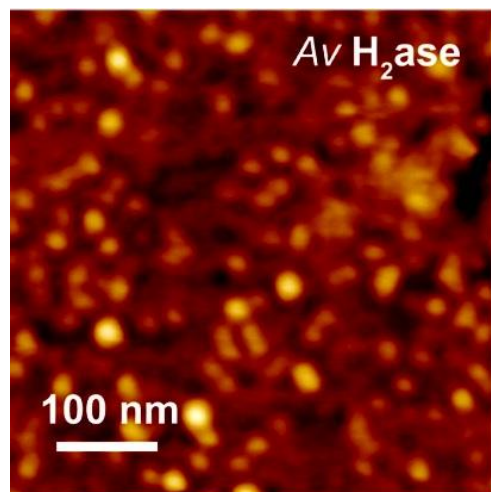


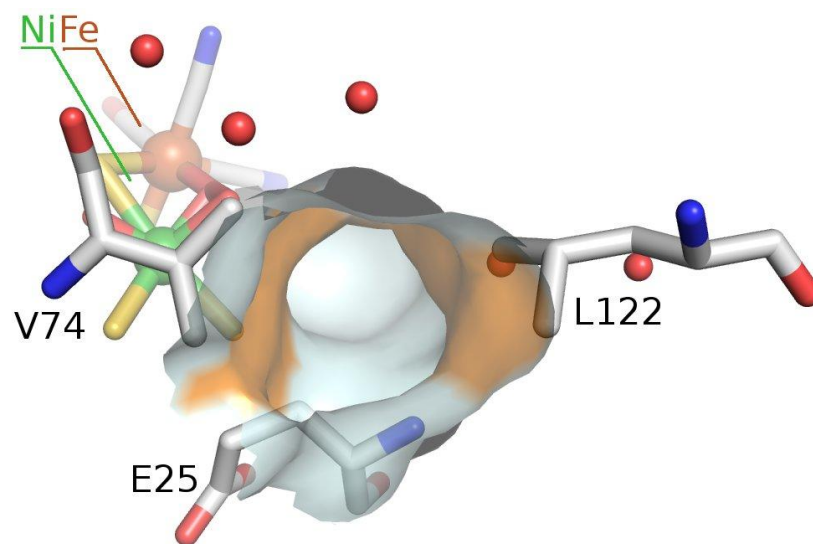
Des électrodes pour étudier et utiliser les hydrogénases: du mécanisme catalytique à la biopile

Christophe Léger, Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, CNRS Marseille

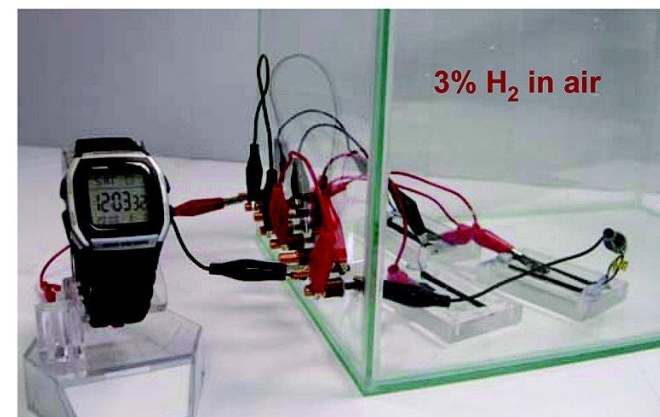
<http://bip.cnrs-mrs.fr/bip06>



Hoeben et al., Langmuir (2008)



Liebrott et al., Nat. Chem. Biol. (2010)



Vincent et al., Chem. Commun. (2006)

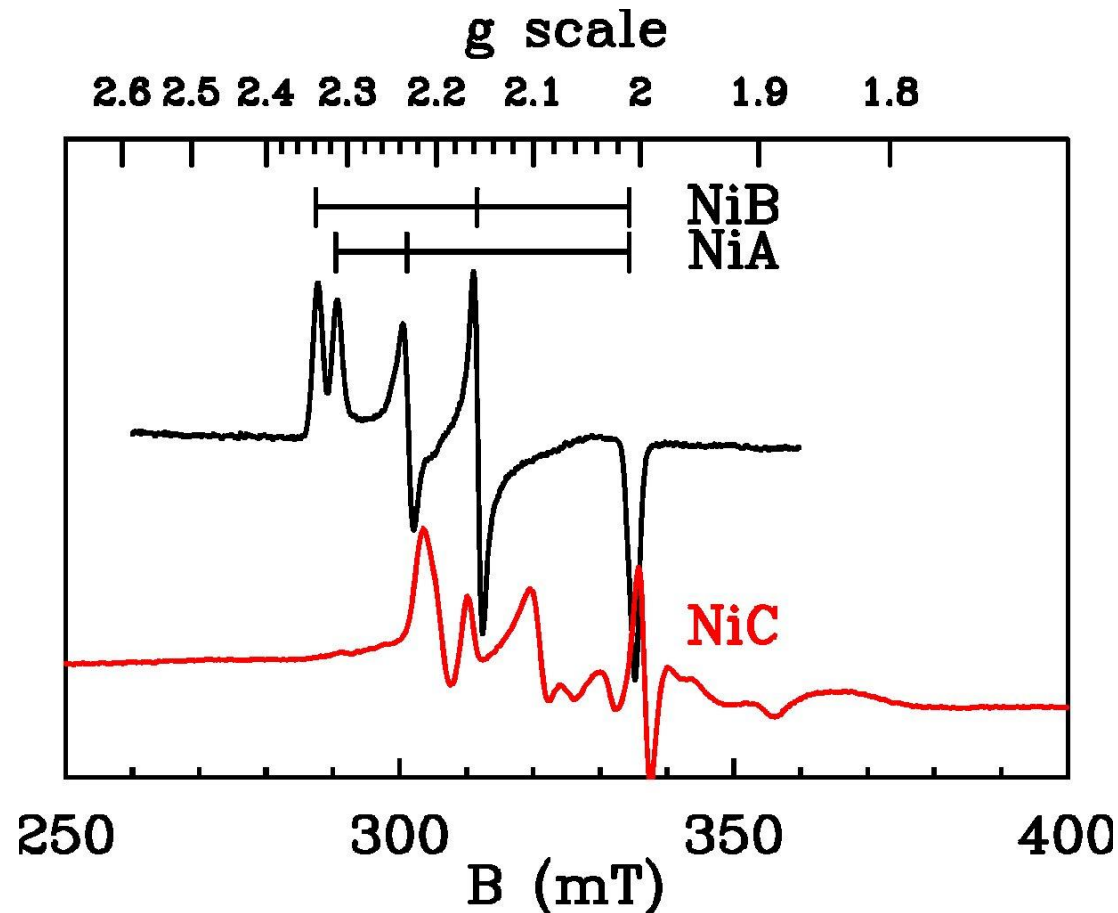
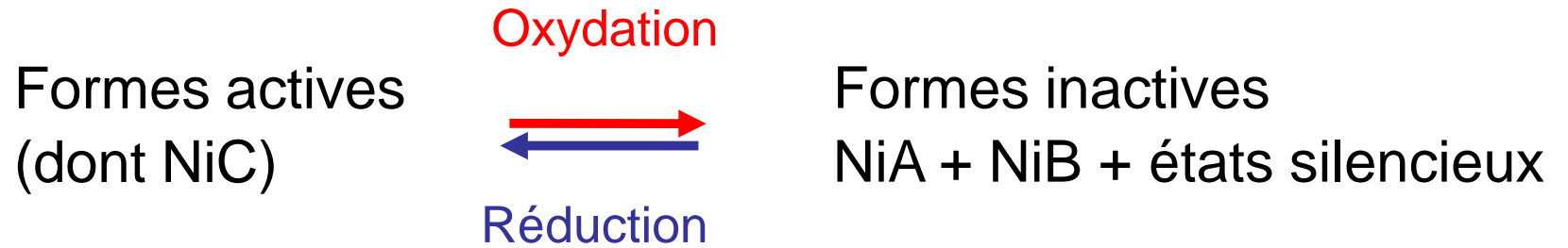


Hydrogénases NiFe les plus étudiées par des techniques biophysiques au XX^e et XXI^e siècles

	Spectro RPE (1980+)	Spectro IR (1994+)	Cristallographie (1995+)	Electrochimie (1999+)	Spectro rayons X	Mutagénèse (1998+)
<i>Desulfovibrio gigas</i>	X		X			
<i>Allochromatium vinosum</i>	X	X		X	X	
<i>Desulfobibrio vulgaris</i> Myasaki	x		X	x		
<i>Desulfomicrobium baculatum</i> NiFeSe	x		X	x		
<i>Desulfovibrio vulgaris</i> NiFeSe		X	X			
<i>Desulfovibrio fructosovorans</i>	X	X	X	X	X	X
<i>Ralstonia eutropha</i> MBH *	x	X		X		X
<i>Ralstonia eutropha</i> RH *	x	x				x
<i>Ralstonia eutropha</i> SH	x	x			x	x
<i>Ralstonia metallidurans</i> *				X		
<i>Escherichia coli</i> (hyd1 *, hyd2)	X			x		
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> RH	X	x				
<i>Aquifex aeolicus</i> *	X	X		X		

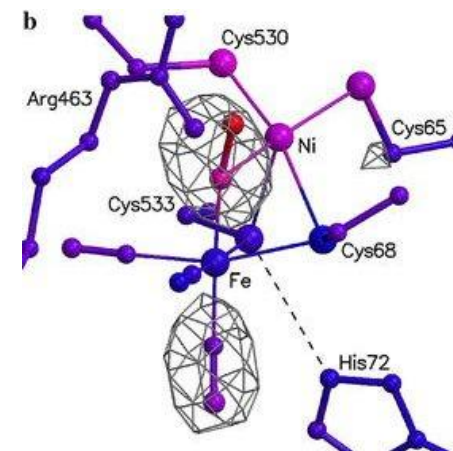
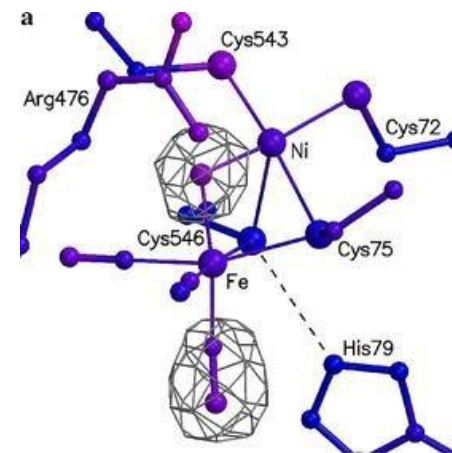
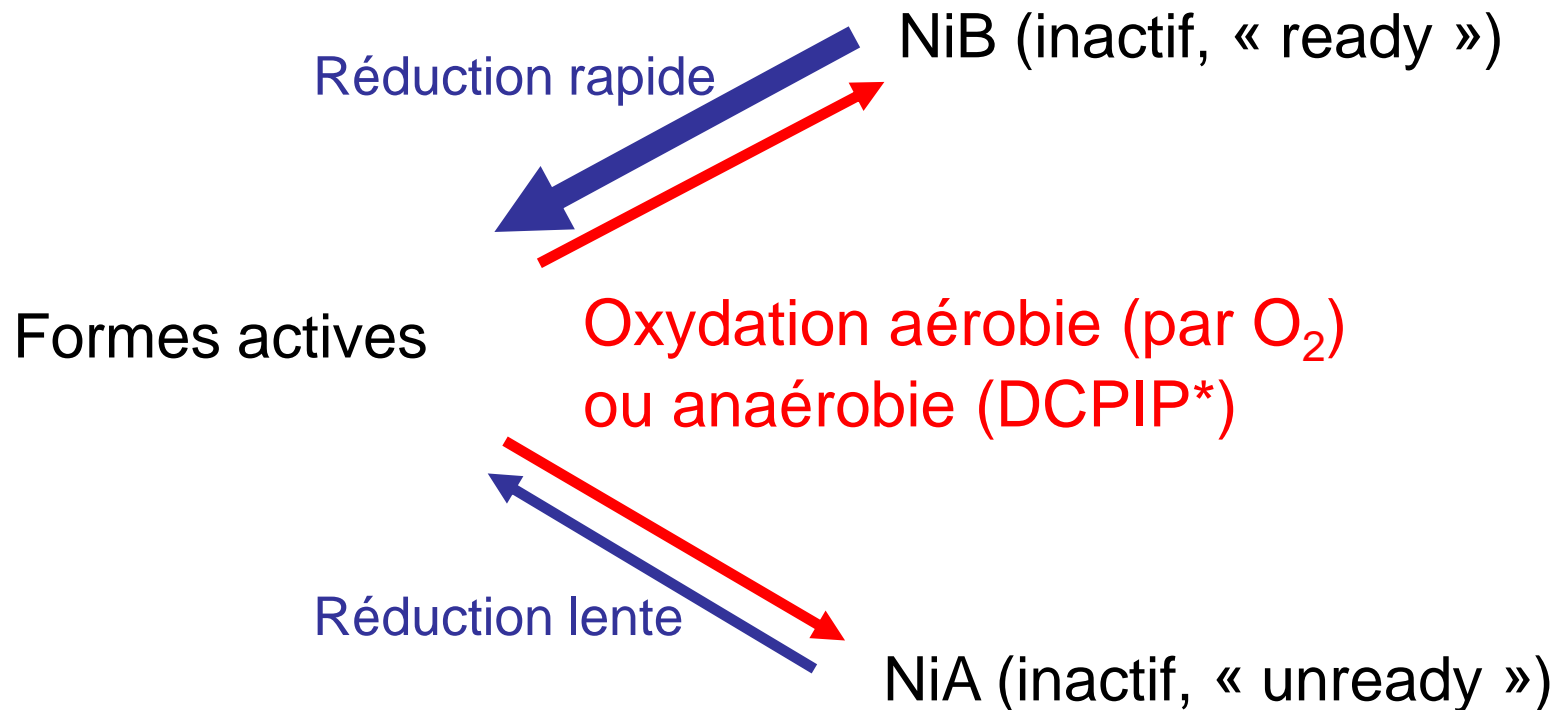
* Enzyme tolérant le dioxygène

L'enzyme purifiée à l'air est un mélange de formes inactives

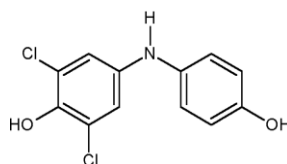


Cinétiques complexes d'activation / réactivation

Structure des formes inactives encore incertaines



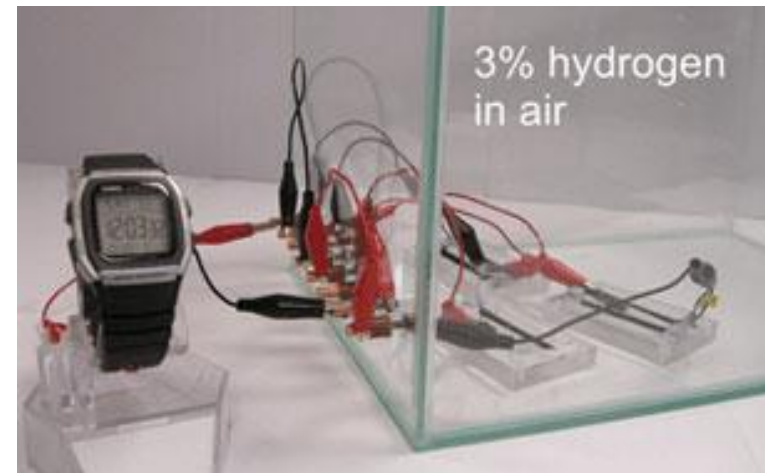
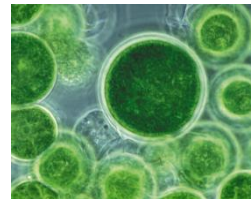
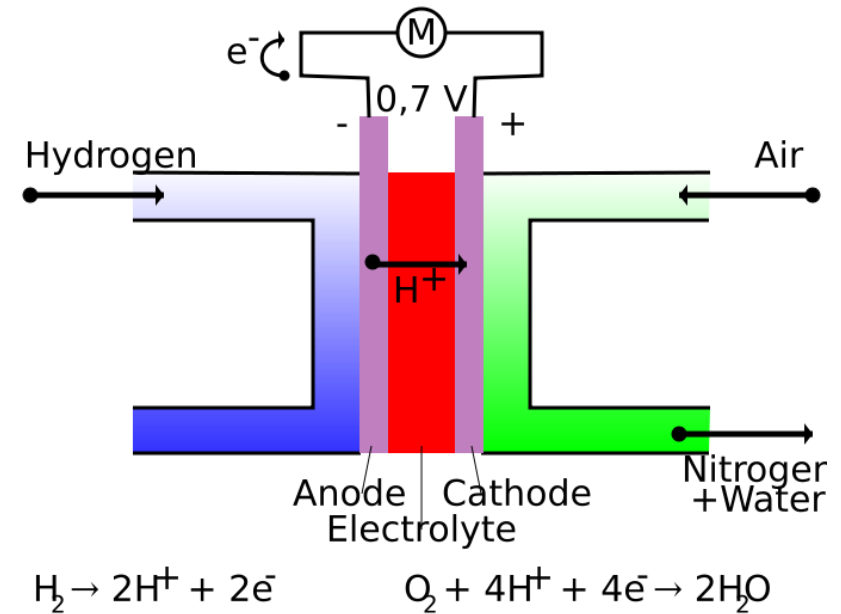
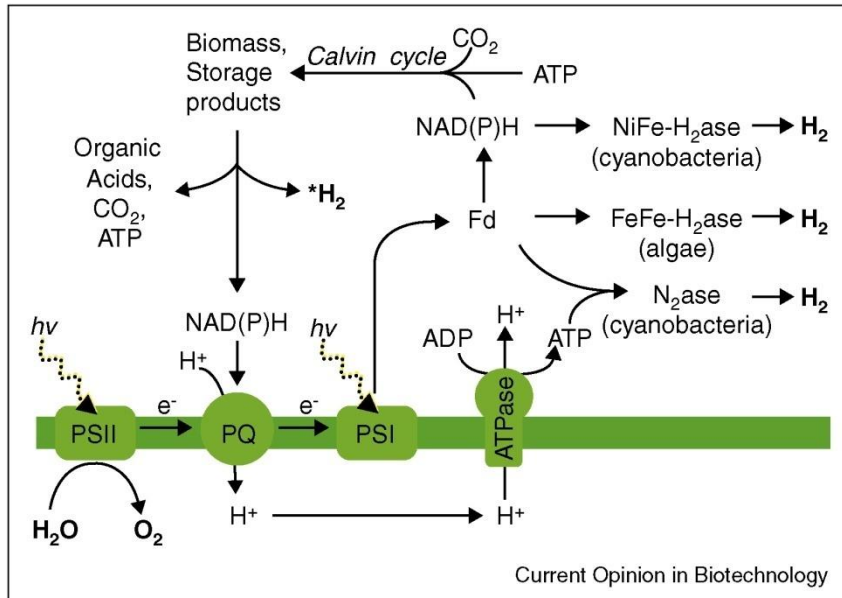
* DCPIP = dichlorophénolindophénol,



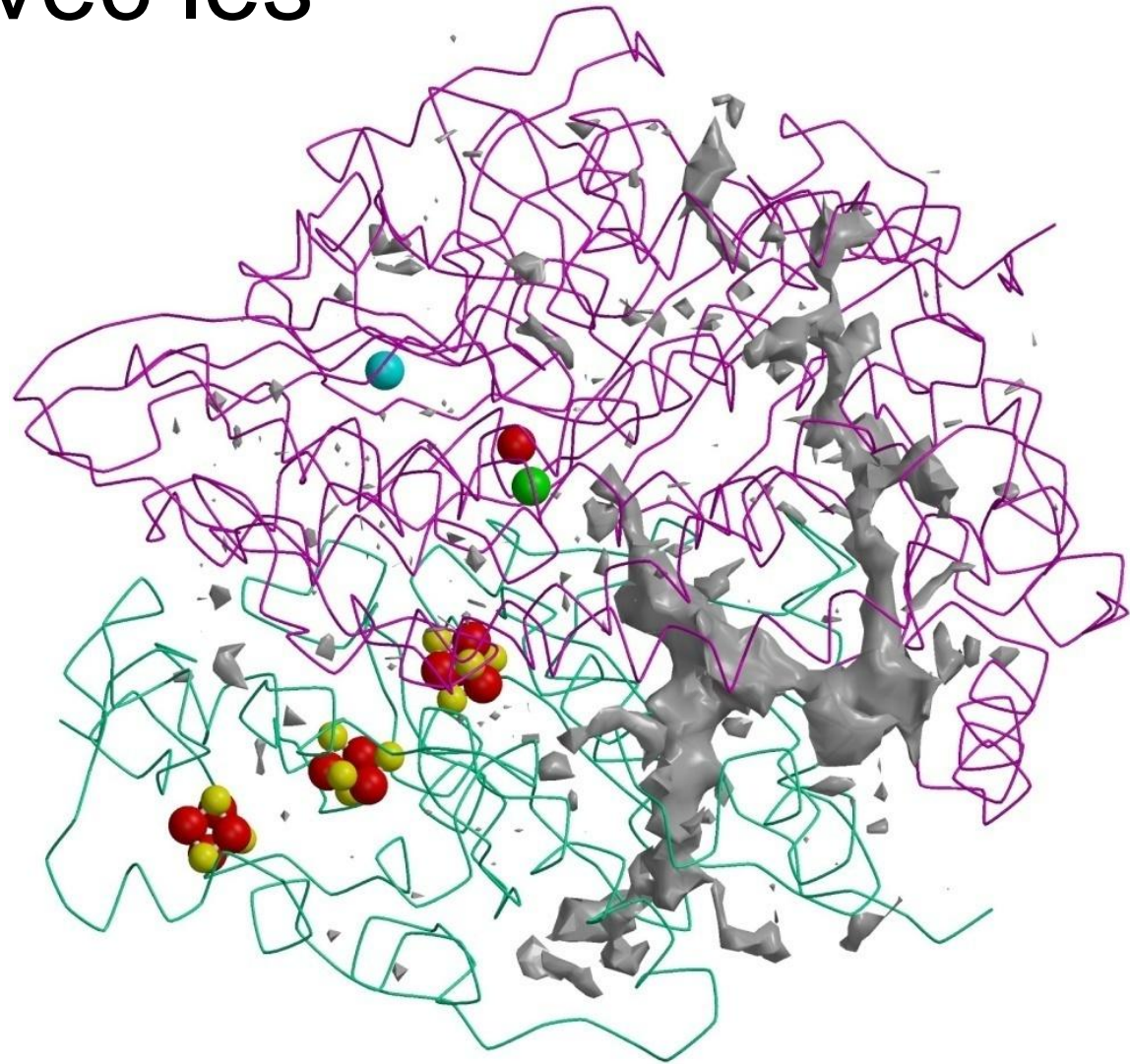
$E^0 = +200\text{mV}$

Hatchikian, Cammack *et al.*, BBA 883 145 (1986)
 Volbeda *et al.*, J. Biol. Inorg. Chem. 10 239 (2005)

Les applications des hydrogénases requièrent qu'elles fonctionnent même en présence de dioxygène



I. Quelles électrodes pour échanger des électrons avec les hydrogénases?



Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Electrode d'or + noir de carbone

Bioelectrochemistry and Bioenergetics, 12 (1984) 267–277

A section of *J. Electroanal. Chem.*, and constituting Vol. 173 (1984)

Elsevier Sequoia S.A., Lausanne – Printed in The Netherlands

653—MECHANISM OF H₂-ELECTROOXIDATION WITH IMMOBILIZED HYDROGENASE

A.I. YAROLOV, A.A. KARYAKIN, S.D. VARFOLOMEEV and I.V. BEREZIN

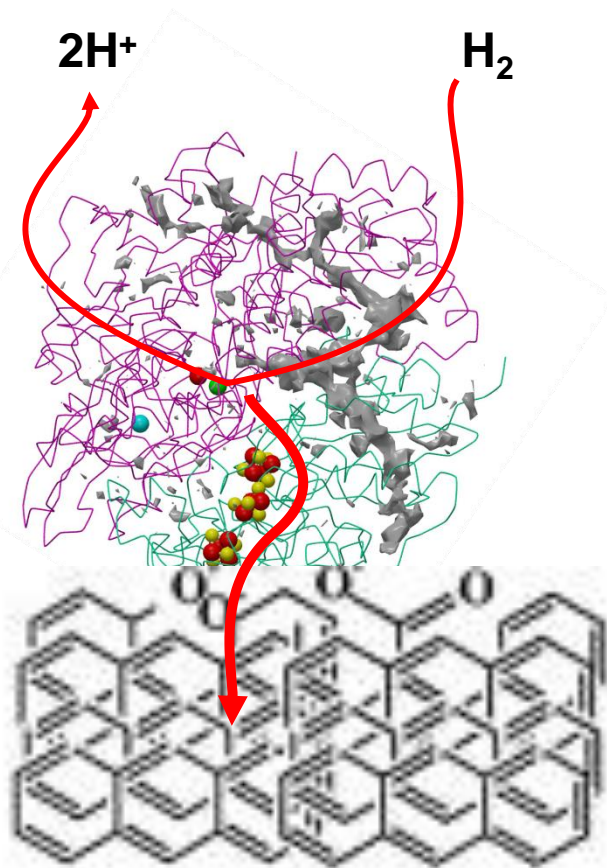
A.N. Bakh Institute of Biochemistry, U.S.S.R. Academy of Sciences, Lomonosov Moscow State University, Moscow (U.S.S.R.)

Hydrogénase de *Thiocapsa roseopersicina*, adsorbée sur or recouvert de noir de carbone

INTRODUCTION: « The investigation of enzymes as catalysts for electrochemical processes is a novel area of chemical enzymology. (...) Besides, it is also of interest to study electrochemically the mechanism of the redox enzyme action ».

Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Graphite pyrolitique "edge"



Les feuillets « graphènes »

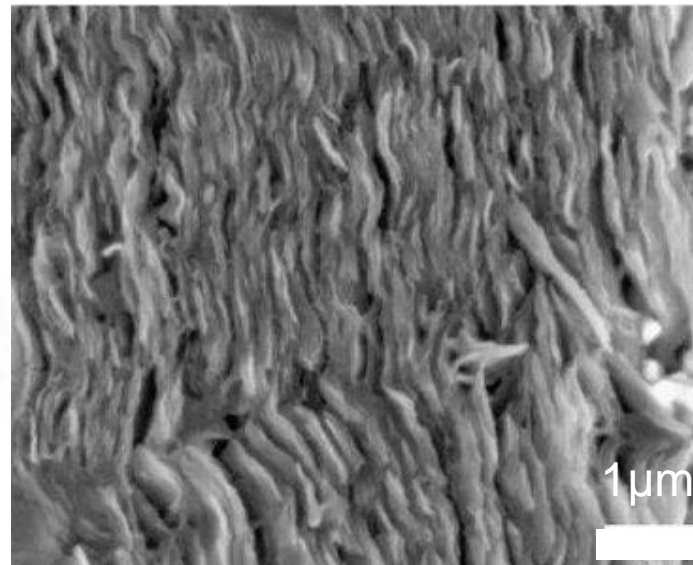
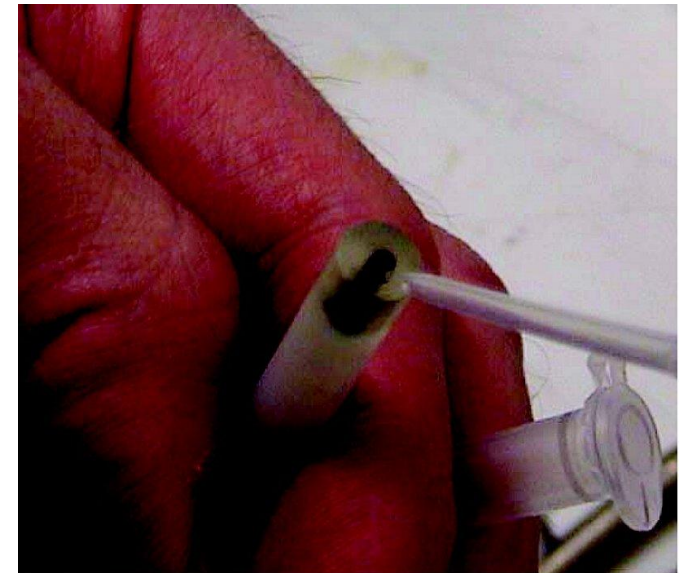


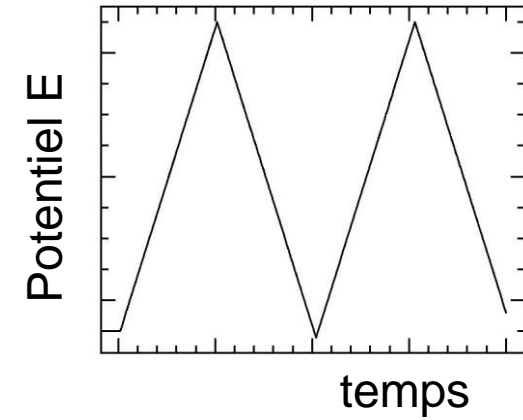
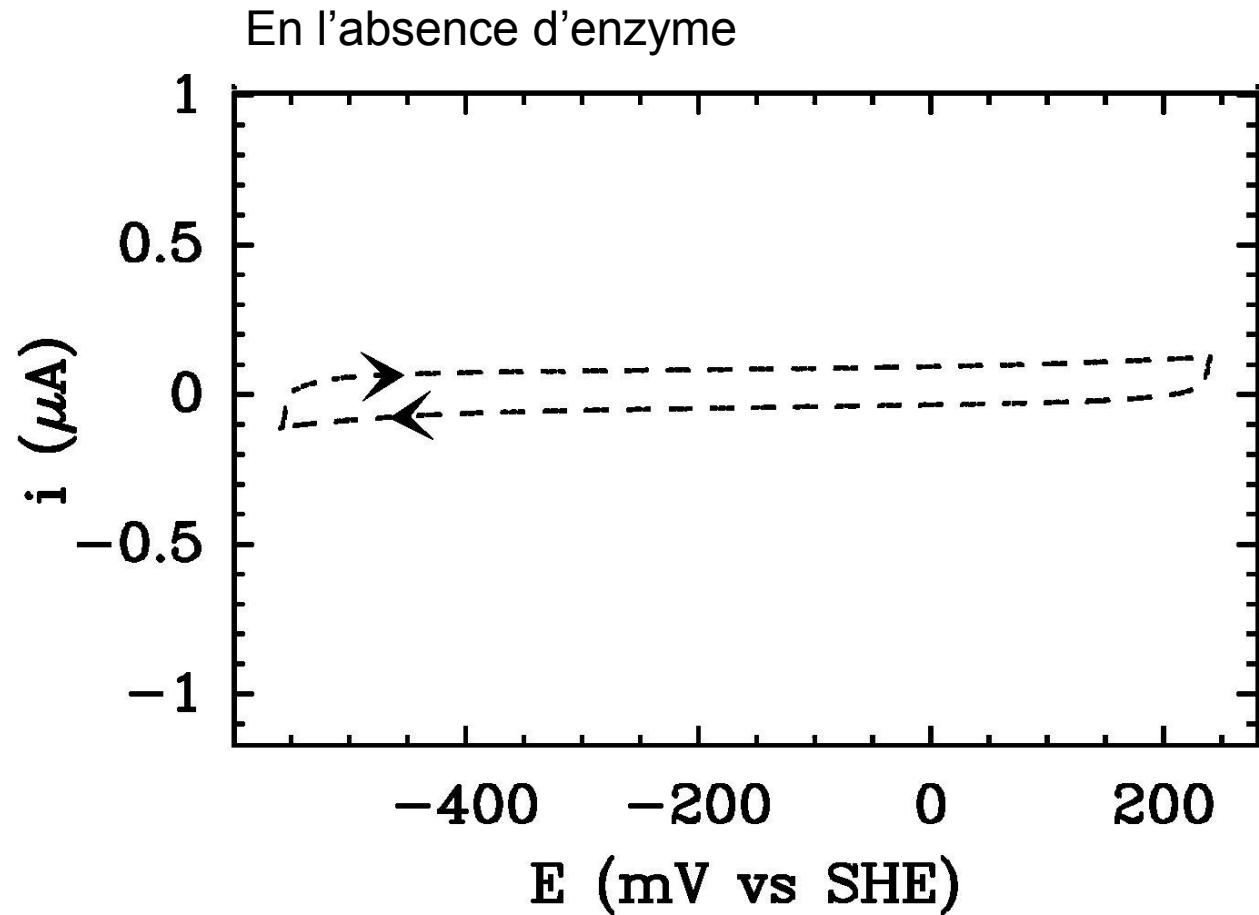
Image en microscopie électronique après abrasion mécanique



Formation d'un film protéique

Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

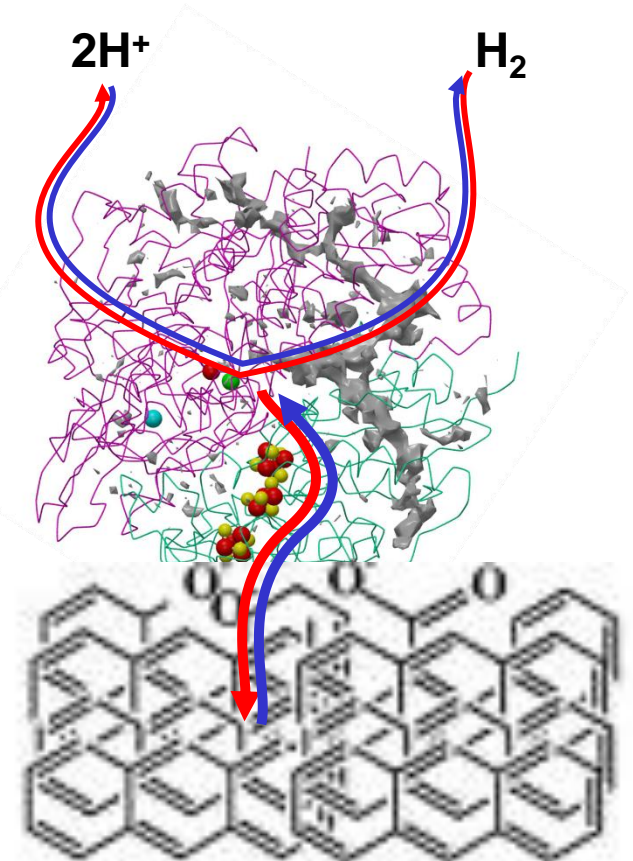
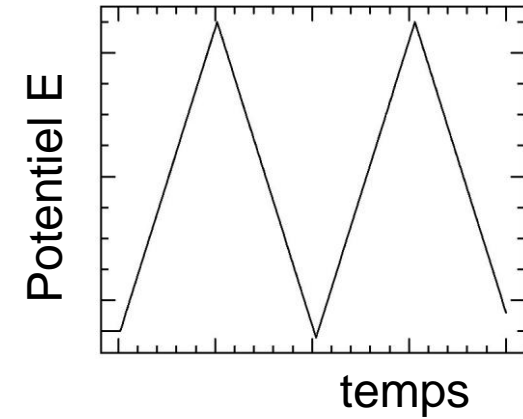
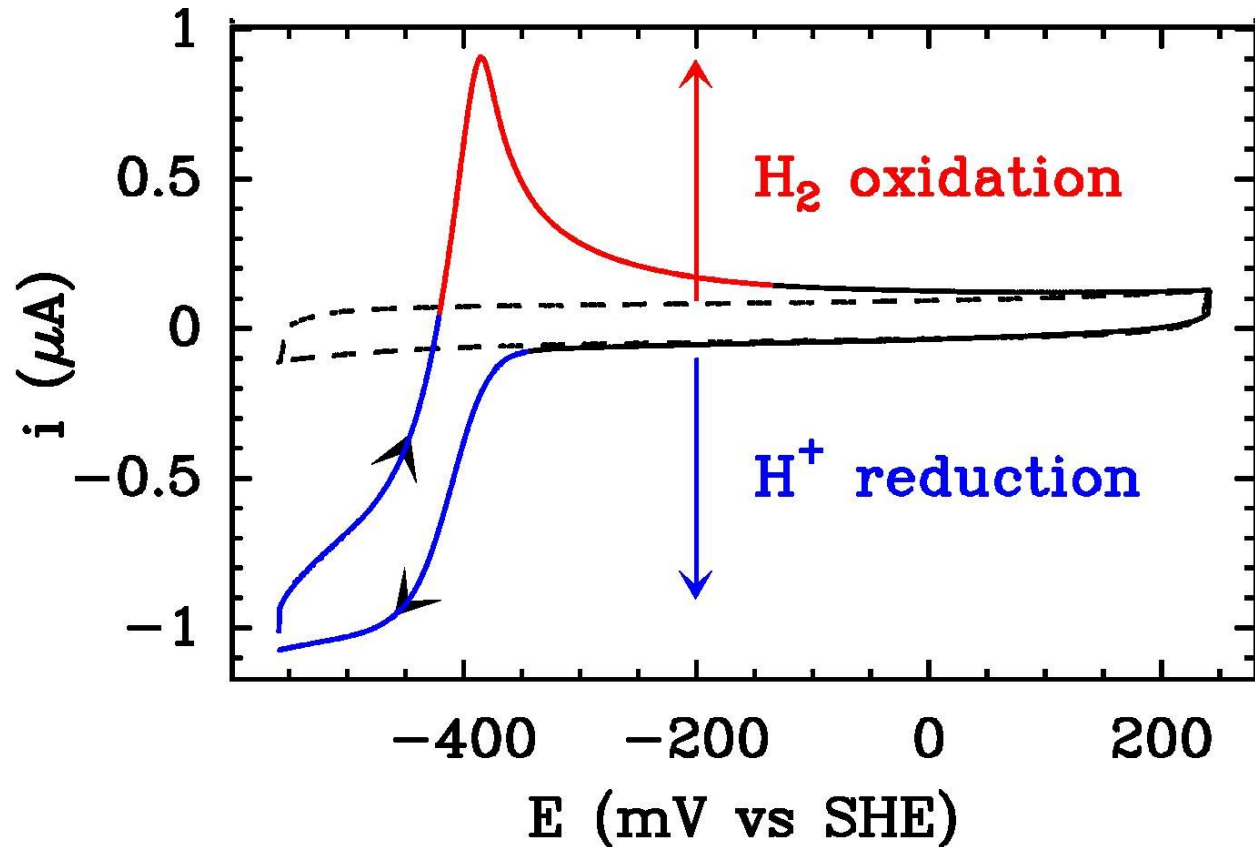
Graphite pyrolytique "edge"



Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Graphite pyrolytique "edge"

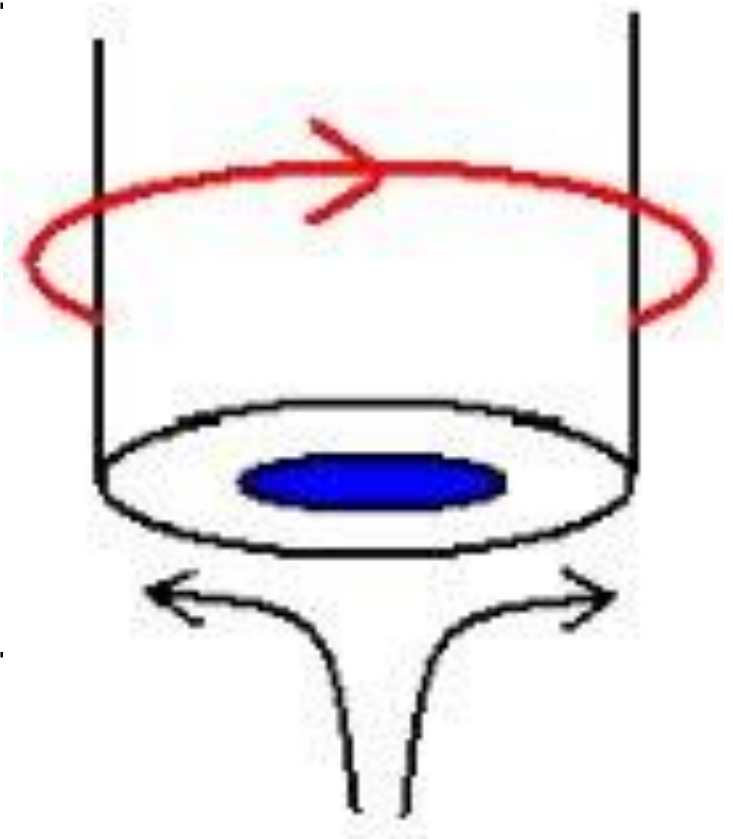
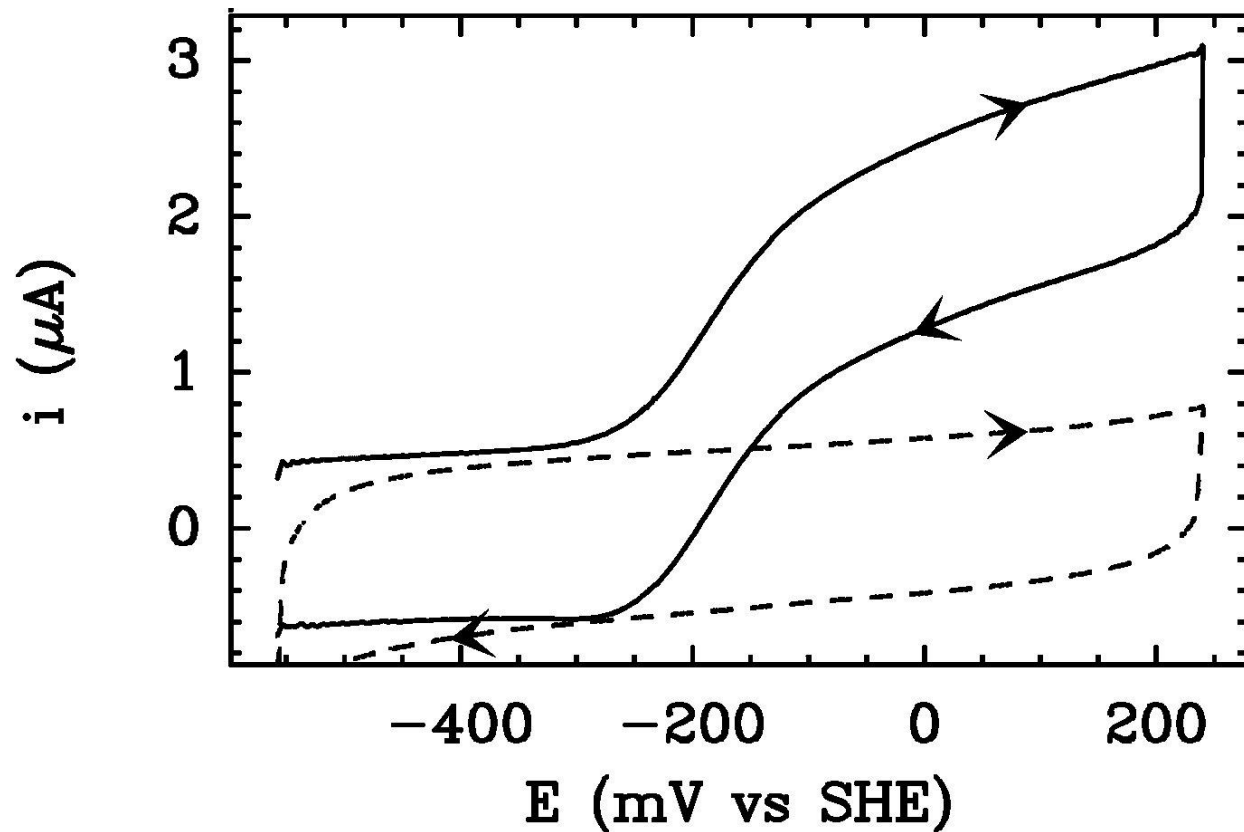
H₂ase de *A. vinosum* adsorbée sur électrode immobile, 1 atm. Ar



Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Graphite pyrolytique "edge"

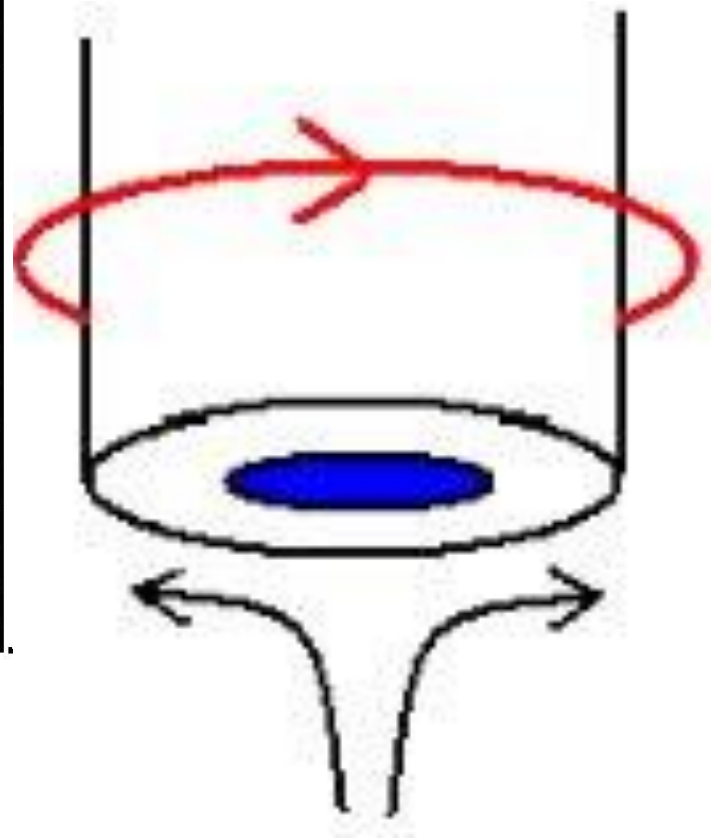
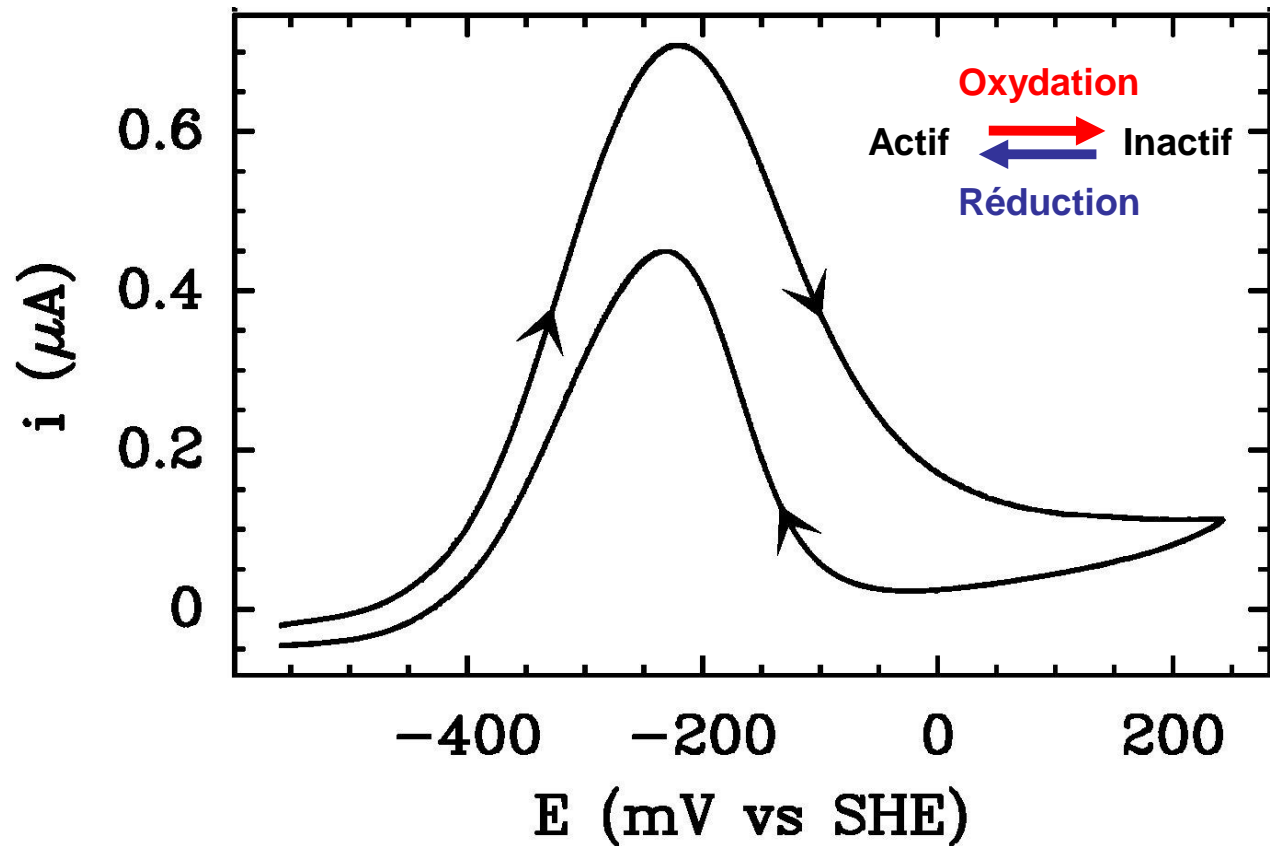
1atm H₂, électrode tournante, haute vitesse
de balayage: 200mV/s (un cycle en 8s)



Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

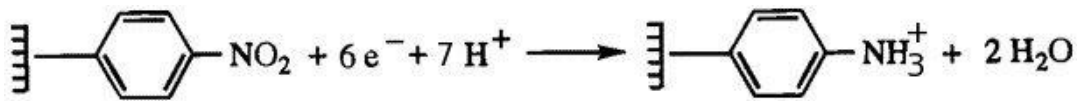
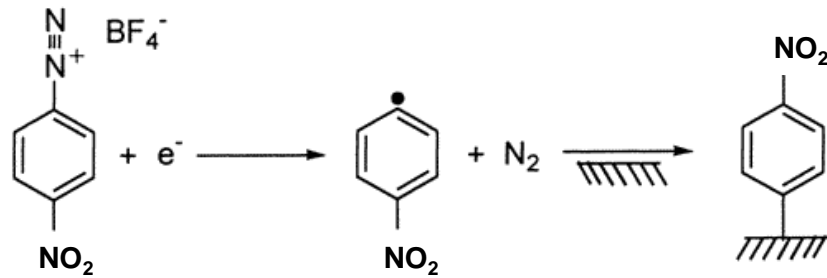
Graphite pyrolytique "edge"

1atm H₂, électrode tournante, basse vitesse de balayage (0.3mV/s, cette expérience en 1h30)

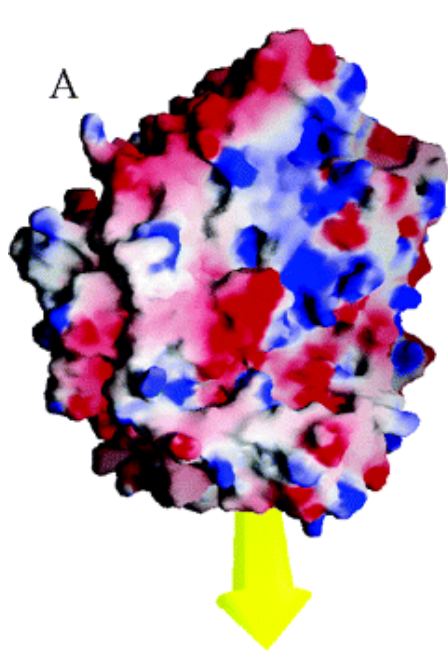


Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Greffage covalent sur graphite fonctionnalisé

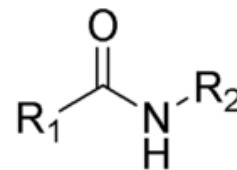
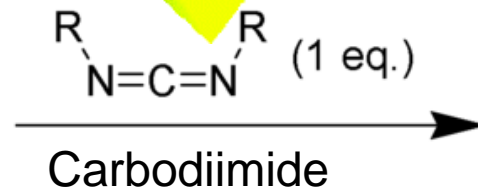
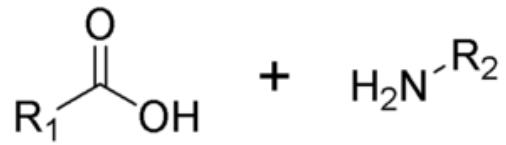


Allongue *et al.*,
J. Am. Chem. Soc. 119 201 (1997)



Acides aminés glutamate
près du 4Fe distal

Orientation favorable
et attachement covalent
(couplage carbodiimide)



Protéine

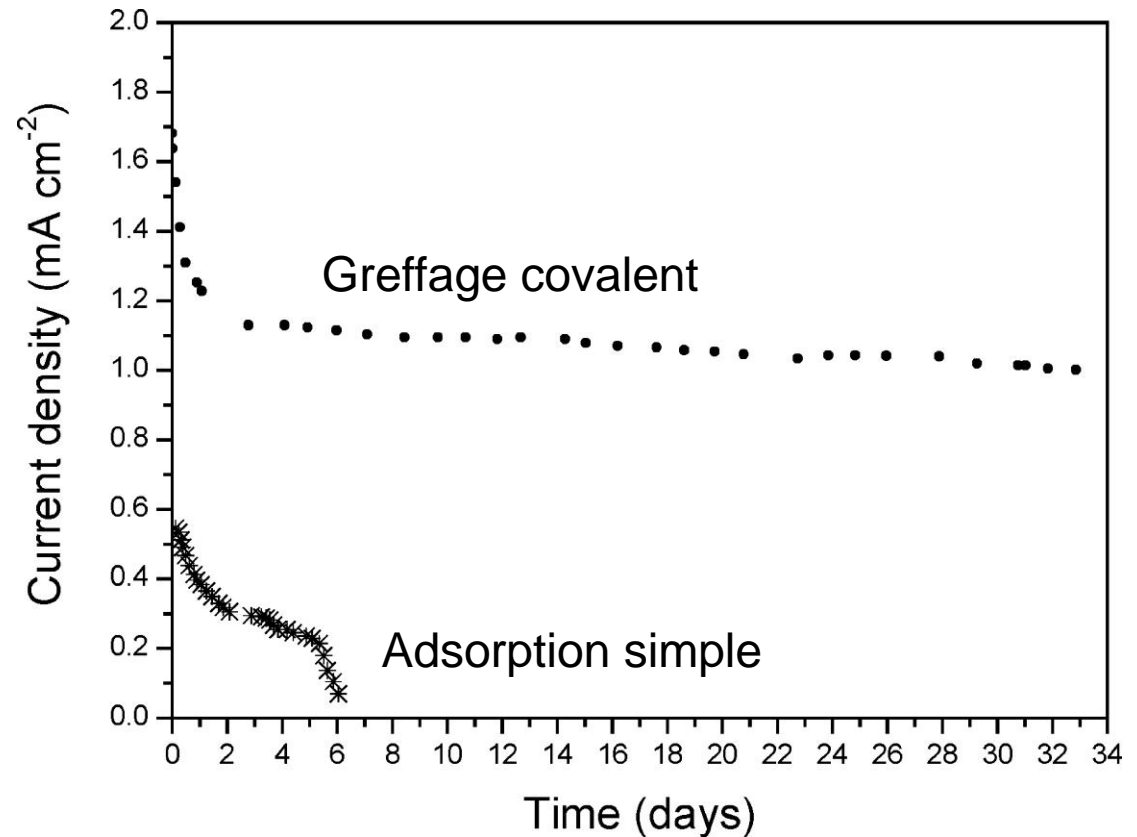
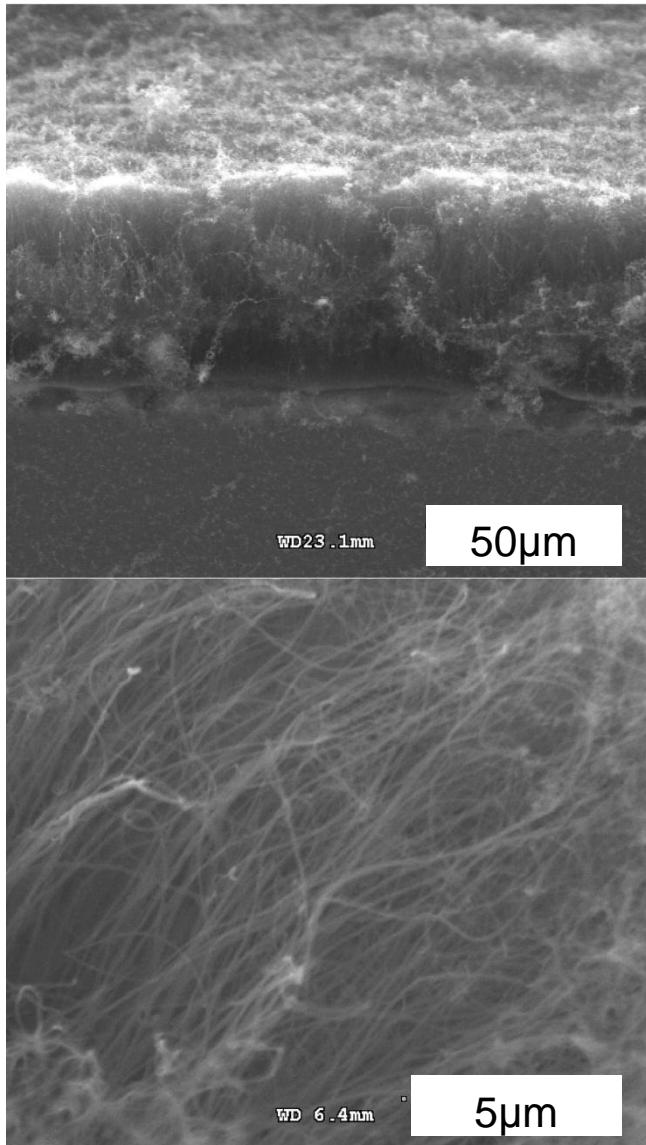
Surface

Liaison amide

Rudiger *et al.*,
J. Am. Chem. Soc. 127
16008 (2005)

Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Greffage covalent sur nanotubes de carbone fonctionnalisés

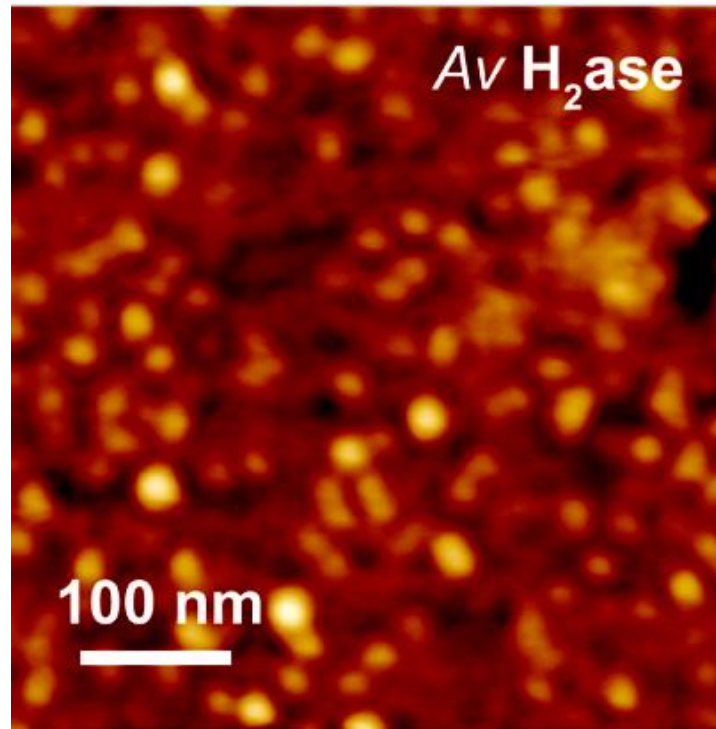
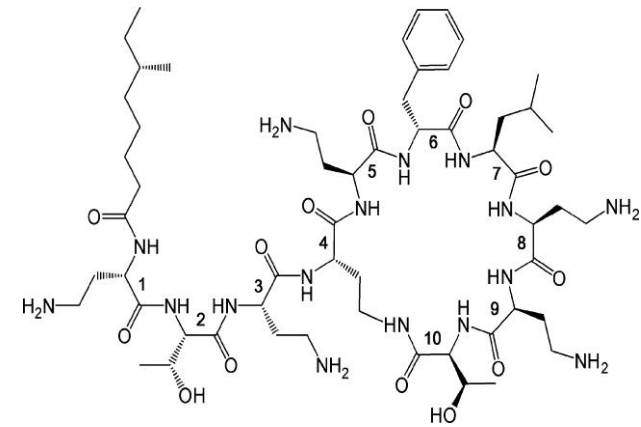


H_2 ase de *D. gigas*, pH 7, 1 atm H_2 , $E = -280\text{mV}$

Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

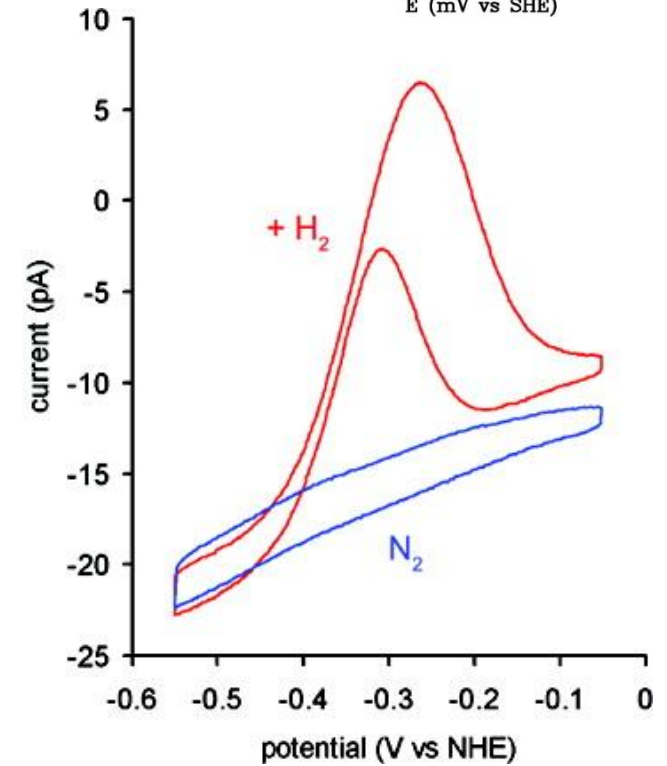
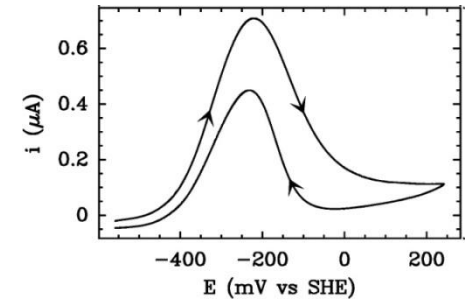
Electrode d'or + polymyxine (PM)

PM



Mica + Au(111) + PM + H₂ase *A. vinosum*
Image AFM (tapping mode, in air)

0.23 pmol/cm²

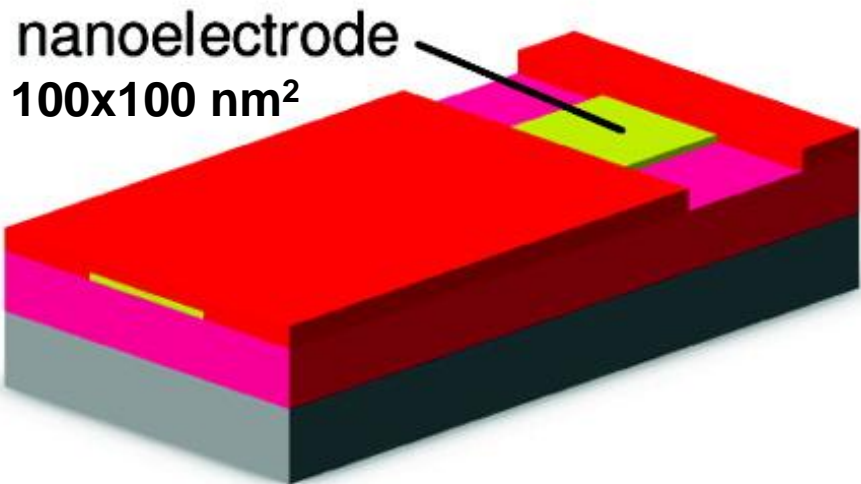
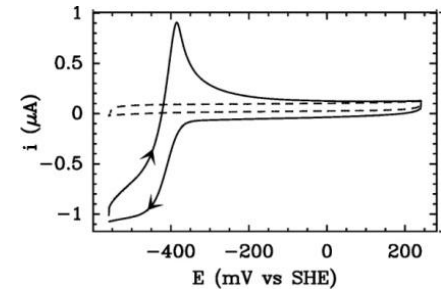


Au + PM + H₂ase *A. vinosum*,
pH 9, 1mV/s

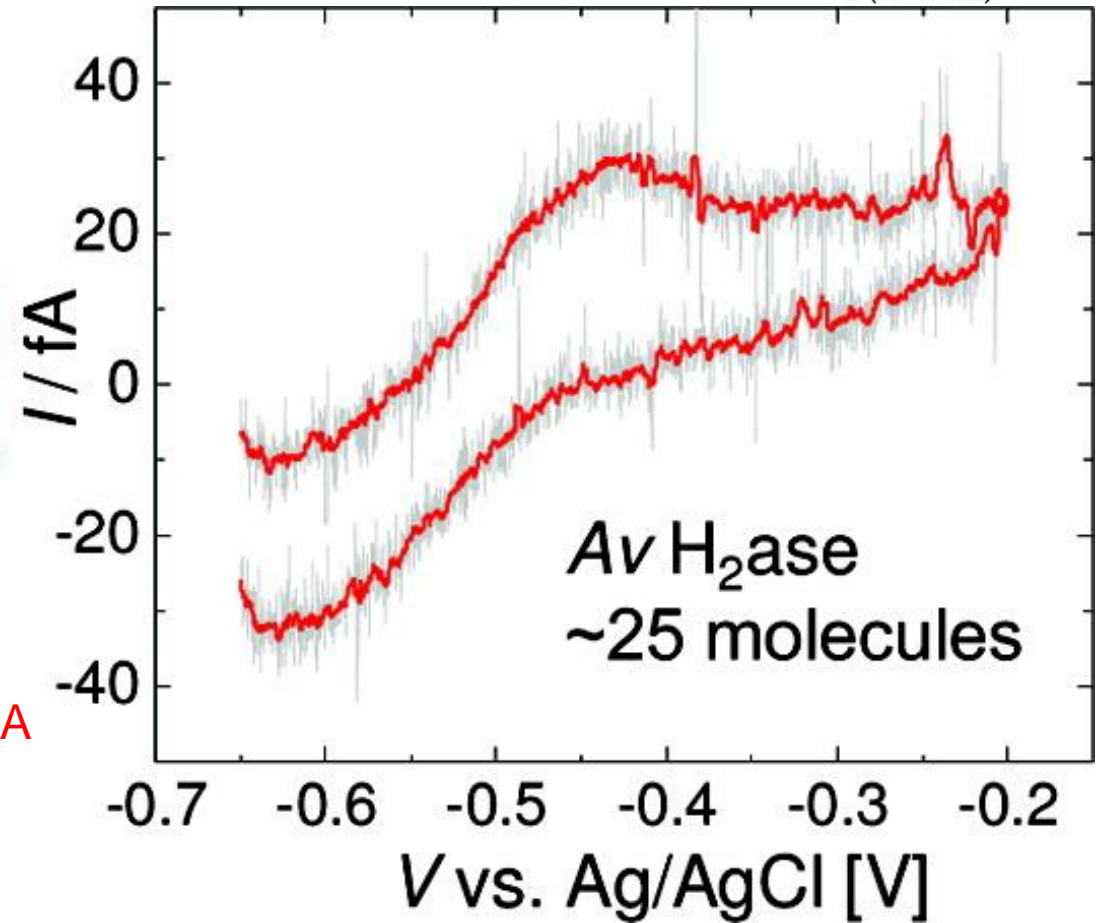
0.13 - 1.3 pmol/cm² (à partir de valeur de kcat en solution)

Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Nanoélectrode d'or + polymyxine



Si + 500nm SiO_2 + 30nm Au + 300nm PMMA

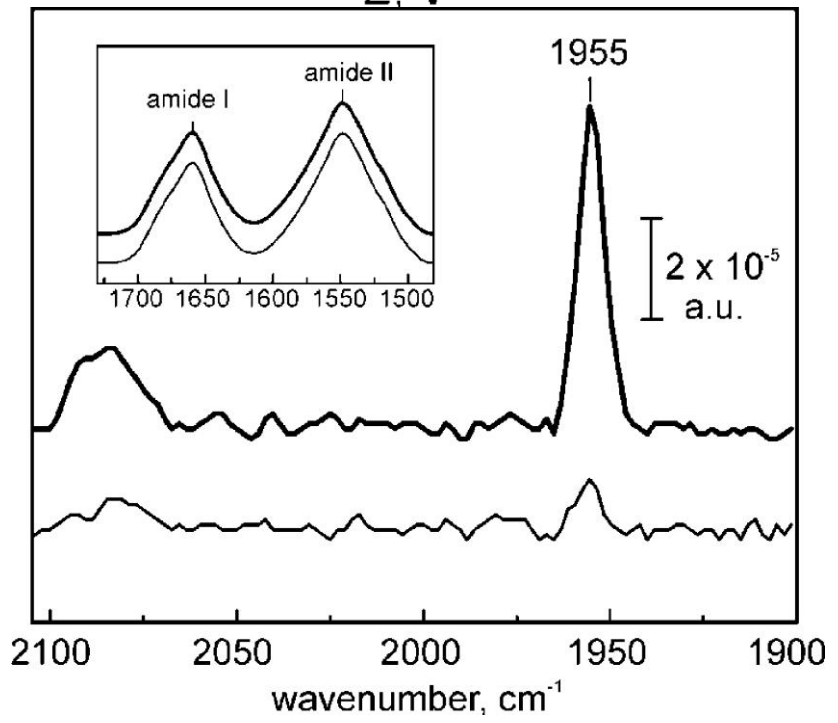
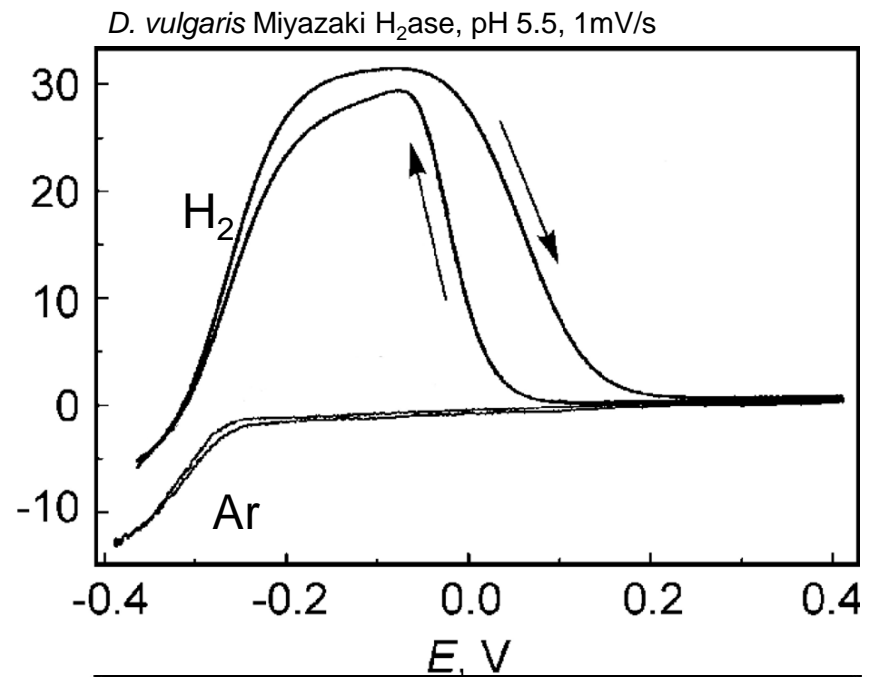
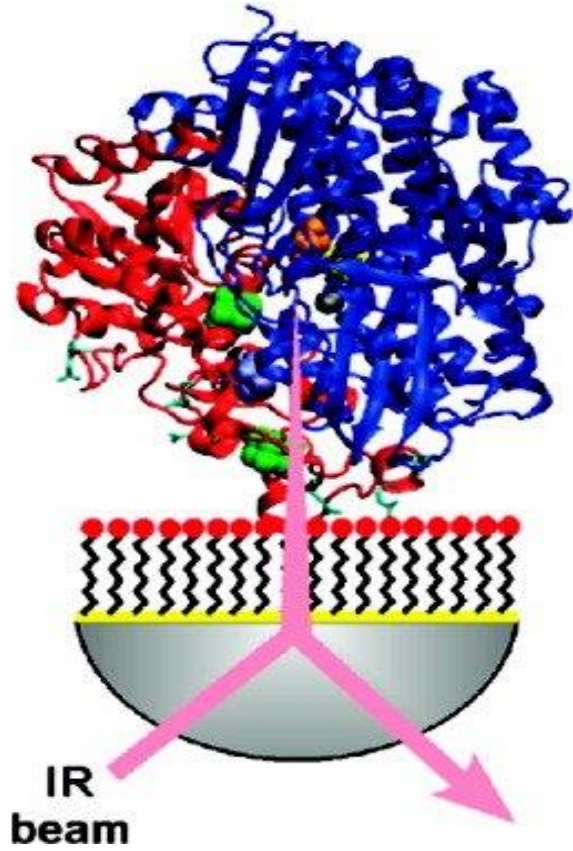
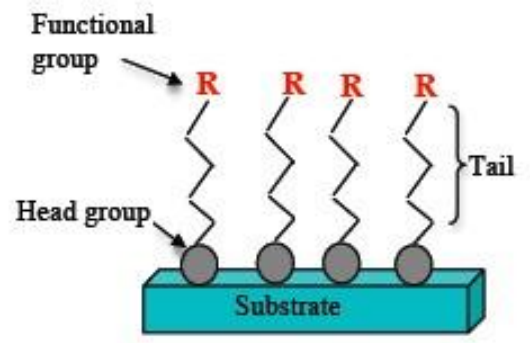


A. vinosum H_2ase , pH 6, 1.5mV/s

Des électrodes qui interagissent avec les hydrogénases

Electrode d'or fonctionnalisée

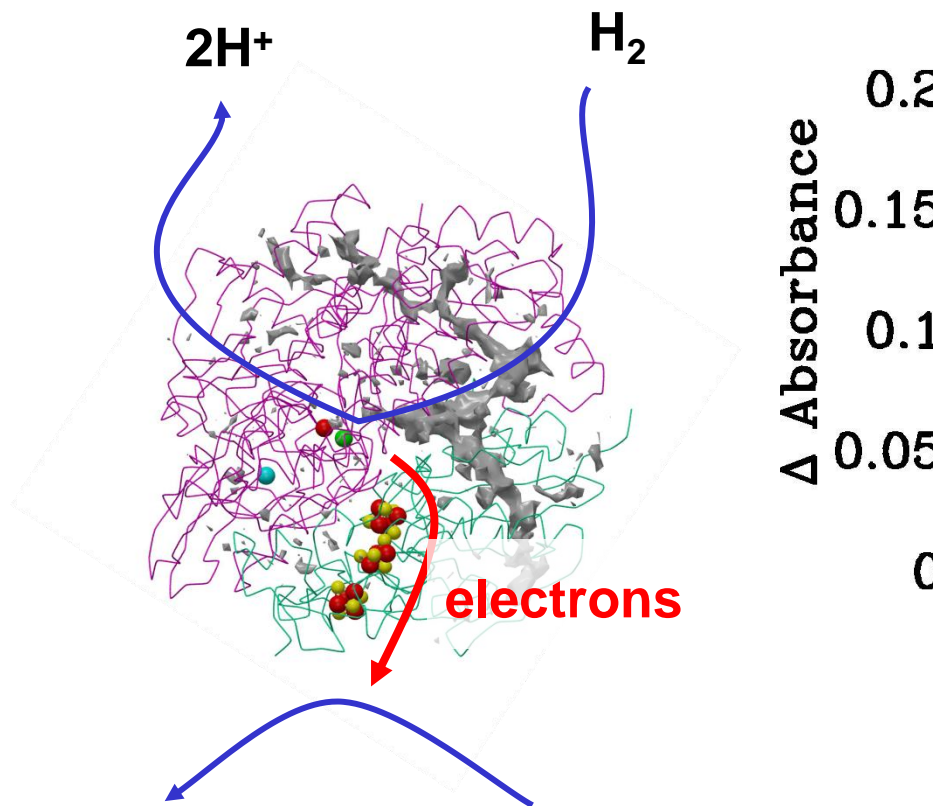
Monocouche auto organisée (SAM) de thiols
 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-\text{NH}_2$



II. Exemples d'études
électrochimiques d'hydrogénases:
quels déterminants moléculaires de
la résistance à l'oxygène?

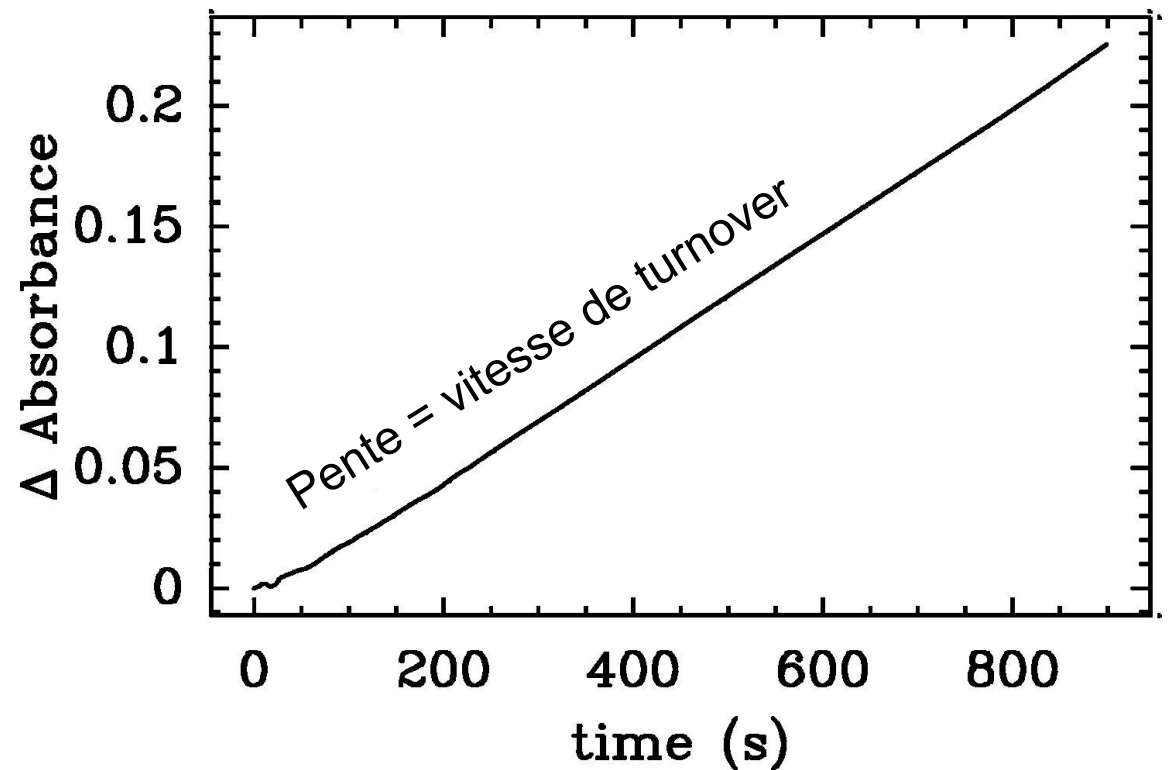
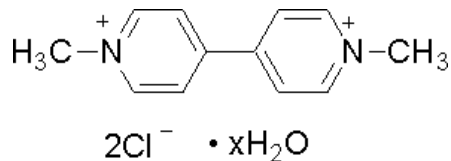
Mesure d'activité classique (spectrophotométrie)

activité = vitesse de turnover = nbr moles de H_2 / sec / enzyme (1000 à 10000s⁻¹)



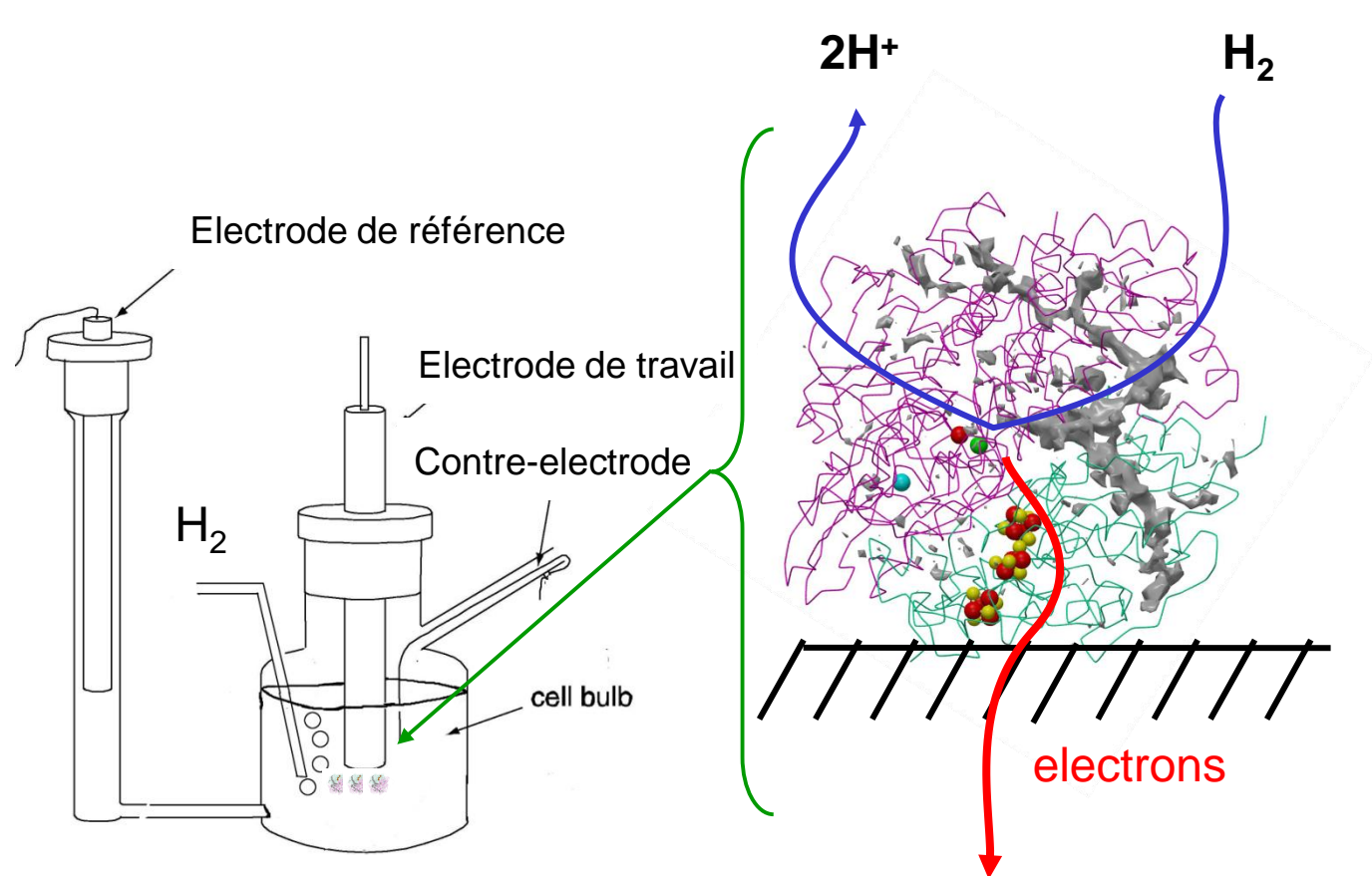
MV réduit
(bleu)

Méthyl viologène
oxydé
(incolore)



- Facile
- Laborieux: 10-20 minutes
- Contraignant: anaérobicité

La mesure électrochimique d'activité



Electrode tournante, potentiel E
Courant = [enzyme] x turnover

Inconvénient:

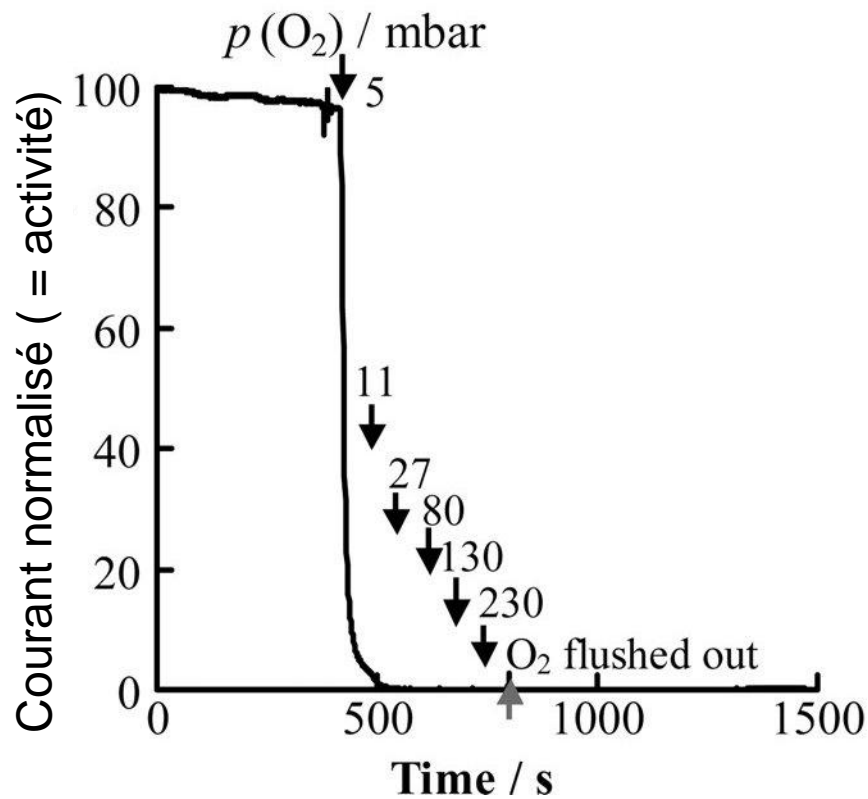
Concentration surfacique le plus souvent inconnue

Avantages:

- Quantités minuscules de matériel biologique
- Contrôle du potentiel d'électrode
- Présence d'O₂ permise (à condition que E élevé)
- Résolution temporelle

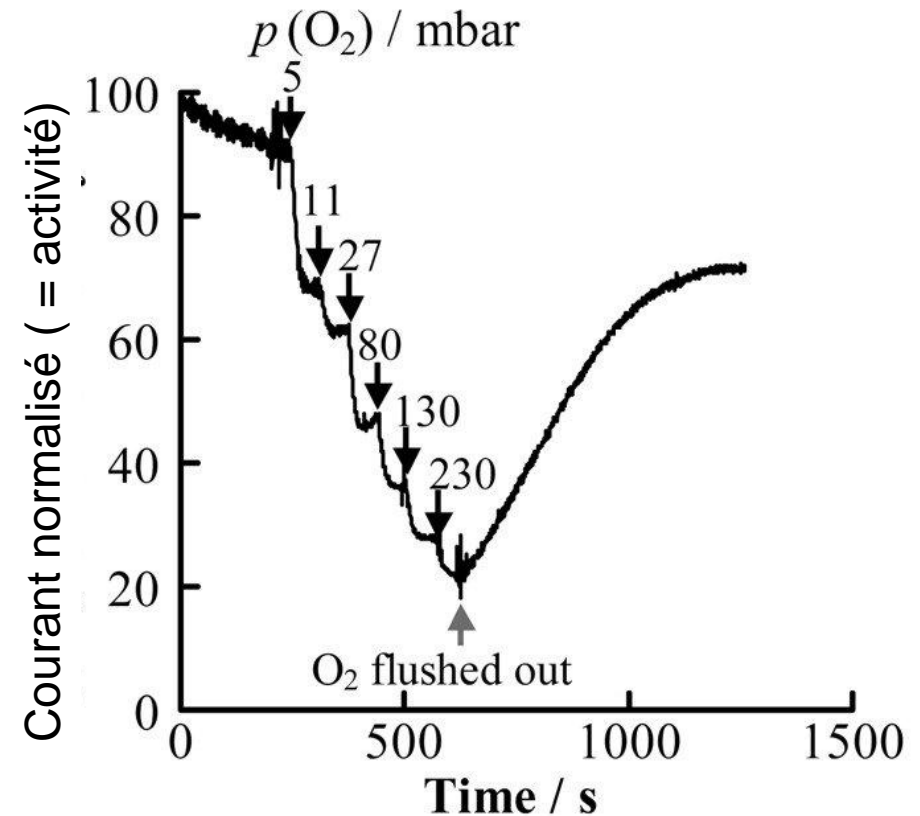
Des hydrogénases NiFe très similaires montrent des résistances à l'O₂ variées

e.g. *A. vinosum*, versus *Ralstonia eutropha* MBH



A. vinosum

1 bar H₂, pH 6, 30°C, E=0.14V



R. Eutropha MBH

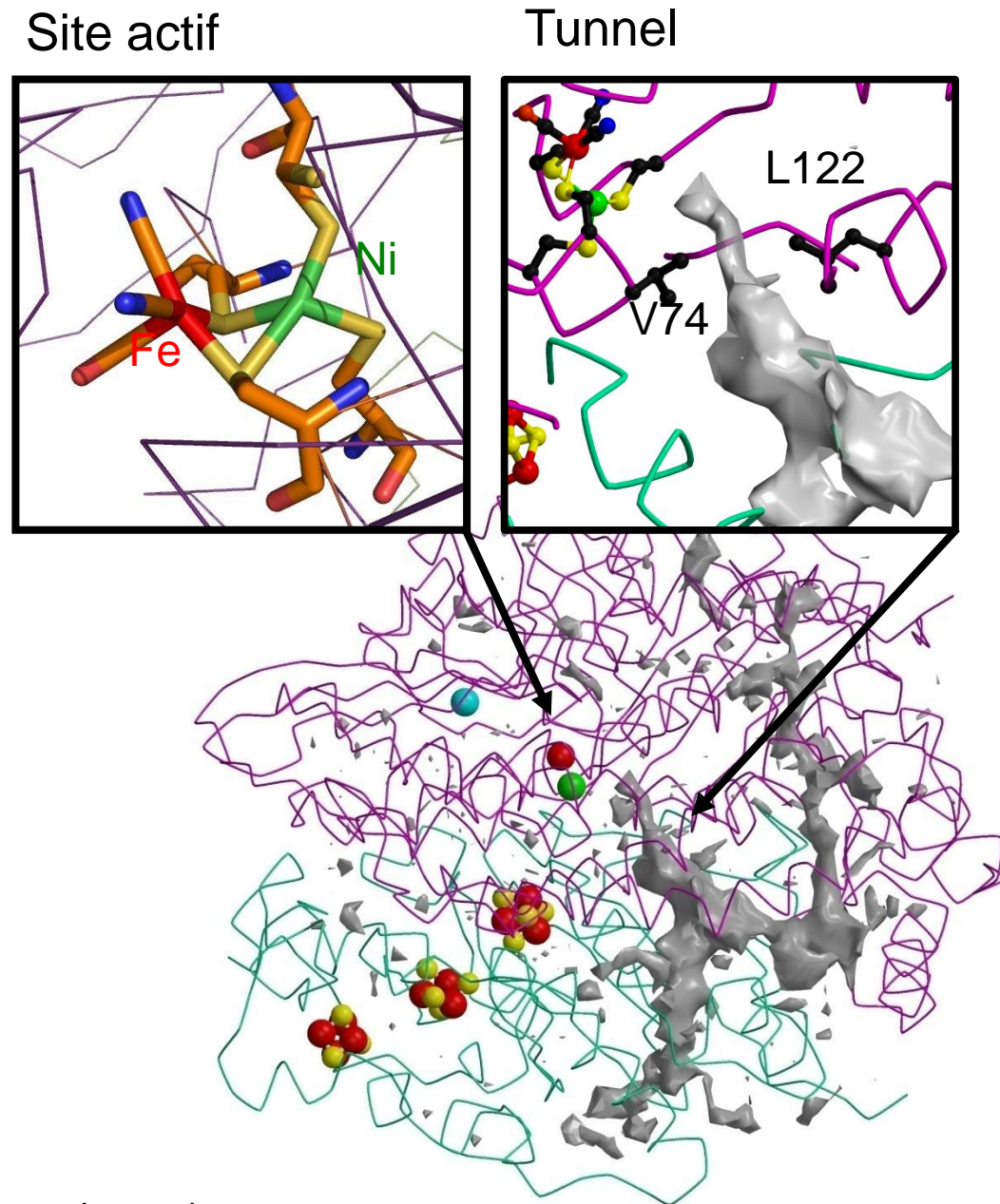
Le tunnel d'accès du substrat détermine-t-il la sensibilité à l'O₂?

1) **Val+Leu** gardent l'embouchure du tunnel dans l'enzyme de *D. fructosovorans*, standard = **sensible à l'O₂**

Résidus conservés dans la plupart des H₂ases NiFe

Exceptions: **Ile+Phe** dans enzymes « senseurs » (*R. capsulatus*, *R. eutropha* RH) **insensibles à l'O₂**

2) La double mutation **Ile→Val / Phe→Leu** rend l'enzyme senseur (RH) de *R. eutropha* sensible à l'oxygène

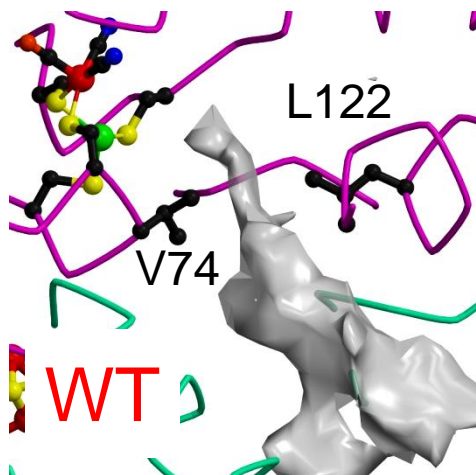
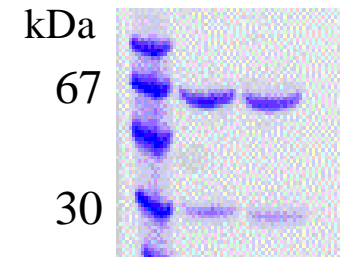
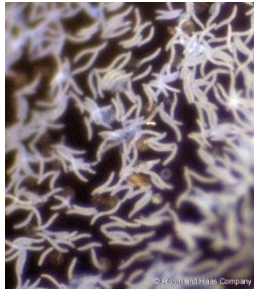
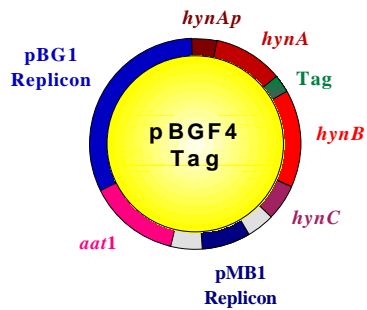
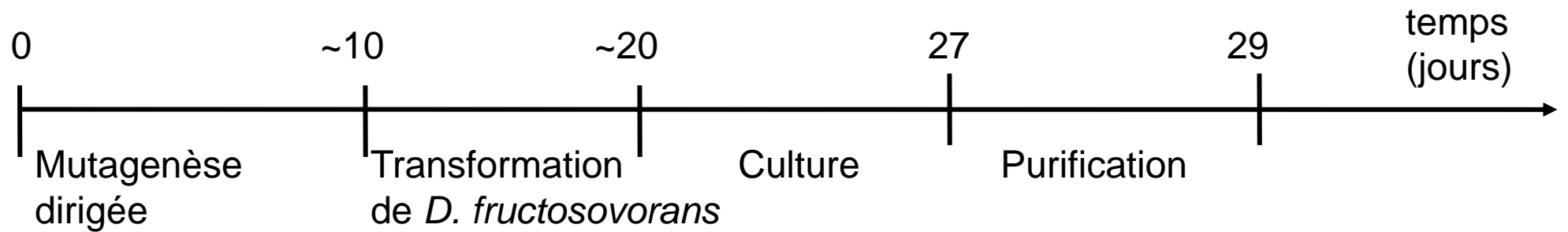


1) Volbeda *et al.*, Int. J. Hydrogen. Energ. 27 1449 (2002)

2) Buhrke *et al.*, J. Biol. Chem. 280 23791 (2005)

Purification de mutants de l'hydrogénase de *D. fructosovorans*

(S. Dementin, P. Liebgott, CNRS Marseille)

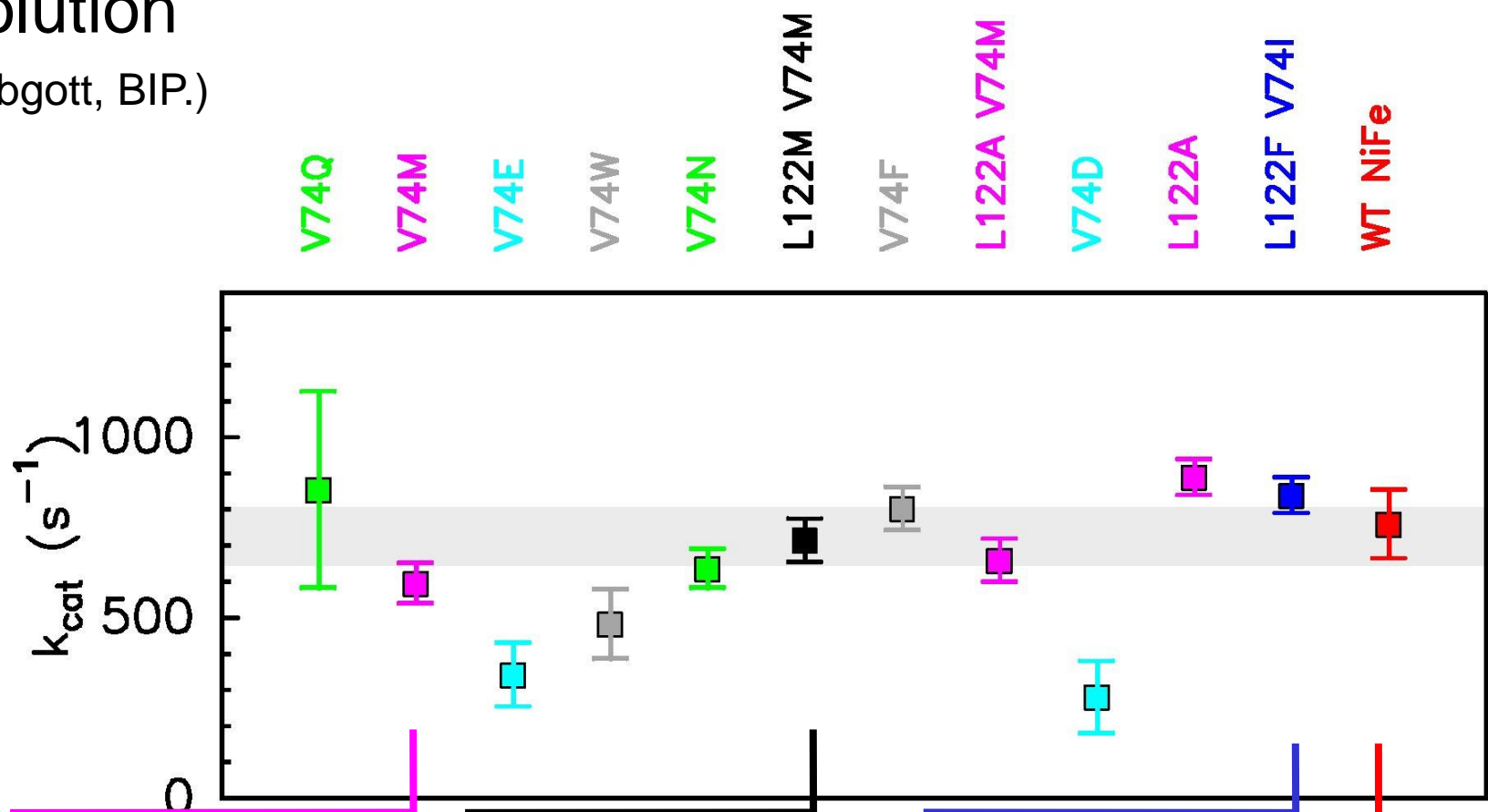


- | | | | |
|------|------|-------|------------|
| V74D | V74M | V74C | L122F |
| V74E | V74C | V74H | L122A |
| V74Q | V74S | V74F | L122M-V74M |
| V74N | V74K | L122M | L122A-V74M |
| V74W | V74I | L122C | L122F-V74I |
| | | | L122C-V74C |

Activité en solution

(S. Dementin, P. Liebgott, BIP.)

Structures
X-ray
(A. Volbeda,
CEA,
Grenoble)

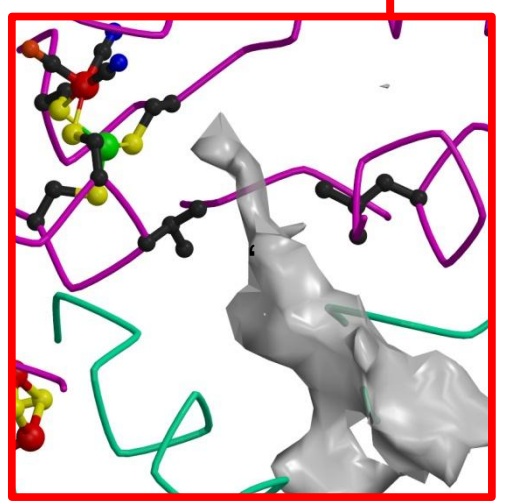
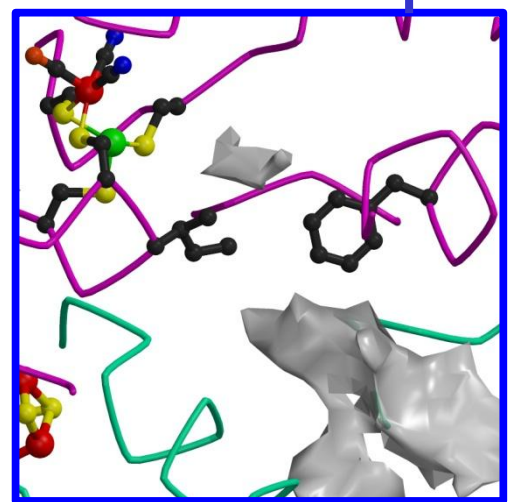
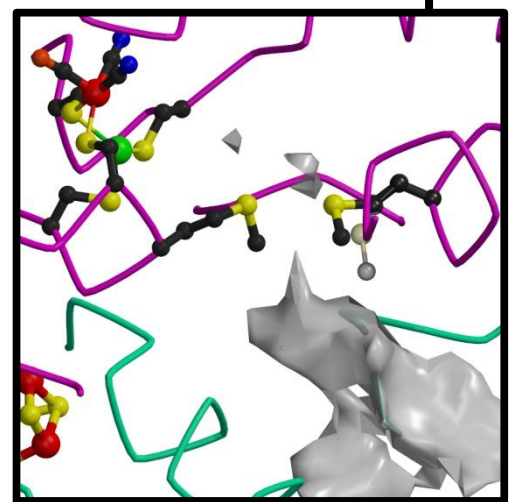
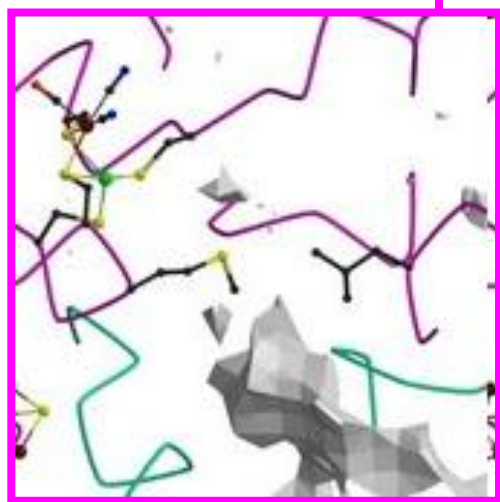


pdb 3H3X

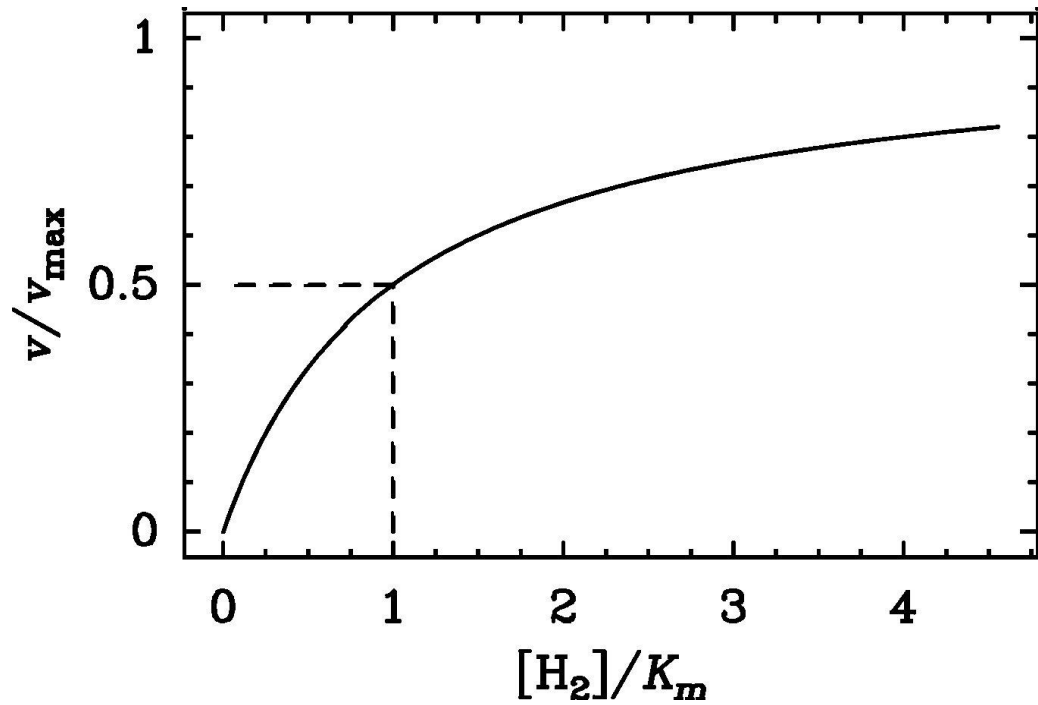
pdb 3CUR

pdb 3CUS

pdb 1YQW

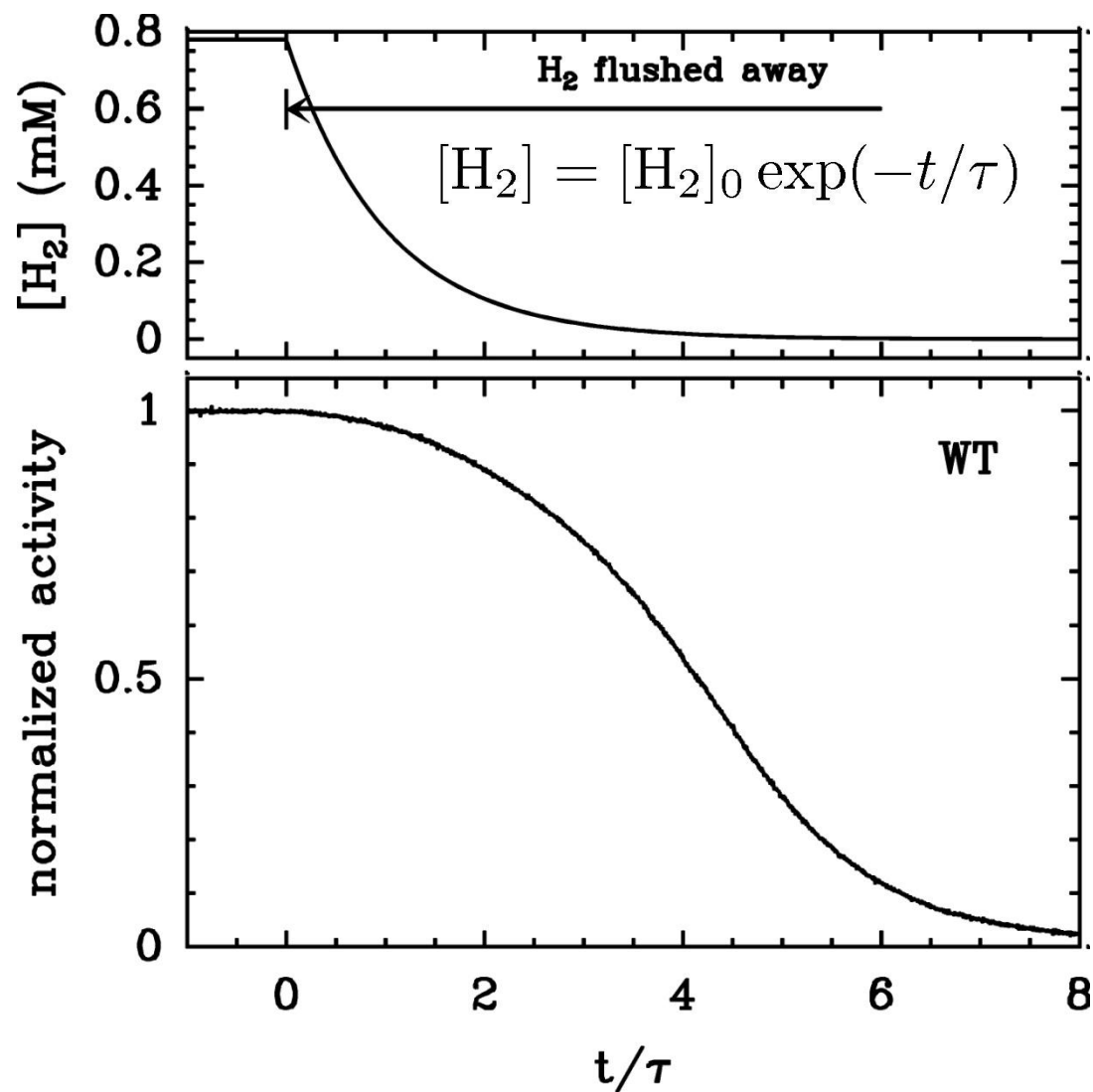


La constante de Michaelis K_m

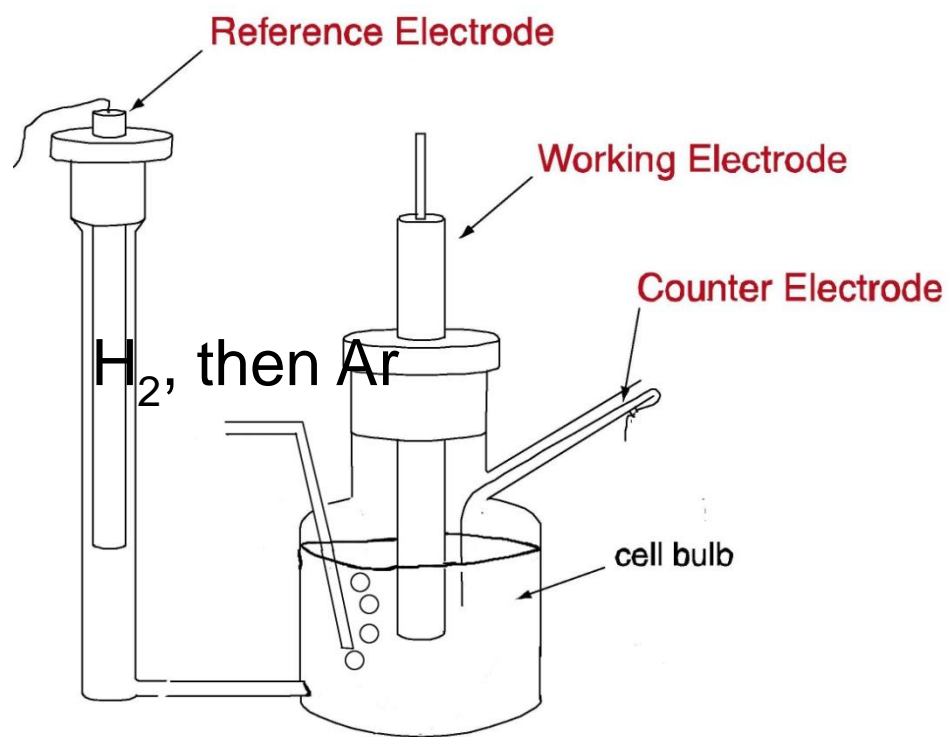


$$v = \frac{v_{\max}}{1 + \frac{K_m}{[H_2]}}$$

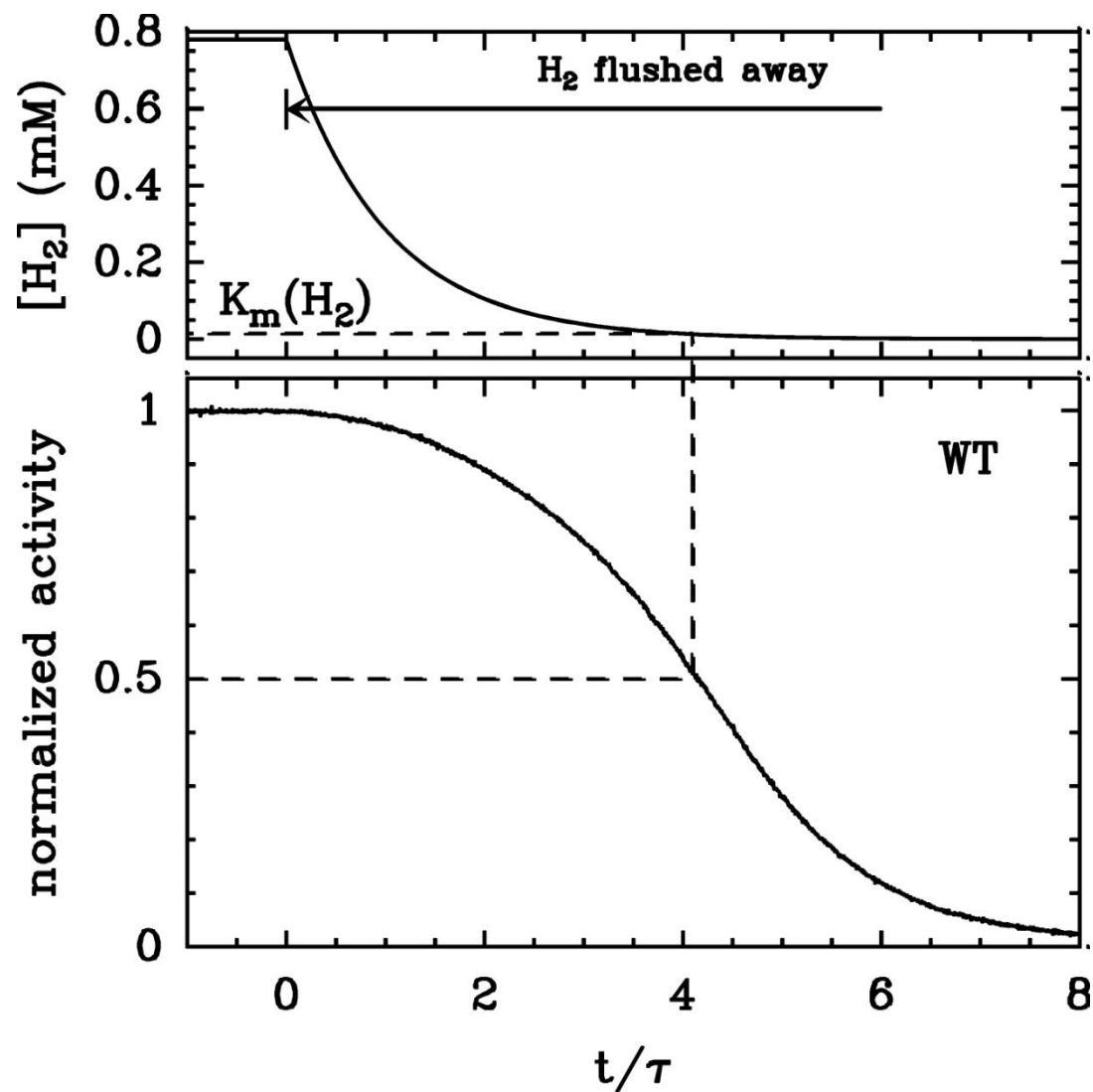
La constante de Michaelis K_m



$$i = \frac{i^{\max}}{1 + \frac{K_m}{[\text{H}_2]}}$$



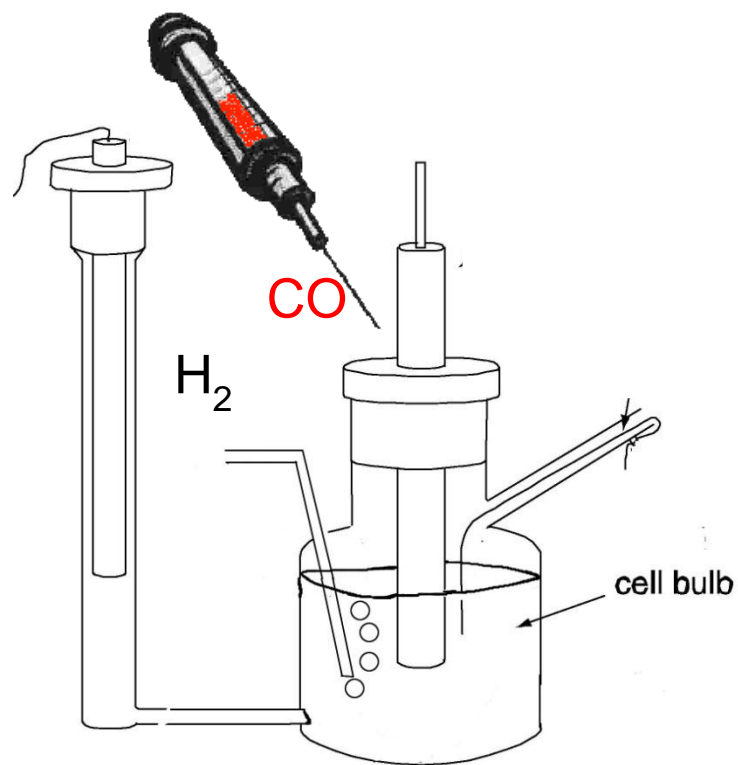
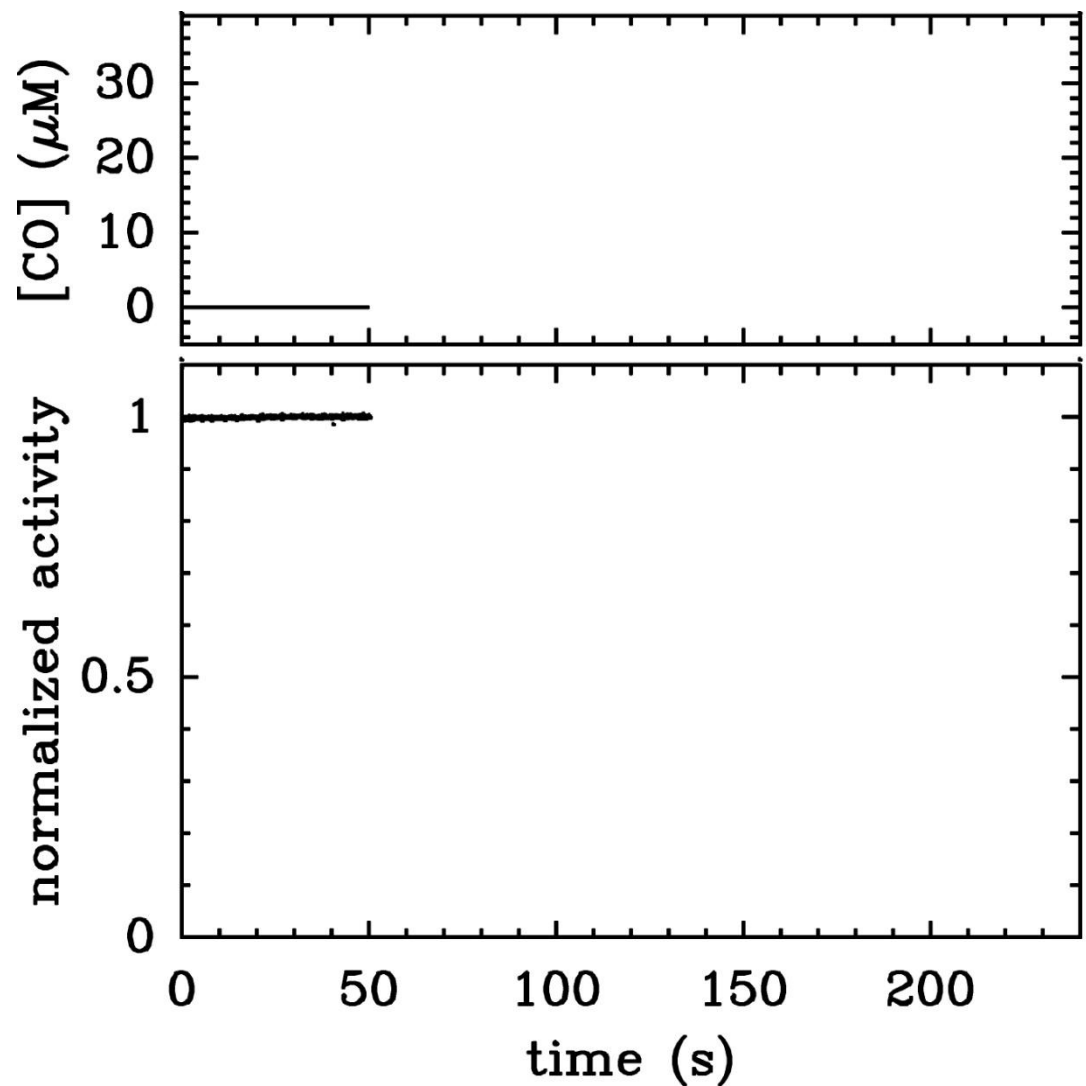
La constante de Michaelis K_m



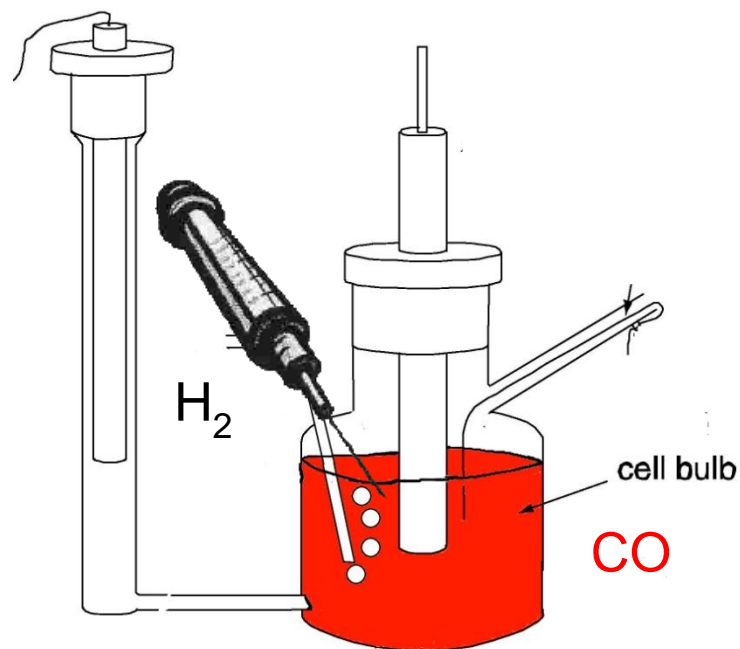
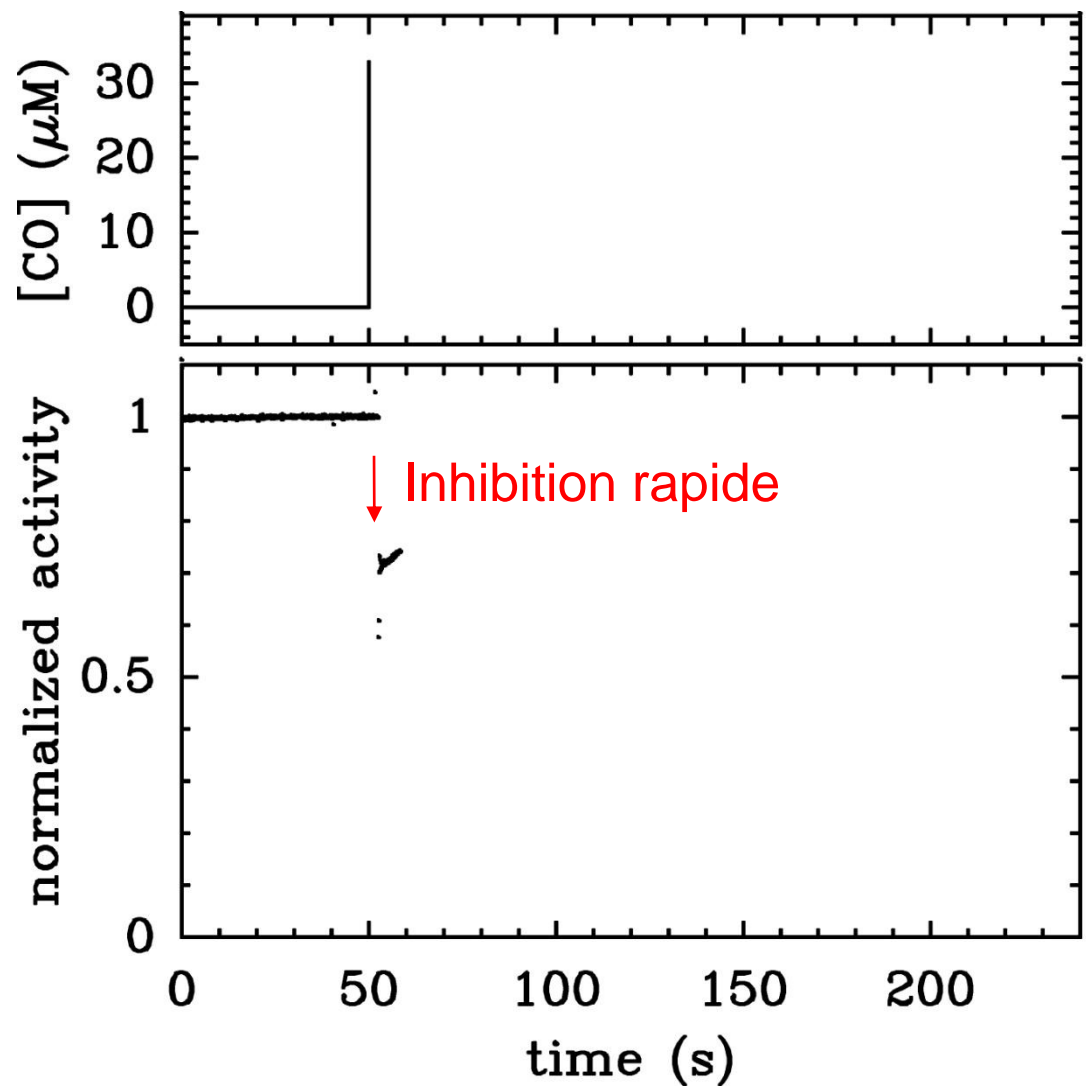
$$i = \frac{i^{\max}}{1 + \frac{K_m}{[H_2]}}$$

$$= \frac{i^{\max}}{1 + \frac{K_m}{[H_2]_0 \exp(-t/\tau)}}$$

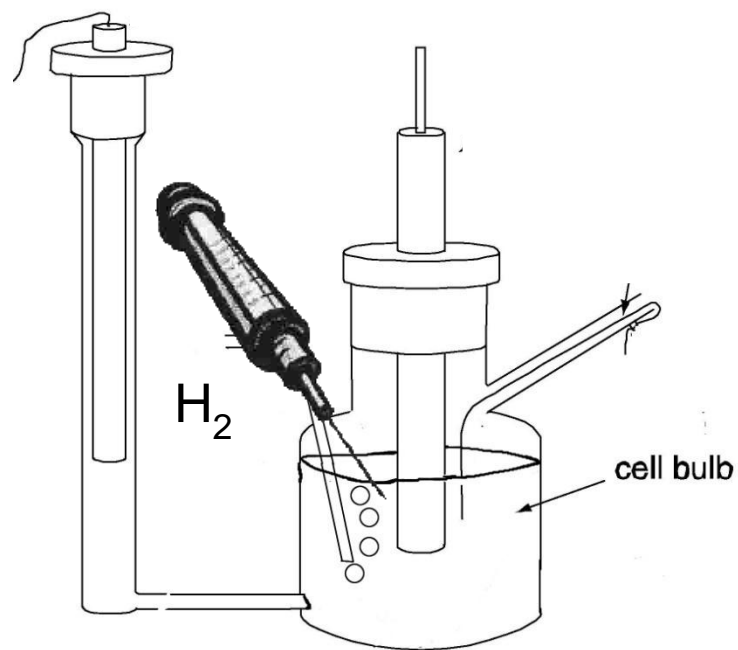
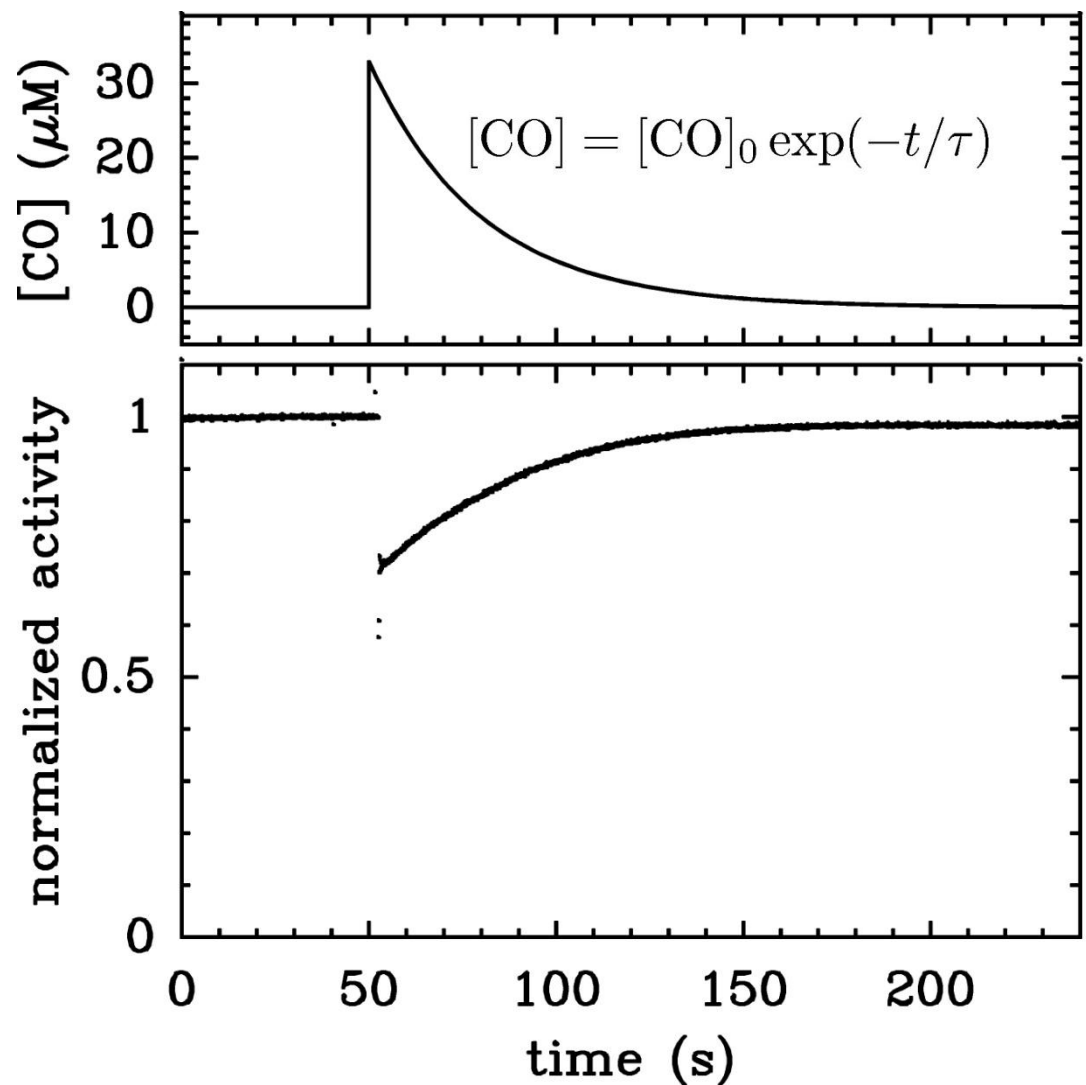
La vitesse de réaction avec CO (inhibiteur "compétitif")



La vitesse de réaction avec CO (inhibiteur "compétitif")

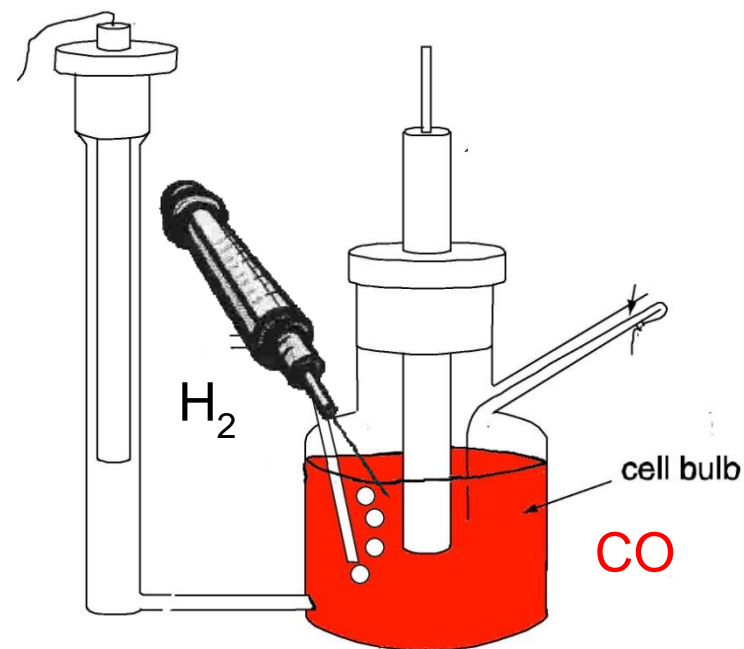
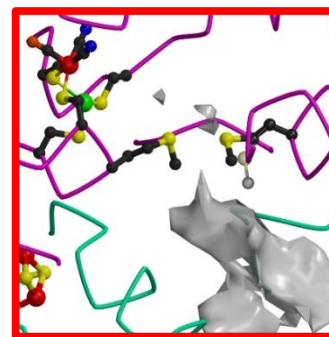
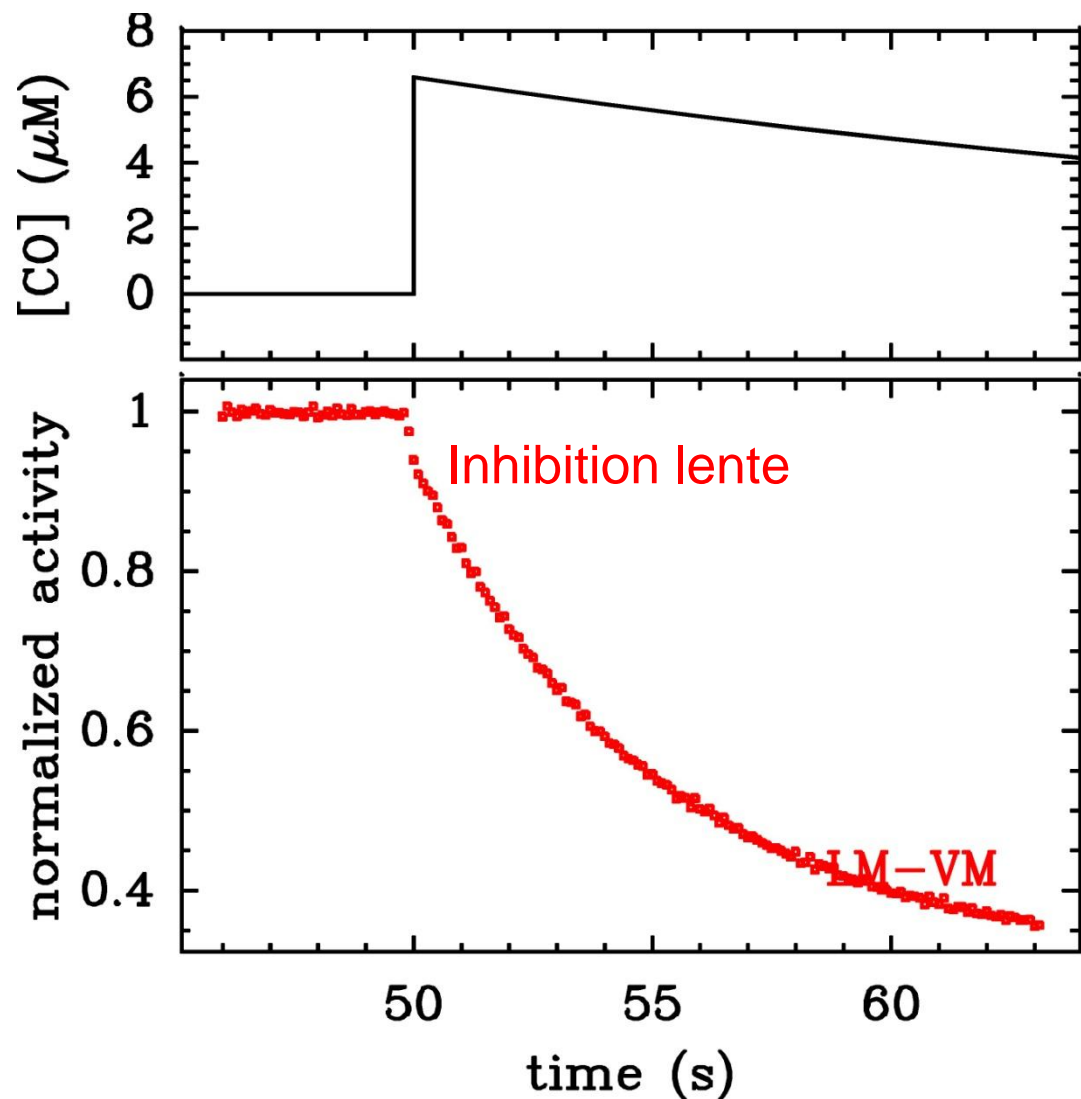


La vitesse de réaction avec CO (inhibiteur "compétitif")



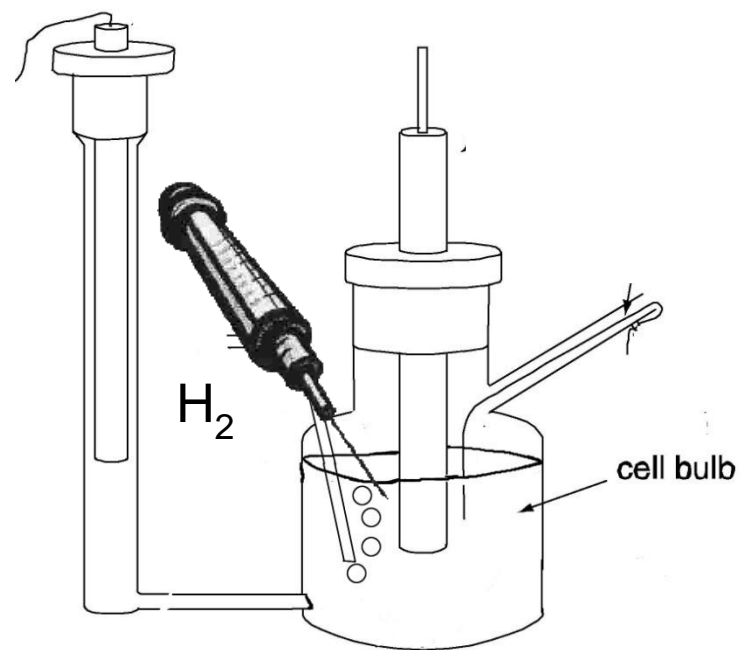
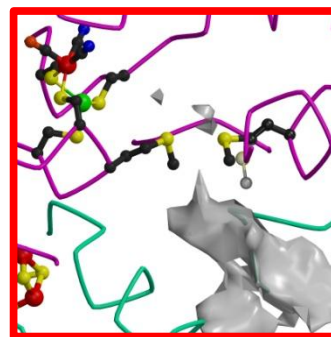
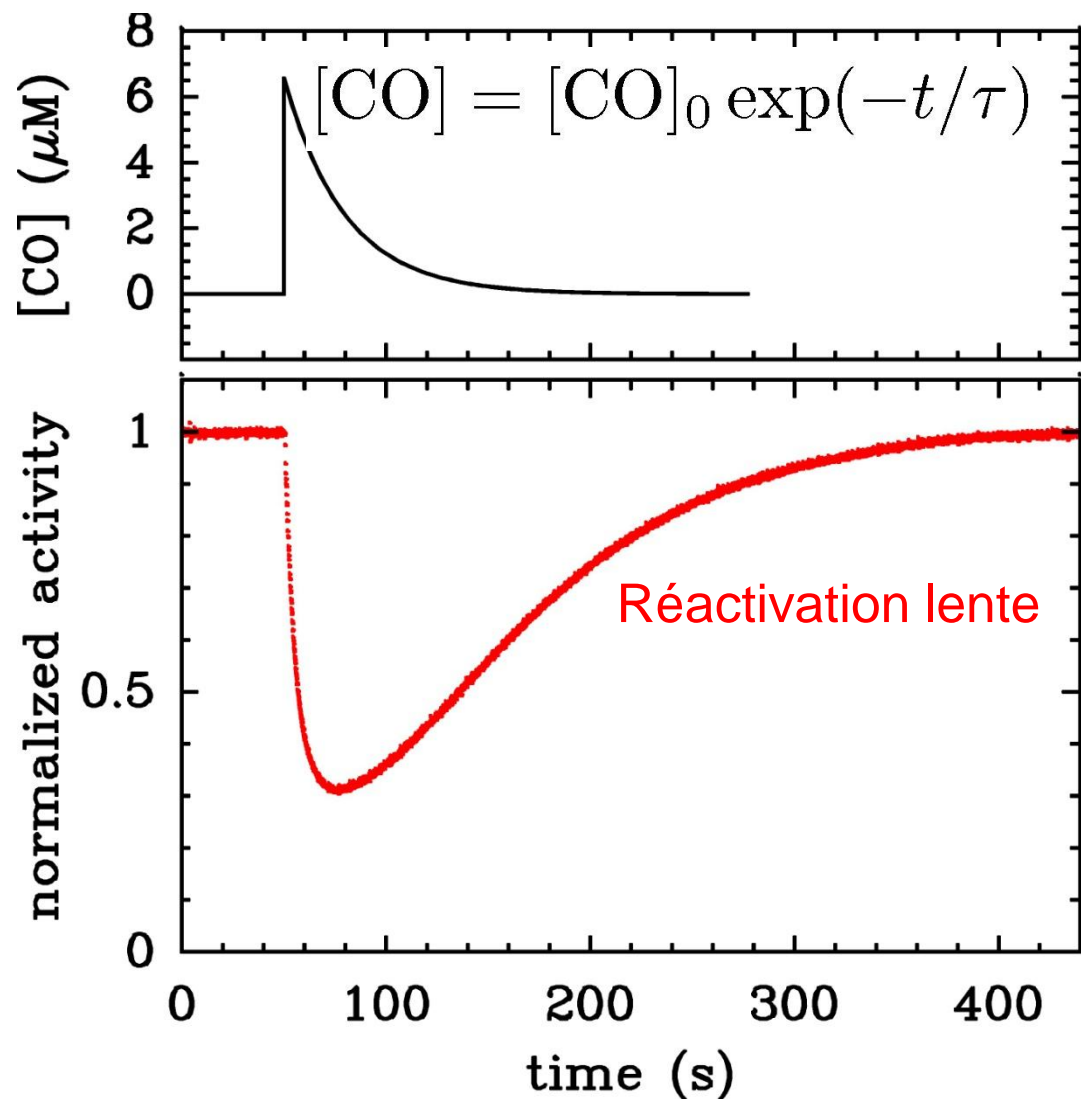
La vitesse de réaction avec CO (inhibiteur "compétitif")

Résultat obtenu avec un mutant dont le canal est partiellement obstrué



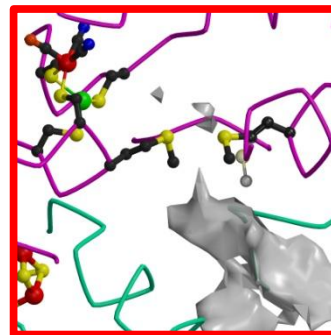
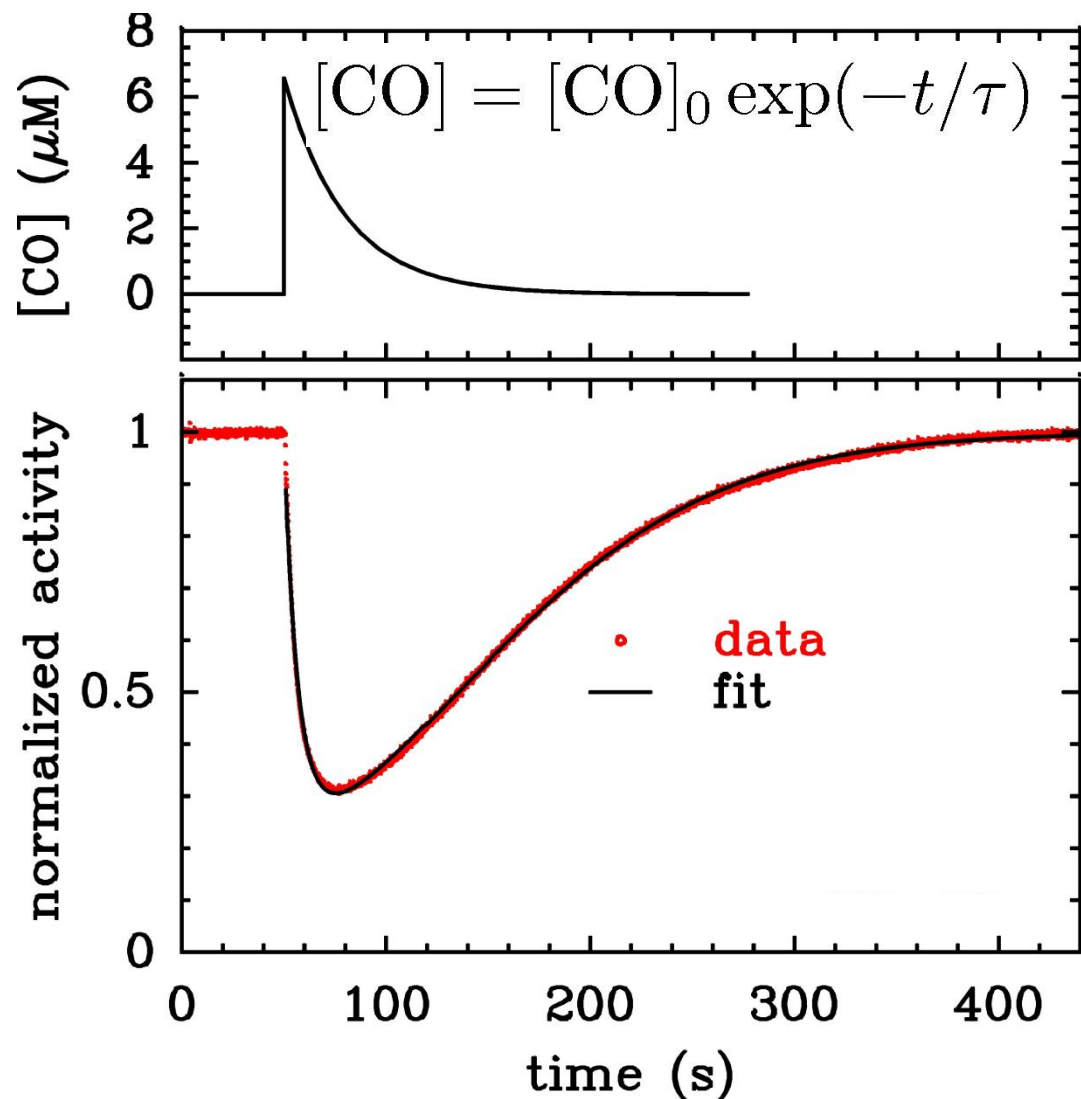
La vitesse de réaction avec CO (inhibiteur "compétitif")

Résultat obtenu avec un mutant dont le canal est partiellement obstrué



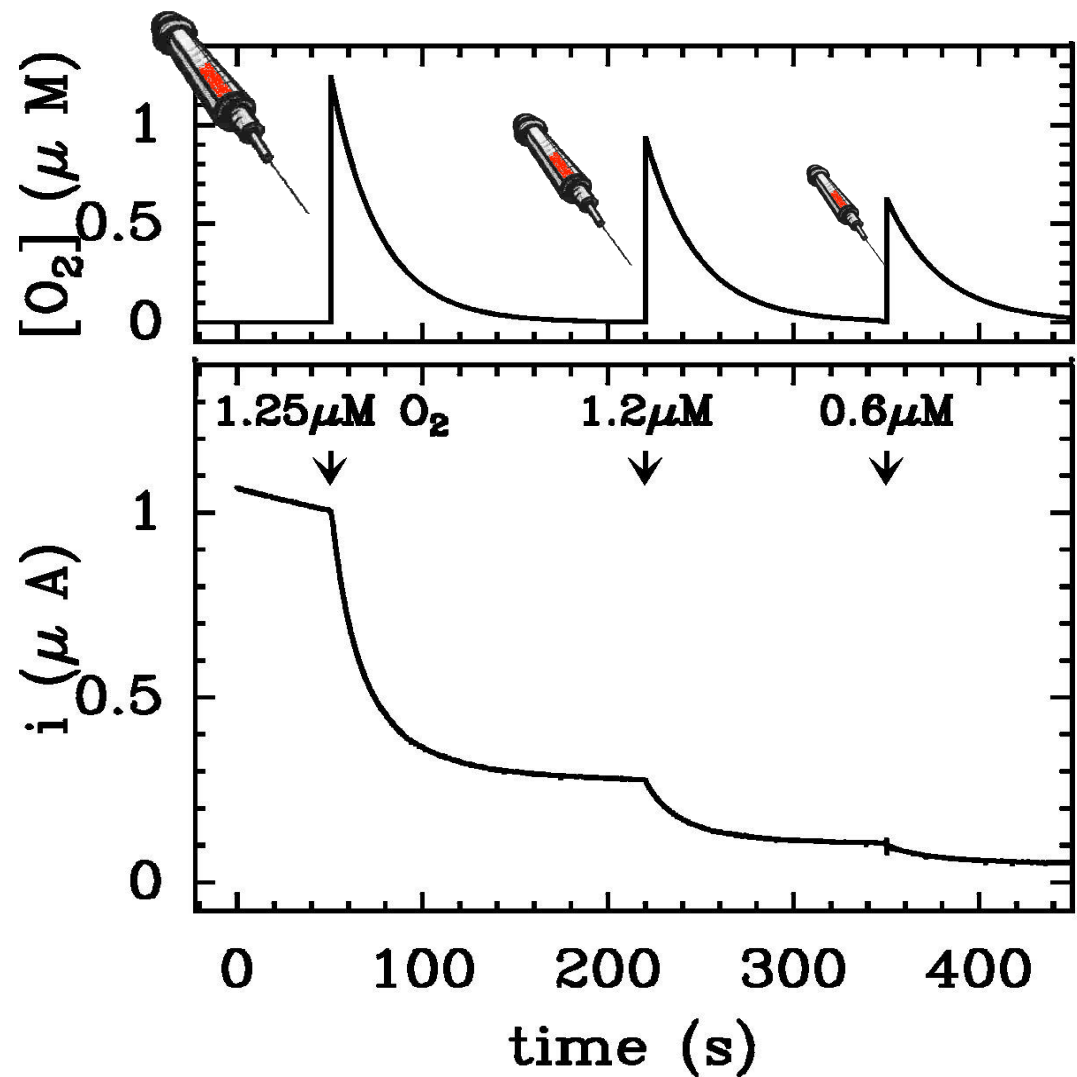
La vitesse de réaction avec CO (inhibiteur “compétitif”)

Résultat obtenu avec un mutant dont le canal est partiellement obstrué



Modélisation $\rightarrow k_{in}^{CO}$ et k_{out}^{CO}

La vitesse de la réaction (irréversible) avec O_2

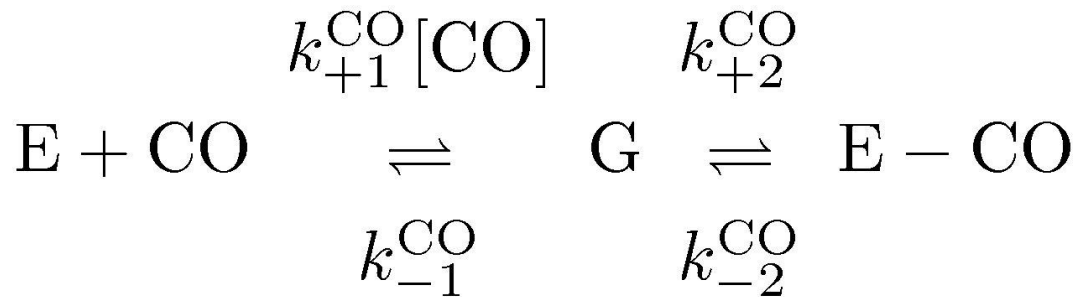
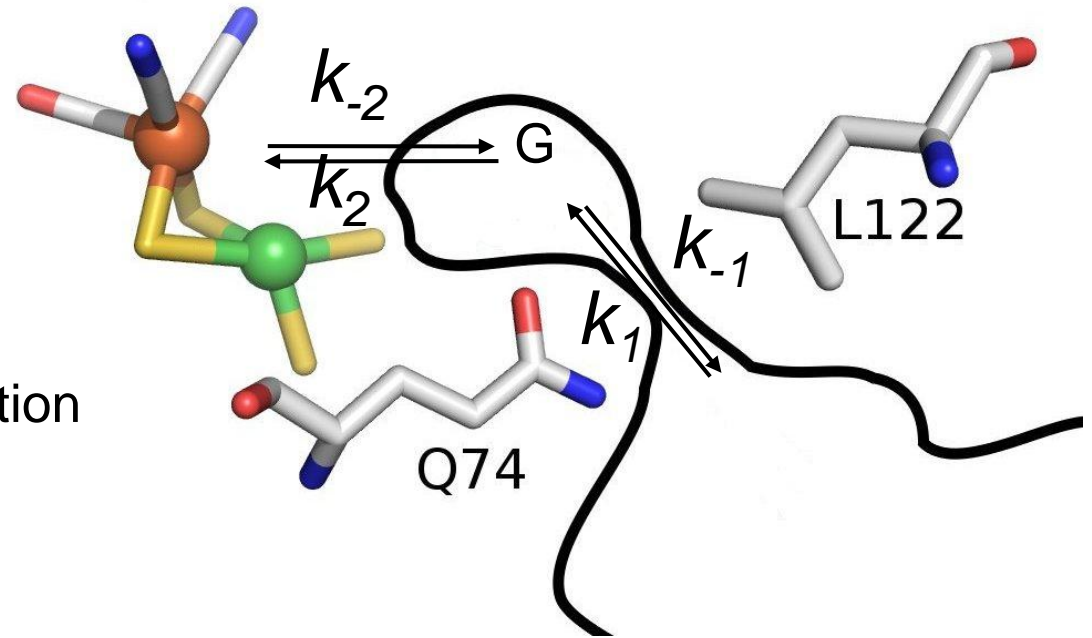


Modélisation $\rightarrow k_{in}^{O_2}$

Interprétation:

une étape (k_1/k_{-1}) de diffusion dans l'un et l'autre sens

une étape (k_2/k_{-2}) de fixation/dissociation du site actif



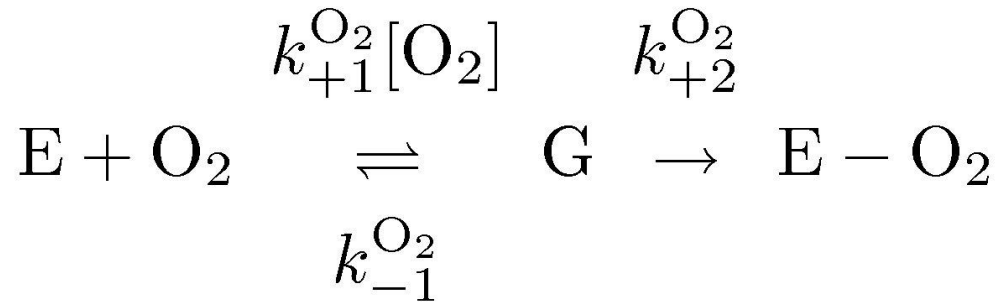
$$\begin{array}{l}
 k_{\text{in}}^{\text{CO}} \approx k_{+1}^{\text{CO}} \\
 k_{\text{out}}^{\text{CO}} \approx k_{-1}^{\text{CO}} \frac{k_{-2}^{\text{CO}}}{k_{+2}^{\text{CO}}}
 \end{array}$$

4 constantes de vitesse

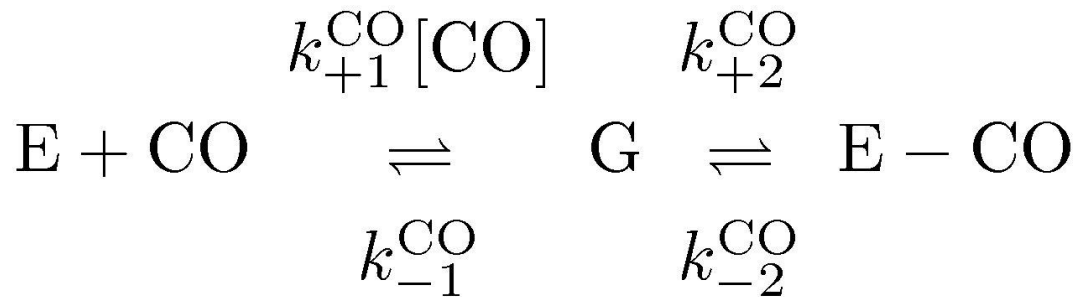
2 observables

10 constantes de vitesse

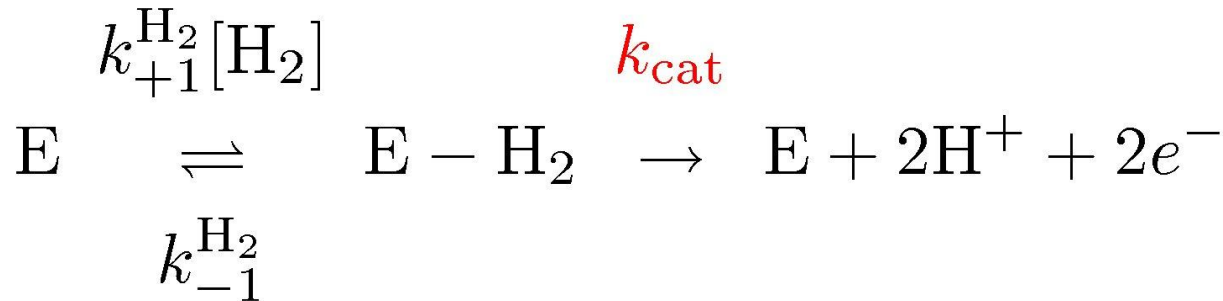
5 observables



$$\frac{1}{k_{\text{in}}^{\text{O}_2}} = \frac{1}{k_{+1}^{\text{O}_2}} + \frac{k_{-1}^{\text{O}_2}}{k_1^{\text{O}_2} k_2^{\text{O}_2}}$$



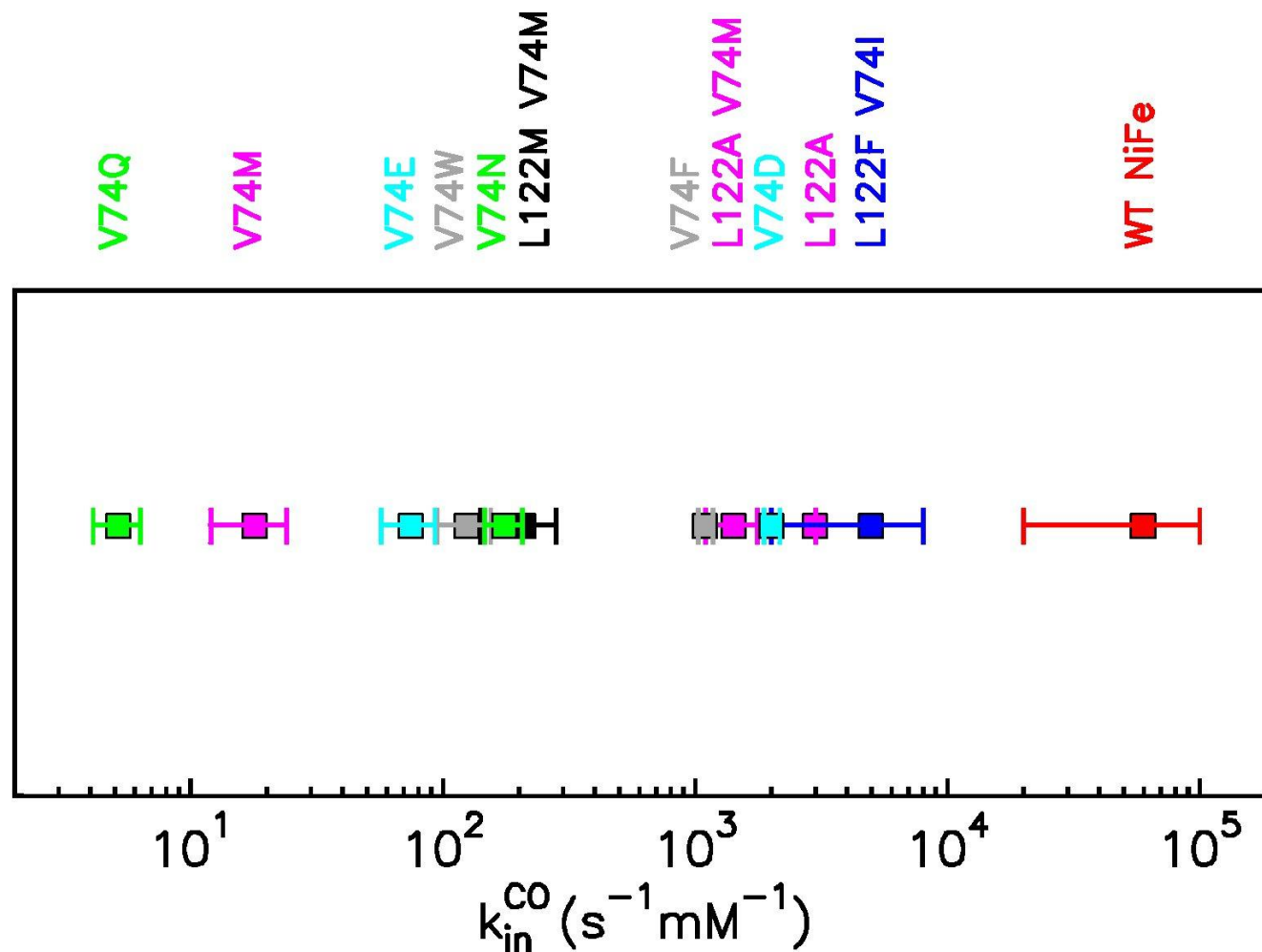
$$\begin{array}{l}
 k_{\text{in}}^{\text{CO}} \approx k_{+1}^{\text{CO}} \\
 k_{\text{out}}^{\text{CO}} \approx k_{-1}^{\text{CO}} \frac{k_{-2}^{\text{CO}}}{k_{+2}^{\text{CO}}}
 \end{array}$$



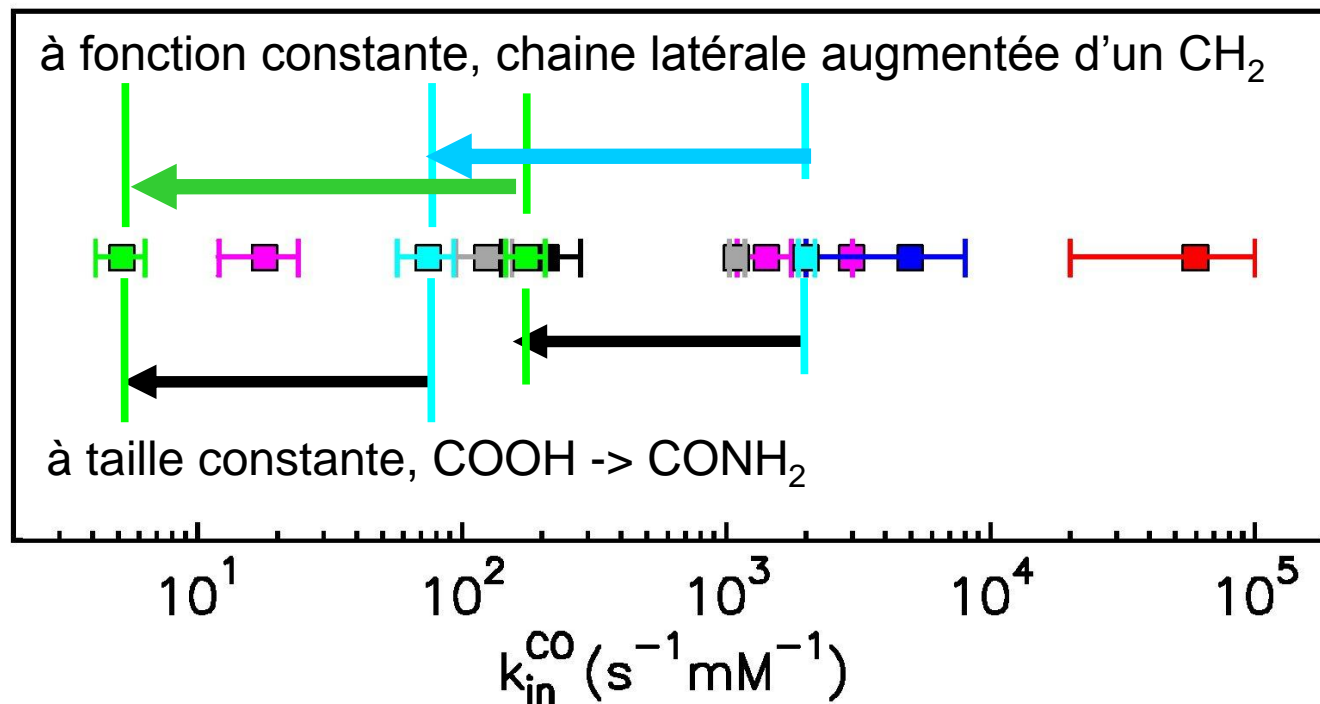
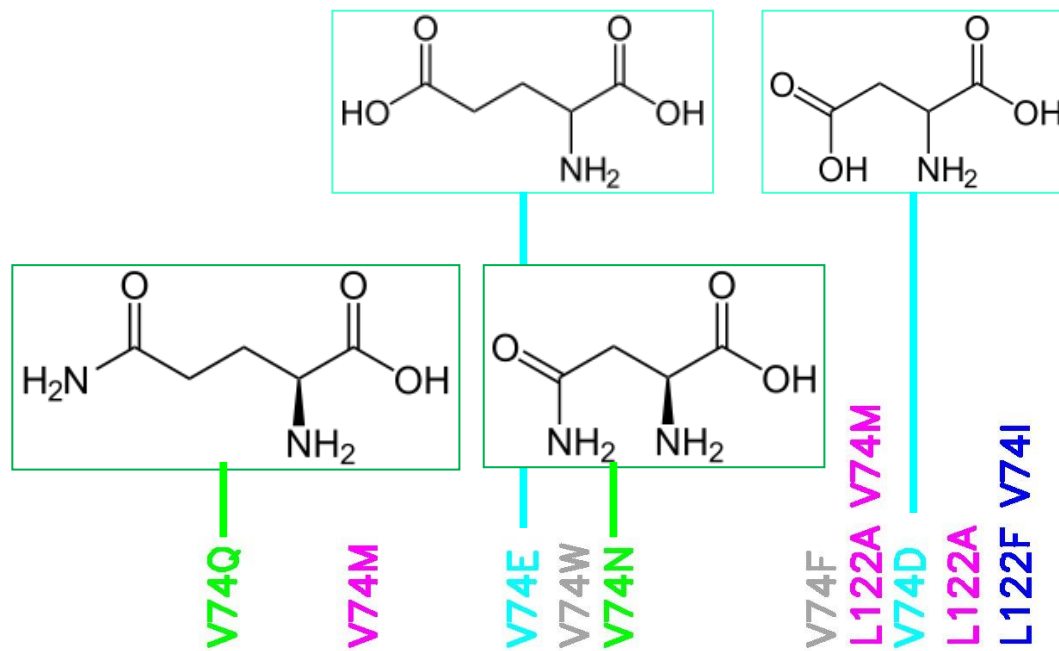
$$K_m = \frac{k_{\text{cat}} + k_{-1}^{\text{H}_2}}{k_1^{\text{H}_2}}$$

La vitesse d'inhibition par CO
est la vitesse de diffusion de CO
vers le site actif

$$k_{\text{in}}^{\text{CO}} \approx k_{+1}^{\text{CO}}$$



$$k_{in}^{CO} \approx k_{+1}^{CO}$$

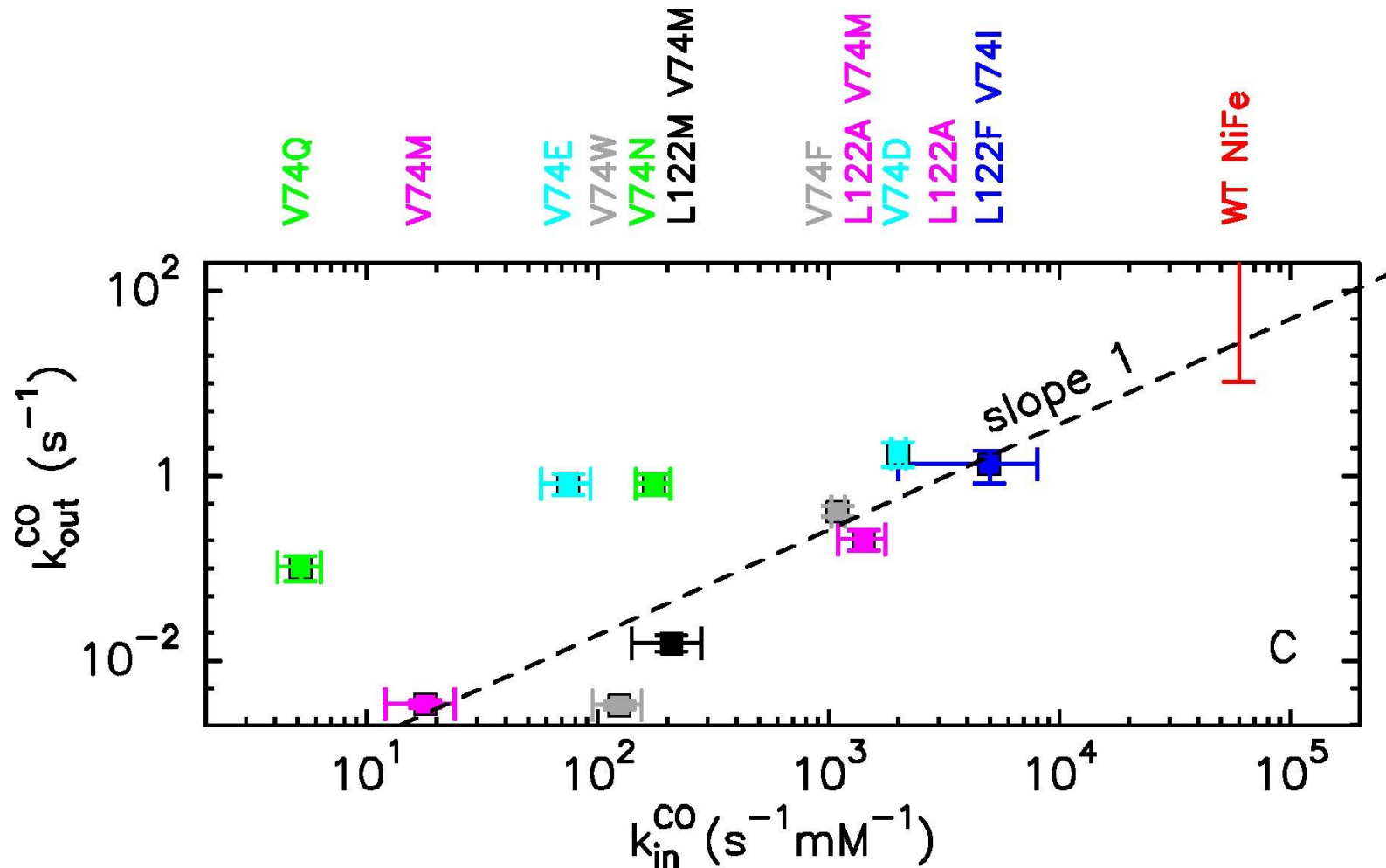


Les mutations affectent les vitesses d'entrée et de sortie de la même façon

$$k_{\text{in}}^{\text{CO}} \approx k_{+1}^{\text{CO}}$$

$$k_{\text{out}}^{\text{CO}} / k_{\text{in}}^{\text{CO}} = \frac{k_{-1}^{\text{CO}}}{k_{+1}^{\text{CO}}} \frac{k_{-2}^{\text{CO}}}{k_{+2}^{\text{CO}}}$$

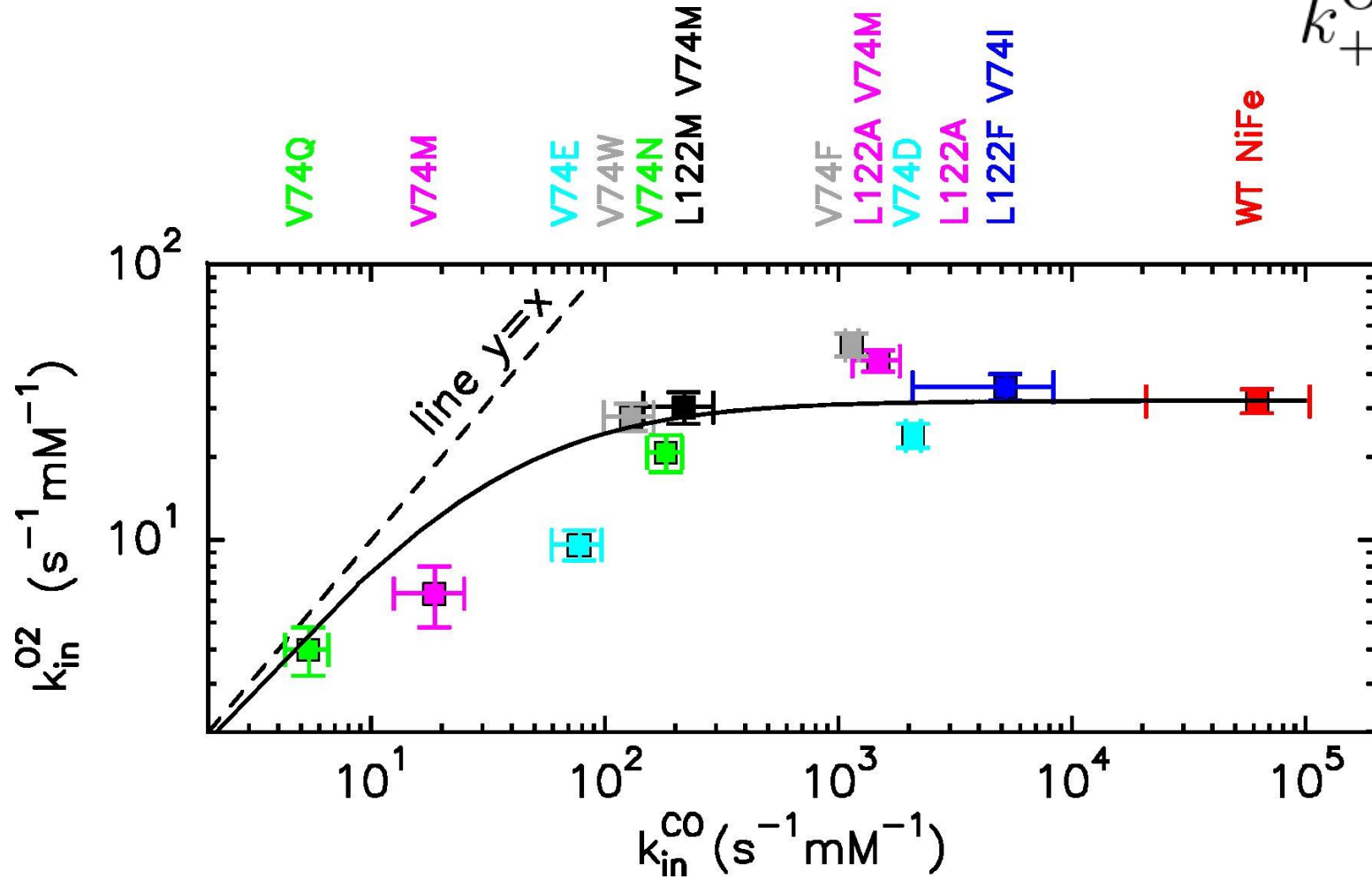
constant



Ralentir la diffusion de O₂ peut augmenter la résistance de l'enzyme à O₂

$$\frac{1}{k_{in}^{O_2}} = \frac{1}{k_{+1}^{O_2}} + \frac{k_{-1}^{O_2}}{k_1^{O_2} k_2^{O_2}}$$

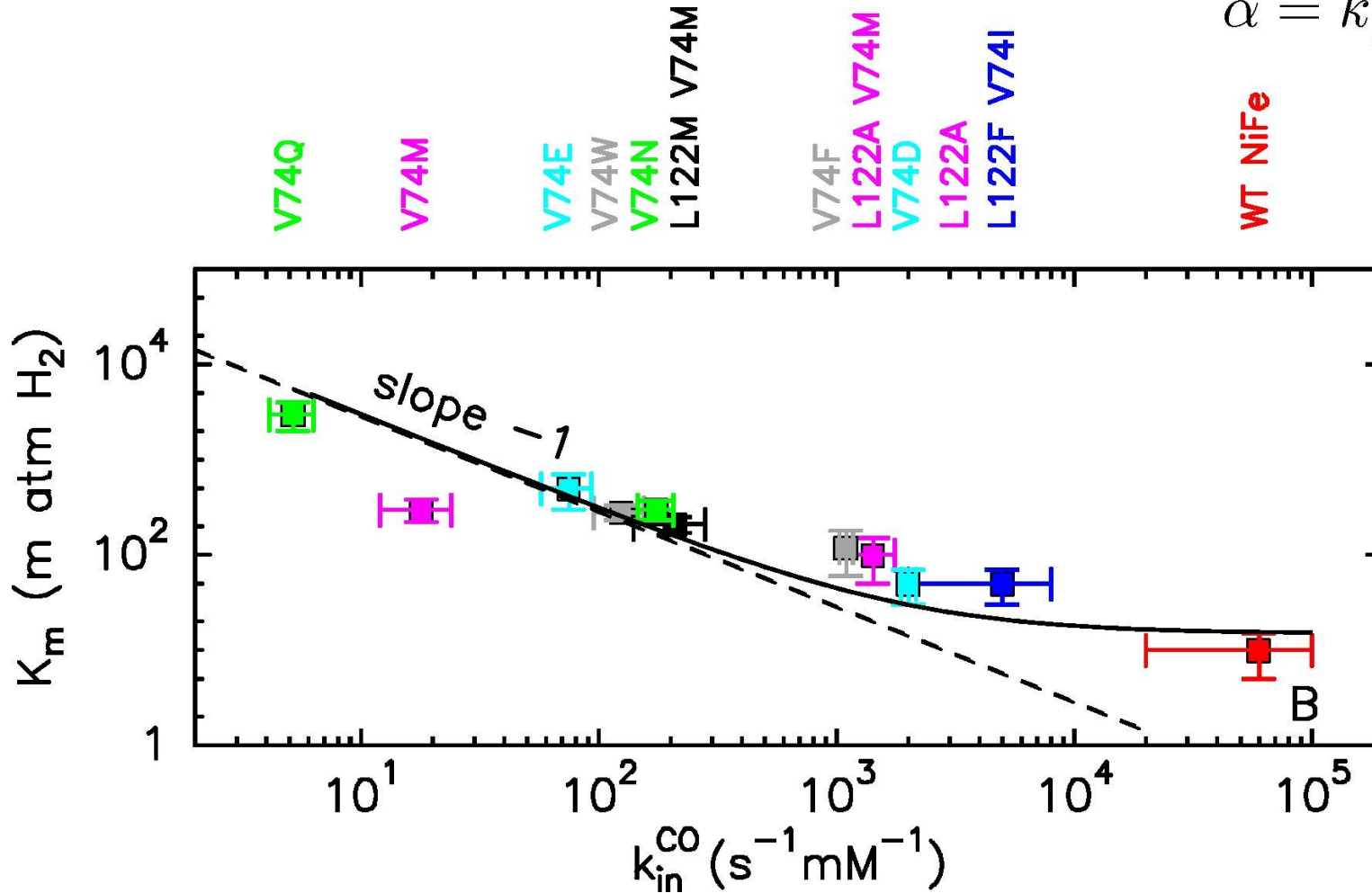
$$k_{+1}^{O_2} = k_{in}^{CO}$$



Les mutations affectent la vitesse de diffusion de H₂

$$K_m = \frac{k_{\text{cat}} + k_{-1}^{\text{H}_2}}{k_1^{\text{H}_2}}$$

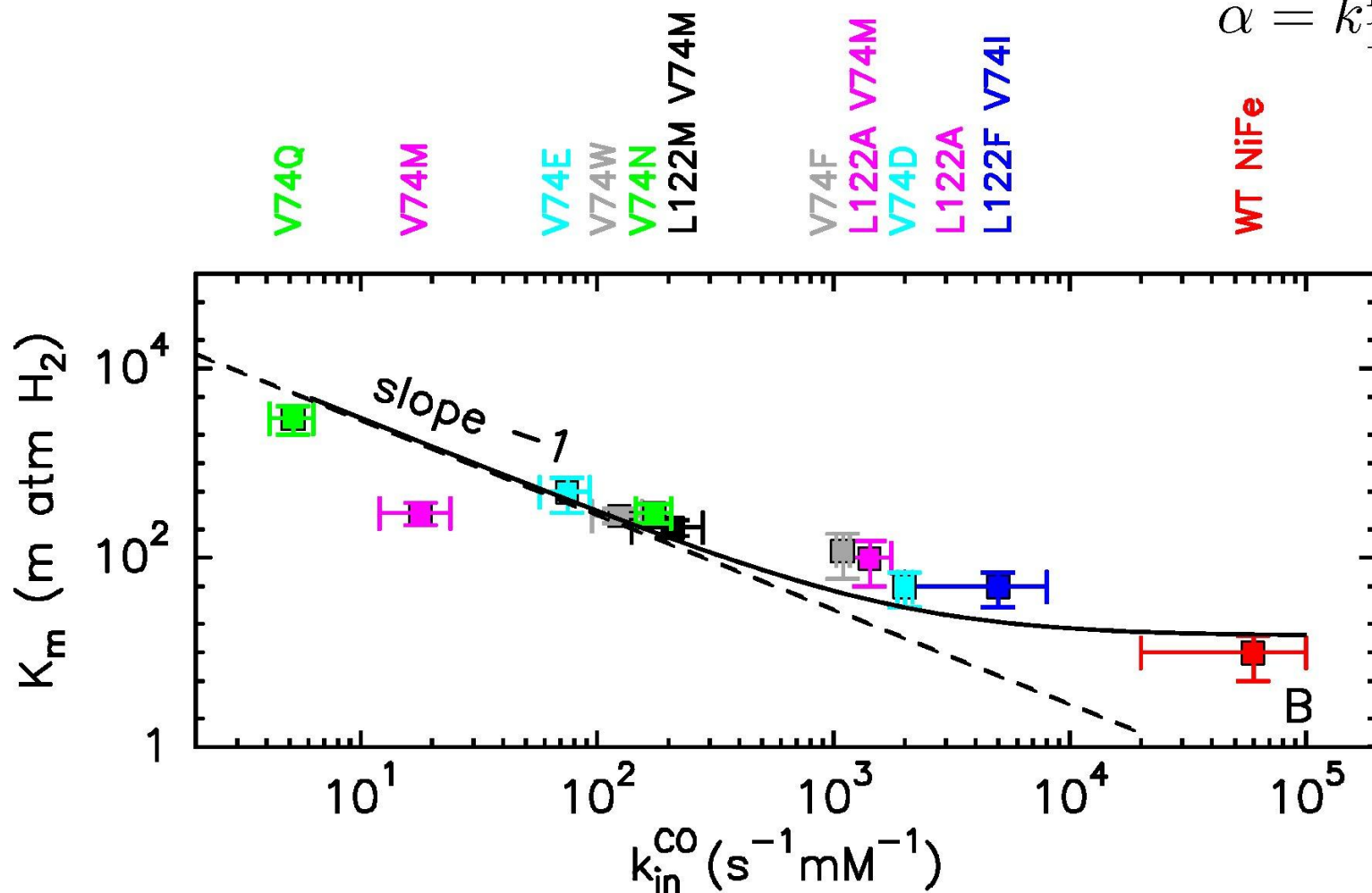
$$\alpha = k_1^{\text{H}_2} / k_1^{\text{CO}}$$



H₂ diffuse par le même canal
 mais 30 fois plus vite
 que O₂ et CO

$$K_m = \frac{k_{\text{cat}}/\alpha}{k_{\text{in}}^{\text{CO}}} + \frac{k_{-1}^{\text{H}_2}}{k_1^{\text{H}_2}}$$

$$\alpha = k_1^{\text{H}_2}/k_1^{\text{CO}} = 31 \pm 3$$



Des tunnels conduisent O₂, H₂, CO, N₂
dans de nombreuses autres métalloenzymes

Cytochrome c oxydase (complexe IV)

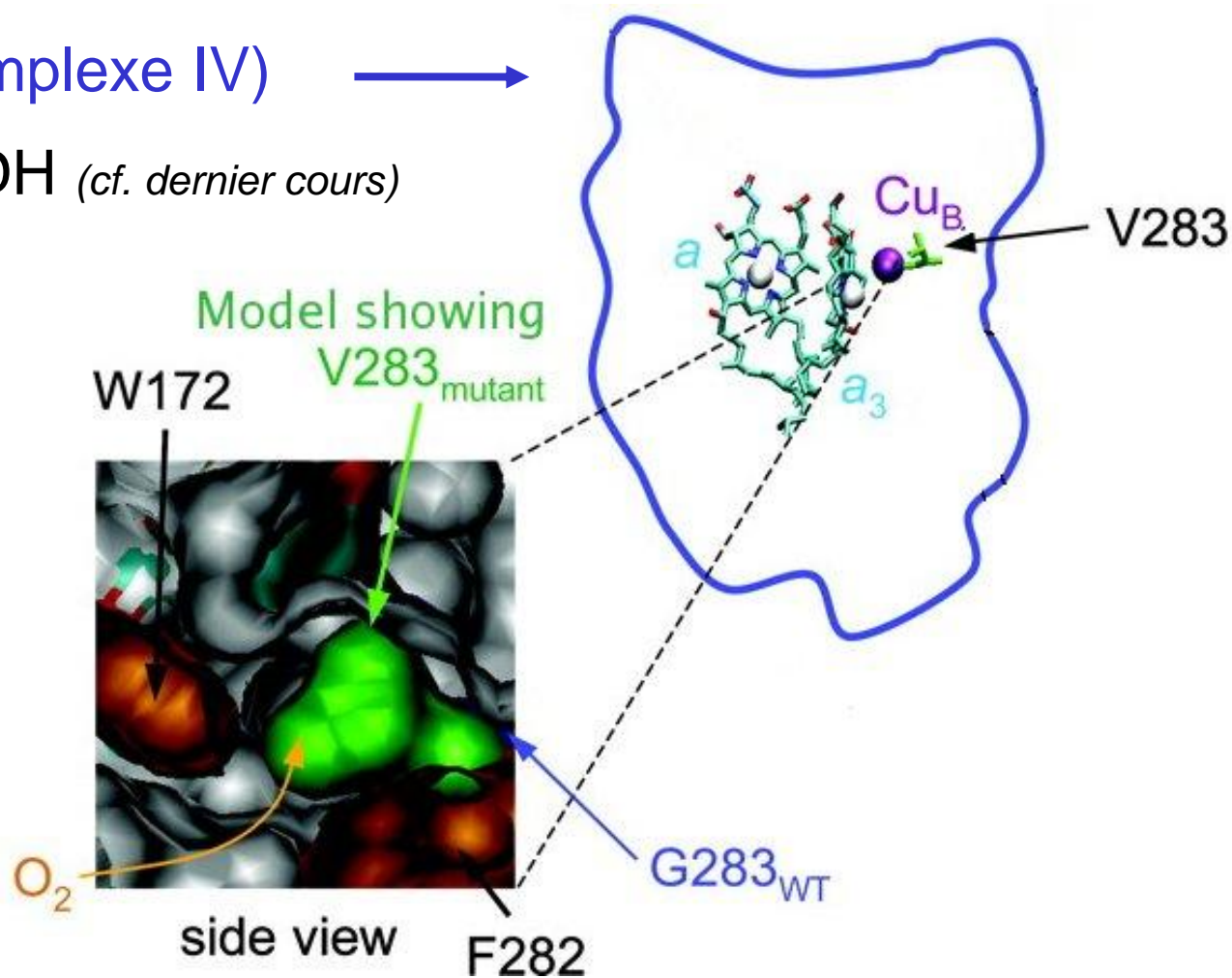
Acétyl-CoA Synthase / CODH (*cf. dernier cours*)

Photosystème II

Lipoxygénase

FeFe hydrogénase

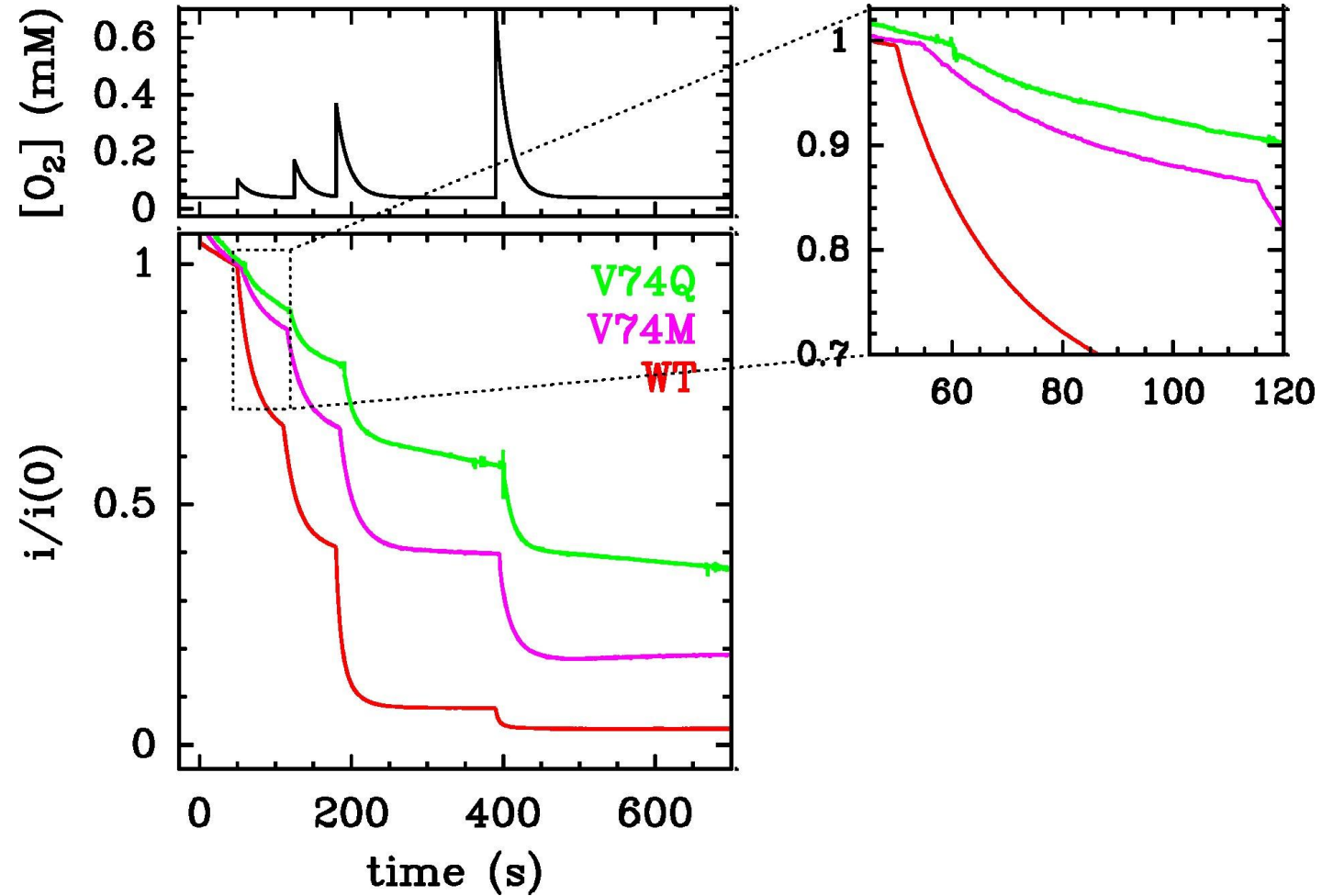
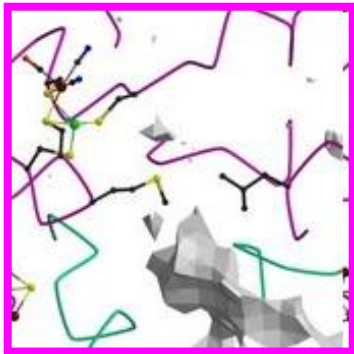
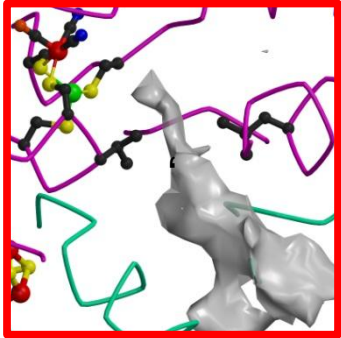
Nitrogénase



Diffusion intramoléculaire dans l'hydrogénase: principaux acquis de l'électrochimie

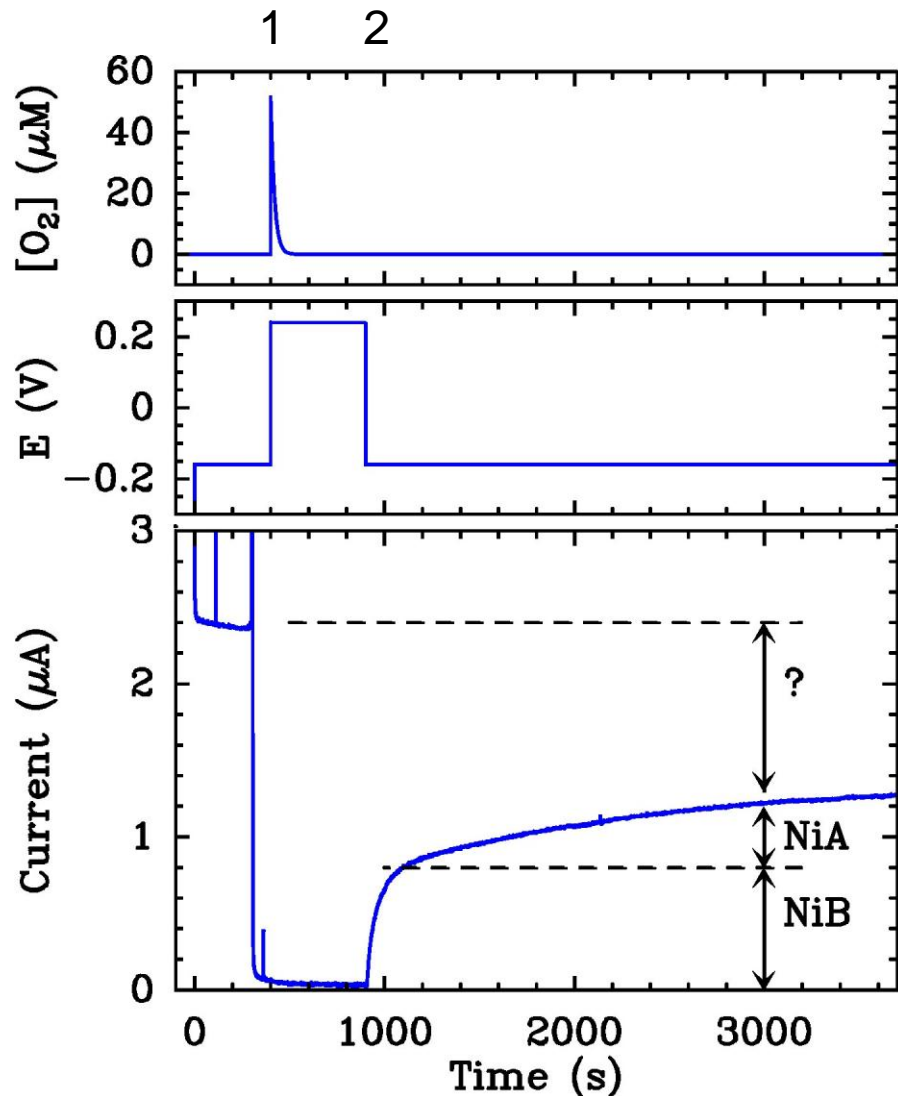
- Les mutations affectent les vitesses de diffusion “in” et “out”
- Elles font varier les vitesses relatives de diffusion de H₂, CO et O₂
- H₂ diffuse plus vite que O₂ et CO
- Des mutations ponctuelles font varier les vitesses de jusqu'à 4 ordres de grandeur. Rôle attendu de la taille et surprenant de la polarité
- Ralentir l'accès de O₂ augmente la résistance à l'oxygène, à condition que la diffusion de O₂ limite la vitesse d'inactivation

Ralentir l'arrivée de O₂ au site actif ne fait *que* ralentir l'inhibition

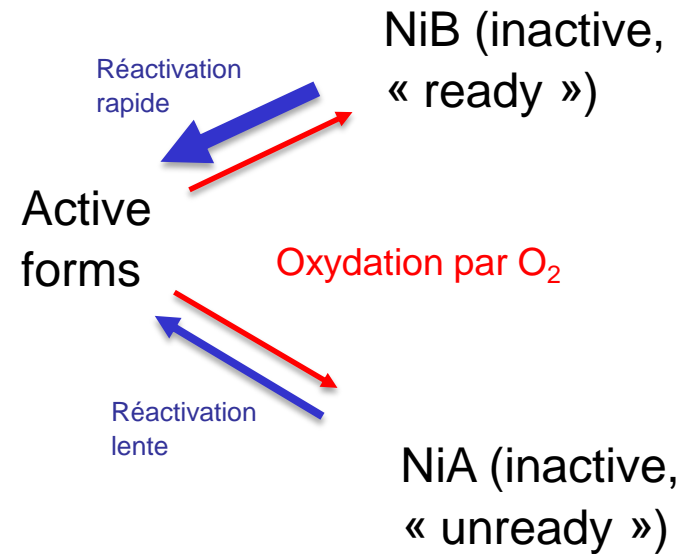


Inactivation aérobie des H₂ases: quelle(s) espèce(s) formée(s)?

1) Hydrogénase standard (*D. fructosovorans*)

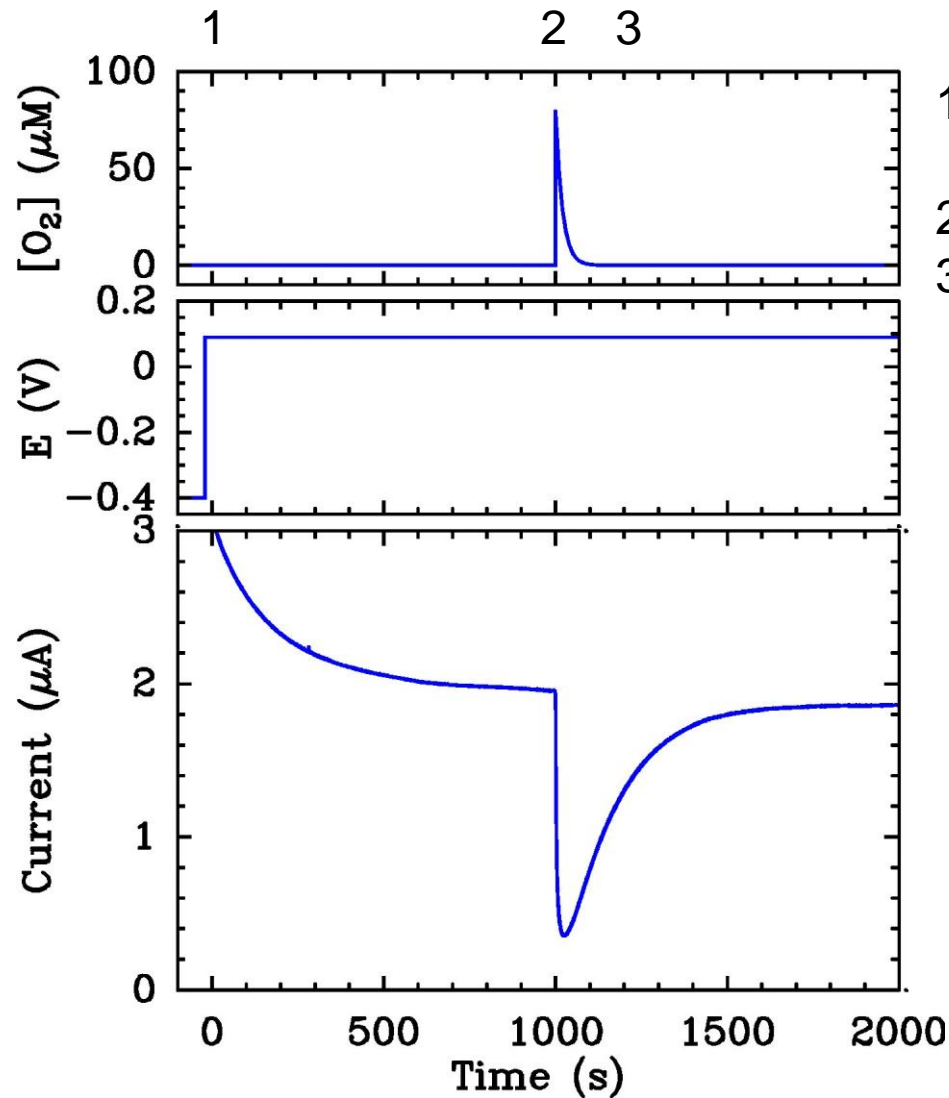


1. Enzyme inactivée par O₂ dans conditions oxydantes
 2. Réactivées dans conditions moins oxydantes
- Cinétique de réactivation multiphasique: plusieurs espèces inactives



Inactivation aérobie des H₂ases: quelle(s) espèce(s) formée(s)?

2) Hydrogénase « résistante » (*A. aeolicus*)

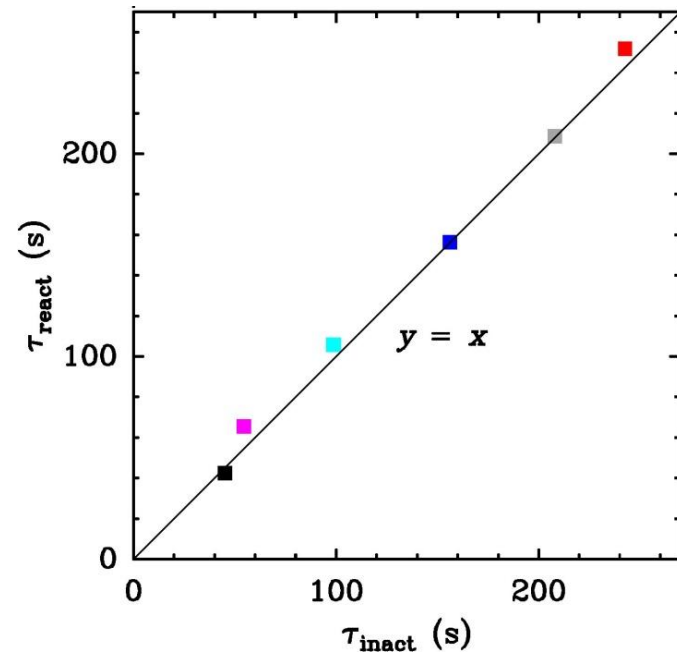
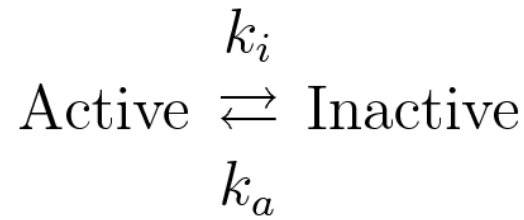
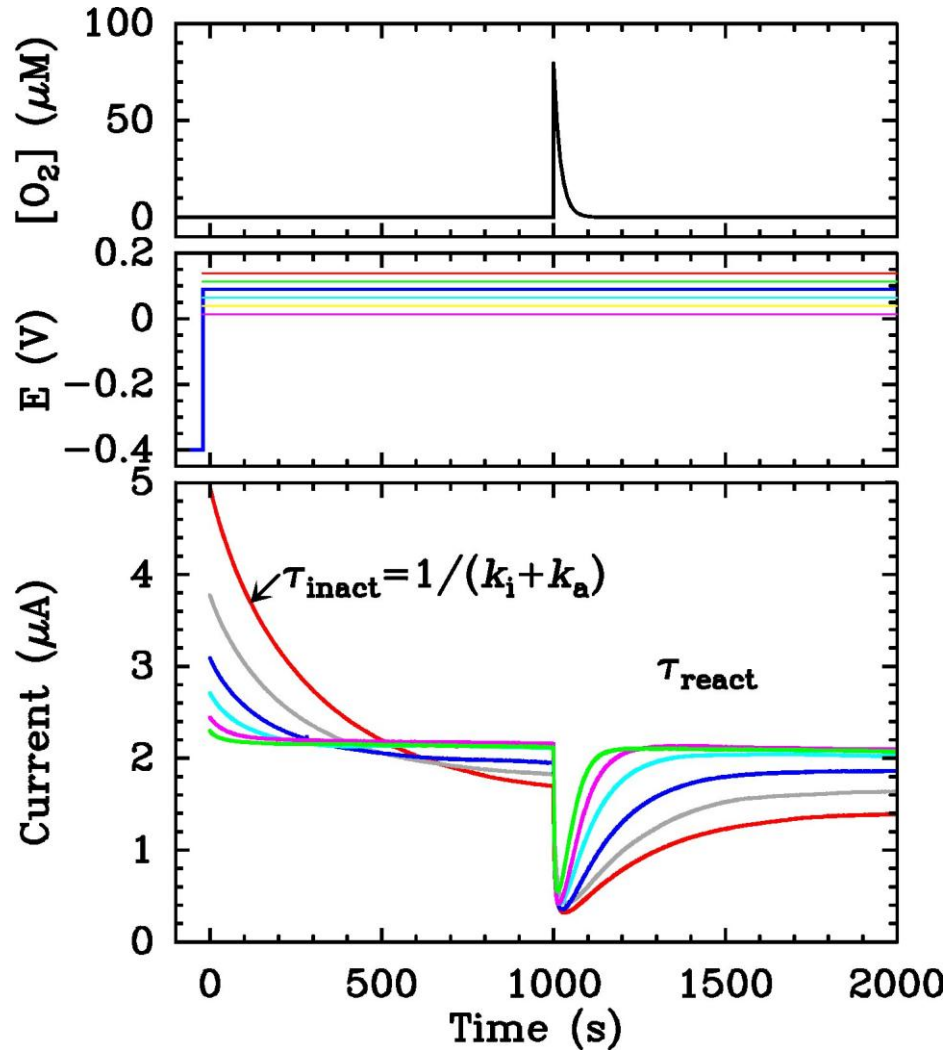


1. Inactivation anaérobie dans conditions oxydantes
 2. Enzyme inactivée par O₂
 3. Se réactive spontanément (réduction inutile)
- Réactivation complète et monophasique:
une seule espèce inactive

Inactivation aérobie des H₂ases: quelle espèce formée?

2) Hydrogénases « résistantes » (*A. aeolicus*)

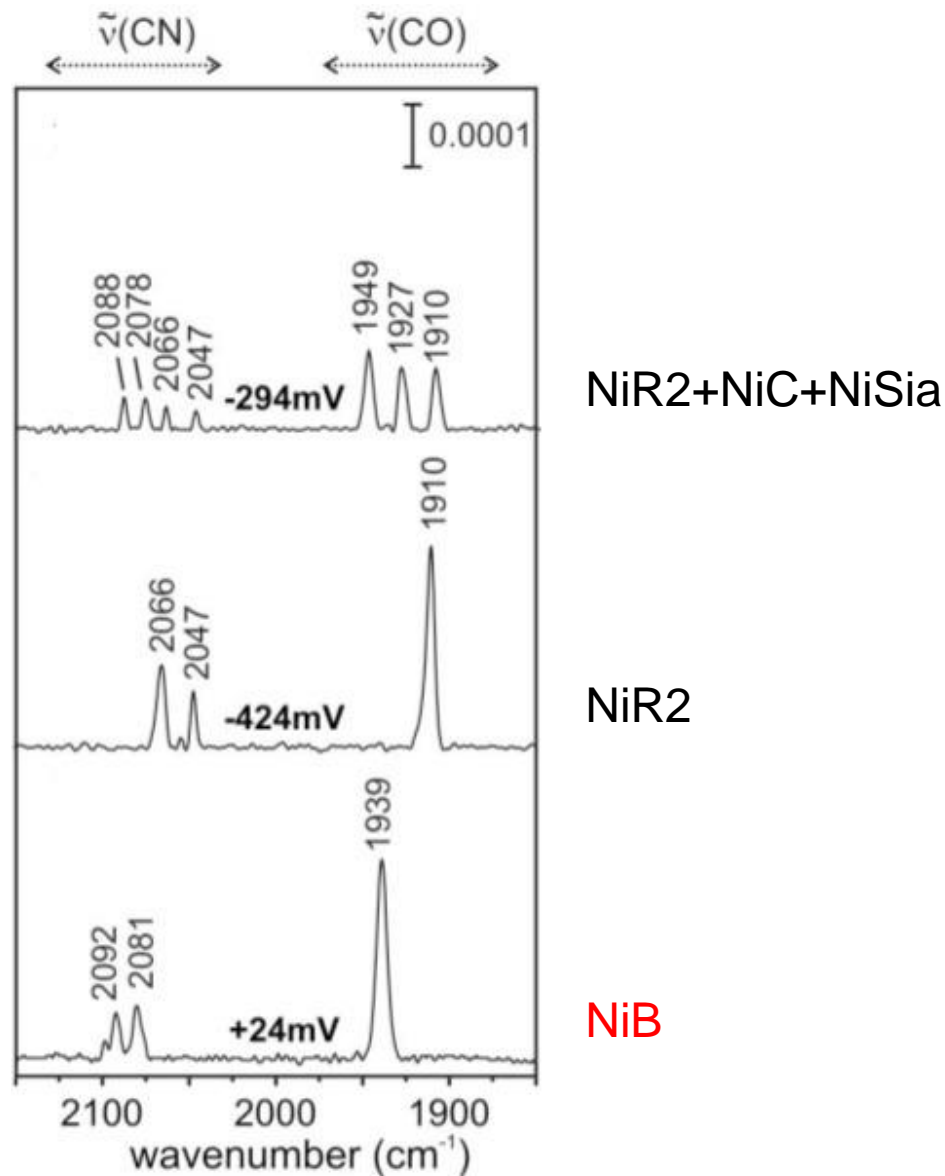
L'enzyme inhibée par O₂ est la même que celle qui se forme par oxydation anaérobie



Inactivation aérobie des H₂ases: quelle espèce formée?

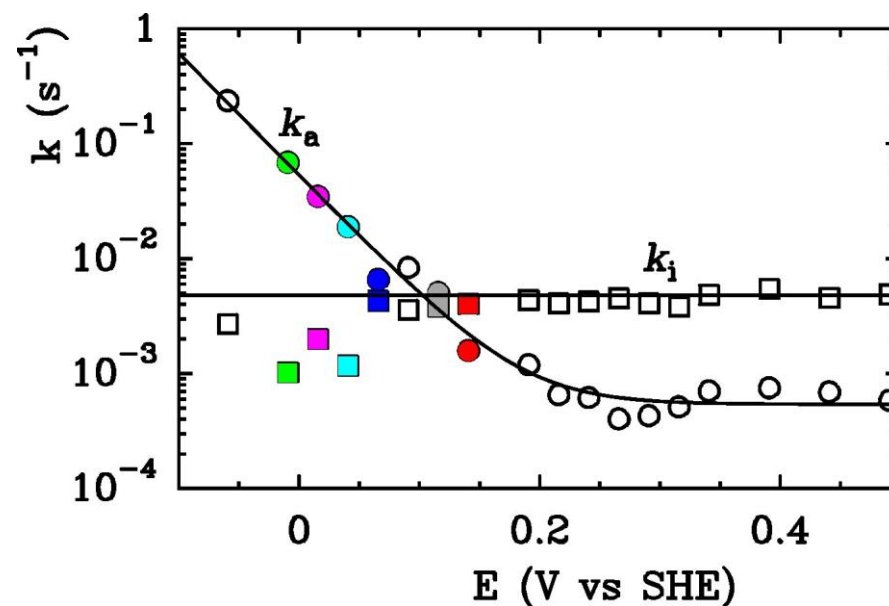
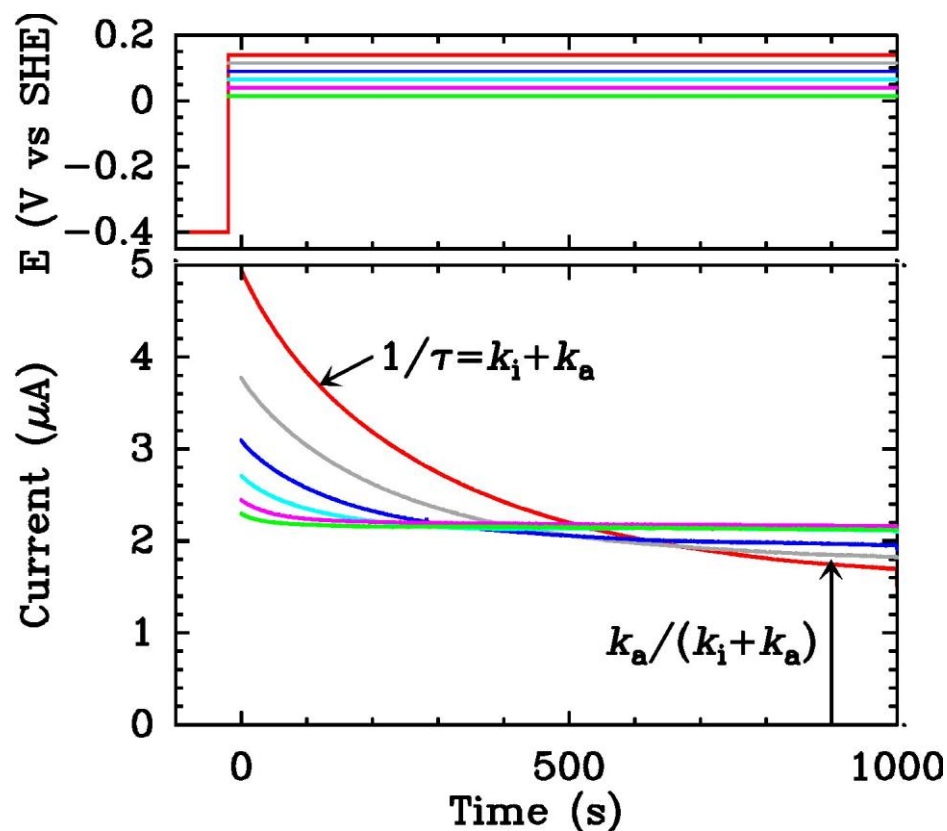
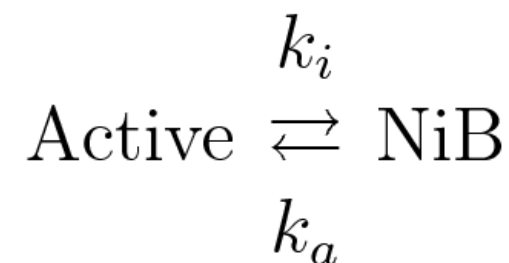
2) Hydrogénase « résistante » (*A. aeolicus*)

La forme produite par réaction avec O₂ est NiB

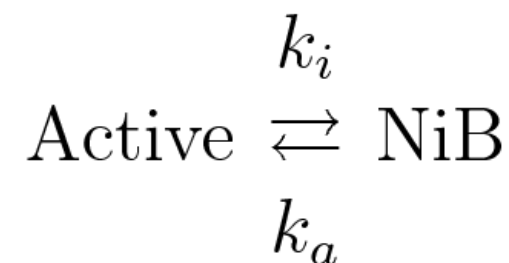


Inactivation aérobie des H₂ases: quel mécanisme?

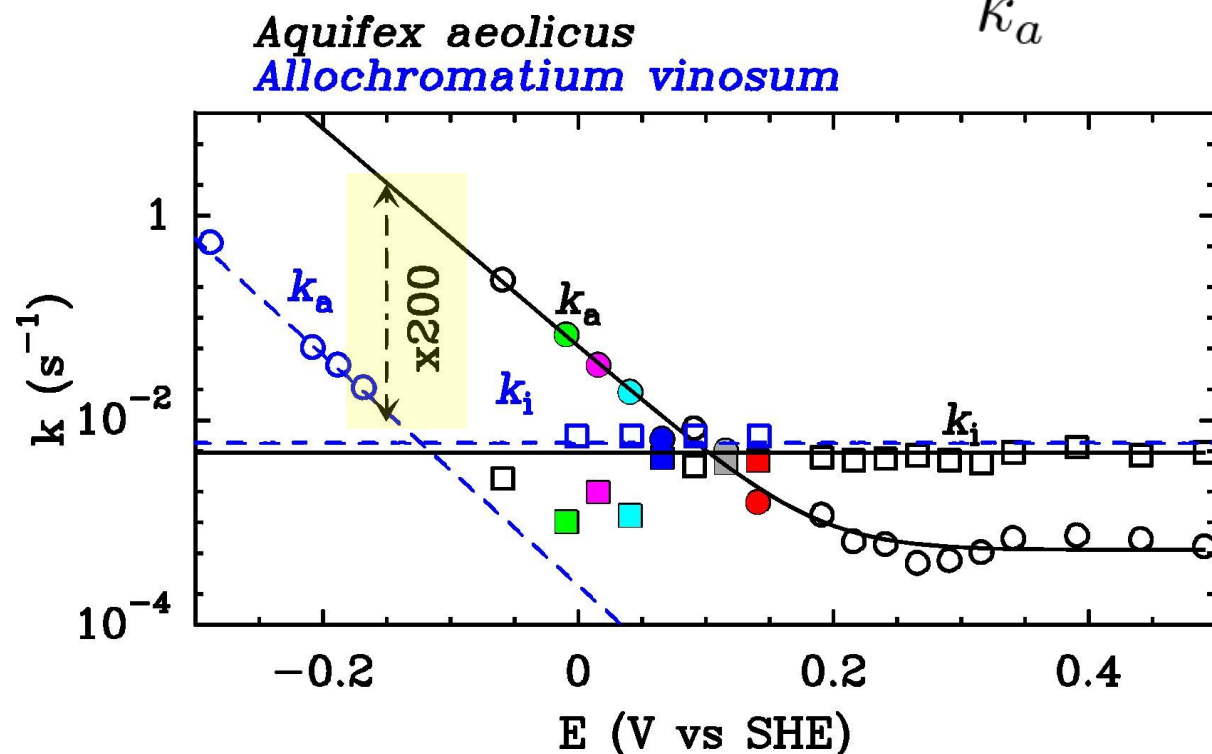
Hydrogénase « résistante » (*A. aeolicus*)



Inactivation anaérobie: comparaison d'une enzyme sensible à l'O₂ (*A. vinosum*) et d'une résistante (*A. aeolicus*)



- Mécanisme d'(in)activation similaire
- Vitesse de formation de NiB (k_i) identique
- Vitesse de réactivation (k_a) beaucoup plus rapide dans le cas de l'enzyme « résistante » de *A. aeolicus*



A. aeolicus: Fourmond, *et al.*, J. Am. Chem. Soc 132 4848 (2010)
Données *A. vinosum*: Jones *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 125 8505 (2003)
R. eutropha: Cracknell *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sc. USA 106 20681 (2009)

Les bases moléculaires des propriétés des enzymes résistantes à l'oxygène toujours inconnues

- Acides aminés proches du site actif ?

Environnement du site actif NiFe de *D. fructosovorans*

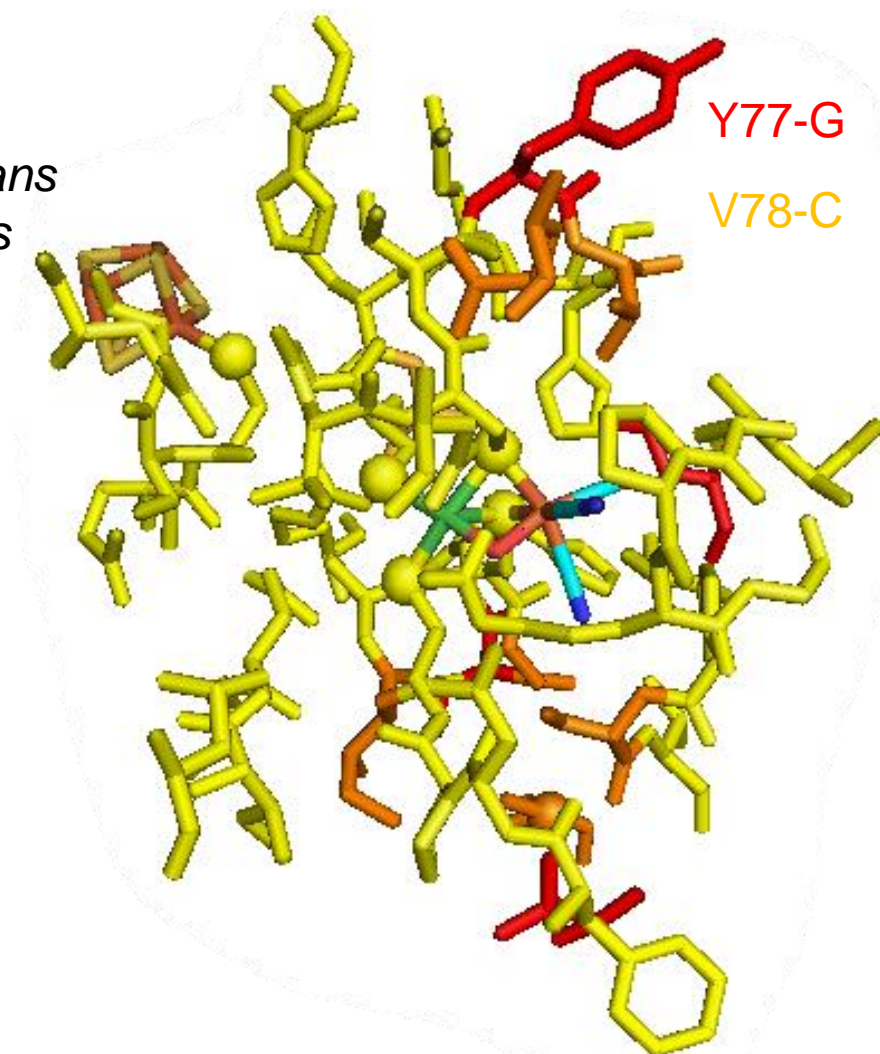
Jaunes: identiques dans la séquence de *A. aeolicus*

Oranges: similaires

Rouges: différents

- Propriétés rédox du site actif ?

- Chaîne de transfert d'électrons ?



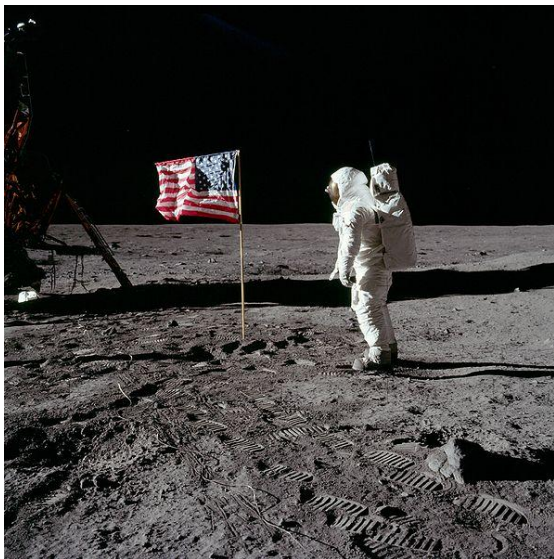
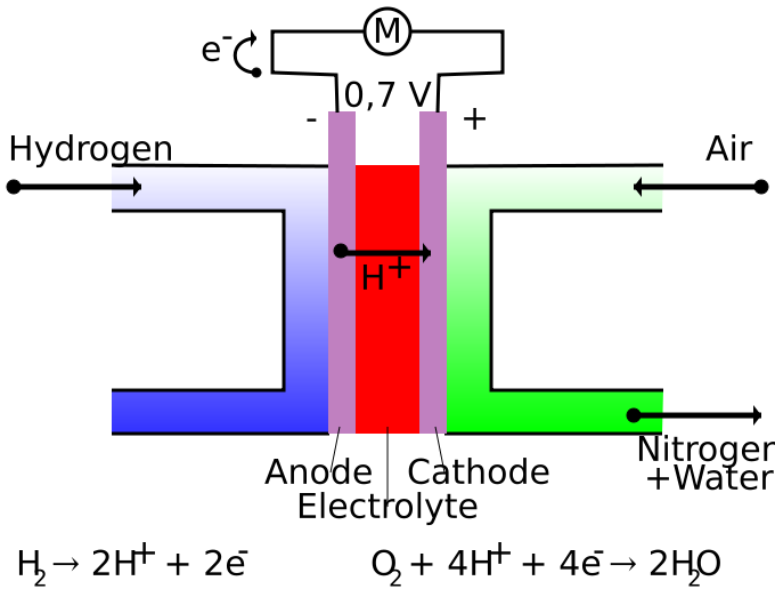
Leroux *et al.*, Int. J. H₂. Energ. online (2010)

Ludwig *et al.*, J. Biol. Chem. 284 465 (2009), Saggiu *et al.*, ChemPhysChem online (2010)

Pandelia, Fourmond, *et al.*, J. Am. Chem. Soc., sous presse (2010)

III. Des électrodes pour utiliser les hydrogénases

La pile à combustible



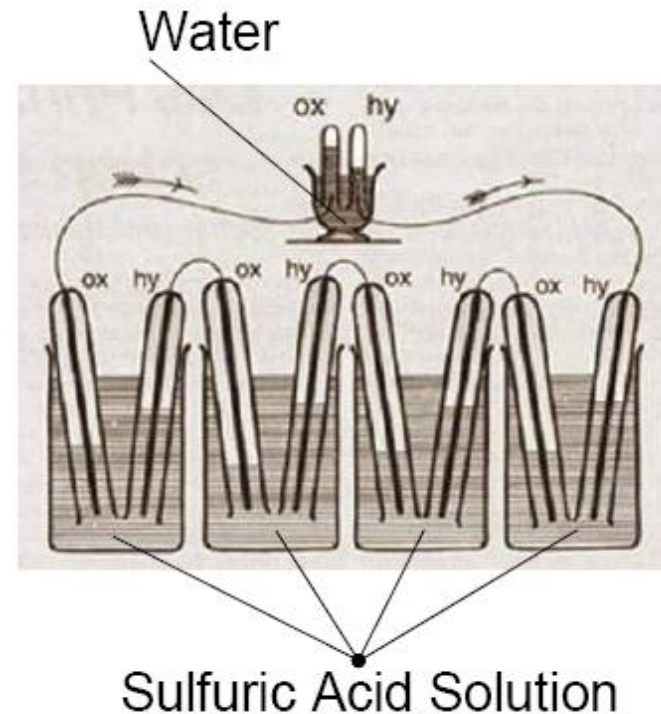
Apollo 11, Juillet 1969

THE
LONDON, EDINBURGH AND DUBLIN
PHILOSOPHICAL MAGAZINE
AND
JOURNAL OF SCIENCE.

[THIRD SERIES.]

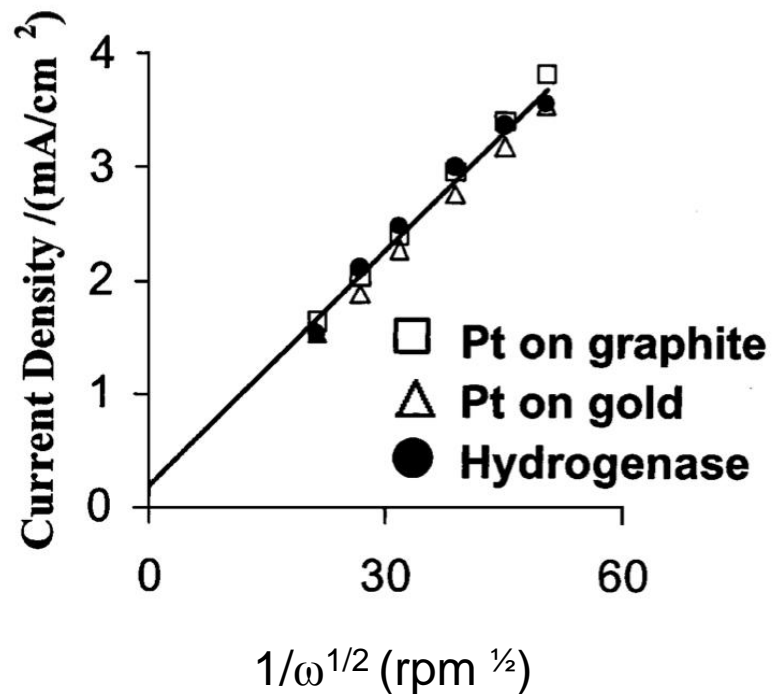
DECEMBER 1842.

LXXII. *On a Gaseous Voltaic Battery.* By W. R. GROVE, Esq., M.A., F.R.S., Professor of Experimental Philosophy in the London Institution.



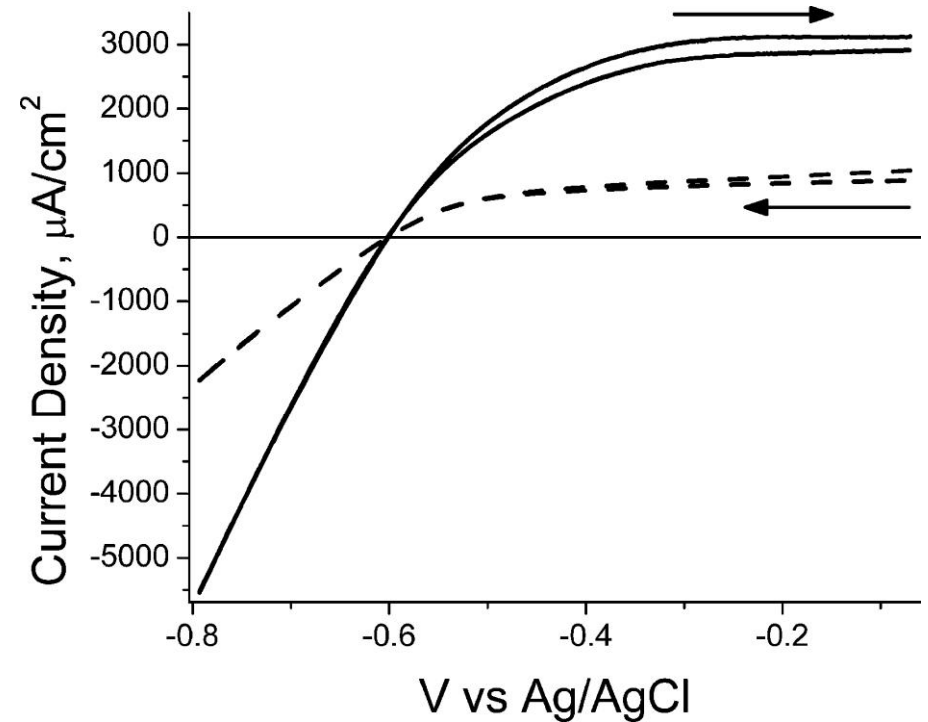
Catalyseurs à l'anode des piles à combustible: Comparaisons entre Pt et hydrogénase adsorbée

H₂ase NiFe de *A. vinosum*
Oxydation de H₂ (chronoampérométrie)



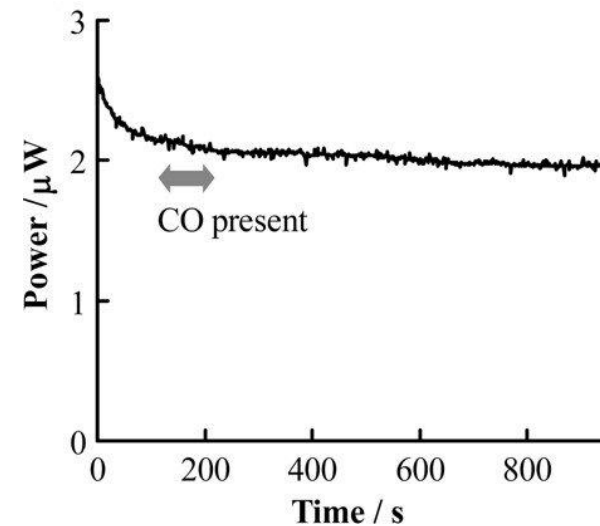
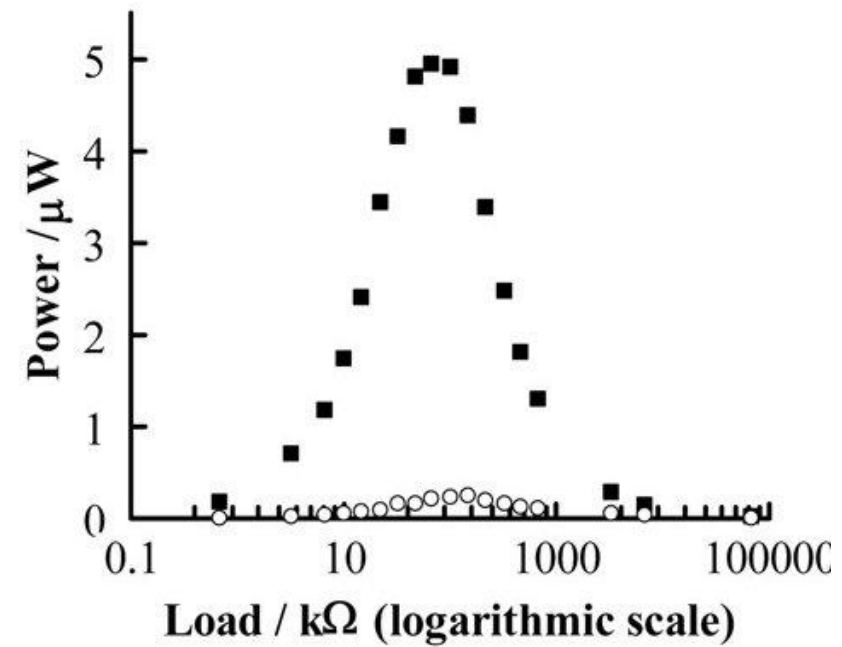
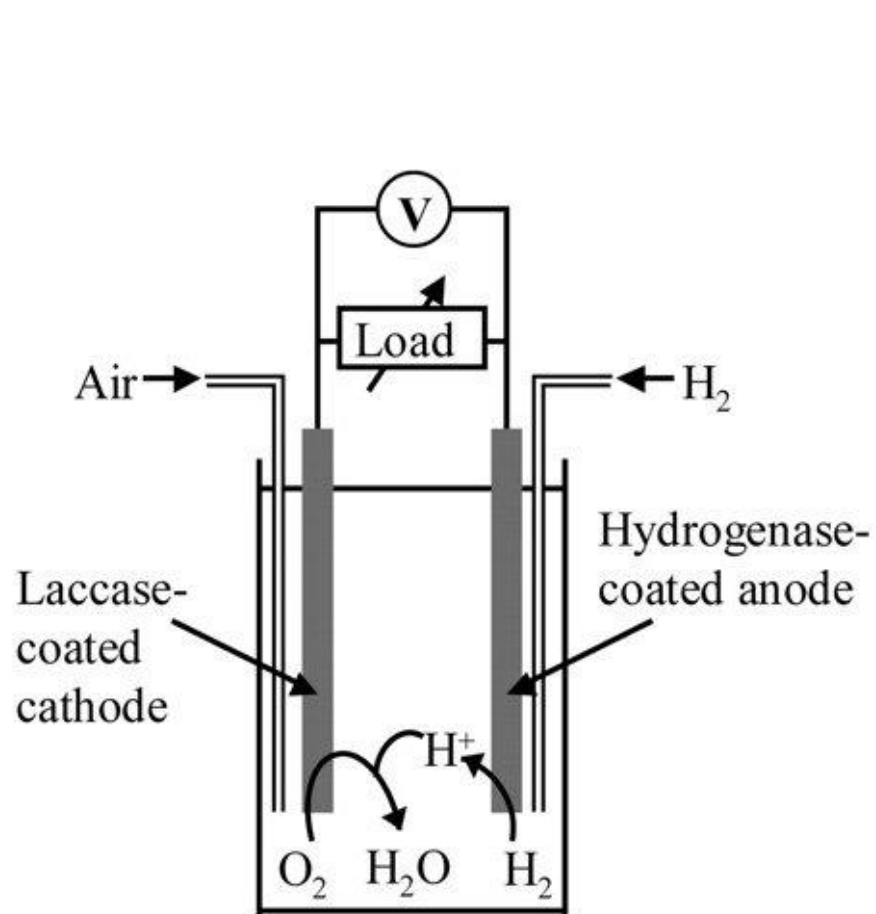
1 bar H₂, pH 7, 45°C, E=0.24V vs SHE

H₂ase FeFe de *C. acetobutylicum*
Oxydation/production de H₂ (voltammétrie)

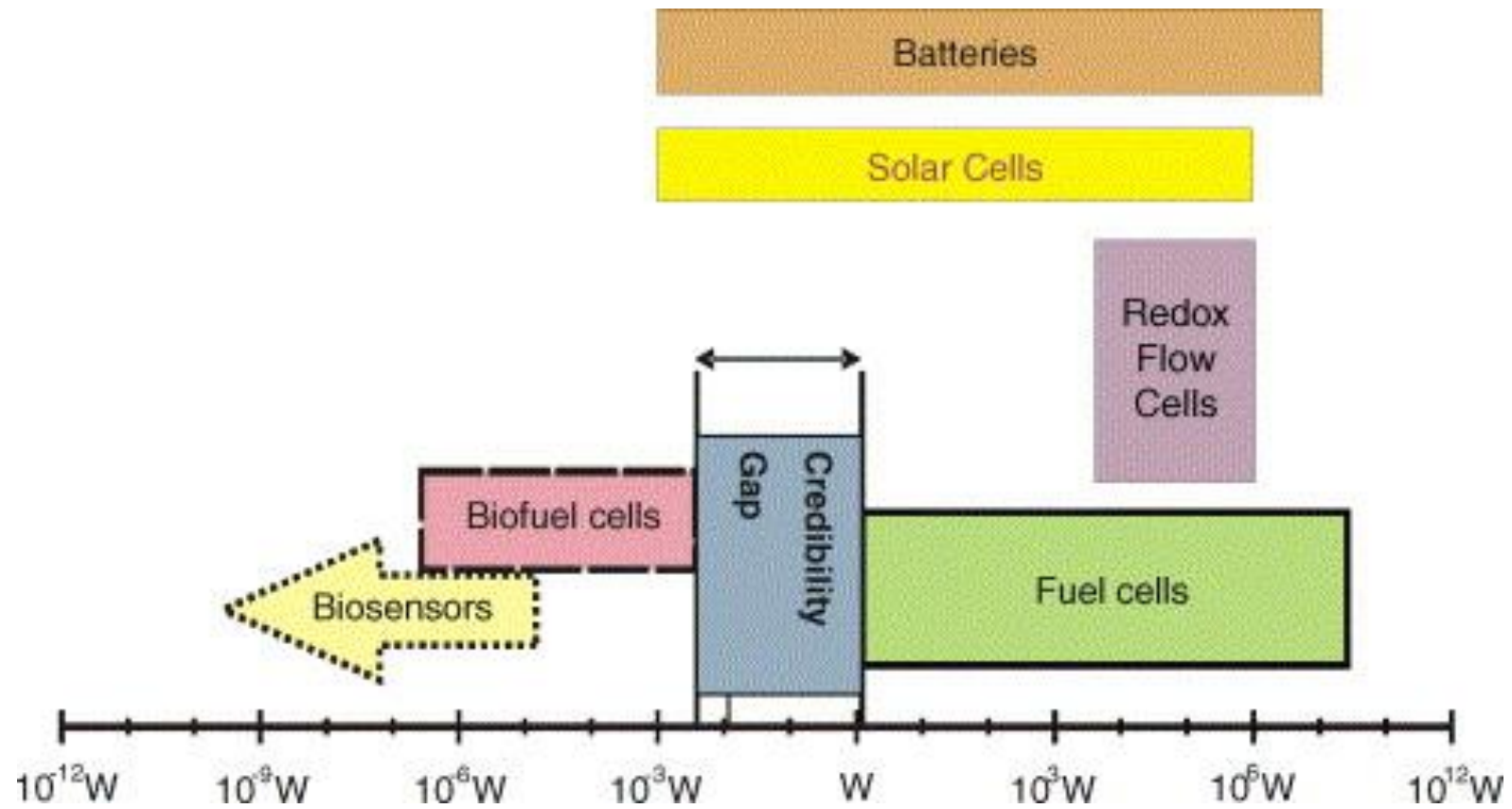


1 bar H₂, pH 7, 50mV/s, 3000rpm

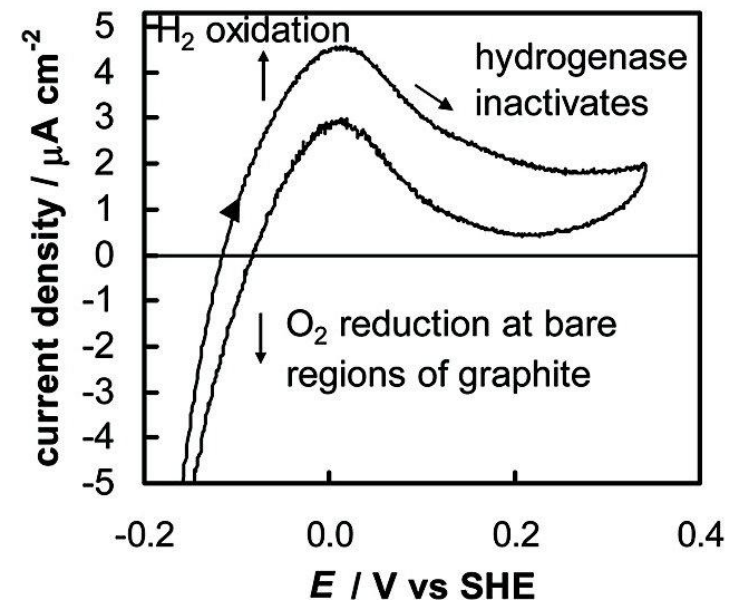
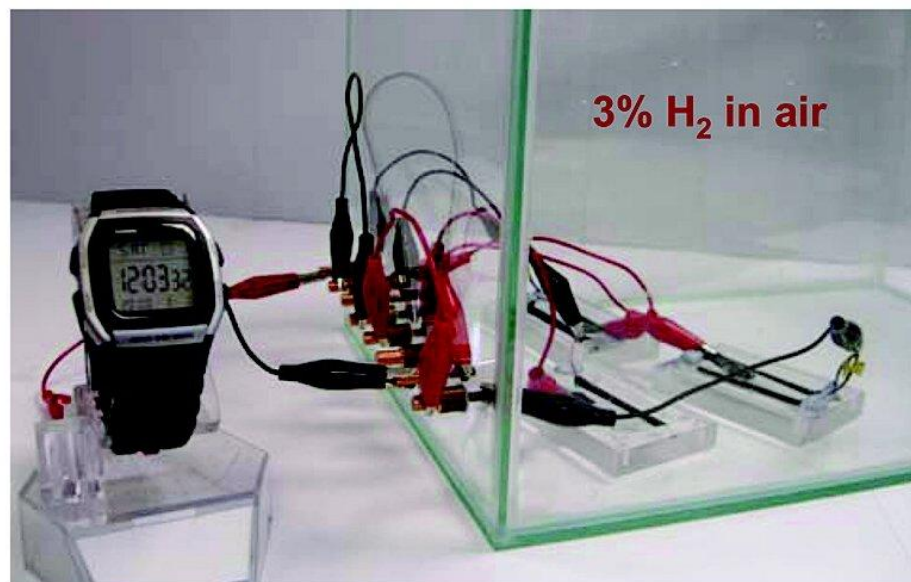
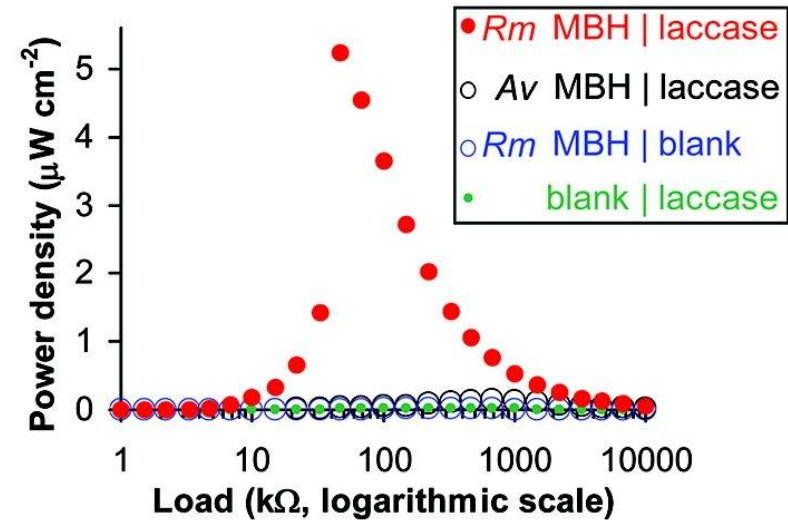
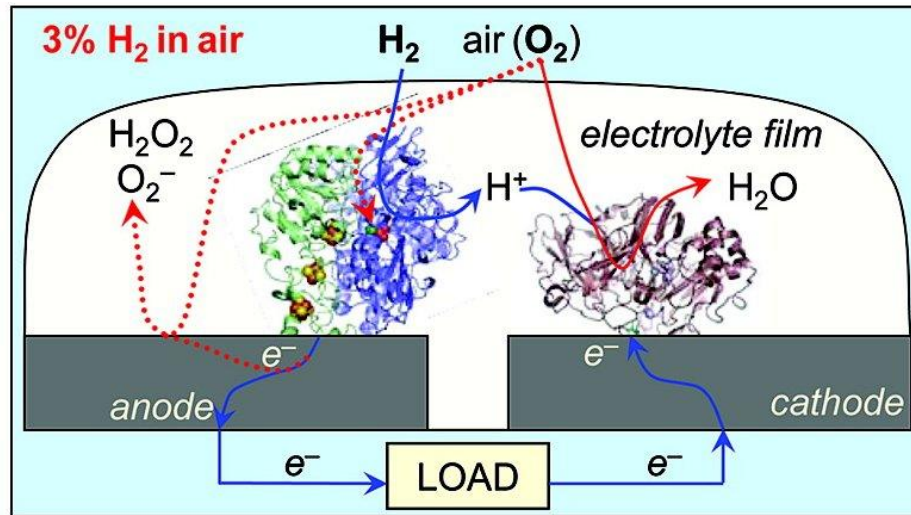
Une biopile à combustible sans membrane, utilisant l'hydrogénase NiFe de *R. eutropha* à l'anode



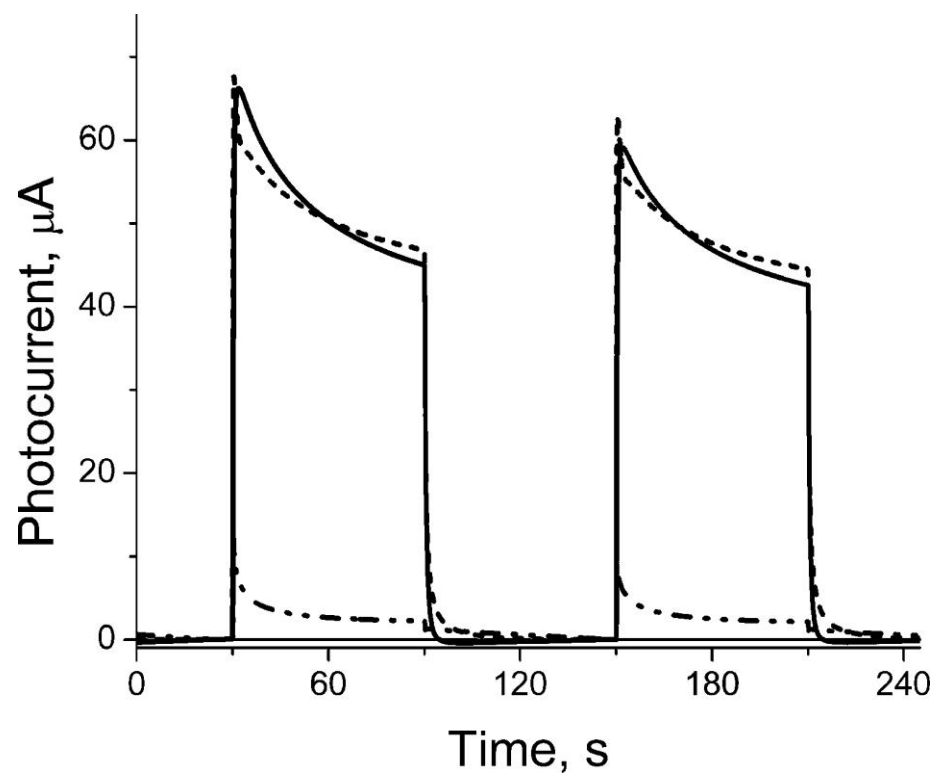
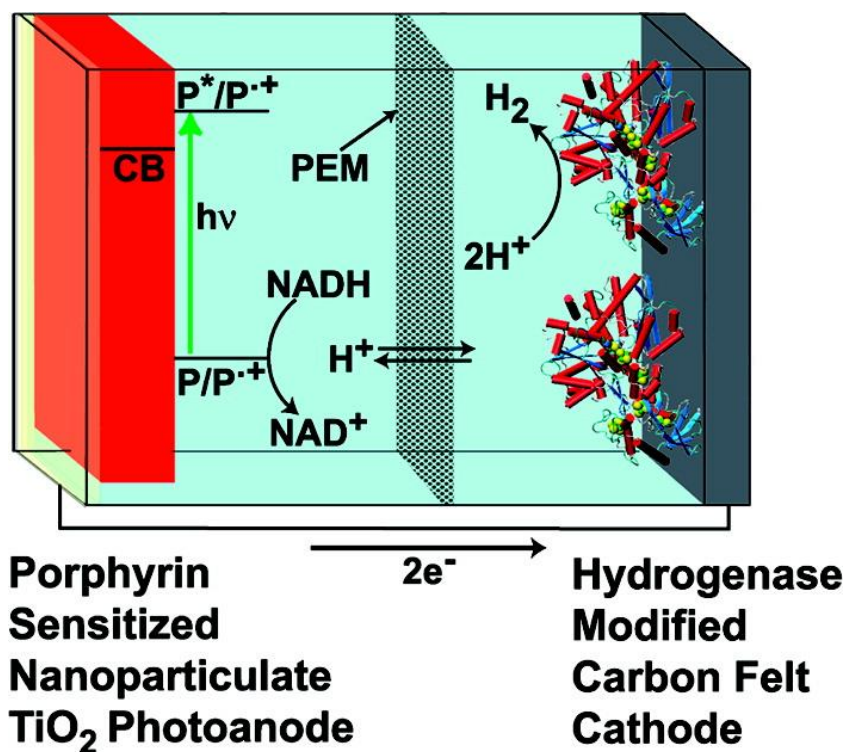
Faible densité de puissance de la biopile à combustible



Une biopile qui fonctionne avec une hydrogénase capable d'oxyder des traces de H₂ dans l'air (*R. metallidurans*)



Photoproduction d'hydrogène dans une cellule photoélectrochimique Cathode carbone + hydrogénase FeFe de *C. acetobutylicum*



Collaborations

 Bio: Sébastien Dementin, **Pierre Pol Liebgott**, Marc Rousset (*D. fructosovorans*)

Pascale Infossi, M.Thérèse Giudici-Ortoni (*A. aeolicus*)

RPE: Bénédicte Burlat, Emilien Etienne, Bruno Guigliarelli,

Electrochimie: **Pierre-Pol Liebgott**, **Fanny Leroux**, **Vincent Fourmond**,

Carole Baffert, Pierre Ceccaldi, Patrick Bertrand



Bio: Thomas Lautier, Isabelle Meynial, Ph. Soucaille (*C. acetobutylicum*, INSA Toulouse)



Cristallographie: Anne Volbeda, Juan Fontecilla Camps (CEA, Grenoble)



Cinétique: Laurent Cournac (CEA, Cadarache)

FTIR: Antonio De Lacey (*D. fructosovorans*, CSIC, Madrid),



FTIR, EPR: **Maria Pandelia**, Wolfgang Lubitz (*A. Aeolicus*, Max Planck, Mulheim)

