanismes cellulaires spécifiques mis en place aux origines de la vie

## Structure cristallographique des différents types d'hydrogénase

Il existe deux types d'hydrogénases, les **hydrogénases à Fe** (fer) et les **hydrogénases à Ni Fe** (nickel et fer), qui sont douées de la même activité catalytique : elles sont capables de faciliter, dans les deux sens, la réaction indiquée plus haut. Pourtant, ces deux groupes de protéines ne présentent ni homologie de séquence ni homologie structurale. Les hydrogénases à Ni Fe se retrouvent plus fréquemment dans des microorganismes qui consomment de l'hydrogène, alors que ceux qui en produisent contiennent le plus souvent des hydrogénases à Fe. **Figure 1.**

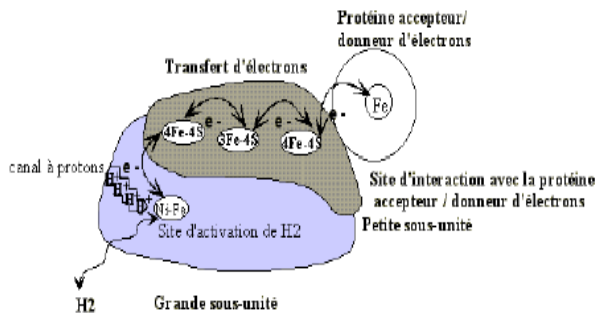


**Figure 1:** Sites actifs des deux types d'hydrogénases ([Fe<sub>2</sub>] (haut) et [NiFe] (bas))

La première structure d'une hydrogénase à Ni Fe a été résolue en 1995, **Figure2**, par le Laboratoire de Cristallographie et de Cristallogenèse des Proteines (LCCP, Institut de Biologie Structurale J. P. Ebel, CEA-CNRS, Grenoble) [1]. Les hydrogénases à Fe ont été particulièrement difficiles à étudier, en raison de leur sensibilité à l'oxygène. Le LCCP vient de

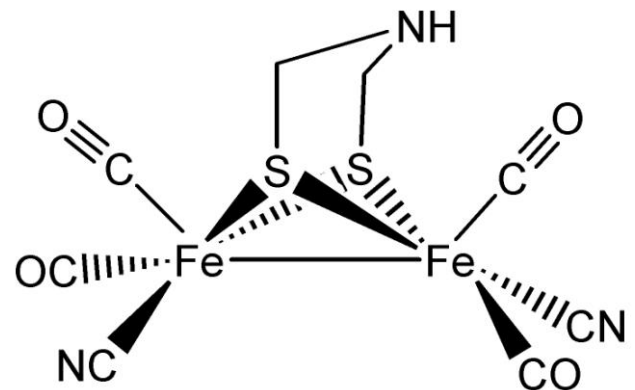
publier la structure cristallographique à 1,6 Å de résolution de l'une d'entre elles :

l'hydrogénase à Fe de *Desulfovibrio desulfuricans*(Dd) [2].



la réalisation de nombreuses analyses spectroscopiques (EPR, ENDOR, ESEEM, Mössbauer) et biochimiques. **Figure 3.** On savait ainsi que leur site actif contenait 5 à 6 atomes de Fe, mais sa structure fine était inconnue avant cette analyse. Ce site, appelé 'cluster H', se révèle être composé de deux groupes fonctionnels distincts : un centre de transfert d'électrons, et un site catalytique proprement dit.

**Figure 1 :** Représentation schématique de l'hydrogénase, d'après Cammack (1995). [5]



Ces résultats apportent une meilleure connaissance du site actif de ce type d'hydrogénase. Trois d'entre elles : hydrogénases de *Desulfovibrio vulgaris* (Dv, homologue à celle de Dd) et *Clostridium pasteurianum*I et II (CpI et CpII) étaient partiellement connues grâce à



Le 2<sup>ème</sup> Séminaire International sur les Energies  
Nouvelles et Renouvelables  
The 2<sup>nd</sup> International Seminar on New and Renewable  
Energies

Unité de Recherche Appliquée en Energies Renouvelables,  
Ghardaïa - Algérie 15, 16 et 17 Octobre 2012



Figure 3 :  $[\text{Fe}_2(\text{ADT})(\text{CO})_4(\text{CN})_2]^{2-}$

Les auteurs y ont mis en évidence le site probable de fixation du substrat de l'enzyme, et une cavité allant de la surface de la protéine vers le site actif, qui permet vraisemblablement l'évacuation du gaz produit dans le site actif profond vers l'extérieur de la protéine. **Figure 4** Ces canaux peuvent aussi jouer un rôle dans l'arrivée de l'hydrogène dans les cas des enzymes qui catalysent la réaction  $\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$ . Une cavité similaire avait déjà été mise en évidence par les mêmes auteurs dans une hydrogénase Ni Fe [3]. Par ailleurs, dans ce site actif, les auteurs décrivent un arrangement unique de 6 atomes de Fer, dans lequel le monoxyde de carbone (CO), et le cyanate (CN<sup>-</sup>) jouent un rôle clé, configuration très inhabituelle en biochimie, mais qui se retrouve dans les hydrogénases Ni Fe.

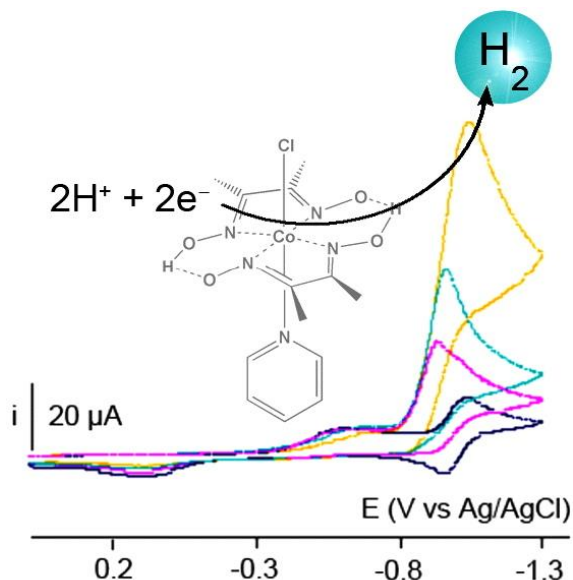


Figure 4 : Production d'hydrogène catalysée par les cobaloximes.

Enfin, la comparaison entre les hydrogénases à Fe de différentes espèces (enzyme monomérique cytoplasmique de CpI, enzymes dimériques périplasmiques de Dv et Dd) permet aux auteurs d'avancer une explication inédite de la localisation différente de ces enzymes, dans le cytoplasme (intérieur) de la bactérie, ou dans son périplasm (espace entre la paroi de la bactérie et sa membrane plasmique). La protéine périplasmique comporte en effet une séquence complémentaire par rapport à la protéine cytoplasmique, provenant du clivage du gène d'origine et de l'insertion d'une séquence codante de type signal-peptide.

Simultanément à la publication de ces travaux, une équipe américaine a publié dans *Science* la structure de l'hydrogénase Fe de CpI, à une résolution de 1,8 Å. La description du site actif de cet enzyme y est similaire à celle des auteurs français, bien que moins détaillée, et nécessitant une plus grande extrapolation dans la modélisation du site actif. Les deux articles ont fait l'objet d'un commentaire [4].

Une bactérie sulfato-réductrice du genre *Desulfovibrio*, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough dont le génome a été séquencé, sert de base à une analyse de cette diversité métabolique et écologique par une approche génétique et protéomique.

### L'Opéron codant pour l'Hydrogénase des Bactérie Sulfatoréductrice

Nous nous intéressons plus particulièrement au métabolisme énergétique et aux systèmes cellulaires liés au stress oxydatif. Une première analyse des données du génome met en évidence une redondance importante des systèmes enzymatiques pouvant être impliqués dans



ces mécanismes. La fonction physiologique de certains de ces systèmes a pu être mise en évidence par délétion des gènes correspondants sur le chromosome (1-3). Une approche de protéomique différentielle est actuellement développée dans le but de caractériser les systèmes cellulaires mis en place en réponse à diverses conditions de croissance ou de stress oxydatifs.

18kDa à centre 2Fe-2S organisée en 2 domaines structuraux indépendants. HndB (13.8 kDa) ne possède aucune homologie de séquence avec une protéine décrite à ce jour. HndC (52kDa) posséderait la fonction NADP reductase. HndD (63.5 kDa) correspond à la sous unité hydrogénase à Fer. L'enzyme particulièrement instable ne peut être purifiée dans des quantités suffisantes pour une étude structurale. La structure par RMN hétéronucléaire a été entreprise sur les différents domaines structuraux afin de mettre en évidence l'agencement des différentes sous unités dans le complexe.

L'étude structurale du domaine C-terminal de la protéine HndA a été réalisée par RMN. Cette extrémité est apparentée à la ferrédoxine à centre (2Fe-2S) d'E.coli et d'Aquifex aeolicus. La structure de cette dernière a été résolue par cristallographie (PDB 1F37), et présente un repliement du type thioredoxine. Le taux de surexpression de la protéine HndAc chez E.coli (1) a permis le double marquage (13C et 15N) de la protéine et l'utilisation de la RMN hétéronucléaire. La présence d'un centre [2Fe-2S] paramagnétique perturbe les déplacements chimiques et

**E. coli 1** M-NNE---  
 ETFYQAMRRQGVTRRSFLKYCSLAA-TS-  
 LGLGAG-MAPKIAWALENKPR

**R. caps.** M-SDI---  
 ETFYDVMRRQGITRRSFMK--  
 SVRSPQHVLGGLGPS-FVPKIGEMETKPR

Le séquençage de l'opéron qui code pour l'hydrogénase à Fer-NADP réductase de la bactérie sulfatoréductrice, *Desulfovibrio fructosovorans*, **Figure 5**, montre que l'enzyme est constituée de quatre sous unités : HndA, HndB, HndC et HndD. HndA est une protéine de

provoque la disparition de 20% des résidus. Les expériences de RMN hétéronucléaire ont été enregistrées sur le spectromètre 500MHz et sur le 800MHz (Grenoble) et ont permis l'attribution de 74 % des résidus de la protéine. Les nOes intra et inter résidus, les angles phi et psi, les constantes de couplages J3, les liaisons hydrogènes ont été utilisés pour le calcul de structure. Les résidus non observables dans la zone du cluster ont été modélisés sur la base de son homologue structural. La structure consiste en 2 hélices et 4 brins béta. Le cluster 2Fe-2S est à la surface de la protéine, au sommet du feuillet et des hélices. Il est lié à la chaîne polypeptidique par 4 cystéines très conservées dans cette nouvelle classe de protéine. Il a été proposé que la sous-unité HndA soit impliquée dans l'échange d'électrons intramoléculaire entre HndC et HndD. Un échange d'électron entre HndAc et le domaine N-terminal de HndD a été démontré (2). Nous avons cartographié sur HndAc le site d'interaction avec HndDN. La prochaine étape sera la résolution de la structure de HndDN afin d'obtenir un modèle du complexe par arrimage moléculaire contraint par RMN.

**B. japo.** MGAAT---  
 ETFYSVIRRQGIYRRSFHKFCSLTA-TS-  
 LGLGPL-AASRIANALETKPR  
**A. eutr.** M---V---  
 ETFYEVRRQGISRRSFLKYCSLTA-TS-  
 LGLGPS-FLPQIAHAMETKPR



**A. vine.** M-SRL----

ETFYDVMRRQGITRRSFLKYCSLTA-AA-

LGLGPA-FAPRIAHAMETKPR

**W. succi.** MLEEKGIERRDFMKW-AGGV-

TA-MLSLPATFTPLTAKAAELADR

**D. gigas**

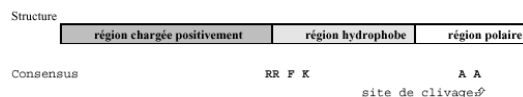
MKCYIGRGKDQVEERLERRGVSRDFMKFC

TAVA-VA-MGMGPA-FAPKVAEALTAKKR

**D. fruct.**

MNFSVGLGRMNAEKRLVQNGVSRDFMKFC

ATVA-AA-MGMGPA-FAPKVAEALTAKHR



**Figure 1 : Alignement des séquences N-terminales d'hydrogénases de différents organismes [5]**

## Perspectives

Les algues n'ont pas fini de nous étonner, des scientifiques de l'université de Bonn ont isolé le gène à l'origine de la production d'hydrogène chez l'algue verte. Ils sont parvenus à modifier génétiquement une espèce afin qu'elle double et parfois triple sa production d'hydrogène. L'hydrogène qui est un excellent moyen de stocker de l'énergie. D'ailleurs, les algues perdent de l'énergie lorsqu'elles le synthétisent, et n'en produisent que si elles y sont forcées. En coopération avec la firme californienne Melis Energy, l'université de Bonn a mis au point un régime sans soufre (entrant dans la composition de nombreuses protéines) afin de changer le comportement des algues. Leur métabolisme passe en mode "stockage d'énergie" : n'étant plus en mesure de synthétiser un grand nombre de protéines, elles stockent les surplus d'énergie résultant de la photosynthèse sous forme d'hydrogène. Les applications technologiques de l'algue verte sont désormais proches. L'équipe de Bonn est parvenue à isoler le gène codant l'hydrogénase (enzyme participant au processus de fabrication d'hydrogène chez l'algue verte). Les scientifiques étudient actuellement le moyen d'isoler ces enzymes dans le but de

les fixer sur des membranes artificielles : ces "batteries biochimiques" permettraient la production d'hydrogène à partir de la lumière du soleil.

## Références :

- [1] Volbeda A, Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. **Nature** (1995) 373 : 580-7.
- [2] Nicolet Y, Piras C, Legrand P, Hatchikian EC, Fontecilla-Camps J. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. **Structure** (1999) 7 : 13-23. **Couverture du numéro.**
- [3] Yaël Montet, Patricia Amara, Anne Volbeda, Xavier Vernede, E. Claude Hatchikian, Martin J. Field, Michel Frey et Juan C Fontecilla-Camps. Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. **Nature structural biology** (1997) 4 : 523-526.
- [4] (news and views) dans *Nature* (1999, 397 : 214-215).
- [5] Agnès RODRIGUE Thèse de doctorat Biosynthèse de L'hydrogénase chez *Escherichia coli*: incorporation du nickel, maturation et translocation transmembranaire de l'hydrogénase (1997)