

Université de Montréal

Augmentation de la production d'hydrogène par l'expression hétérologue
d'hydrogénase et la production d'hydrogène à partir de résidus organiques

par

Guillaume Sabourin

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc en microbiologie et immunologie
en Microbiologie et immunologie

Août, 2008

©, Guillaume Sabourin, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Augmentation de la production d'hydrogène par l'expression hétérologue
d'hydrogénase et la production d'hydrogène à partir de résidus organiques

présenté par :

Guillaume Sabourin

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. George Szatmari
président-rapporteur

Dr. Patrick C. Hallenbeck
directeur de recherche

Dre. France Daigle
membre du jury

RÉSUMÉ FRANÇAIS

La recherche de sources d'énergie fiables ayant un faible coût environnemental est en plein essor. L'hydrogène, étant un transporteur d'énergie propre et simple, pourrait servir comme moyen de transport de l'énergie de l'avenir. Une solution idéale pour les besoins énergétiques implique une production renouvelable de l'hydrogène. Parmi les possibilités pour un tel processus, la production biologique de l'hydrogène, aussi appelée biohydrogène, est une excellente alternative. L'hydrogène est le produit de plusieurs voies métaboliques bactériennes mais le rendement de la conversion de substrat en hydrogène est généralement faible, empêchant ainsi le développement d'un processus pratique de production d'hydrogène. Par exemple, lorsque l'hydrogène est produit par la nitrogénase sous des conditions de photofermentation, chaque molécule d'hydrogène constituée requiert 4 ATP, ce qui rend le processus inefficace.

Les bactéries photosynthétiques non sulfureuses ont la capacité de croître sous différentes conditions. Selon des études génomiques, *Rhodospirillum rubrum* et *Rhodopseudomonas palustris* possèdent une hydrogénase FeFe qui leur permettrait de produire de l'hydrogène par fermentation anaérobie de manière très efficace. Il existe cependant très peu d'information sur la régulation de la synthèse de cette hydrogénase ainsi que sur les voies de fermentation dont elle fait partie. Une surexpression de cette enzyme permettrait potentiellement d'améliorer le rendement de production d'hydrogène.

Cette étude vise à en apprendre davantage sur cette enzyme en tentant la surexpression de cette dernière dans les conditions favorisant la production d'hydrogène. L'utilisation de résidus organiques comme substrat pour la production d'hydrogène sera aussi étudiée.

MOTS CLÉS

Nitrogénase · Photofermentation · Biohydrogène · Bactéries pourpres non-sulfureuses · Fermentation anaérobie · Bioréacteur · RT-PCR · Glycérol

ABSTRACT

The search for alternative energy sources with low environmental impact is in great expansion. Hydrogen, an elegant and simple energy transporter, could serve as means of transporting energy in the future. An ideal solution to the increasing energy needs would imply a renewable production of hydrogen. Out of all the existing possibilities for such a process, the biological production of hydrogen, also called biohydrogen, is an excellent alternative. Hydrogen is the end result or co-product of many pathways in bacterial metabolism. However, such pathways usually show low yields of substrate to hydrogen conversion, which prevents the development of efficient production processes. For example, when hydrogen is produced via nitrogenase under photofermentation conditions, each hydrogen molecule produced requires 4 molecules of ATP, rendering the process very energetically inefficient.

Purple non-sulfur bacteria are highly adaptive organisms that can grow under various conditions. According to recent genomic analyses, *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas palustris* possess, within their genome, an FeFe hydrogenase that would allow them to produce hydrogen via dark fermentation quite efficiently. Unfortunately, very little information is known on the regulation of the synthesis of this enzyme or the various pathways that require it. An overexpression of this hydrogenase could potentially increase the yields of substrate to hydrogen conversion.

This study aims to increase our knowledge about this FeFe hydrogenase by overexpressing it in conditions that facilitate the production of hydrogen. The use of organic waste as substrate for hydrogen production will also be studied.

KEYWORDS

Nitrogenase · Photofermentation · Biohydrogen · Purple non-sulphur bacteria · Dark fermentation · Bioreactor · RT-PCR · Glycerol

TABLE DES MATIÈRES

Résumé français	iv
Résumé anglais	v
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Dédicace	xiv
Remerciements	xv
Chapitre I : Revue de littérature	1
1.0 Diverses méthodes de production de biohydrogène.....	3
1.1 La photolyse de l'eau	3
1.1.1 Évolution d'hydrogène via la biophotolyse	4
1.1.2 Différentes classes d'hydrogénase	5
1.1.3 Perspectives industrielles	6
1.2 La photofermentation	7
1.2.1 Évolution d'hydrogène via la photofermentation	9
1.2.2 Facteurs ayant une influence sur la photofermentation.....	9
1.2.2.1 Effet du rapport carbone/azote sur la photofermentation.....	10
1.2.2.2 Effet de la concentration d'ions Fe sur la photofermentation	11
1.2.2.3 Effet des caractéristiques de la lumière sur la photofermentation	12
1.2.3 Perspectives industrielles de la photofermentation	12
1.3 La fermentation anaérobie.....	13
1.3.1 Évolution d'hydrogène via la fermentation anaérobie	13
1.3.2 La maturation d'une hydrogénase FeFe fonctionnelle.....	15

1.3.3 Perspectives industrielles de la fermentation anaérobie.....	16
1.4 Les bactéries pourpres non sulfureuses.....	16
1.5 Accumulation de résidus reliés à la production de biocarburants : Un problème grandissant	17
1.6 Le projet de recherche.....	18
Chapitre II : Matériel et méthodes	19
2.1 Souches bactériennes et plasmides utilisés	20
2.2 Conditions de croissance.....	22
2.2.1 Composition du Milieu RCV	22
2.2.2 Composition du Milieu YPS	23
2.2.3 Composition du Milieu LB	23
2.2.4 Préparation des cultures et du milieu pour croissance anaérobie.....	24
2.3 Manipulation de l'ADN	24
2.3.1 Extraction de l'ADN plasmidique	24
2.3.2 Extraction de l'ADN génomique	25
2.3.3 Amplification d'ADN par PCR.....	26
2.3.4 Analyse d'ADN par gel agarose d'électrophorèse.....	27
2.3.5 Digestion par des enzymes de restriction.....	28
2.3.6 Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose	28
2.3.7 Méthode de ligation	29
2.4 Manipulation de l'ARN	29
2.4.1 Extraction de l'ARN total	29

2.4.2 Conversion de l'ARN en ADNc	30
2.4.3 Mesure de l'expression d'un gène par PCR quantitatif en temps réel	31
2.5 Stratégies de Clonage.....	33
2.5.1 Clonage de Fusion_NifH2_HydA dans pCRBlunt	33
2.5.2 Clonage de Fusion_NifH2_HydA dans pJB3Tc20.....	34
2.5.3 Clonage de HydA1' dans pRSFDuet-1 et co-expression avec pET-HydeEF et pCDF-HydG.....	34
2.6 Séquençage.....	34
2.7 Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	35
2.7.1 Préparation de cellules thermocompétentes fraîches et de stock	35
2.7.2 Transformation chimique	35
2.8 Conjugaison dans <i>Rhodospirillum rubrum</i>	36
2.9 Mesure de la production d'hydrogène.....	37
2.9.1 Mesure de la quantité de gaz produit par une culture	37
2.9.2 Détermination de la composition en hydrogène d'un échantillon gazeux	37
2.10 Dosage de la quantité de glycérol	38
2.11 Dosage de l'activité de l'hydrogénase	39
Chapitre III : Résultats	40
3.1 Étude de la sur-expression du gène <i>hydA</i> chez <i>R. rubrum</i>	41
3.1.1 Création d'un fragment de fusion entre les fragments d'ADN <i>nifH2</i> et <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i>	41
3.1.2 Surexpression du gène <i>hydA</i> dans UR206, par le contrôle du promoteur de <i>nifH2</i>	45

3.1.3 Étude sur la modification de la production d'hydrogène de <i>R. rubrum</i> par la surexpression du gène <i>hydA</i> grâce à la construction NifH2HydA..	47
3.2 Étude de la co-expression du gène <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> avec les gènes de maturation <i>hydE</i> , <i>F</i> et <i>G</i> de <i>D. vulgaris</i>	48
3.2.1 Clonage du gène <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> dans le plasmide pRSFDuet-1 .	49
3.2.2 Co-expression de <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> et HydE, F et G de <i>D. vulgaris</i> dans le vecteur d'expression BL21 et dosage de l'activité de l'hydrogénase	50
3.3 Étude de la production d'hydrogène de <i>R. palustris</i> par photofermentation en utilisant du glycérol comme substrat.....	52
3.3.1 Détermination de la capacité de <i>R. palustris</i> à photofermenter le glycérol et confirmation de l'implication de la nitrogénase dans cette réaction.....	52
3.3.2 Effet de la concentration de la source d'azote sur le rendement de production d'hydrogène de <i>R. palustris</i> à partir de la photofermentation du glycérol	54
3.3.3 Comparaison entre la production d'hydrogène par photofermentation du glycérol pur et celle à partir du glycérol provenant de la production de biodiesel	58
Chapitre IV : Discussion	63
Conclusion	71
Références bibliographiques	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Bactéries pourpres non-sulfureuses qui présentent un intérêt pour la production d'hydrogène	17
Tableau II	Caractéristiques et provenances des souches bactériennes utilisées dans cette étude	20
Tableau III	Caractéristiques et provenances des plasmides utilisés dans cette étude	21
Tableau IV	Amorces utilisées lors de différentes réactions de PCR	27
Tableau V	Amorces utilisées lors de différentes réactions de qRT-PCR	32

LISTE DES FIGURES

Figure I	Schématisation de la production d'hydrogène par biophotolyse directe..	5
Figure II	Schématisation de la production d'hydrogène par photofermentation via l'action de la N ₂ ase	8
Figure III	Effet de la source d'azote d'un milieu de croissance sur la production totale d'hydrogène de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001	11
Figure IV	Schématisation de la production d'hydrogène par la fermentation anaérobie par l'H ₂ ase FeFe	14
Figure V	Gène <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> amplifié par PCR.....	41
Figure VI	Promoteur du gène <i>nifH2</i> de <i>R. rubrum</i> amplifié par PCR	42
Figure VII	Partie 3' de la fusion entre le promoteur de <i>nifH2</i> et <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> , obtenue par PCR.....	43
Figure VIII	Partie 5' de la fusion entre le promoteur de <i>nifH2</i> et <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> , obtenue par PCR.....	44
Figure IX	Fusion complétée entre le promoteur de <i>nifH2</i> et <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> , obtenue par PCR	45
Figure X	Mesure du niveau d'expression du gène <i>hydA</i> de la souche UR206_HydA ⁺ en condition de répression de <i>nifH2</i> et en condition d'induction de <i>nifH2</i> , par qRT-PCR	46
Figure XI	Production cumulative totale de gaz de trois souches de <i>R. rubrum</i> en condition de répression ou dérépression de la nitrogénase	48
Figure XII	Amplification PCR du gène <i>hydA</i> de <i>R. rubrum</i> et insertion de sites de restriction HindIII et AflIII.....	49
Figure XIII	Vérification de la construction pRSF-HydA par analyse de restriction d'un clone	50
Figure XIV	Niveau d'expression des gènes <i>hydA</i> , E et G co-exprimés dans GS_HydAEFG avec ou sans induction par 1 mM d'IPTG	51

- Figure XV** Production cumulative de gaz en fonction du temps des souches CGA009 et CGA750, 10mM glycérol, 2 mM glutamate..... 53
- Figure XVI** Production cumulative de gaz en fonction du temps de la souche CGA009, 10mM glycérol, 0, 2, 4 ou 8 mM glutamate 55
- Figure XVII** Production cumulative de gaz en fonction du temps de la souche CGA009, 10mM glycérol, 0, 1, ou 2 mM sulfate ammonium..... 57
- Figure XIX** Production cumulative de gaz en fonction du temps de la souche CGA009, 10mM glycérol dérivé de la production de biodiesel ou 10mM de glycérol pur, 2, 4 ou 6 mM glutamate 59

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Sigle ou abréviation	Signification
Acetyl CoA	Groupement acetyl lié à la coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
BPNS	Bactérie pourpre non sulfureuse
BSA	Albumine sérique bovine
CT	Point critique limite
DO	Densité optique
e ⁻	Électrons
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
Fd _(ox)	Ferredoxine, forme oxydée
Fd _(red)	Ferredoxine, forme réduite
Fe	Fer moléculaire ou ionique
H ⁺	Protons
H ₂	Hydrogène moléculaire
H ₂ ase	Enzyme hydrogénase
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
kb	Nombre de milliers de paires de bases de l'ADN bicaténaire
LB	Milieu de culture Luria-Bertani
N ₂	Azote moléculaire
N ₂ ase	Enzyme Nitrogénase
NAD	Nicotinamide adenine dinucléotide
NADP	Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate
NaOH	Hydroxyde de sodium
Ni	Nickel moléculaire ou ionique
pb	Nombre de paires de bases de l'ADN bicaténaire
PCR	Réaction polymérase en chaîne
PFOR	L'enzyme pyruvate : ferredoxine oxydoréductase
PNS	Bactérie pourpre non sulfureuse
PSI	Photosystème I
PSII	Photosystème II
RPM	Nombre de rotations par minute
RNase	Ribonucléase
qRT-PCR	PCR quantitatif en temps réel
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Se	Sélénium moléculaire ou ionique
UV	Lampe à photon à longueur d'onde ultraviolette

DÉDICACE

Pour Tassadar, Sarah et Jim et tous les autres.

"I am Alpha and Omega, the beginning and the end. I will give to him that is thirsty of the fountain of the water of life freely."

- Revelation 21:6

"The cake is a lie"

- Inconnu

REMERCIEMENTS

Cette recherche a été supportée par des fonds du Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada ainsi que par le programme de bourse du Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies.

J'aimerais remercier spécialement Rothsay Biodieseltm pour l'obtention des échantillons de glycérol provenant de la production de biodiesel.

J'aimerais aussi remercier le Jardin Botanique de Montréal pour le prêt de matériel nécessaire à l'expérimentation.

Je voudrais également remercier le département d'Immunologie et de Microbiologie de l'Université de Montréal pour le support et le personnel amical.

Finalement, je désirerais remercier toute l'équipe du laboratoire du Dr. Patrick Hallenbeck pour m'avoir accueilli et permis de faire cette étude.

CHAPITRE I
REVUE DE LITTÉRATURE

Avec l'accroissement de la population mondiale, la demande énergétique est en pleine expansion et ne cessera de croître dans les années à venir. Cette consommation, qui se situe aujourd'hui à environ $0.5 \cdot 10^{21}$ J an⁻¹, pourrait atteindre $1 \cdot 10^{21}$ J an⁻¹ d'ici 2050 (46). Un très grand pourcentage de l'énergie requise pour combler ce besoin provient des combustibles fossiles. Ce pourcentage se situe à 85 % dans le cas des Etats-Unis (2). Les combustibles fossiles sont de moins en moins adéquats pour répondre au besoin énergétique mondial étant donné le fait qu'ils sont non renouvelables, que leur combustion entraîne la production de pollution et des gaz à effet de serre et que leur distribution géographique inégale rend leur disponibilité et leur prix à la merci du climat géopolitique. La recherche de sources alternatives d'énergie renouvelables est donc un secteur en plein essor. Non seulement ces sources doivent être renouvelables, mais il faut aussi que celles-ci soient non dommageables pour l'environnement.

On reconnaît de plus en plus l'hydrogène comme le transporteur énergétique qui démontre le plus grand potentiel. Dans le cas d'un transporteur, l'énergie d'une source, comme le Soleil, est convertie en hydrogène qui est alors emmagasiné jusqu'à ce que cette énergie soit requise. À ce moment, l'hydrogène est alors reconverti en électricité ou énergie. Ce dernier serait un bon transporteur puisqu'en plus d'être inoffensif pour l'être humain et l'environnement (9), il offre la densité énergétique de combustion par unité de masse la plus élevée de tous les combustibles connus, c'est-à-dire, $122 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$. soit 2.75 fois (46) la densité énergétique des combustibles fossiles. En surcroît de son application, l'hydrogène peut aussi être utilisé dans des moteurs de véhicule à piles à combustible à échange de protons, (50) et ce, avec une efficacité de près du double de ce qui est présentement utilisé. L'hydrogène a une importance telle que certains analystes prédisent que ce sera la source d'énergie principale venant l'an 2100 (18).

Il existe plusieurs méthodes pour produire de l'hydrogène en grande quantité. Que ce soit un procédé thermochimique ou électrolytique, ces procédés industriels se

produisent souvent à des températures élevées, génèrent des déchets polluants ou sont dangereux pour l'homme. De plus, la plupart de ces procédés dépendent de sources d'énergies non renouvelables et sont donc à proscrire pour développer un procédé durable. On compte parmi ces procédés la « reformation » du gaz naturel par la vapeur, la gazéification du charbon et l'électrolyse de l'eau (38). Les procédés biologiques de production d'hydrogène, quant à eux, sont une bonne solution de remplacement aux procédés industriels puisque ces premiers se produisent à température ambiante, à une pression normale et ne demandent pas d'apport énergétique très important (7).

1.0 DIVERSES MÉTHODES DE PRODUCTION DE BIOHYDROGÈNE

On dénombre plusieurs méthodes de production biologique de l'hydrogène se retrouvant chez une panoplie de micro-organismes. Effectivement, dès qu'une espèce possède une enzyme permettant la réduction de protons à l'hydrogène, cet organisme pourra produire de l'hydrogène. Les micro-organismes produisent principalement l'hydrogène selon deux méthodes; par photosynthèse et par fermentation. Outre le besoin de lumière, la grande différence entre les deux processus est la provenance des électrons pour la réaction. Parmi ces mécanismes, on compte plusieurs méthodes spécifiques 1) la photolyse de l'eau par les algues et les cyanobactéries photosynthétiques, 2) la photofermentation d'acides organiques par des bactéries photosynthétiques, 3) la fermentation anaérobie de composés organiques ainsi qu' 4) un procédé hybride en deux étapes de fermentation anaérobie suivi d'une photofermentation (29).

1.1 LA PHOTOLYSE DE L'EAU

La photolyse de l'eau par des algues et des cyanobactéries photosynthétiques est aussi appelée biophotolyse directe. Ce procédé fonctionne par le biais de l'appareillage photosynthétique de ces organismes. Cette méthode de production

d'hydrogène pourrait être attrayante pour le secteur industriel puisque l'hydrogène produit provient du scindage de l'eau. Cette simplicité pourrait rendre la biophotolyse de l'eau plus efficace que certaines alternatives au niveau du rendement énergétique.

1.1.1 Évolution d'hydrogène via la biophotolyse

Tel qu'illustré à la figure 1, l'évolution d'hydrogène durant la biophotolyse de l'eau implique deux systèmes de captage de photons qui sont situés dans la membrane du thylakoïde chez les algues ou dans la membrane plasmique chez la cyanobactérie, le photosystème I (PSI) et le photosystème II (PSII) (56). L'énergie des photons captés par le PSII catalyse le scindage de l'eau en O₂ et en électrons qui réduiront le PSI (23, 34, 66). Ces électrons, après avoir interagi avec plusieurs molécules telles qu'avec certains cytochromes (60), réduiront alors le PSI (6, 33). Le PSI amorcera une autre chaîne de transfert d'électrons qui finiront par réduire la ferredoxine oxydée pour générer la ferredoxine réduite. Dans le contexte de croissance influencée par la photosynthèse, la Fd(red) réduira alors NADP⁺ pour générer NADPH et fixe le CO₂ par le cycle de Calvin (12). Lorsqu'il y a production d'hydrogène, les électrons provenant du PSI sont plutôt détournés vers une hydrogénase par les molécules de Fd(red). Cette réduction de l'hydrogénase libère de l'hydrogène via la réaction $2e^- + 2H^+ \leftrightarrow H_2$ et régénère Fd(ox) (8).

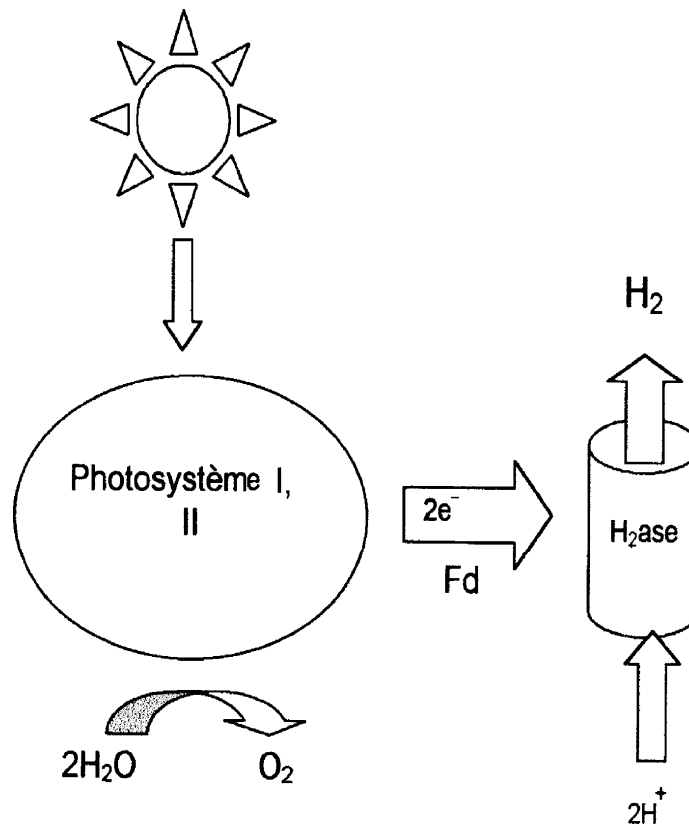


Figure I. Schématisation de la production d'hydrogène par biophotolyse directe. Adapté de Hallenbeck et Benemann 2002 (29).

1.1.2 Différentes classes d'hydrogénase

Tout comme il existe plusieurs méthodes de production d'hydrogène, il existe aussi plusieurs classes d'hydrogénases. Malgré ce fait, toutes catalysent la même réaction, c'est-à-dire $2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \leftrightarrow \text{H}_2$ et toutes sont réversibles. Celles-ci peuvent être classées selon l'ion métallique qui se retrouve au sein du cœur enzymatique. Trois classes sont d'une importance particulière pour la production de biohydrogène : 1) l'hydrogénase Ni-Fe-Se 2) l'hydrogénase Ni-Fe et 3) l'hydrogénase FeFe. On retrouve principalement la première classe d'hydrogénase liée à la membrane de bactéries ayant la capacité de réduire le sulfate. Ses caractéristiques enzymatiques font en sorte qu'elle catalyse préférentiellement la réaction de décomposition d'hydrogène (consommation)

(25). La seconde classe, elle aussi normalement liée à la membrane (30), favorise aussi une fonction principale de ré-acquisition de l'hydrogène produit chez plusieurs familles de bactéries (13). Dans le cadre de la production industrielle de biohydrogène, il serait donc favorable de chercher à désactiver ces gènes des organismes qui produisent l'hydrogène tel qu'il a été suggéré par Levin et coll. 2004 (39). Quant à la troisième classe d'hydrogénase, située dans le périplasme, elle favorise grandement la production d'hydrogène plutôt que sa consommation (14). Non seulement cette classe d'hydrogénase catalyse de manière privilégiée la production d'hydrogène, mais elle le fait avec une activité qui est 100 fois supérieure à l'activité des autres classes d'hydrogénases (3). C'est donc cette hydrogénase qui est la plus susceptible de jouer un rôle important dans la production d'hydrogène par biophotolyse de l'eau.

1.1.3 Perspectives industrielles

Quoiqu'une efficacité de conversion de l'énergie solaire de 2 % ait été observée lorsque *Chlamydomonas reinhardtii* fut utilisée dans l'étude de Doebbe et coll. (17), ceci fut possible grâce à l'application de conditions très limitantes pour des applications industrielles. Effectivement, l'hydrogénase FeFe est excessivement sensible à l'oxygène et pour qu'il y ait production d'hydrogène en parallèle à la photosynthèse, la pression partielle d'oxygène dans le système doit être de beaucoup inférieure à ce qu'on retrouverait normalement dans un bioréacteur. Cette pression d'oxygène doit être plus petite que 0.01 % pour que l'hydrogénase ne soit pas inhibée (29). Comme il y a production simultanée d'oxygène et d'hydrogène lors de la biophotolyse directe, cela rend cette technique beaucoup moins intéressante comme procédé efficace de production de biohydrogène. À moins de découvrir ou de générer une hydrogénase qui serait tolérante à l'oxygène, la biophotolyse directe n'est probablement pas la voie d'avenir pour satisfaire les besoins en biohydrogène.

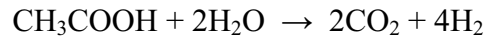
De plus, le fait que la biophotolyse directe utilise l'énergie lumineuse dans l'évolution de la réaction est aussi un obstacle majeur. D'une part, le rayonnement

solaire est une source d'énergie diffuse, d'autre part, les organismes phototrophes ont évolué de manière à capter le plus de photons pour favoriser leur survie. Dans une culture dense en bioréacteur, les micro-organismes en surface capturent donc beaucoup plus de photons qu'il leur est nécessaire. Cela contribue à diminuer de beaucoup le rendement théorique de telles cultures de deux façons. Premièrement, les micro-organismes en surface disposent des photons en trop en émettant de la chaleur ou des infrarouges au lieu de les utiliser dans le processus réactionnel. Effectivement, les photons capturés par le PSI sont beaucoup plus nombreux que ce qu'il est nécessaire et jusqu'à 90% de leur énergie n'est pas utilisé pour promouvoir la biophotolyse (37). Deuxièmement, la lumière incidente s'appauvrit très rapidement avec la profondeur dans le bioréacteur. Donc, les microorganismes en surface reçoivent trop d'illumination alors que ceux se situant plus en profondeur n'en reçoivent pas assez. Plusieurs solutions potentielles sont présentement à l'étude comme l'ingénierie génétique de micro-organismes dont l'appareillage photosynthétique serait moins efficace (44), l'immobilisation des microorganismes sur des membranes (26) ou le design de bioréacteurs ayant la capacité de distribuer la lumière efficacement. Cependant, d'autres voies métaboliques existantes offrent la capacité de production d'hydrogène de la biophotolyse directe sans ces inconvénients de taille.

1.2 LA PHOTOFERMENTATION

La photofermentation est un autre procédé qui tire profit de l'énergie solaire pour la croissance de l'organisme. Cependant, contrairement à la photosynthèse qui utilise l'eau comme donneur d'électrons, la photofermentation utilise plutôt des molécules organiques pour fournir les électrons qui sont requis pour la croissance. Un avantage de poids pour la photofermentation est le fait qu'une très grande diversité de substrats peut être utilisée comme donneur d'électrons. Par exemple, l'acide butyrique, l'acide succinique, l'acide lactique, l'acide malique et l'acide acétique sont tous des donneurs d'électrons potentiels. Contrairement à la biophotolyse directe, qui produit

l'hydrogène via la chaîne de transport d'électrons grâce au transfert d'électron entre Fd(ox) et l'hydrogénase, l'évolution d'hydrogène par photofermentation se produit grâce à l'action de la nitrogénase. La réaction générale catalysée par le procédé de photofermentation peut être illustrée par la formule suivante (16):



Tel qu'illustré à la figure II, pour chaque mole d'acide acétique, quatre moles d'hydrogène pourraient être produites. Si on considère que 2 moles d'acétate peuvent être produites par mole d'hexose, on peut déduire qu'en théorie, 8 moles d'hydrogène pourraient être produites par mole d'hexose consommée lors de la photofermentation.

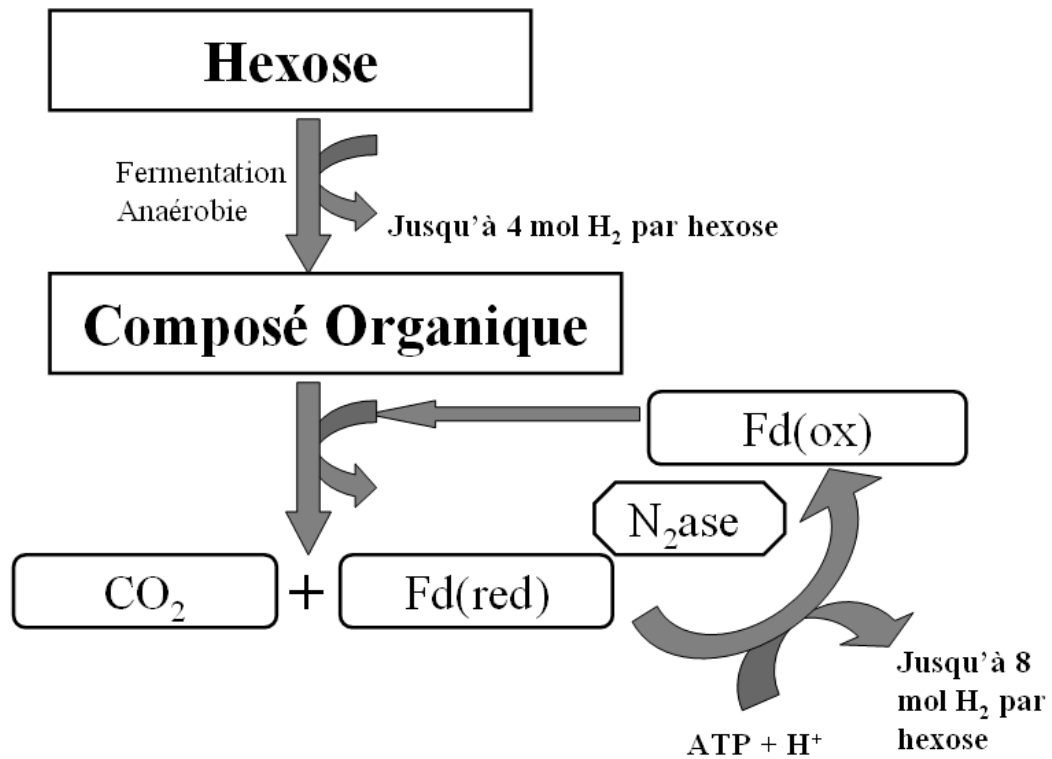


Figure II. Schématisation de la production d'hydrogène par photofermentation via l'action de la N₂ase. Adapté de Basak, 2007. (5)

1.2.1 Production d'hydrogène via la photofermentation

Contrairement aux hydrogénases, la fonction principale de la nitrogénase n'est pas de produire ou de consommer l'hydrogène. La production d'hydrogène par la nitrogénase est plutôt une conséquence obligatoire du fonctionnement de la nitrogénase et se produit au tiers ou au quart de la vitesse de la fixation d'azote. La nitrogénase cherche à combler le besoin en azote des bactéries lorsque cet élément est en quantité limitante. De manière opposée au fonctionnement de l'hydrogénase, la réaction catalysée par la nitrogénase n'est pas réversible et requiert 4 ATP par mole d'hydrogène produite (5). La réaction catalysée est la suivante : $N_2 + x e^- + x H^+ + 2x ATP \rightarrow NH_3 + (\frac{1}{2}x+3) H_2 + 2x ADP$ (64) où x varie selon le type de nitrogénase impliquée. Effectivement, trois types de nitrogénases ont été identifiés à ce jour, selon le type d'atomes métalliques dans le milieu réactionnel; la nitrogénase-Mo, la nitrogénase-V et la nitrogénase-Fe. La nitrogénase est régulée de manière négative par la présence d'ions ammonium. Chez les bactéries pourpres non sulfureuses, les ions vont inactiver la nitrogénase par une modification covalente réversible (51). La noirceur a aussi le même effet sur la nitrogénase (58) chez certaines espèces.

1.2.2 Facteurs ayant une influence sur la photofermentation

Comme la production d'hydrogène par photofermentation se fait par l'intermédiaire d'organismes vivants, il est normal qu'une panoplie de facteurs vienne influencer, à la hausse ou à la baisse, le rendement de ce procédé. Évidemment, la nature même de l'organisme, l'espèce et la souche auront une très grande incidence sur les capacités de production d'hydrogène.

1.2.2.1 Effet du rapport carbone/azote sur la photofermentation

Plusieurs organismes peuvent produire de l'hydrogène par photofermentation à partir d'un acide organique. Il a été établi que le lactate (31), l'acétate (49), le butyrate (22), le propionate (59) et le malate (53) sont tous des donneurs d'électrons potentiels pour la photofermentation, le meilleur donneur d'électrons variera en fonction de l'espèce et de la souche étudiée. La source d'azote influencera aussi beaucoup l'efficacité de production. Effectivement, comme il est mentionné plus tôt, les ions NH_4^+ régulent de manière négative l'enzyme responsable de la photofermentation. De plus, comme l'équation de la nitrogénase le démontre, un surplus d'azote dans le milieu défavorisera la réaction de fixation d'azote et, donc, diminuera la production d'hydrogène concomitante, tel qu'illustré à la figure III. Pour ces raisons, l'utilisation d'une source d'azote qui ne libère pas d'ions ammonium, comme le glutamate, sera favorisée. Selon Eroglu et coll. 1999, un rapport de 15 mM (acide malique) pour 2 mM (glutamate) dans le milieu de culture représenterait le ratio idéal pour la production d'hydrogène par photofermentation (21).

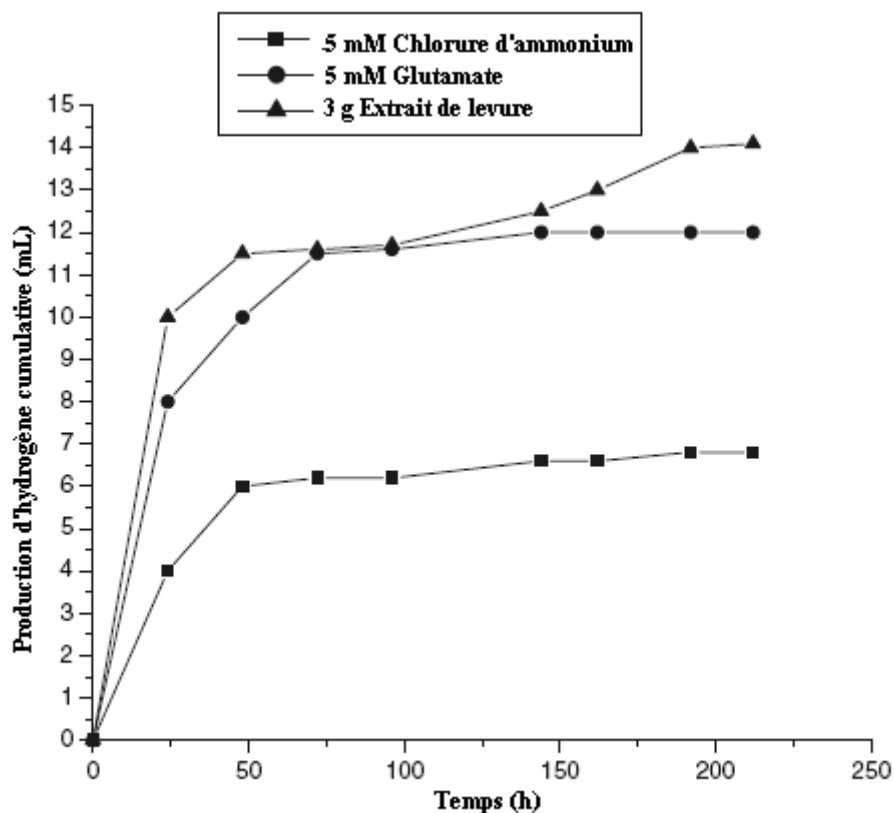


Figure III. Effet de la source d'azote d'un milieu de croissance sur la production totale d'hydrogène de *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001. Adapté de Eroglu et coll. 1998 (20).

1.2.2.2 Effet de la concentration d'ions Fe sur la photofermentation

Une étude récente par Zhua et coll. 2007 démontre l'effet de la concentration d'ions ferreux libre dans le milieu de culture sur la production d'hydrogène par photofermentation (65). Effectivement, le fer étant cofacteur de plusieurs enzymes et molécules essentielles à la survie des organismes, il n'est pas étonnant qu'une quantité limitante de fer nuise à la photofermentation. De plus, comme la nitrogénase et la ferredoxine contiennent à leur tour plusieurs atomes de fer dans leur structure (41), il devient clair qu'une quantité suffisante de fer ionique doit être accessible au micro-organisme. Cette quantité est évaluée à environ $2.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ dans l'étude précédente. Une quantité plus grande n'entraînant pas une amélioration de la production.

1.2.2.3 Effet des caractéristiques de la lumière sur la photofermentation

Les propriétés de la lumière incidente ont une influence très grande sur la productivité et le rendement de la photofermentation. L'intensité et la longueur d'onde sont deux caractéristiques qui sont particulièrement importantes. Pour la production d'hydrogène à grande échelle, il est important de développer des bioréacteurs à grande capacité pour que l'hydrogène soit produit de manière rentable. La connaissance des effets des caractéristiques de la lumière incidente est donc cruciale pour le développement d'un bioréacteur efficace. Selon une étude menée par Uyar B, et coll. (2007) sur l'influence de l'intensité lumineuse sur la production d'hydrogène de *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001 par photofermentation, il y a une augmentation de la production d'hydrogène avec une augmentation de l'intensité lumineuse (62). Cette augmentation atteint son seuil lorsque l'intensité lumineuse dépasse $270 \text{ W}\cdot\text{m}^2 \text{ }^{-1}$. L'étude ci-dessus démontre également que la longueur d'onde de la lumière incidente entraînant la plus grande production d'hydrogène se situe 750 et 950 nm. Cette plage correspond à la longueur d'onde captée par la bactériochlorophylle a.

1.2.3 Perspectives industrielles de la photofermentation

À première vue, la photofermentation de composés organiques pour la production de biohydrogène pourrait s'avérer un choix intéressant pour combler le besoin de biohydrogène. Cependant, plusieurs obstacles restent à surmonter pour que cette technique puisse être rentable économiquement. Comme pour la biophotolyse directe, la lumière a un rôle très important dans le processus, donc, les mêmes limitations concernant la lumière incidente s'appliquent. Deuxièmement, la nitrogénase est une enzyme beaucoup moins efficace au niveau énergétique que les hydrogénases à cause de son besoin en ATP. Effectivement, la réaction catalysée est irréversible et, pour chaque mole d' H_2 produite, deux moles d'ATP seront nécessaires. Il serait théoriquement possible, par ingénierie génétique, de pallier à ce problème en

modifiant l'expression des gènes d'un micro-organisme producteur d'hydrogène par photofermentation. Effectivement, la redirection des électrons disponibles lors de la photofermentation vers une hydrogénase-FeFe pourrait rendre la réaction beaucoup plus efficace.

1.3 LA FERMENTATION ANAÉROBIE

Contrairement à la biophotolyse directe et à la photofermentation, la fermentation anaérobie, aussi appelée « Dark Fermentation », n'a pas besoin d'illumination pour produire du biohydrogène. Effectivement, dans le processus de fermentation anaérobie, un sucre est dégradé par des voies métaboliques en acides organiques plus simples et il y a production concomitante d'hydrogène par l'organisme pour oxyder les éléments réducteurs qui s'accumulent pendant le métabolisme (15). Le principal avantage de la fermentation anaérobie pour la production d'hydrogène est bien entendu le fait qu'aucune source lumineuse n'est nécessaire et, donc, que les inconvénients qui y sont liés ne posent pas de problèmes. En surcroît, une production de biohydrogène se basant sur cette voie métabolique peut fonctionner à capacité maximale toute la journée et toute la nuit, ce qui n'est pas le cas des productions liées à une voie phototrophique pour les raisons citées précédemment. Également, plusieurs types de micro-organismes sont capables de produire de l'hydrogène par fermentation anaérobie notamment les familles des Clostridiaceae (19), des Enterobacteriaceae (61) ainsi que le groupe non taxonomique des bactéries pourpres non sulfureuses (BPNS) .

1.3.1 Évolution d'hydrogène via la fermentation anaérobie

Tout comme la biophotolyse directe, la production d'hydrogène par la fermentation anaérobie se produit via l'action d'une hydrogénase-FeFe. Lors de la fermentation, un sucre, le glucose par exemple, est dégradé via la glycolyse pour donner deux moles de pyruvate par mole d'hexose. Ce pyruvate est ensuite transformé

par l'enzyme pyruvate:ferredoxin oxydoréductase (PFOR) pour donner de l'acetyl CoA et la Fd(red) (29). L'acétylCoA est métabolisé dans le cycle de Calvin pour produire de l'ATP tandis que la Fd(red) est oxydée par l'hydrogénase FeFe pour produire de l'hydrogène. Tel qu'illustré à la figure IV, à partir d'une mole d'hexose, deux moles de pyruvate sont générées par la glycolyse et à partir de chaque mole de pyruvate, deux Fd(ox) sont réduits par la PFOR. En théorie, le rendement maximal de la fermentation anaérobie serait donc de quatre moles d'hydrogène produites par mole d'hexose consommée si les produits de la réaction ne sont pas métabolisés davantage.

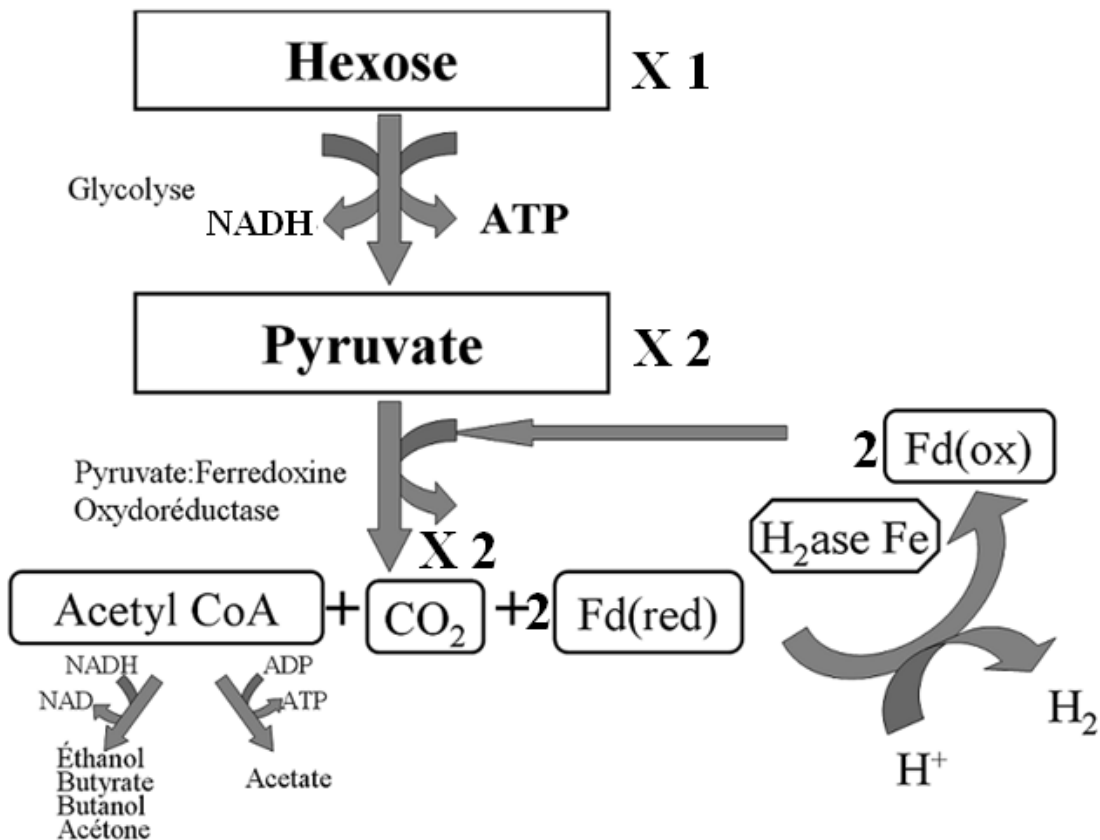


Figure IV. Schématisation de la production d'hydrogène par la fermentation anaérobie par l'H₂ase FeFe. Adapté de Nath et Das, 2004. (48)

1.3.2 La maturation d'une hydrogénase FeFe fonctionnelle

Comme les hydrogénases sont des enzymes qui comportent un centre métallique complexe ainsi qu'une structure tridimensionnelle précise, leur maturation en une enzyme fonctionnelle dépend de la présence de protéines de maturations. Quoique les enzymes de maturation requise pour l'hydrogénase NiFe soit connues et élucidées depuis un certain temps, il n'en est pas de même pour les enzyme de maturations de l'hydrogénase FeFe (63). Effectivement, même si trois protéines de maturation ont été identifiées, HydE, HydF et HydG (54), pour la maturation d'une hydrogénase FeFe fonctionnelle, la fonction exacte de chacun de ces trois protéines n'est pas définie clairement.

Il est cependant connu que la séquence des gènes de maturation est très conservée d'une espèce à une autre (55) et que des domaines de liaison sont présents chez chacun des trois gènes de maturation. HydE est une protéine de la famille des radical-SAM et comporte deux domaines de liaison [4Fe-4S] (57). HydF est une GTPase comportant un domaine de liaison [4Fe-4S] (11) et HydG est aussi une protéine de la famille radical-SAM comportant un domaine de liaison [4Fe-4S] ainsi qu'un domaine non résolu Fe-S (57).

D'après les expériences de Nagy et coll. 2007 chez plusieurs espèces de *Clostridium*, il est possible d'affiner plusieurs FeFe hydrogénases fonctionnelles provenant de divers organismes à partir d'un seul ensemble de gènes de maturation (47).

1.3.3 Perspectives industrielles de la fermentation anaérobie

Le principal avantage de la fermentation anaérobie est bien entendu l'absence de la nécessité d'une source lumineuse lors de la fermentation. Cela permet d'éviter tous les problèmes qui sont associés au design de bioréacteurs qui doivent tenir compte de la distribution de la lumière à l'intérieur de ceux-ci. Cependant, le rendement maximal de quatre moles d' H_2 par mole d'hexose rend cette méthode de production d' H_2 très peu probable pour combler le besoin d'énergie mondial grandissant. Effectivement, contrairement à la réaction se produisant lors de la photofermentation, la réaction de fermentation anaérobie a une enthalpie libre de Gibbs négative et peut donc se produire sans besoin d'énergie. Il n'est donc pas possible (et pas très avantageux) pour la bactérie de surmonter l'énergie nécessaire pour oxyder davantage le produit de la fermentation pour produire plus d'hydrogène. En effet, cette réaction est possible lors de la photofermentation puisque l'énergie solaire permet de surmonter la demande en énergie (5). Une solution intéressante à ce problème serait de combiner fermentation anaérobie à la noirceur et photofermentation au sein d'un même procédé. Par exemple, on pourrait fermenter des résidus d'industrie alimentaire et produire quatre moles d' H_2 par mole d'hexose initiale et ensuite alimenter un bioréacteur fonctionnant par un processus de photofermentation avec les effluents du premier bioréacteur et extraire huit moles d' H_2 supplémentaires par mole de substrat initial.

1.4 LES BACTÉRIES POURPRES NON SULFUREUSES

Comme il est mentionné précédemment, les BPNS sont un groupe non taxonomique assez large de bactéries faisant partie des alpha-protéobactéries dont la polyvalence et la capacité d'adaptation à leur environnement sont très grandes. Effectivement, le métabolisme que ces bactéries utiliseront dépendra du degré d'aérobiose, de la présence ou l'absence d'illumination (32) ainsi que la présence ou absence de certaines substances.

Ces bactéries sont très intéressantes puisqu'elles possèdent des enzymes nitrogénases (52) ainsi que plusieurs hydrogénases (42). Elles ont donc potentiellement la capacité de produire de l'hydrogène par photofermentation ou par fermentation anaérobie.

Tableau I. BPNS d'intérêt

Groupe Phylogénétique	Espèces
<i>Rhodobacteraceae</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> , <i>R. capsulatus</i>
<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i> , <i>R. centenum</i>
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> , <i>R. faecalis</i>

Dans le cadre de l'étude, nous avons étudié plus spécifiquement deux espèces de bactéries de la classe des BPNS. Effectivement, *Rhodopseudomonas palustris* et *Rhodospirillum rubrum* semblent posséder, d'après des études bio-informatiques initiales, une hydrogénase FeFe qui ne serait pas présente chez les autres espèces de BPNS. Les principaux groupes phylogénétiques des BPNS sont donnés au tableau I.

1.5 ACCUMULATION DE RÉSIDUS RELIÉS À LA PRODUCTION DE BIOCARBURANTS : UN PROBLÈME GRANDISSANT

Avec la diminution des réserves de combustibles fossiles ainsi que la pression grandissante pour des alternatives plus propres, il y a un accroissement dans la production de biocarburants (28). L'adoption du « Renewable Fuel Standard » par le Canada, qui demande que d'ici 2010, 5 % du volume de carburant soit composé de biocarburants, fait en sorte que la demande pour le biodiesel est en pleine expansion. Pour satisfaire ce standard, il peut être estimé que plus de 500 millions de litres de

biodiesel seront requis chaque année(1). À l'heure actuelle, la principale méthode utilisée pour la production du biodiesel est la trans-estérification d'huiles végétales et animales avec du méthanol (24). Cette méthode, qui produit une quantité stœchiométrique de biodiesel à partir d'huiles d'origines diverses, est très efficace et pratique. Cependant, pour chaque 100 kg de biodiesel produit, il y a production concomitante de 10 kg de glycérol. D'ici 2010, il peut donc être estimé que plus de 50 millions de litres de glycérol seront produits chaque année. Le marché qui entoure l'utilisation du glycérol ne peut qu'utiliser une infime partie de ce glycérol.

Une alternative biologique qui permettrait de métaboliser le glycérol excédentaire serait potentiellement une bonne solution. Effectivement, certaines bactéries peuvent métaboliser le glycérol en une panoplie de produits métaboliques, par exemple : du formate, du succinate, du butanol, de l'éthanol, et de l'hydrogène.

1.6 LE PROJET DE RECHERCHE

Étant donné que l'hydrogénase FeFe de *R. rubrum* et *R. palustris* n'a pas été étudiée en profondeur, il serait intéressant d'essayer de surexprimer cette enzyme dans diverses conditions pour potentiellement augmenter la production d'hydrogène et en apprendre d'avantage sur cette enzyme.

De manière similaire, l'étude du métabolisme du glycérol en hydrogène par *R. palustris* lors de la photofermentation nous permettra de caractériser cette production d'hydrogène. L'analyse des résultats nous en dira davantage sur la possibilité future d'une élimination de ce résidu organique par la photofermentation avec une production d'hydrogène concomitante.

CHAPITRE II
MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES UTILISÉS

Le tableau II représente la liste des souches bactériennes et des plasmides qui ont été utilisés et construits dans cette étude.

Tableau II. Caractéristiques et provenances des souches bactériennes utilisées.

Souche	Caractéristiques	Référence
<i>E. coli</i>		
DH5 α	ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>) <i>recA endA hsdR supE</i>	GIBCO-BR004C
BL21(DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (rB – mB ⁻) <i>gal</i> λ (DE3)	GIBCO-BR004C
S17.1	RP4-2 (Tc :: Mu) (Km :: Tn7) intégré dans le chromosome	Simon et coll., 1983
GS_HydAEFG	BL21 avec pRSF-HydA, pET- HydEF et pCDF-HydG	Cette étude
<i>R. rubrum</i>		
ATCC [®] 11170 [™]	souche sauvage	Pfennig et coll., 1971
UR206	Sm ^r <i>nifH</i> ::Km ^r	Lehman et coll. 1990
UR206_HydA+	UR206 + pJB3Tc20 avec NifH2HydA	Cette étude
<i>R. palustris</i>		
RPA009	Souche sauvage	

Tableau III. Caractéristiques et provenances des plasmides utilisés.

Plasmides	Caractéristiques	Références
pETDuet-1	Ap ^r , vecteur co-expression (5.4 kb)	Novagen
pCDFDuet-1	Sm ^r , vecteur co-expression (3.8 kb)	Novagen
pRSFDuet-1	Km ^r , vecteur co-expression (3.8 kb)	Novagen
pBluescript IIKS-	Ap ^r ; <i>lacPOZ</i> , SCM, (2960 pb)	Stratagene
pJB3Tc20	Ap ^r , Tc ^r , vecteur conjugaison, (7069 pb)	Blatny J., 1997
pET-HydEF	Ap ^r , <i>Desulfovibrio vulgaris</i> HydE et HydF dans pETDuet-1 (5.4 kb)	Mansure J. et Hallenebeck P., 2008
pCDF-HydG	Sm ^r , <i>D. vulgaris</i> HydG dans pCDFDuet-1 (3.8 kb)	Mansure J. et Hallenebeck P., 2008
pGSP02	Km ^r , Fusion_NifH2_HydA (2.2 kb) dans pCRBlunt	Cette étude
pGSP03	Ap ^r , Tc ^r , Fusion_NifH2_HydA (2.2 kb) dans pJB3Tc20 (7 kb)	Cette étude
pRSF-HydA	Km ^r , <i>R. rubrum</i> <i>hydA</i> dans pRSFDuet-1	Cette étude

2.2 CONDITIONS DE CROISSANCE

Les souches de *R. rubrum* ont été cultivées dans des flacons à collet de 12 mm de 125 mL remplis de milieu RCVBN et refermés par des bouchons de caoutchouc, en conditions anaérobies sans agitation à 30 °C. Un incubateur Biotronette mark III environmental chamber (Labline Instruments) muni de trois ampoules incandescentes de 150 W a permis d'obtenir ces conditions.

Pour les études sur la photofermentation du glycérol de *R. palustris*, les cultures en RCV-succinate dont la croissance était optimale ont été transférées dans 100 ml de RCV, milieu minimal ne contenant pas de source d'azote. Pour produire le milieu non réprimant pour la nitrogénase, du glutamate a été utilisé comme source d'azote à une concentration finale variant de 2 mM à 15 mM. La source de lumière est une série de six lumières halogènes à faisceau large de 50 watts pointée vers les échantillons à une distance de 25 cm avec une intensité lumineuse de 25 350 lux moyennant un écart type de 2467 lux. L'intensité lumineuse est mesurée avec l'appareil traceable dual-display de Fisher Scientifictm réglé à « Tungsten ».

2.2.1 Composition du Milieu RCV

Le milieu minimal RCV a été utilisé pour faire croître *R. rubrum* selon la recette de Weaver et coll. 1975. Pour préparer 1 L de ce milieu, il faut ajouter à 40 mL de solution 1% EDTA pH 8 ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 20 mL d'une solution MgSO_4 20 % ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 20 mL d'une solution CaCl_2 7.5 % ($7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 48 mL d'une solution de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5% ($0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 1 mL d'une solution biotine $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ et 20 mL d'une solution éléments trace et on complète le volume à 940mL. Le mélange résultant est ensuite stérilisé à l'autoclave. Ensuite, 50 mL d'un tampon au potassium préalablement stérilisé, ajusté à un pH de 6.8, contenant 40 g de KH_2PO_4 et 60 g de K_2HPO_4 par litre sont ajoutés. Comme cette recette de milieu RCV n'inclut pas de

source de carbone, de source d'azote et de facteurs essentiels, il reste à les ajouter. Pour *R. rubrum*, il faut ajouter $15 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biotine filtrée alors que pour *R. palustris* il faut aussi $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acide para-amino benzoïque filtrée. La source de carbone préalablement stérilisée est ensuite ajoutée à une concentration finale variant de 1 mM à 20 mM. La source d'azote est soit du sulfate d'ammonium, répression de la nitrogénase, ou du glutamate, aucune répression. Tout comme la source de carbone, la source d'azote est préalablement stérilisée avant d'être ajoutée au mélange à une concentration finale de 2 mM. Pour la fermentation anaérobie à la noirceur, le milieu RCV est supplémenté de bicarbonate de sodium et d'extrait de levure à une concentration de $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. La solution d'éléments trace contient par litre : 750 mg; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 40 mg; $\text{CuNO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2.8 g; H_3BO_3 , 1.59 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.24 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

2.2.2 Composition du Milieu YPS

Le milieu YPS est un milieu non défini plus riche que le milieu RCV et permet une croissance plus rapide et plus grande que ce dernier. Ce milieu est utilisé pour faire croître *R. rubrum* et *R. palustris* dans certaines conditions telles que pour faire un stock glycérol de ces bactéries. Pour faire 1 L de ce milieu de culture, il faut ajouter à 800 mL d'eau 4 mL d'une solution CaCl_2 7 % ($7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 1.2 mL d'une solution MgSO_4 20 % ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 3 g d'extrait de levure et 3 g de peptone. Le mélange est ensuite agité jusqu'à ce que les ingrédients soient complètement dissous. Le volume est par la suite complété à 1 L avec de l'eau et le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave avant d'être utilisé.

2.2.3 Composition du Milieu LB

Le milieu riche Luria-Bertani (LB) est utilisé pour faire croître diverses souches de *Escherichia coli*, telle que la souche DH5 α ou BL21, depuis les années 1950 (4). Pour préparer ce milieu de culture, 800 mL d'eau il faut ajouter, 10 g de

bacto-tryptone, 10 g de NaCl et 5 g d'extrait de levures. Le mélange est ensuite agité jusqu'à ce que tous les ingrédients soient dissous. Le volume est subséquemment complété à 1 L avec de l'eau et le milieu est stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 55 minutes. Pour faire un milieu solide, il suffit d'ajouter 15 g d'agar avant de compléter le volume à 1 L et de verser le milieu sortant de l'autoclave dans des pétris avant que le milieu commence à se solidifier.

2.2.4 Préparation des cultures et du milieu pour croissance anaérobie

Rhodospirillum rubrum et *Rhodopseudomonas palustris* sont tous deux des micro-organismes anaérobies facultatifs. C'est-à-dire qu'ils vont croître en présence ou en absence d'oxygène. Cependant, pour étudier l'hydrogénase en photofermentation et en fermentation anaérobie, il est primordial que la croissance se fasse sans oxygène. Pour ce faire, des flacons à collet en verre de 125 mL sont stérilisés à l'autoclave et du milieu RCV est préparé tel que décrit ci-dessus. De manière aseptique, 100 mL de milieu RCV sont transférés dans chacun des flacons. Pour les échantillons non contrôle, 5 mL d'une culture fraîche, ayant cru dans les mêmes conditions, en fin de phase logarithmique de croissance sont ajoutés. Des bouchons de caoutchouc imperméables aux gaz préalablement stérilisés sont ensuite installés sur les flacons de manière à rendre ces derniers imperméables et les flacons sont ensuite purgés à l'argon pendant 5-10 minutes.

2.3 MANIPULATION DE L'ADN

2.3.1 Extraction de l'ADN plasmidique

L'extraction et l'isolation d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne ont été effectuées selon la technique suivante. Cette technique est nécessaire pour plusieurs manipulations subséquentes qui nécessitent de l'ADN de haute pureté et de bonne qualité. La méthode consiste en premier lieu à centrifuger à

10000 rpm, pendant 10 minutes, 5 ml d'une culture bactérienne contenant le plasmide voulu ayant cru pendant une nuit. Le surnageant est ensuite retiré par inversion et le culot est resuspendu dans 100 μL de solution TEG (Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM glucose) et transféré dans un eppendorf. Les cellules sont ensuite lysées par l'ajout de 200 μL d'une solution de NaOH 0.2M-SDS 1 % en inversant le tube 5 à 10 fois. Après une incubation de 5 minutes sur glace, 150 μL d'une solution d'acétate de potassium (60 mL acétate K 5M, 11 mL acide acétique glacial, 28 mL eau) sont ajoutés et mélangés au contenu du tube. Une autre incubation sur glace de 5 minutes est effectuée. Le contenu du tube est ensuite transféré à un autre tube eppendorf propre et le tout est centrifugé à vitesse maximale pendant 10 minutes. Le surnageant est de nouveau transféré dans un eppendorf propre et est centrifugé pendant 5 minutes à vitesse maximale. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube de 1.5 mL propre et stérile et 900 μL d'éthanol anhydre froid est ajouté. Après avoir été vortexé, le tube est centrifugé à vitesse maximale pendant 15 minutes. Le culot, contenant l'ADN plasmidique, est ensuite lavé avec 500 μL d'éthanol 70 % et centrifugé 5 minutes à vitesse maximale deux fois. Finalement, le culot est séché à l'air ambiant pendant 12 à 15 minutes puis, est resuspendu dans 40 μL d'eau distillée stérile contenant de la RNase ($40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) et incubé 15 minutes à la température ambiante avant d'être entreposé à $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. La qualité de l'ADN peut être évaluée en mesurant la densité optique à 260 nm et 280 nm et en calculant le ratio 260 sur 280. Un ratio s'approchant de 1.8 indique de l'ADN de bonne qualité.

2.3.2 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction et l'isolation d'ADN génomique à partir d'une culture bactérienne ont été effectuées avec le kit QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN selon le protocole qui est fourni avec le kit. Ce kit permet d'obtenir facilement de l'ADN génomique de haute qualité et pureté, choses qui seraient plus difficile à faire sans kit. Le protocole C a été suivi pour l'extraction de l'ADN génomique à partir de cultures bactériennes liquides. Les étapes supplémentaires du protocole dont le but est de donner de l'ADN

de meilleure qualité ont aussi été suivies. À la dernière étape, la colonne est éluée deux fois avec un volume de 100 μL d'eau distillée.

2.3.3 Amplification d'ADN par PCR

La réaction polymérase en chaîne, ou PCR, permet d'amplifier *in vitro* une région particulière d'une molécule d'ADN à l'aide d'amorces spécialement conçues pour s'hybrider aux extrémités de la région à amplifier. Dans le cadre de cette étude, plusieurs réactions de PCR ont été effectuées dans le but d'amplifier un gène d'intérêt ou de générer une molécule d'ADN hybride. Toutes ces réactions ont eu recours à l'enzyme de polymérisation provenant de *Pyrococcus furiosus*, Pfu, qui a été produite dans le laboratoire du Dr. Patrick Hallenbeck. L'appareil GeneAmp PCR system 2400 (Perkin Elmer) a été utilisé pour effectuer les réactions. D'autres réactifs ont aussi été nécessaires, notamment, dNTP à 0.2 mM, tampon PCR incluant MgSO_4 1X, eau distillée stérile ainsi que de l'ADN gabarit. Pour chaque réaction, une paire d'amorces spécifique a été choisie et optimisée. La concentration des amorces dans la réaction finale est de 900 nM. La liste et la description de celles-ci figurent au tableau ci-dessous.

Tableau IV. Amorces utilisées lors de différentes réactions de PCR

Pr	Code	Nom	Po	Séquence 5'-3'
A	F	RruHydAHindIII_F	5'	CCAAGCTTAGAACGTCCTGTCGAT
	R	RruHydAXhoI_R	3'	CCCTCGAGTCATCGTTCGCCTCAA
B	F	RruNifH2_F	5'	GAAGGGCGTTCTGGGCAGTAG
	R	RruNifH2_R	3'	TCGCAGCCGACAATCAGGA
C	F	OlapNifHHydA_F	5'	AAAGGATTGATTCCATGTTCGATCCA AC
	R	OlapNifHHydA_R	3'	GTTGGATCGACATGGAATCAATCCT TT
A'	R	RruHydAAfIII_R	5'	CCCTTAAGTCATCGTTCGCCTCAA

Légende : Pr : produit, Po : position, A : HydA1, B : RruNifH2,

C : Fusion_NifH2_HydA, A' : HydA1'

Les nucléotides soulignés sur les séquences représentent les sites de restriction introduits dans l'ADN. Les amorces ont été fabriquées par la compagnie alpha DNA.

2.3.4 Analyse d'ADN par gel agarose d'électrophorèse

L'analyse de fragments d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose permet la séparation des fragments d'ADN selon leur taille. Cela permet de confirmer l'identité d'un fragment lorsqu'un contrôle positif est disponible ou d'estimer la probabilité que le fragment soit le bon sinon. Avec cette technique, il est possible de différencier des fragments de taille allant de 100 pb à plus de 20 000 pb. Tout d'abord, à une solution contenant le ou les fragments d'intérêts, il faut ajouter un quart du volume total de la solution de tampon de chargement 5X composé de 10 mM Tris-HCl à pH 8.5, 1 mM EDTA, 40 % de sucrose et 0.25 % de bleu de bromophénol. Ensuite, il faut charger 10-40 µL de cette solution dans le puits du gel d'agarose. Le gel est produit en amenant d'abord à ébullition 50 mL d'une solution TAE contenant (par litre) 4.84 g de Tris, 1.142 mL d'acide acétique glacial et 0.372 g de EDTA et une concentration

d'agarose variant de 0.8 % à 2.0 % (poids · volume⁻¹). Ensuite, 1 µL de bromure d'éthidium à une concentration de 5 mg · mL⁻¹ est ajouté au mélange. Une fois ce dernier refroidi à environ 50 °C, le mélange est versé dans un moule de grandeur approprié et un peigne est inséré. Le gel est laissé solidifié. Une fois solidifié, celui-ci est démoulé et est immergé dans la solution de TAE dans l'appareil à électrophorèse. La solution contenant les fragments d'intérêts ainsi qu'une échelle moléculaire sont ensuite chargés dans des puits différents et l'appareil d'électrophorèse est allumé et ajusté à une tension de 75 à 110 volts. Finalement, une fois le front de migration ayant parcouru les 2 tiers du gel, ce dernier est retiré de l'appareil et analysé sous une lampe UV.

2.3.5 Digestion par des enzymes de restriction

Les différentes digestions enzymatiques ont toutes été faites selon le protocole suivant. À un tube contenant 1-10 µL de l'ADN à digérer, il faut ajouter 2 µL de tampon de digestion 10X, 1 µL de BSA si requis, 1-1.5 µL de l'enzyme et de l'eau pour compléter le volume à 20 µL. Pour les digestions doubles, il faut utiliser un tampon qui sera compatible avec les deux enzymes et, dans ce cas, ajouter 1 µL de chaque enzyme. Toutes les digestions enzymatiques ont été faites à 37 °C, ou, le cas échéant, à la température indiquée par le manufacturier, pendant 2 heures en utilisant différentes enzymes de restriction et tampons provenant de la compagnie New England Biolabs.

2.3.6 Extraction de l'ADN à partir d'un gel d'agarose

Pour purifier des molécules d'ADN à partir d'un gel d'agarose, la bande voulue a été découpée du gel et mise dans un tube eppendorf. Pour procéder à l'extraction, le QiaexII Gel Extraction Kit (Qiagen) dont la méthode consiste à faire l'élution avec de la poudre de verre a été utilisé selon le protocole du manufacturier.

Souvent, cette technique est utilisée pour purifier un insert et un vecteur en vue d'un clonage.

2.3.7 Méthode de ligation

Pour liguer un fragment d'ADN dans un vecteur, il est impératif de préalablement digérer le vecteur et l'insert avec des enzymes de restriction qui créeront des extrémités cohésives à moins que la ligation ne soit avec des bouts non cohésifs. Pour qu'une ligation soit efficace, un ratio de 4 : 1 (insert : vecteur) est requis. Lors de nos recherches, les réactions de ligation ont été faites avec l'aide de la T4 ADN ligase provenant d'Invitrogen pendant 8 heures à 16 °C.

2.4 MANIPULATION DE L'ARN

Comme l'ARN est excessivement sensible aux RNases, enzymes ayant la capacité de dégrader l'ARN, tous les réactifs sont traités ou manipulés soigneusement pour limiter la quantité de RNases présents et la contamination. Les tubes eppendorfs utilisés lors de la manipulation de l'ARN ainsi que les contenants de verre sont traités avec du diéthyle pyrocarbonate 0.1 % pour inactiver les RNases puis stérilisés à l'autoclave. Les embouts de pipettes sont aussi traités avec ce réactif avant d'être stérilisés. Lors des manipulations avec de l'ARN, des gants de latex sont portés et changés régulièrement pour éviter la contamination avec les enzymes présentes à la surface de la peau. Les échantillons qui contiennent de l'ARN sont maintenus sur glace le plus longtemps possible et sont exposés à l'air de manière minimale.

2.4.1 Extraction de l'ARN total

L'extraction de l'ARN total des cultures bactériennes a été faite avec le réactif TRIzol[®] de la compagnie Invitrogen. Le protocole d'extraction à partir de cultures bactériennes est suivi. En résumé, les bactéries sont cultivées jusqu'à la phase logarithmique dans les conditions dont on veut étudier le niveau d'expression puis, $1 \times$

10^7 cellules (environ 5 mL de culture) sont précipitées par centrifugation à 10 000 RPM pendant 5 minutes. 1 mL de TRIzol[®] est ensuite ajouté au culot de cellules et celles-ci sont homogénéisées par pipetage répétitif. Le mélange est transféré dans un tube eppendorf et incubé 5 minutes à température ambiante puis, 0.2 mL de chloroforme est ajouté. Le tube est agité vigoureusement pendant 15 secondes puis est laissé incubé 3 minutes à température ambiante. L'échantillon est centrifugé 15 minutes à 13 000 RPM et 4 °C et le surnageant, constitué de la phase aqueuse qui contient l'ARN, est récupéré par pipetage dans un nouvel eppendorf. L'ARN est ensuite précipité par l'ajout de 0.5 mL d'alcool isopropylique et l'échantillon est incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'ARN forme par la suite un culot par centrifugation pendant 10 minutes à 13 000 RPM et 4 °C. Le culot d'ARN est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol 75 % et centrifugé pendant 5 minutes à 9 000 RPM à 4 °C. Le culot d'ARN est finalement séché à l'air pendant 10 minutes puis dissous avec 100 µL d'eau avant d'être incubé pendant 10 minutes à 55 °C. La qualité de l'ARN peut être évaluée en mesurant la densité optique à 260 nm et 280 nm et en calculant le ratio 260 sur 280 ou en évaluant l'intégrité de l'ARN par gel d'électrophorèse. Un ratio s'approchant de 2.0 indique de l'ARN de bonne qualité.

2.4.2 Conversion de l'ARN en ADNc

Pour quantifier le niveau d'expression d'un gène, il est important de convertir l'ARN en ADNc. L'ADNc est beaucoup plus stable que l'ARN et n'est pas sensible aux RNases. Pour convertir l'ARN en ADNc, nous utilisons le kit QuantiTect[®] Reverse Transcription de QIAGEN. Tout d'abord, il faut ajouter 2 µL de tampon 7x ADNg wipeout à un volume d'ARN pouvant contenir jusqu'à 1 µg dans un tube eppendorf. Le volume est ensuite complété à 14 µL avec de l'eau distillée. Le tube est subséquentement incubé à 42 °C pendant 2 min et placé sur glace. 4 µL de tampon RT Quantiscript 5 X, 1 µL de mélange d'amorces RT et 1 µL d'enzyme Transcriptase Reverse de Quantiscript sont ensuite ajoutés au tube maintenu sur glace. Après avoir

mélangé, le tube est incubé à 42 °C pendant 15 min et ensuite 3 minutes à 95 °C . La solution résultante contient l'ADNc dérivée de l'ARN initiale.

2.4.3 Mesure de l'expression d'un gène par PCR quantitatif en temps réel

Pour doser le niveau d'expression d'un gène, nous utilisons la technique du qRT-PCR. Ce procédé, basé sur les principes du PCR, permet de détecter, à l'aide d'un agent intercalaire fluorescent ainsi qu'un détecteur de fluorescence, la quantité d'un produit PCR amplifié par des amorces spécifiques. Pour ce faire, nous employons le kit QuantiTect[®] SYBR[®] Green PCR de QIAGEN ainsi que l'appareil Rotor-Gene[™] 6000 de Corbett Life Science. Dans chaque tube de la réaction, il faut ajouter 25 µL du mélange 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, jusqu'à 0.3 µM de l'amorce sense et jusqu'à 0.3 µM de l'amorce anti-sense et 5 µL d'ADNc. Le volume de la réaction est ensuite complété à 50 µL avec de l'eau distillée sans RNases. Pour chaque série d'échantillons, il faut inclure un témoin négatif sans ADNc ainsi qu'un témoin négatif dont l'ARN n'a pas été converti en ADNc. Comme pour une réaction de PCR, il faut ensuite déterminer les conditions de la réaction. Une réaction typique possède le profil suivant : 15 minutes à 95 °C (requis pour l'activation d'un réactif du kit), répéter 35-50 fois le cycle suivant : 94-95 °C pendant 10-20 secondes, 55-65 °C pendant 30-60 secondes, 72 °C pendant 15-30 secondes et 70-85 °C pendant 15 secondes (détection de la fluorescence). Après les cycles de la réaction, l'appareil effectue une détection du ou des points de déshybridation des fragments amplifiés. Cela permet de déterminer la spécificité de l'amplification. Pour chaque réaction, une paire d'amorces spécifique a été choisie et optimisée. La liste et la description de celles-ci figurent au tableau ci-dessous.

Tableau V. Amorces utilisées lors de différentes réactions de qRT-PCR

Pr	Code	Nom	Po	Séquence 5'-3'
A	F	RruHydART_F	5'	TTCGACAAGGCCGTTCCCTATCTT
	R	RruHydART_R	3'	TTTCTCGGTTTCCAGCAGCACCTT
B	F	RruRplC_F	5'	GGTCTTATCGCCCAGAAGGT
	R	RruRplC_R	3'	TTAGAGGTACGCTTGACCTTGG
C	F	DvuHydE_Rt_F	5'	GACTCGGCTACGAGATAGGC
	R	DvuHydE_Rt_R	3'	CATCTCCACACCGAGTTCAC
D	F	DvuHydG_Rt_F	5'	CTCAAGAAGATGCGGTGAAG
	R	DvuHydG_Rt_R	3'	CGGTCTGGAACATCTCCTCT
E	F	Eco16S_Rt_F	5'	CGGAGGGTGCAAGCGTTAATC
	R	Eco16S_Rt_R	3'	TACGCATTTACCGCTACAC

Légende : **Pr** : produit, **Po** : position, **A** : HydA_Rt, **B** : rplC_Rt, **C** : HydE_Rt,
D : HydG_Rt, **E** : 16S_Rt

Pour l'analyse des résultats, les points critiques (CT), cycle de la réaction à partir duquel la fluorescence d'un échantillon croît de manière exponentielle, sont d'abord identifiés à l'aide du logiciel Rotor-Gene 6000 Series Software fourni par Corbett Life Science. La technique du delta-delta CT est ensuite utilisée pour comparer le niveau d'expression relatif de plusieurs conditions (40). Cette technique préconise la comparaison entre le niveau d'expression d'un gène exprimé de manière constitutive et le niveau d'expression du gène à l'étude entre deux échantillons différents. Lors de notre étude, le gène rplC, gène encodant pour la grande sous-unité de la protéine ribosomale L3, est utilisé comme gène constitutif pour *R. rubrum*. Dans

le cas de *E. coli*, l'ARN 16S est utilisé. Une fois les CT identifiés, le niveau d'expression de notre gène cible par rapport à *rplC* est évalué et, en utilisant la formule qui tient compte de l'efficacité d'amplification, il est possible d'approximer l'expression relative du gène cible dans diverses conditions. Pour déterminer l'efficacité d'amplification d'un gène, il suffit de créer une étendue de concentration initiale de gabarit d'ADNc et de comparer la réduction dans les CT avec l'accroissement de la concentration initiale de gabarit.

2. 5 STRATÉGIES DE CLONAGE

2.5.1 Clonage de Fusion_NifH2_HydA dans pCRBlunt

Les fragments d'ADN HydA1 et RruNifH2 sont obtenus par amplification PCR à partir de l'ADN génomique de *R. rubrum* selon la méthode décrite à la section 2.3.3. Le fragment d'ADN HydA1 est subséquentement utilisé avec l'amorce OlapNifHHydA_F ainsi que l'amorce RruHydAXhoI_R pour générer un fragment d'ADN hybride par PCR, partageant une région d'homologie avec le bout 3' du fragment RruNifH2. Ce fragment est ensuite purifié sur gel selon la méthode décrite à la section 2.3.5. De même, le fragment d'ADN RruNifH2 est modifié par PCR en utilisant l'amorce Rru_NifH2_F et l'amorce OlapNifHHydA_R pour générer un fragment d'ADN ayant une homologie avec le bout 5' du fragment précédemment modifié. Ce fragment est aussi purifié sur gel. Les deux fragments d'ADN modifiés sont ensuite combinés dans une même réaction de PCR avec l'amorce NifH2_F et l'armorce RruHydAXhoI_R pour produire une fusion entre le fragment RruNifH2 et HydA1, le fragment Fusion_NifH2_HydA. Ce dernier est ensuite purifié sur gel, puis il est cloné dans pCRBlunt par ligation non cohésive puis transformation dans DH5 α pour générer le plasmide pGSP02.

2.5.2 Clonage de Fusion_NifH2_HydA dans pJB3Tc20

À partir d'une extraction plasmidique de pGSP02, on digère le plasmide avec les enzymes HindIII et XbaI pour générer Fusion_NifH2_HydA avec des bouts cohésifs HindIII et XbaI. Ce fragment est ensuite cloné dans le vecteur conjugatif pJB3Tc20 aux sites HindIII/XbaI pour générer le plasmide pGSP03. Ce dernier est transformé dans S17.1 puis conjugué avec UR206 pour former la souche UR206_HydA+ de *R. rubrum*.

2.5.3 Clonage de HydA1' dans pRSFDuet-1 et co-expression avec pET-HydEF et pCDF-HydG

À l'aide des amorces RruHydAAflIII_R et RruHydAHindIII_F et de l'ADN génomique de *R. rubrum*, le fragment d'ADN HydA1' est généré par amplification PCR. Ce fragment est ensuite purifié à partir du gel et digéré avec les enzymes HindIII et AflIII pour générer des bouts cohésifs avant d'être purifié à nouveau. Ce bout d'ADN est ensuite cloné aux sites HindIII/AflIII de pRSFDuet-1 pour générer pRSF-HydA et est transformé dans des cellules BL21 rendues compétentes en même temps que les plasmides pCDF-HydG et pET-HydEF. Les transformants qui possèdent les trois plasmides, nommés GS_HydAEFG, sont sélectionnés à l'aide d'antibiotiques. L'expression des quatre gènes contenus dans les trois plasmides peut être induite par l'ajout d'IPTG au milieu de culture.

2.6 SÉQUENÇAGE

Le service de séquençage du centre hospitalier de l'Université de Montréal est utilisé pour toutes les réactions de séquençage.

2.7 TRANSFORMATION D'*ESCHERICHIA COLI*

2.7.1 Préparation de cellules thermocompétentes fraîches et de stock

Pour produire des cellules *E. coli* DH5 α thermocompétentes, une modification du protocole amélioré par Cohen et coll. (1972) est suivie. Ce protocole, originalement élaboré par Mandel et Higa (1970), se base sur la capacité de certaines bactéries de devenir temporairement compétentes lorsqu'elles sont exposées à une solution de chlorure de calcium froide. Tout d'abord, un tube contenant 5 mL de milieu LB est inoculé avec une boucle d'un stock de cellules DH5 α et est incubé pendant une nuit à 37 °C. Ensuite, la culture fraîche de DH5 α est diluée 1 dans 50 dans un tube contenant 5 mL de milieu LB et est incubée pendant 2 heures à 37 °C. Effectivement, les cellules doivent être en phase de croissance logarithmique pour qu'elles puissent devenir compétentes. Cette culture est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 13 000 RPM à la température ambiante. Le surnageant est ensuite décanté et le culot est placé sur glace pendant 15 minutes. Pour éviter une diminution de l'efficacité de la compétence des cellules, toutes les étapes subséquentes se produisent à 4 °C . Après l'incubation sur glace, le culot de cellules DH5 α est resuspendu dans 1 mL d'une solution froide de CaCl₂ 0.1 M. La suspension est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 13 000 RPM. Le surnageant est ensuite décanté et le culot est resuspendu dans 200 μ L d'une solution froide de CaCl₂ 0.1 M. À cette étape, les cellules peuvent être utilisées selon le protocole de transformation décrit plus loin ou aliquotées dans des tubes eppendorfs refroidis sur glace et rapidement gelées en les immergeant dans de l'azote liquide. Les cellules thermocompétentes DH5 α ainsi aliquotées peuvent être conservées pendant quelques mois à -80 °C.

2.7.2 Transformation chimique

La transformation consiste à incorporer un fragment d'ADN exogène dans une bactérie préalablement rendue compétente dans le but de cloner ce fragment ou de

l'exprimer. Nous procédons de la manière suivante; à 100 µL de cellules thermocompétentes DH5α fraîches ou aliquotées, 10 µL d'une ligation ou 1 µL de plasmide purifié est ajouté. Le mélange est ensuite incubé sur glace pendant 25 minutes. Après l'incubation, la réaction de transformation est incubée à 37 °C pendant exactement 6 minutes puis incubée sur glace pendant 2 minutes. À cette réaction, 600 µL de milieu de culture LB sont ajoutés puis celle-ci est incubée pendant 45 minutes à 37 °C dans un incubateur agitateur à 200 RPM. Cette période d'incubation permet à la cellule d'exprimer les gènes de résistance aux antibiotiques encodés par le plasmide. Après l'incubation, 100 µL de la réaction sont étalés sur un pétri LB avec l'antibiotique approprié et ce dernier est incubé de 12 à 24 heures à 37 °C.

2.8 CONJUGAISON DANS *RHODOSPIRILLUM RUBRUM*

Il est souvent plus facile et simple de travailler avec des organismes plus connus, comme *E. coli*, qu'avec des organismes moins caractérisés tel que *R. rubrum*. La conjugaison est une technique qui permet de transférer une construction plasmidique préalablement construite et contenue dans *E. coli* dans un second organisme. Nous utilisons la technique telle que décrite par Grunwald et coll. (1995) pour transférer des constructions dans *R. rubrum* (27). Brièvement, la souche *E. coli* S17.1 contenant le plasmide à donner, ainsi que la souche réceptrice de *R. rubrum* sont crues jusqu'à l'obtention d'une densité optique élevée. La souche donneuse est ensuite sous-cultivée dans du milieu de culture LB frais avec un ratio d'inoculum 1 :10 pendant 2 heures à 37 °C. 100 µL de la souche donneuse sont ensuite ajoutés à 100 µL de la souche réceptrice dans un tube eppendorf puis mélangés en inversant quelques fois. Le tube est ensuite centrifugé pendant 30 secondes à 13 000 RPM. Le surnageant est enlevé par inversion et les cellules sont resuspendues dans le liquide restant. Le mélange est par la suite étalé sur un pétri YPS puis incubé 24 heures à 30 °C. 1 ml de YPS est utilisé pour récupérer les cellules ayant crues sur le pétri puis celles-ci sont étalées sur un pétri YPS avec les antibiotiques appropriés pour

sélectionner la souche réceptrice ayant reçu le plasmide et incubées 24-48 heures à 30 °C.

2.9 MESURE DE LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE

Pour mesurer la quantité d'hydrogène produit par une culture, il suffit de mesurer deux choses. Premièrement, il faut connaître le volume ou la quantité de gaz produit par l'échantillon et, deuxièmement, il faut connaître la composition de ce volume gazeux.

2.9.1 Mesure de la quantité de gaz produit par une culture

Pour mesurer le volume total de gaz produit, nous avons rattaché les flacons de culture de 125 mL à des tubes FEP 890 de manière étanche. Les tubes sont ensuite reliés à des cylindres gradués inversés remplis d'eau et le volume gazeux est mesuré par déplacement d'un volume d'eau. Puisque le volume gazeux total d'un flacon de culture est connu, il suffit de déterminer la concentration en hydrogène d'un échantillon pour déterminer la quantité d'hydrogène produite.

2.9.2 Détermination de la composition en hydrogène d'un échantillon gazeux

La mesure de la production d'hydrogène par les cultures de *R. rubrum* et *R. palustris* ont été faites par chromatographie en phase gazeuse avec l'appareil Gas Chromatograph GC-8A (Shimadzu) possédant un détecteur à conductivité thermique. Un tamis moléculaire de 5Å a été utilisé et le gaz transporteur calibré à une pression de $3 \text{ kg}\cdot\text{cm}^3^{-1}$ était de l'argon. Le port d'injection était maintenu à 110 °C alors que la colonne était à 60 °C. Toutes les mesures ont été calibrées et normalisées à un facteur d'atténuation de 2 X. L'imprimante, quant à elle, a été ajustée à une vitesse de $1 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$. Pour calibrer le chromatographe, un flacon de verre bouchonné avec un septum de caoutchouc imperméable à l'air a été purgé avec de l'hydrogène pur pendant 10

minutes. Ensuite, des quantités connues variant de 10 μL à 50 μL d'hydrogène pur ont été injectées dans le chromatographe selon les spécifications mentionnées ci-dessus. Une droite de l'aire sous la courbe du pic d'hydrogène en fonction de la quantité d'hydrogène injectée a été tracée et l'équation de cette droite permet de calculer la quantité d'hydrogène dans un volume connu d'un échantillon inconnu en fonction de l'aire sous le pic d'hydrogène de cet échantillon.

2.10 DOSAGE DE LA QUANTITÉ DE GLYCÉROL

Pour pouvoir déterminer le rendement de production d'hydrogène à partir d'un composé, il est primordial de quantifier le substrat qui a été consommé lors de la croissance de la culture. Pour déterminer la quantité de glycérol restant dans nos cultures de *R. palustris* nous suivons le protocole de dosage de glycérol tel que décrit par Bondioli et Della Bella 2005 (10). Un échantillon de culture de 5 mL est prélevé et centrifugé à 10 000 RPM pendant 10 minutes pour faire précipiter les cellules en suspension. Ensuite, 500 μL de l'échantillon sont ajoutés à 1.5 mL de solution de travail composée de 50 % (vol/vol) d'eau distillée et de 50 % (vol/vol) d'une solution d'éthanol 95 % (vol/vol). 1.2 mL d'une solution de periodate de sodium composée de 21 mg de periodate de sodium, 5 mL d'une solution d'acide acétique 1.6 M et 5 mL d'une solution d'acétate d'ammonium 4 M sont ajoutés. Le tube est agité pendant 30 secondes puis 1.2 mL d'une solution d'acétyle acétone 0.2 M composée de 200 μL d'acétyle acétone dans 5 mL d'une solution d'acide acétique 1.6 M et 5 mL d'une solution d'acétate d'ammonium 4 M sont ajoutés. Le tube est ensuite plongé dans un bain-marie maintenu à 70 °C et agité manuellement pendant exactement une minute. Après cette étape, le tube est immergé dans un bain d'eau maintenu entre 20 et 25 °C pendant 2 minutes. L'absorbance à 410 nm est ensuite lue et le résultat est comparé à une courbe étalon effectuée avec une étendue de solutions de diverses concentrations de glycérol puis, la concentration de glycérol de l'échantillon est déterminée.

2.11 DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE L'HYDROGÉNASE

Le dosage de l'activité de l'hydrogénase se fait avec l'aide de la chromatographie en phase gazeuse avec un appareil Gas Chromatograph GC-8A (Shimadzu) en utilisant la technique du viologen de méthyle. Les cultures dont nous voulons doser l'activité de l'hydrogénase sont d'abord crues 8 heures dans un milieu LB avec les antibiotiques appropriés. Les cultures sont ensuite diluées, en proportion 1 dans 50, dans du milieu LB frais contenant 100 μ M de citrate de fer. Elles sont ensuite incubées à 37 °C jusqu'à ce que leur densité optique à 600 nm soit entre 0.5 et 0.7. Les cultures sont ensuite purgées à l'argon pendant 10 minutes et, s'il y a lieu, de l'IPTG est ajouté jusqu'à une concentration de 1 mM. Les cultures sont incubées pendant 2 heures à 37 °C. Après l'incubation, 1 mL de culture est prélevé et est transféré de manière à limiter la contamination par l'oxygène à un flacon de 25 mL fermé avec un bouchon hermétique en caoutchouc. Pour rendre l'échantillon anoxique, celui-ci est purgé avec de l'argon pendant 1 à 2 heures. Ensuite, à l'aide d'une seringue hermétique, 1 mL d'une solution tampon 2x préalablement rendue anoxique contenant 50 mM de sulfate de potassium, 10 mM de viologen de méthyle, 20 mM de dithionite de sodium, 6 mM de NaOH et 0.2% (v/v) de triton X-100 sont ajoutés. Des échantillons de gaz sont prélevés toutes les 30 minutes et leur contenu en hydrogène est déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Il est possible de corréler l'activité de l'hydrogénase à la quantité d'hydrogène qui aura été relâchée.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 ÉTUDE DE LA SUR-EXPRESSION DU GÈNE HYDA CHEZ *R. RUBRUM*

3.1.1 Création d'un fragment de fusion entre les fragments d'ADN *nifH2* et *hyda* de *R. rubrum*

À l'aide des amorces RruHydAHindIII_F et RruHydAXhoI_R (tableau IV), un fragment, correspondant au gène *hyda*, d'une longueur d'environ 1.6 kb est amplifié à partir de l'ADN génomique de *R. rubrum*. Ce fragment est ensuite purifié sur gel d'électrophorèse avant d'être utilisé pour générer le fragment de fusion.

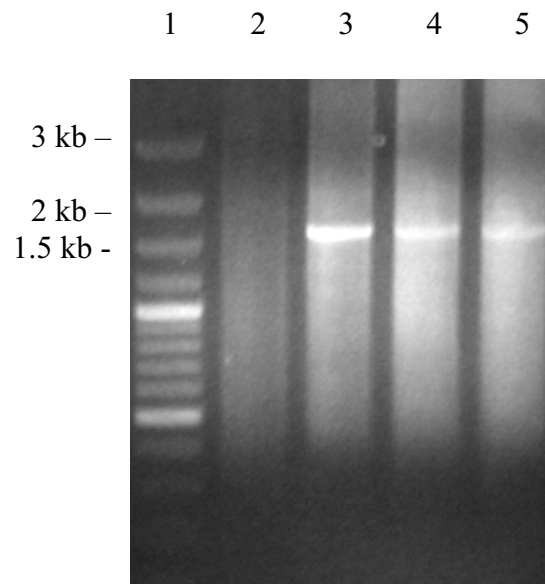


Figure V. Gène *hyda* de *R. rubrum* amplifié par PCR.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Puit 2 : Contrôle négatif sans gabarit d'ADN génomique.

Puit 3, 4 et 5 : Fragment de 1.6 kb correspondant au gène *hyda* de *R. rubrum*.

Une fois le fragment *hyda* isolé, la région promoteur en amont du gène *nifH2* est amplifiée à partir de l'ADN génomique de *R. rubrum* à l'aide des amorces RruNifH2_F et RruNifH2_R. Quoique la présence d'une autre bande sur le gel

suggère que la réaction n'est pas spécifique à un seul produit, le fragment d'une longueur d'environ 400 bp est facile à isoler et à purifier sur gel.

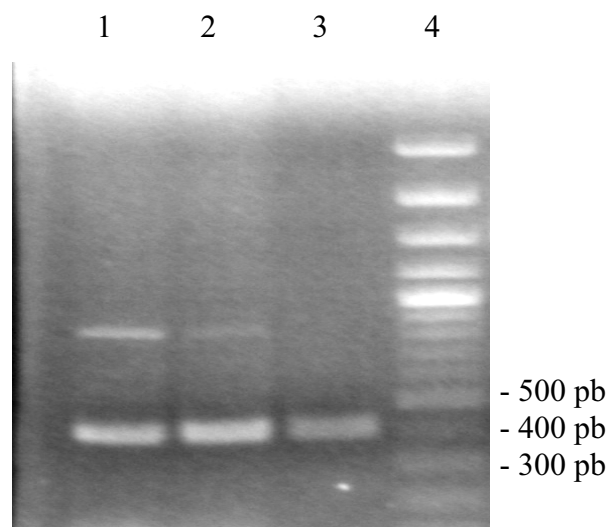


Figure VI. Promoteur du gène *nifH2* de *R. rubrum* amplifié par PCR.

Puit 1, 2 et 3 : Fragment d'environ 400 bp correspondant au promoteur du gène *nifH2* de *R. rubrum*. Les différents puits correspondent à différentes concentrations en ions magnésium.

Puit 4 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Une fois les deux fragments à fusionner isolés, il est possible d'effectuer la fusion par PCR. À l'aide des amorces OlapNifHHydA_F et RruHydAXhoI_R et en utilisant le fragment *hydA* de 1.6 kb isolé ci-dessus comme gabarit, nous créons une molécule d'ADN hybride qui possède une région d'homologie avec le promoteur *nifH2* en région 5'. Comme l'amorce OlapNifHHydA_F fait coïncider la séquence ATG de *nifH2* avec l'ATG de *hydA*, la séquence qui se trouve en amont de l'ATG de *hydA* est tronquée du produit final. Le fragment amplifié (1.5 kb) est donc moins long que le gabarit de départ (1.6 kb).

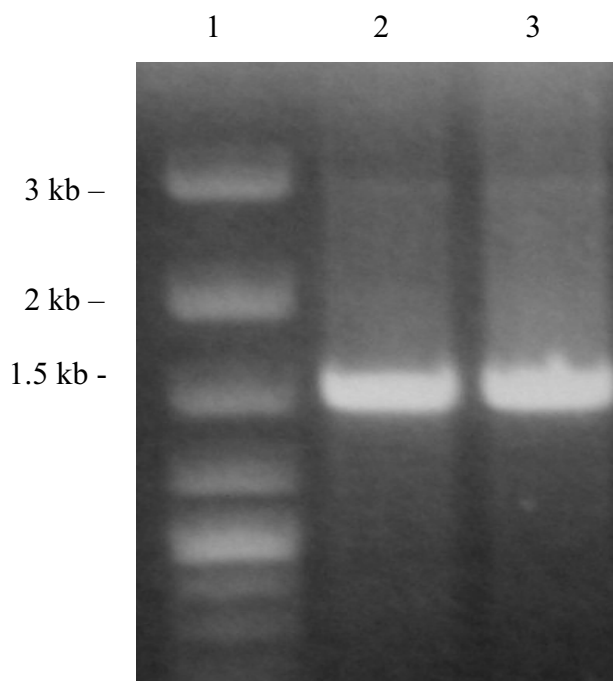


Figure VII. Partie 3' de la fusion entre le promoteur de *nifH2* et *hydA* de *R. rubrum*, obtenue par PCR.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Puit 2, 3 : Partie 3' du fragment NifH2HydA, 1.5 kb.

Nous procédons de manière similaire pour produire le bout 5' du fragment NifH2HydA. À partir de la région promoteur de *nifH2* comme gabarit, l'amorce RruNifH2_F ainsi que l'amorce OlapNifHHydA_R sont utilisées pour générer une portion d'ADN composée du promoteur du gène *nifH2* ainsi qu'une région d'homologie avec le fragment d'ADN décrit au paragraphe précédent en région 3'. Comme l'amorce OlapNifHHydA_R fait coïncider la séquence ATG de *nifH2* avec l'ATG de *hydA*, la séquence qui se trouve en aval de l'ATG de *nifH2* est tronquée du produit final. Le fragment amplifié (0.3 kb) est donc moins long que le gabarit de départ (0.4 kb).

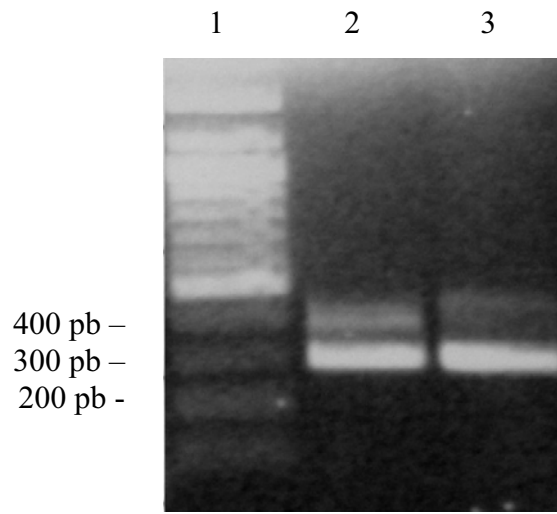


Figure VIII. Partie 5' de la fusion entre le promoteur de *nifH2* et *hydA* de *R. rubrum*, obtenue par PCR.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

Puit 2, 3 : Partie 5' du fragment NifH2HydA, 0.3 kb.

À partir des bouts 5' et 3' du morceau d'ADN NifH2HydA comme gabarit, il est possible de fusionner ces deux parties en un seul fragment d'ADN par PCR. Effectivement, en utilisant les amorces RruNifH2_F ainsi que RruHydAXhoI_R, nous obtenons une bande se rapprochant du marqueur à 1.8 kb. Quoiqu'une seconde bande soit visible, celle-ci n'est pas de la bonne longueur et il est facile d'extraire la bonne bande du gel. Pour confirmer que le fragment amplifié possède la bonne séquence, le fragment sera lié dans pCRBlunt au site EcoRI, transformé dans DH5 α puis séquencé.

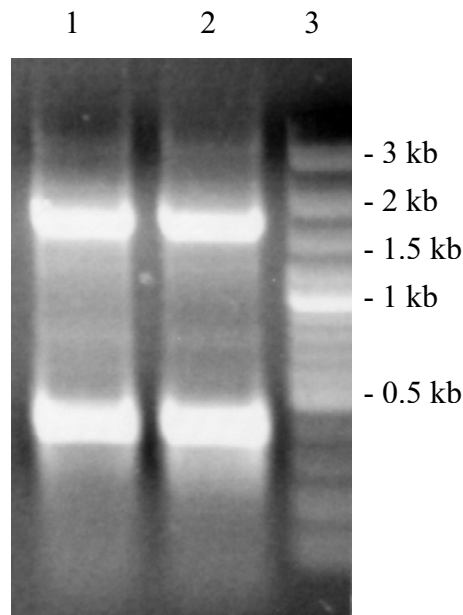


Figure IX. Fusion complétée entre le promoteur de *nifH2* et *hydA* de *R. rubrum*, obtenue par PCR.

Puit1, 2: Fragment NifH2HydA fusionné, 1.8 kb.

Puit 3 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder.

3.1.2 Surexpression du gène *hydA* dans UR206, par le contrôle du promoteur de *nifH2*

Pour contrôler l'expression du gène *hydA* de *R. rubrum*, la construction NifH2HydA sera incorporée dans le plasmide pJB3Tc20 par ligation et transformée dans la souche S17.1 de *E. coli* avant d'être transférée à la souche UR206 de *R. rubrum* par conjugaison pour générer la souche UR206_HydA⁺. Comme le gène *hydA* de la construction est sous le contrôle du promoteur de *nifH2* et comme la souche UR206 ne possède pas de nitrogénase fonctionnelle, le fait d'induire ou de réprimer *nifH2* n'aura d'impact que sur l'expression du gène *hydA*.

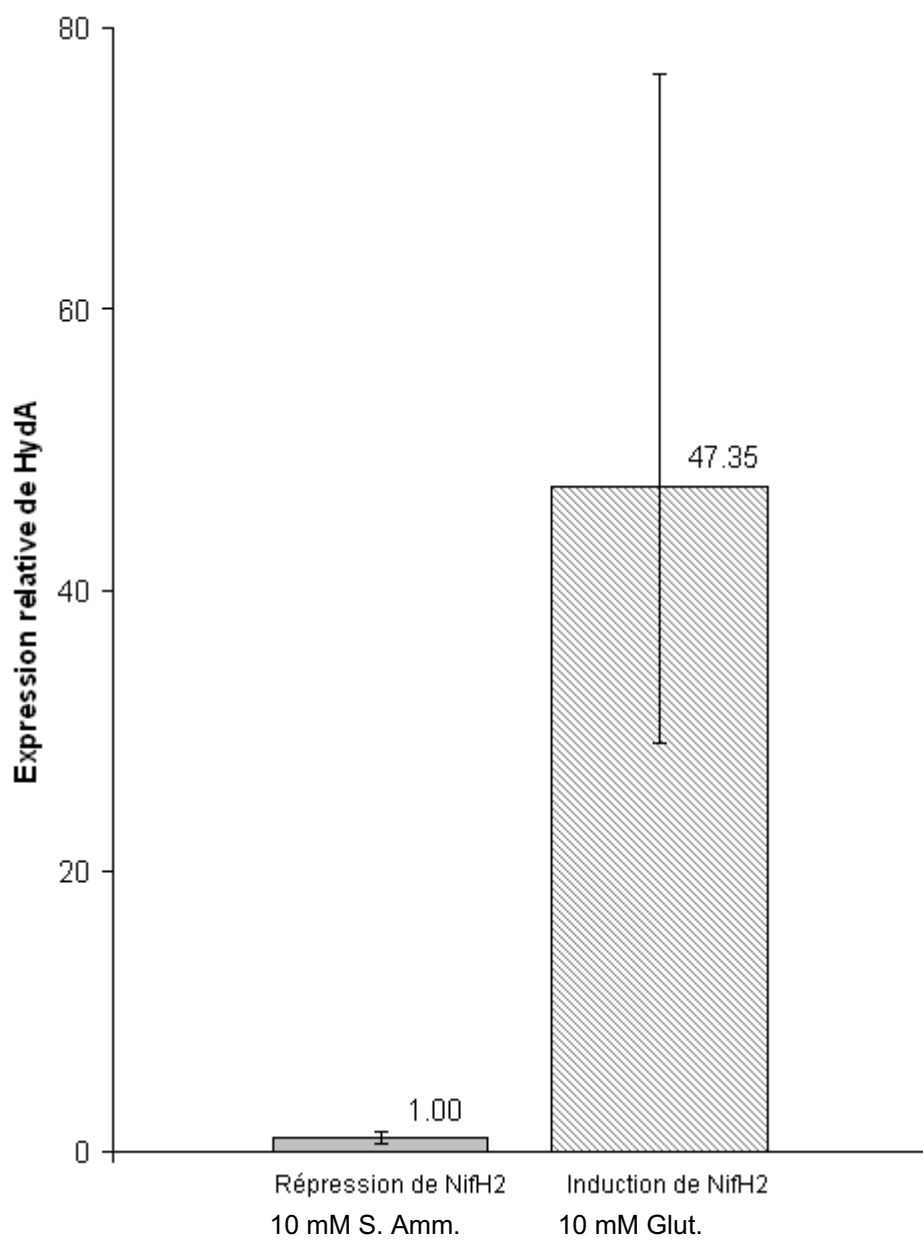


Figure X. Mesure du niveau d'expression du gène *hydA* de la souche UR206_HydA+ en condition de répression de *nifH2* (couleur unie), par croissance en présence de 10 mM de sulfate d'ammonium, et en condition d'induction de *nifH2* (hachuré), par croissance en présence de 10 mM de glutamate, par qRT-PCR.

À la figure X, il est possible d'observer que le niveau d'expression du gène *hydA* est environ 50 fois supérieur en condition d'induction du promoteur *nifH2* qu'en condition de répression de ce dernier. Ce résultat nous permet de conclure que la construction NifH2HydA incorporée dans la souche UR206_HydA+ de *R. rubrum* est fonctionnelle et qu'il est possible de réguler l'expression du gène *hydA* en réprimant ou en induisant le promoteur *nifH2*.

3.1.3 Étude sur la modification de la production d'hydrogène de *R. rubrum* par la surexpression du gène *hydA* grâce à la construction NifH2HydA

À la figure XI, il est possible de constater la production cumulative de gaz (incluant l'hydrogène) de trois souches de *R. rubrum*; la souche sauvage, la souche UR206 ainsi que la souche UR206_HydA+. Deux conditions sont testées, la répression de la nitrogénase (N+) , impliquant une croissance avec 10 mM de sulfate d'ammonium comme source d'azote et l'expression de la nitrogénase (N-), impliquant une croissance avec 10 mM de glutamate comme source d'azote. Dans les deux cas, 10 mM de succinate sont utilisés comme source de carbone. D'après la figure X, on peut voir que l'induction de *nifH2* cause une surexpression du gène *hydA*. Cependant, cette surexpression de *hydA* n'engendre pas une production d'hydrogène. Ce résultat est donc contraire aux attentes. Il est aussi possible de remarquer que, contrairement à *R. rubrum* sauvage, UR206 ne produit pas d'hydrogène ni dans l'une ou ni dans l'autre des conditions.

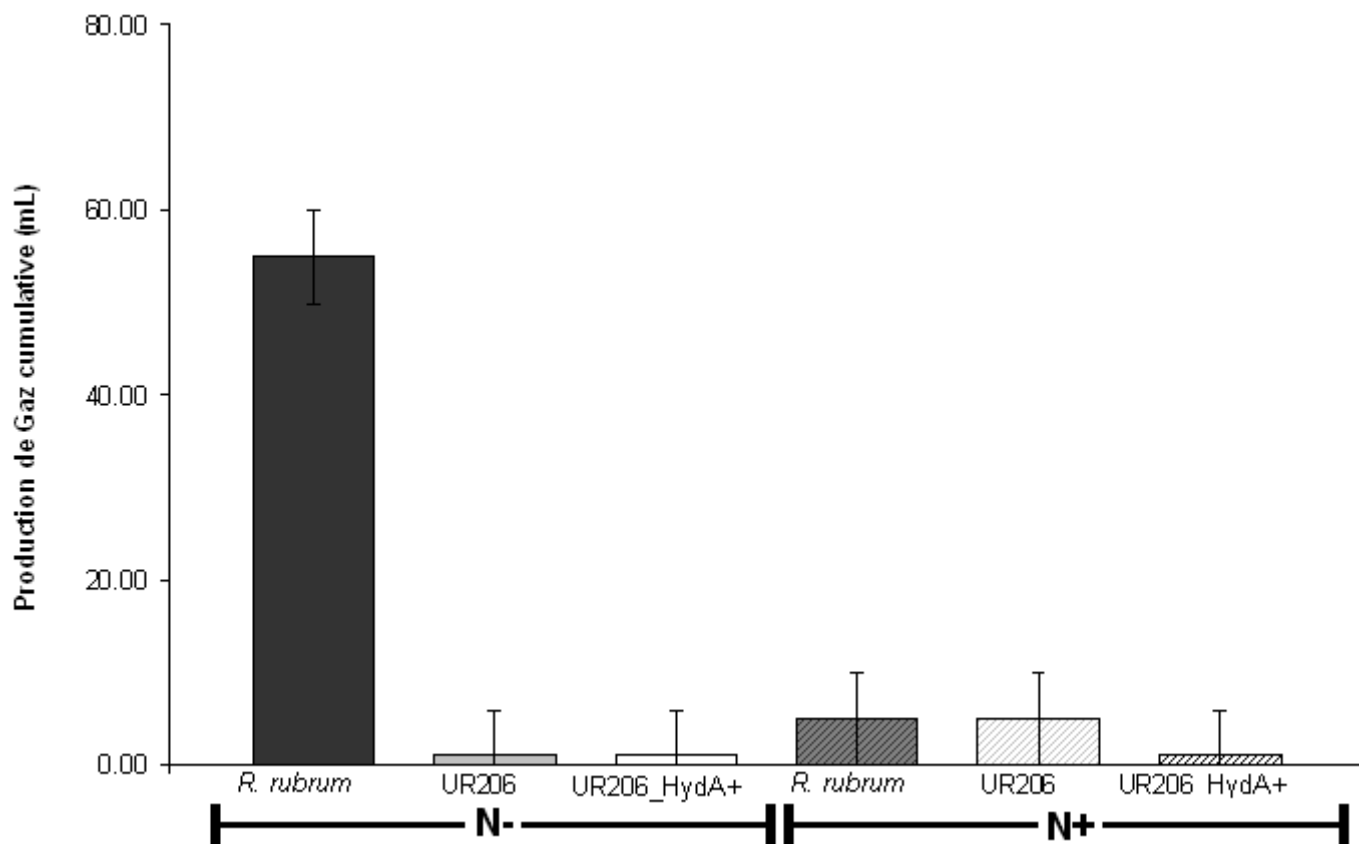


Figure XI. Production cumulative totale de gaz de trois souches de *R. rubrum* en condition de répression (N+) ou dérépression (N-) de la nitrogénase. 10 mM de succinate sont utilisés comme source de carbone et le volume final produit est mesuré par déplacement d'un volume d'eau dans des cylindres gradués. Les souches sont maintenues en condition anaérobie et sont incubées en présence de lumière.

3.2 ÉTUDE DE LA CO-EXPRESSION DU GÈNE *HYDA* DE *R. RUBRUM* AVEC LES GÈNES DE MATURATION HYDE, F ET G DE *D. VULGARIS*

3.2.1 Clonage du gène *hydA* de *R. rubrum* dans le plasmide pRSFDuet-1

Avec les amorces RruHydAHindIII_F et RruHydAAflIII_R (tableau V) et en utilisant l'ADN génomique de *R. rubrum* comme gabarit, un fragment d'ADN de 1.6 kb correspondant au gène *hydA* est amplifié par PCR. Les amorces utilisées permettent d'introduire un site de restriction HindIII à l'extrémité 5' du fragment et un site de

restriction AflII à l'extrémité 3'. Le fragment est purifié sur gel, puis, cloné dans pRSFDuet-1 aux sites HindIII/AflII pour générer la construction pRSF-HydA.

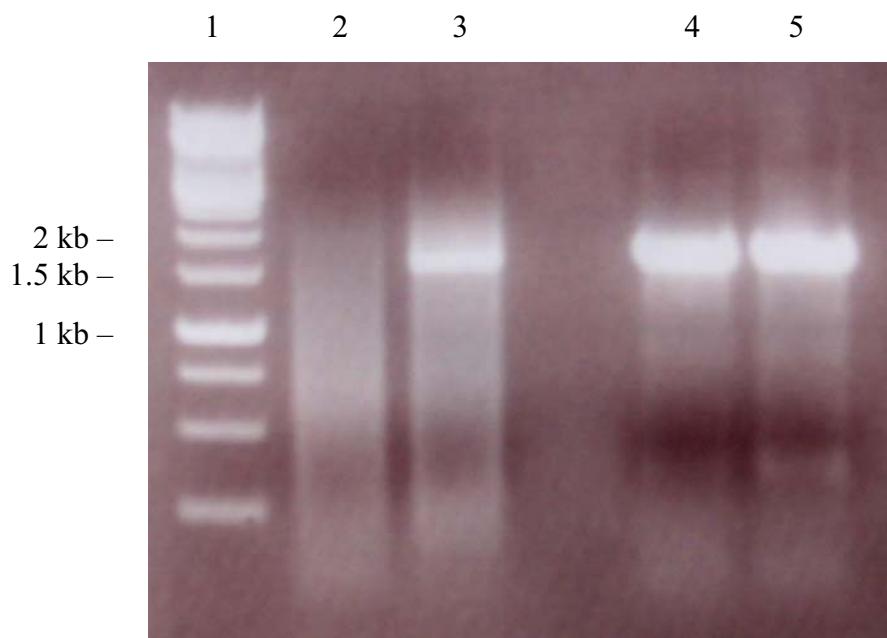


Figure XII. Amplification PCR du gène *hydA* de *R. rubrum* et insertion de sites de restriction HindIII et AflII .

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 1 kp DNA Ladder.

Puit 2 : Contrôle négatif sans gabarit d'ADN génomique.

Puit 3 : Contrôle positif avec amorces qui ont préalablement été confirmées comme étant fonctionnelles

Puit 4 et 5 : Fragment de 1.6 kb correspondant au gène *hydA* de *R. rubrum*.

Une fois la construction pRSF-HydA complétée, celle-ci est transformée dans des cellules DH5 α puis est vérifiée par digestion enzymatique après une extraction plasmidique. On peut voir à la figure XIII que son profil de restriction est adéquat puisque l'on retrouve un fragment de 1.6 kb et un fragment de 3.8 kb.

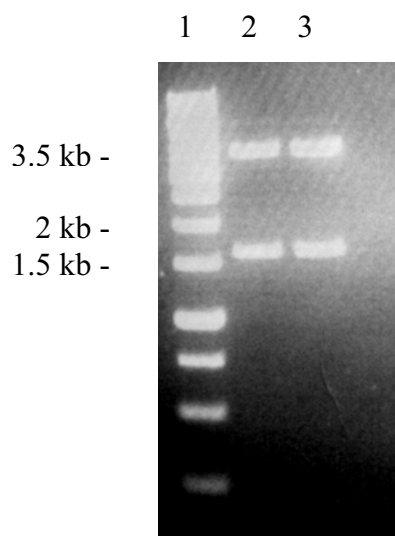


Figure XIII. Vérification de la construction pRSF-HydA par analyse de restriction d'un clone.

Puit 1 : Marqueur de poids moléculaire GeneRuler™ 1 kp DNA Ladder.

Puit 2 et 3 : Extraction plasmidique digérée HindIII/AflII : Fragments de 3.8 kb et 1.6 kb

Après vérification de la construction, les trois plasmides, pRSF-HydA, pET-HydEF et pCDF-HydG sont co-transformés dans la souche *E. coli* BL21 pour donner la souche GS_HydAEFG. Les transformants qui ont incorporé les trois plasmides sont sélectionnés sur des pétris LB avec Kanamycine, Ampicilline et Streptomycine, les trois marqueurs de résistance associés aux plasmides utilisés.

3.2.2 Co-expression de *hydA* de *R. rubrum* et HydE, F et G de *D. vulgaris* dans des cellules compétentes BL21 et dosage de l'activité de l'hydrogénase

Pour induire l'expression des quatre gènes co-exprimés dans GS_HydAEFG, des cultures sont incubées dans du LB et induites telles que décrit dans la section

matériel et méthode avec de l'IPTG. Ensuite, l'expression de chaque gène est mesurée par qRT-PCR puis, le niveau d'activité de l'hydrogénase est dosé en utilisant la méthode de méthyle viologen. À la figure XIV on peut voir la surexpression des gènes co-exprimés dans GS_HydAEFG lorsque leur expression est induite par l'addition de 1 mM d'IPTG. On peut observer que, comparativement au contrôle non induit, les gènes induits sont exprimés de 2 à 6 fois plus.

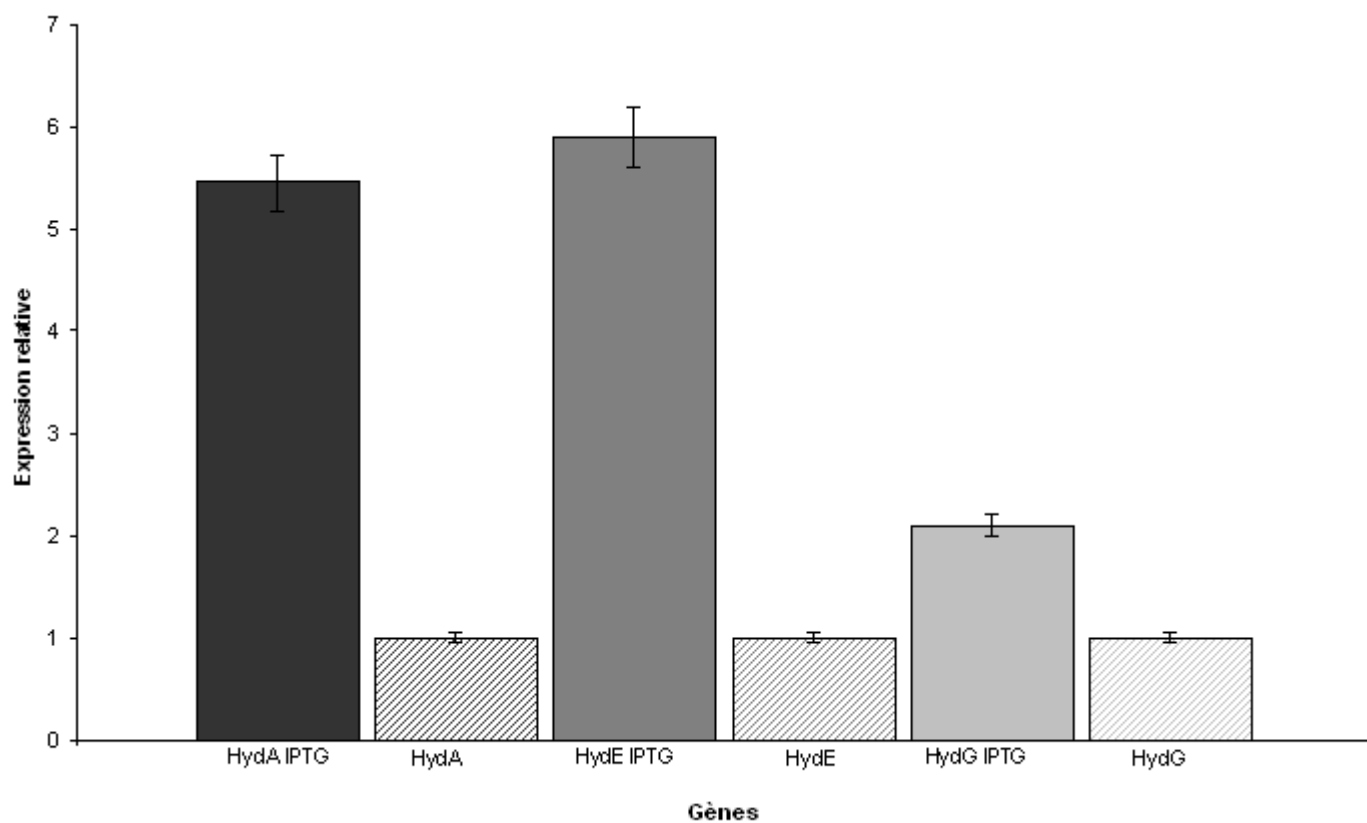


Figure XIV. Niveau d'expression des gènes *hydA*, E et G co-exprimés dans GS_HydAEFG avec (couleur unie) ou sans induction (hachuré) par 1 mM d'IPTG.

Malgré le fait qu'il y ait détection d'une légère surexpression des gènes de maturations et du gène *hydA*, le dosage de l'activité de l'hydrogénase ne démontre aucune activité ni dans l'échantillon induit, ni dans le contrôle non induit. L'expérience est répétée à plusieurs reprises en changeant le temps d'induction, le

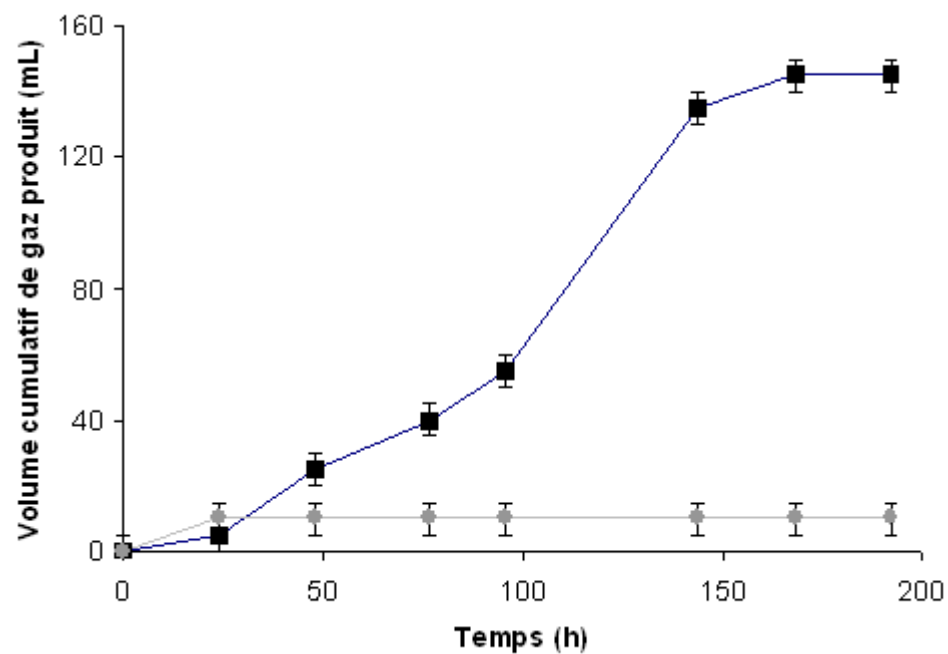
temps d'incubation ou le temps d'exposition à un flux d'argon. Cependant, il n'y a pas de détection d'activité dans l'une ou l'autre des conditions.

3.3 ÉTUDE DE LA PRODUCTION D'HYDROGÈNE DE *R. PALUSTRIS* PAR PHOTOFERMENTATION EN UTILISANT DU GLYCÉROL COMME SUBSTRAT

3.3.1 Détermination de la capacité de *R. palustris* à photofermenter le glycérol et confirmation de l'implication de la nitrogénase dans cette réaction

Pour étudier la production d'hydrogène de *R. palustris* par photofermentation en utilisant du glycérol comme source de carbone, la capacité de *R. palustris* à utiliser le glycérol comme source de carbone est d'abord vérifiée. Deux souches de *R. palustris*, CGA009, la souche sauvage, et CGA750, une souche déficiente en nitrogénase, sont crues à la lumière dans un milieu RCV contenant 10 mM de glycérol pur comme source de carbone ainsi que 2 mM de glutamate comme source d'azote. La production d'hydrogène est mesurée tel que décrit dans le chapitre de matériels et méthodes. On peut voir à la figure XVA que la souche CGA750 ne démontre aucune production d'hydrogène malgré qu'il y ait tout de même croissance. La souche CGA009 quant à elle, démontre une production d'hydrogène à partir du glycérol.

A



B

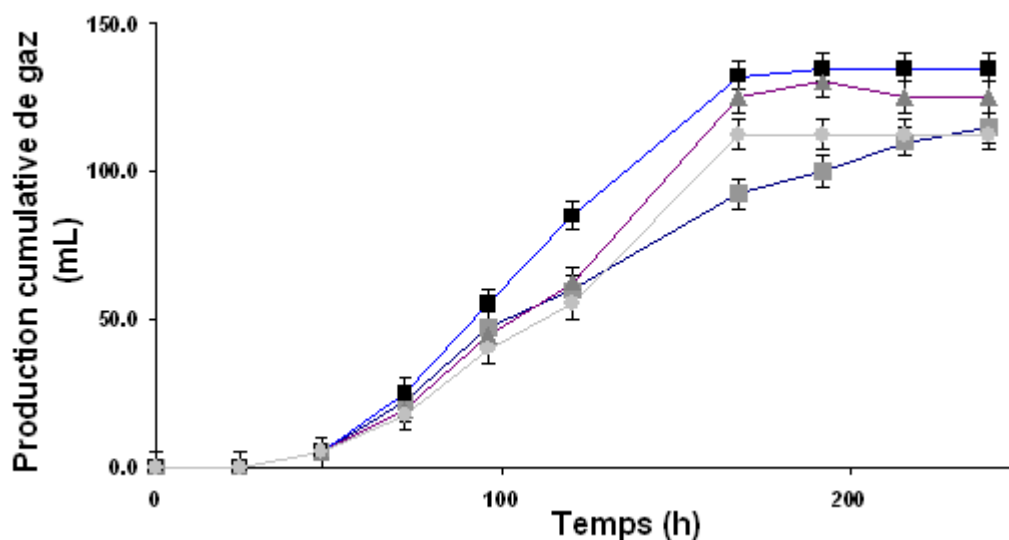
Souche	DO 660 nm	Utilisation Glycérol (%)
CGA009	0.983	> 98
CGA750	1.13	82.4

Figure XV. A) Production cumulative de gaz en fonction du temps. Deux souches, CGA009 (■) et CGA750 (●) sont étudiées. B) Résumé des caractéristiques de la production de gaz observée en A.

3.3.2 Effet de la concentration de la source d'azote sur le rendement de production d'hydrogène de *R. palustris* à partir de la photofermentation du glycérol

La figure XVI nous permet de voir l'effet de la concentration d'azote disponible sur la production d'hydrogène par *R. palustris* CGA009. La croissance des cultures se fait telle que décrite dans la section matériel et méthodes. Des concentrations de glutamate de 0 mM, 2 mM, 4 mM et 8 mM sont étudiées. 10 mM de glycérol pur est utilisé comme source de carbone. Le milieu est supplémenté de 0.05 % d'extrait de levure et 0.05 % de bicarbonate de soude. On peut voir que la concentration de glutamate montrant le meilleur rendement de production d'hydrogène est de 2 mM, cette dernière démontre un rendement de plus de 75 % du rendement maximal. Cependant, il faut noter que l'ajout de 0.05 % d'extrait de levure augmente probablement le rendement comparativement à celui qui serait obtenu dans les mêmes conditions mais sans cet ajout. Effectivement, le milieu plus riche permet possiblement une meilleure économie d'énergie métabolique qui pourra être utilisée pour augmenter la production d'hydrogène. Pour ces raisons, le milieu de croissance n'est pas supplémenté d'extrait de levure dans les expériences subséquentes.

A

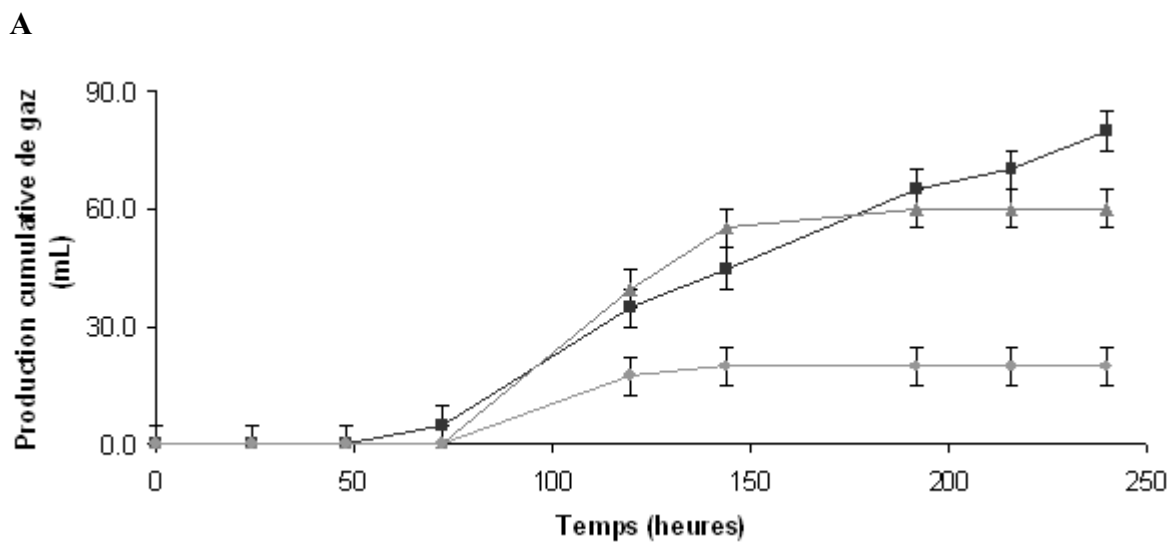


B

Concentration Glutamate (mM)	DO 660 nm	Concentration Hydrogène (%)	Rendement Mol H ₂ / Mol Glycérol	Utilisation Glycérol (%)
0	0.69	55.4	5.19	> 98
2	1.03	63.1	6.18	> 98
4	1.31	54.1	5.64	> 98
8	1.51	41.2	3.65	> 98

Figure XVI. A) Production cumulative de gaz en fonction du temps en photofermentation anaérobie. Quatre concentrations de glutamate sont testées, 0 mM (●), 2 mM (■), 4 mM (▲) et 8 mM (◆) sont étudiées. B) Résumé des caractéristiques de la production d'hydrogène observée en A.

Comme la production d'hydrogène par la nitrogénase nécessite que la nitrogénase ne soit pas réprimée, il est primordial d'utiliser des sources d'azote qui ne répriment pas celle-ci. Le sulfate d'ammonium, en très petite concentration, peut aussi être considéré comme non-répresseur de la nitrogénase. La figure XVII nous permet de constater l'effet de la concentration de sulfate d'ammonium sur la production d'hydrogène par photofermentation anaérobie en utilisant le glycérol comme substrat. Des concentrations de sulfate d'ammonium de 0 mM, 1 mM et 2 mM sont étudiées. Il est possible de remarquer que même si le sulfate d'ammonium ne réprime pas complètement la nitrogénase à basse concentration, il suffit d'une très basse concentration pour influencer le rendement de production d'hydrogène à la baisse.



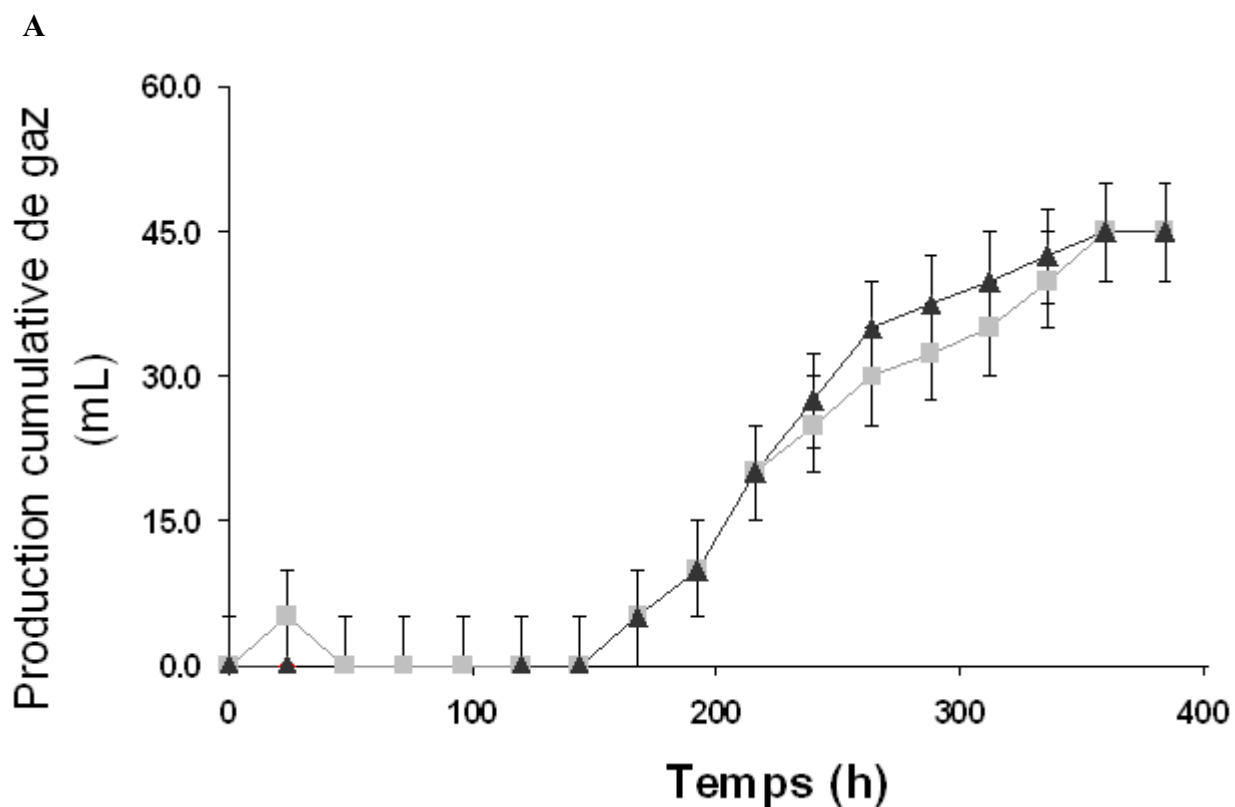
B

Concentration S. Amm (mM)	DO 660 nm	Concentration Hydrogène (%)	Rendement Mol H ₂ / Mol Glycérol
0	0.21	73.38	4.90
1	0.30	46.99	2.94
2	0.35	41.84	1.74

Figure XVII. A) Production cumulative de gaz en fonction du temps en photofermentation anaérobie. Trois concentrations de sulfate d'ammonium sont testées, 0 mM (■), 1 mM (▲) et 2 mM (●) sont étudiées. B) Résumé des caractéristiques de la production d'hydrogène observée en A.

3.3.3 Comparaison entre la production d'hydrogène par photofermentation du glycérol pur et celle à partir du glycérol provenant de la production de biodiesel

Contrairement au glycérol de qualité laboratoire, le glycérol dérivé de la production de biodiesel n'est pas pur. Effectivement, il peut contenir divers contaminants qui peuvent influencer le rendement de production d'hydrogène. Nous comparons donc ce rendement à partir de souche croissant avec du glycérol pur à celui de souches croissant avec du glycérol provenant de la production de biodiesel. À la figure XVIII, on peut observer l'effet de la concentration de glutamate sur la production d'hydrogène à partir de glycérol contaminé. Comme le glycérol contaminé contient entre 20 et 25 % d'impuretés (v/v), 1 mol du mélange contient environ 0.75 mol de glycérol. Pour une même concentration de glycérol, il faut donc rajouter un plus grand volume de glycérol contaminé que de glycérol pur.



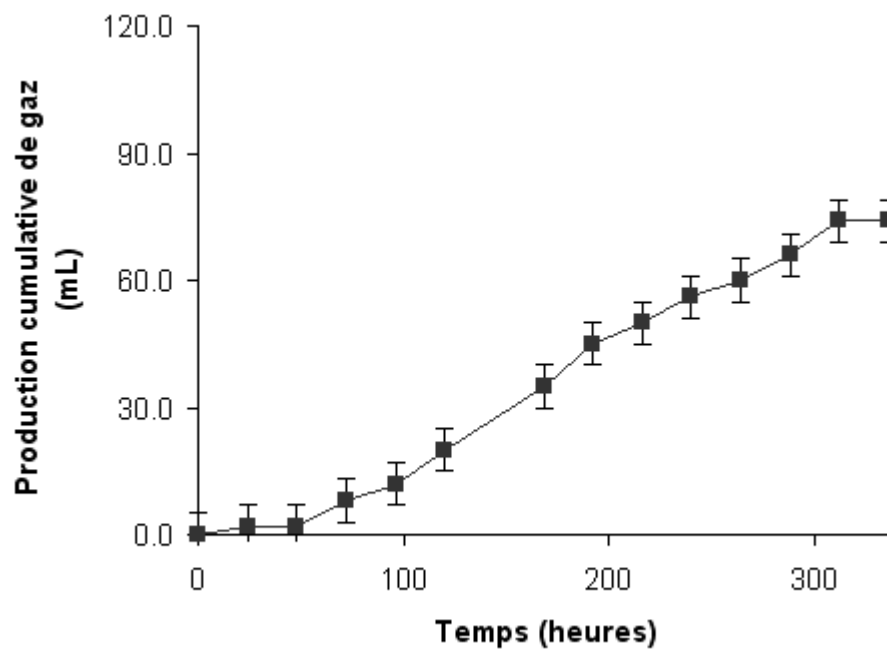
B

Concentration Glutamate (mM)	DO 660 nm	Concentration Hydrogène (%)	Rendement Mol H ₂ / Mol Glycérol	Utilisation Glycérol (%)
1	0.87	53.4	4.28	> 98
2	0.90	51.5	4.13	> 98

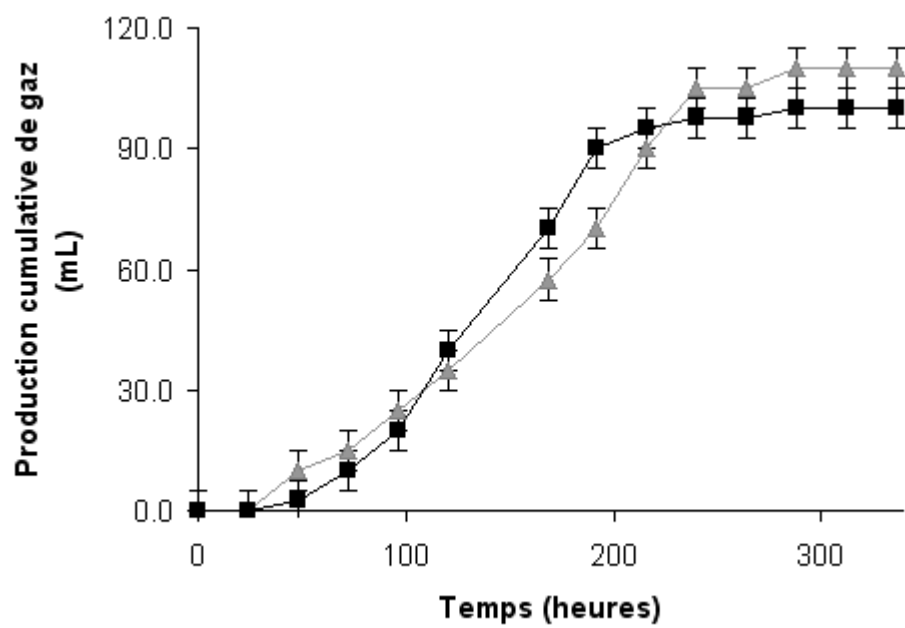
Figure XVIII. A) Production cumulative de gaz en fonction du temps en photofermentation anaérobie avec 10 mM de glycérol dérivé de la production de biodiesel comme substrat. Deux concentrations de glutamate sont testées, 1 mM (■) et 2 mM (▲). B) Résumé des caractéristiques de la production d'hydrogène observée en A.

Une comparaison directe est effectuée à la figure XIX. En effet, des cultures croissant soit en présence de 10 mM de glycérol pur ou soit en présence de l'équivalent de 10 mM de glycérol provenant de la production de biodiesel sont testées dans le cadre de la même expérience. Des concentrations de 2, 4 et 6 mM de glutamate sont utilisées comme source d'azote. Le point 2 mM glutamate et 10 mM glycérol contaminé n'a pas pu être testé de manière conclusive puisqu'une jonction du bioréacteur n'était pas hermétiquement scellée et devrait donc être répété ultérieurement. Il est possible de remarquer que plus la concentration en glutamate est grande, plus la phase plateau est atteinte rapidement.

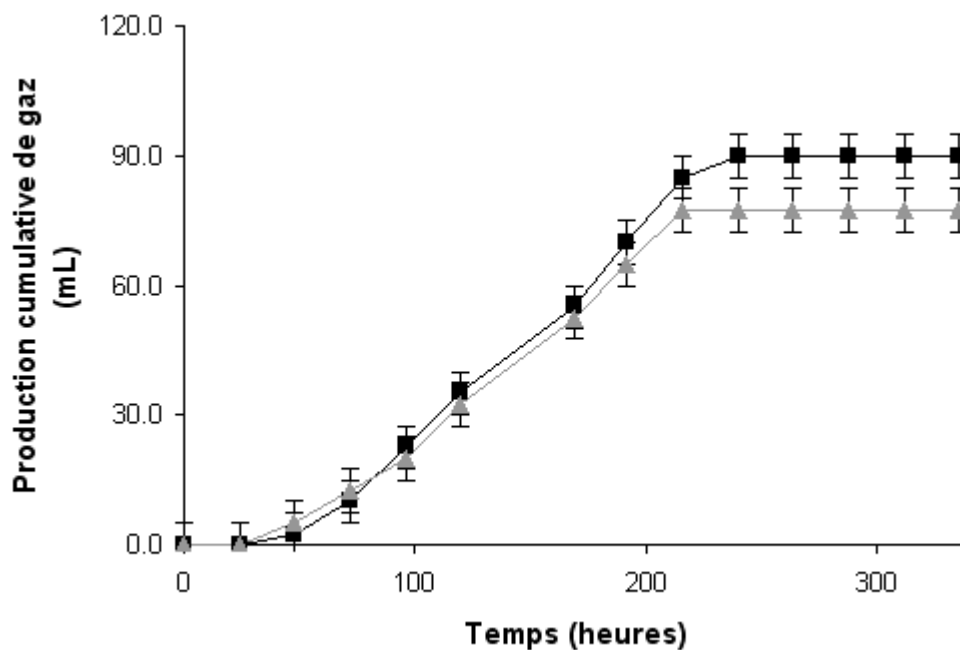
A1



A2



A3



B

Glycérol Pur (P) / Biodiesel (BD)	Concentration Glutamate (mM)	DO 660 nm	Concentration Hydrogène (%)	Rendement Mol H ₂ / Mol Glycérol	Utilisation Glycérol (%)
P	2	1.18	56.64	3.28	> 98
P	4	1.57	49.56	3.93	> 98
P	6	2.21	44.41	3.52	> 98
BD	4	1.77	43.12	4.05	> 98
BD	6	2.13	37.98	3.09	> 98

Figure XIX. A) Production cumulative de gaz en fonction du temps en photofermentation anaérobie avec 10 mM de glycérol (■) ou de glycérol contaminé (▲) comme substrat. **A1)** 2 mM glutamate **A2)** 4 mM glutamate **A3)** 6 mM glutamate. **B)** Résumé des caractéristiques de la production d'hydrogène observée en A.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Depuis quelque temps, la recherche d'alternatives propres aux combustibles fossiles est une avenue de recherche très fréquentée. Un transporteur d'énergie qui permettrait de remplacer ces combustibles à moyen et long terme et qui mettrait fin à la dépendance aux pays producteurs de pétrole est un but enviable dans le secteur de l'énergie. Tel qu'il a été mentionné précédemment, l'hydrogène remplirait très bien ce rôle. En effet, sa grande densité énergétique, sa propreté, la quantité de façons différentes permettant de récupérer l'énergie et la diversité dans les moyens de sa production sont tous des avantages intéressants associés à l'utilisation de l'hydrogène comme transporteur d'énergie. La bioproduction d'hydrogène est de loin la meilleure méthode de production de ce gaz. La réaction se produisant à basse température et ne nécessitant pas ou peu d'apport énergétique externe rend cette méthode très attrayante. Le facteur limitant dans l'exploitation de la bioproduction d'hydrogène à grande échelle est le rendement de production par rapport à l'apport initial en substrat. Effectivement, il est primordial d'étudier et de comprendre la capacité de production de micro-organismes produisant l'hydrogène afin d'en améliorer le rendement. Notre étude a permis de contribuer à cette connaissance en étudiant diverses voies possibles d'amélioration de la production d'hydrogène par l'expression ou la surexpression d'enzyme hydrogénase hétérologue. De manière parallèle, nous contribuons doublement à l'accroissement de la connaissance à ce sujet par l'étude de la production d'hydrogène de *R. palustris* à partir de glycérol dérivé de la production de biodiesel. Quoique la production d'hydrogène à partir de certains rejets industriels ait déjà été caractérisée, l'utilisation de glycérol comme substrat pour la photofermentation, quant à elle, reste très peu caractérisée.

La nitrogénase, tout comme l'hydrogénase, est une enzyme catalysant la réaction de réduction de protons à l'hydrogène avec oxydation concomitante d'un transporteur d'électrons tel que la ferredoxine. La principale différence entre ces deux enzymes, outre le fait que l'hydrogénase est plus active, réside dans le fait que cette dernière, contrairement à la nitrogénase, ne nécessite pas d'ATP pour produire de

l'hydrogène. En théorie, la surexpression de l'hydrogénase dans des conditions où il y aurait normalement production d'hydrogène par la nitrogénase permettrait la production d'hydrogène par l'hydrogénase sans utilisation d'ATP. Les résultats que nous avons obtenus ne correspondent pas à cette attente. Effectivement, nous n'avons pas observé d'augmentation dans la production d'hydrogène lorsque nous avons surexprimé l'hydrogénase dans des conditions où il y aurait normalement production d'hydrogène par la nitrogénase.

Dans le but d'étudier l'hydrogénase de *R. rubrum*, nous avons identifié l'enzyme par analyse génomique de base de données. Pour pouvoir surexprimer l'enzyme, nous avons créé des fragments d'ADN de fusion entre cette dernière et la région promoteur du gène *nifH2*, gène natif à *R. rubrum* très important pour le métabolisme de l'azote. Ce promoteur est très fortement réprimé en condition de répression de la nitrogénase et est fortement exprimé dans le cas contraire. Le fait d'avoir le gène *hydA* de *R. rubrum* sous le contrôle de ce promoteur dans une construction plasmidique nous permet donc de contrôler l'expression du gène *hydA*.

Les figures V à IX nous permettent de suivre l'évolution de la fusion entre le gène *hydA* et le promoteur du gène *nifH2*. Un séquençage nous confirme également qu'il n'y a pas de modifications à la séquence du gène ou du promoteur. La figure X démontre bien que notre construction nous permet de surexprimer *hydA*. Quoique nous ayons réussi à surexprimer ce gène, les résultats obtenus par la suite n'atteignent pas nos attentes. Effectivement, à la figure X, on peut observer que les conditions permettant la production d'hydrogène sont la photofermentation anaérobie avec non-répression de la nitrogénase chez la souche sauvage. Comme la souche UR206 ne possède pas de nitrogénase fonctionnelle, toute activité de production d'hydrogène serait associée à une enzyme autre que cette dernière. Même s'il y a surexpression de l'hydrogénase dans la souche UR206_HydA+, nous n'observons pas de production d'hydrogène. Il existe plusieurs interprétations possibles qui peuvent expliquer ce résultat.

Comme les hydrogénases sont des enzymes complexes avec un centre réactionnel composé d'ions métalliques, ces dernières dépendent de la présence d'enzymes de maturation, ou maturases, pour produire une enzyme fonctionnelle. Il est donc possible que l'étape de maturation soit limitante et que sans surexpression concomitante des gènes de maturation, la surexpression de *hydA* ne donne aucune augmentation de l'activité de l'hydrogénase.

Il est connu que la séquence des gènes de maturation de l'hydrogénase est très conservée d'une espèce à l'autre (36). Certaines études démontrent même qu'il est possible de maturer une hydrogénase d'une espèce avec les gènes de maturation d'une autre (47). Pour vérifier si la maturation de *hydA* posait un problème, nous voulions coexprimer les gènes de maturation de *D. vulgaris* avec *hydA* de *R. rubrum* dans *E. coli*. Effectivement, *E. coli* a déjà été utilisé pour l'expression hétérologue d'hydrogénases (47) et, de surcroît, les plasmides ayant les gènes de maturation de *D. vulgaris* que nous avons permettent l'expression des gènes chez *E. coli*. Comme nous possédions déjà les constructions plasmidiques avec les gènes de maturation, il suffisait de sous cloner *hydA* dans pRSFDuet-1 puis de la coexprimer avec pETDuet_HydEF et pCDFDuet_HydG (43). Les figures XII et XIII démontrent les étapes de construction de pRSFDuet_HydA ainsi que la vérification de la construction. Pour vérifier que l'expression des gènes *hydA*, *hydE*, *hydF* et *hydG* était bien induite par l'ajout d'IPTG, nous avons eu recours à la qRT-PCR. En utilisant les amorces décrites au tableau V, nous avons effectivement déterminé que les gènes étudiés étaient surexprimés par l'ajout d'IPTG. La surexpression des gènes étudiés n'était pas très grande. Cependant, il est possible qu'en modifiant les conditions d'induction ou qu'en incubant pour une plus longue période, il soit possible d'obtenir une plus grande expression. Quoique la surexpression ne soit qu'environ d'un ordre de grandeur, cela devrait être suffisant pour mesurer une différence au niveau de l'activité de l'hydrogénase si elle peut être maturée. Bien que nous ayons répété plusieurs fois l'expérience de dosage d'hydrogénase par la technique du méthyle de viologen en

modifiant les paramètres de l'expérience, nous n'avons pas été en mesure d'identifier une activité au niveau de l'hydrogénase.

Ce résultat peut-être interprété de différentes façons. Certains diront qu'il pourrait s'agir d'un problème de l'expression de l'hydrogénase au niveau de la construction plasmidique. Cependant, même si le degré de surexpression est faible, ce dernier produirait quand même une augmentation mesurable de l'activité de l'hydrogénase, chose qui n'a pas été observée. En surcroit, des modifications aux paramètres de l'induction produiraient certainement un plus fort niveau d'expression qui confirmerait certainement ce raisonnement.

L'hypothèse la plus plausible, selon nous, serait que les gènes de maturation de *D. vulgaris* n'ont pas la capacité de maturer HydA en une enzyme fonctionnelle. En effet, quoique la séquence des gènes de maturation soit conservée, il est possible que certaines petites différences au niveau des protéines de maturation combinées à certaines petites différences au niveau de l'enzyme s'additionnent de manière synergique et résulte en une incapacité de maturation de l'hydrogénase. Un effet similaire est observé par Nagy *et coll.* 2007, lorsqu'une suite de protéines de maturation HydE, HydF et HydG est capable de maturer cinq protéines HydA provenant de cinq espèces du genre *Clostridium* mais incapable de maturer la protéine HydA, connu comme étant fonctionnel, d'une sixième espèce du genre *Clostridium*. Il est donc plausible que les protéines HydE, HydF et HydG de *D. vulgaris* soit simplement incapables de maturer HydA de *R. rubrum*. Pour tester cette hypothèse, il faudrait surexprimer *hydA* et *hydE*, *hydF* et *hydG* de *R. rubrum* et vérifier si l'activité de HydA reste inchangée.

Un autre explication serait que *R. rubrum* aurait un gène *hydA* non fonctionnel. En effet, une proposition récente présente que *R. rubrum* aurait acquis le gène *hydA* par un événement de transfert de gène latéral (45). En effet, selon Meyer, il serait possible que *R. rubrum* ait acquis le gène *hydA* sans transfert concomitant des gènes

de maturation nécessaires ou que ce transfert se serait fait avant l'émergence des gènes de maturation. Dans ce contexte, en poussant la théorie de Meyer plus loin, il serait possible que le gène *hydA* ait perdu sa fonction suite à un manque de pression sélective à garder ce gène. Cette dernière hypothèse, celle de la perte de fonction de *hydA*, n'est pas particulièrement crédible puisqu'il a déjà été démontré que l'hydrogénase FeFe de *R. rubrum* est fonctionnelle (35). De surcroît, la surexpression de l'hydrogénase de *R. rubrum* et son expression hétérologue dans *R. sphaeroides* a déjà été accomplie avec succès.

Quoique l'expression hétérologue de l'hydrogénase de *R. rubrum* n'ait pas donné les résultats escomptés, notre étude nous a permis de franchir une première étape vers la compréhension et l'amélioration de la production d'hydrogène par les hydrogénases FeFe.

Il est mentionné précédemment que la recherche d'alternatives plus favorables au niveau de l'environnement pour le remplacement des combustibles fossiles est un secteur en plein développement. Avant d'arriver à une solution qui permettra de remplacer complètement le pétrole, la tendance est à la réduction de l'utilisation de cette substance ou le déplacement vers des carburants moins nocifs. Le biodiesel est un bon exemple de carburant tampon. D'ici quelques années, la quantité de biodiesel requise sera multipliée plusieurs dizaines de fois. Avec la production de biodiesel, une très grande quantité de glycérol sera produite. Il est donc intéressant d'étudier la production d'hydrogène par la photofermentation du glycérol et l'action de la nitrogénase de *R. palustris*. Effectivement, cette photofermentation serait un moyen très élégant de disposer de ce déchet.

Au cours de notre étude, nous avons étudié la production d'hydrogène par *R. palustris* lors de la photofermentation de glycérol provenant de la production de biodiesel, les facteurs importants pour le rendement de cette production et nous avons établie un étalon comparatif qui permet de jauger cette production.

La figure XV nous confirme que la production de gaz associée à la photofermentation du glycérol est bel et bien due à l'action de la nitrogénase. Effectivement, la souche CGA750, souche déficiente en nitrogénase fonctionnelle, ne démontre pas de production de gaz alors que la souche CGA009, quant à elle, montre une bonne production. Étant donné que la seule différence entre les deux souches est le fait que CGA750 n'ait pas de nitrogénase, on peut conclure que la production de gaz de la souche CGA009 y est associée.

Étant donné que le rendement de production est associé à l'action de la nitrogénase, il est important d'étudier l'effet de la source d'azote ainsi que sa concentration sur ce premier. Les figures XVI et XVII nous renseignent à ce sujet. À la première, on peut observer une certaine tendance. À partir de 2 mM de glutamate, une augmentation de la quantité de glutamate résulte en une diminution du rendement de production d'hydrogène et en une augmentation de la densité optique de la culture. Cela s'explique probablement par le fait qu'une plus grande quantité de glutamate permet aux bactéries de croître davantage qu'une quantité plus limitante d'azote. Puisque plus de bactéries peuvent croître, cela diminue vraisemblablement la quantité de glycérol qui sera utilisé pour produire de l'hydrogène, une plus grande proportion du glycérol servira à produire de la masse cellulaire. Cette augmentation dans la masse cellulaire aura aussi un effet néfaste sur la quantité de lumière qui pénétrera le milieu de culture (effet « d'auto ombrage ») et diminuera donc la quantité d'énergie lumineuse qui servira à produire l'hydrogène. Le graphique sur la production de gaz en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium donne des résultats similaires. En effet, plus la concentration d'ammonium est grande, moins le rendement est grand. L'effet observé ici n'est pas très lié à l'utilisation d'azote pour la croissance cellulaire (elle reste faible à toutes les concentrations), mais plutôt lié à la répression de la nitrogénase lorsque des ions ammoniums sont présents en solution. On peut donc conclure que le sulfate d'ammonium, même en très faible concentration, ne serait pas une bonne source d'azote pour une production à grande échelle parce qu'il supporte

très peu de croissance à basse concentration et qu'il inhibe la nitrogénase dans le cas contraire.

Les résultats obtenus avant la figure XVIII nous permettaient d'évaluer certaines tendances dans l'amélioration de la production d'hydrogène avec un milieu RCV supplémenté d'extrait de levure et de bicarbonate de soude et contenant du glycérol pur. Ces résultats ne sont donc pas indicatifs du rendement maximal atteignable avec un milieu RCV non supplémenté et du glycérol contaminé. La figure XVIII évalue la possibilité d'utilisation du glycérol contaminé provenant de la production de biodiesel avec du glutamate comme source de carbone. Le glycérol contaminé contient une certaine quantité de résidu du processus de transformation du biodiesel et contient de 75 à 80 % de glycérol pur. Les résultats démontrent bien que *R. palustris* est capable de photofermenter du glycérol contaminé pour produire de l'hydrogène.

Une fois que nous savions que *R. palustris* était en mesure de photofermenter le glycérol contaminé, nous voulions comparer le rendement de production de glycérol contaminé à celui du glycérol pur dans le cadre d'une même expérience. La figure XIX examine cet aspect. On peut remarquer que, à une concentration de glutamate donnée, le rendement de production du glycérol contaminé est sensiblement inférieur ou équivalent à celui du glycérol pur. Cette diminution peut vraisemblablement être associée à la partie non déterminée de la composition du glycérol contaminé. Une autre tendance que l'on peut observer est le fait qu'une concentration plus élevée de glutamate, donnera un rendement moins élevé, certes, mais atteindra plus rapidement la production maximale. Il y a donc un équilibre existant entre la vitesse de production de l'hydrogène, qui sera proportionnelle à la quantité de bactéries vivantes en suspension, et le rendement de production, qui suit la tendance inverse. Cela représente un facteur important dans une production à grande échelle. Certes, il faut que le rendement soit bon, mais il faut aussi considérer la vitesse de la production.

CONCLUSION

Afin d'étudier l'hydrogénase FeFe de *R. rubrum*, nous avons créé une construction qui mettait le gène de l'hydrogénase sous le contrôle du promoteur *nifH2*. Cette construction nous a permis de surexprimer *hydA* chez la souche UR206. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que l'expression concomitante des gènes de maturation serait nécessaire pour observer une augmentation dans la production d'hydrogène. Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en surexprimant *hydA* avec HydE, F et G de *D. vulgaris*, mais ces gènes de maturations ne semblent pas être en mesure de maturer une hydrogénase fonctionnelle. Cette construction devrait être réessayée avec les gènes de maturations de *R. rubrum* ou ceux d'une espèce se rapprochant davantage de cette dernière.

Dans le but d'étudier la production d'hydrogène par photofermentation à partir de glycérol dérivé de production de biodiesel, nous avons effectué diverses expériences pour évaluer les facteurs importants de cette production. Dans le cadre de ces études, nous avons pu conclure que la source d'azote est un facteur important du rendement, que la concentration de cette source aura un impact très grand sur le rendement, mais aussi sur la vitesse de production. Nous avons aussi pu conclure que cette utilisation du glycérol est très intéressante pour une production à grande échelle avec des rendements approchant 60-70 % de la production maximale. En conclusion, plusieurs recherches s'avèrent encore nécessaires afin d'étudier davantage la production d'hydrogène par photofermentation pour en améliorer le rendement. Notamment, des études sur l'effet du pH et de l'intensité lumineuse seraient de mise.

RÉFÉRENCES

1. 2006, posting date. Agriculture et agroalimentaire Canada. [Online.]
2. 2007, posting date. Department of Energy - Fossil Fuels. [Online.]
3. **Adams, M. W. W.** 1990. The structure and mechanism of [Fe]-hydrogenase. *Biophys Biochem Acta* **1020**:115-145.
4. **Anderson, E. H.** 1946. Growth requirement of virus-resistant mutants of *Escherichia coli* strain B. *Proc Natl Acad Sci USA* **32**:120-128.
5. **Basak, N., and D. Das.** 2007. The prospect of purple non-sulfur (PNS) photosynthetic bacteria for hydrogen production: the present state of the art. *World J Microbiol Biotechnol* **23**: 31–42.
6. **Ben-Shem, A., F. Frolow, and N. Nelson.** 2003. Crystal structure of plant Photosystem I. *Nature* **426**:630-635.
7. **Benemann, J. R.** 1997. Feasability analysis of photobiological hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy* **22**:979-987.
8. **Benemann, J. R., J. A. Berenson, N. O. Kaplan, and M. D. Kamen.** 1973. Hydrogen evolution by chloroplast-ferredoxin-hydrogenase system. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**:2317-2320
9. **Bockris, J.** 1981. The economics of Hydrogen as a fuel. *Int J Hydrogen Energy* **6**:223-241.
10. **Bondioli, P., and L. Della Bella.** 2005. An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur J Lipid Sci Technol* **107**:153–157.
11. **Brazzotto, X., J. K. Rubach, J. Gaillard, S. Gambarelli, M. Atta, and M. Fontecave.** 2006. The [Fe-Fe]-hydrogenase maturation protein HydF from *Thermotoga maritima* is a GTPase with an iron-sulfur cluster. *J Biol Chem* **281**:769-774.
12. **Calvin, M.** 1962. The path of carbon in photosynthesis. *Science* **135**:879-889.
13. **Cammack, R.** 1999. Hydrogenase sophistication. *Nature* **397**:214-215.

14. **Chen, J.-S., and L. E. Mortenson.** 1974. Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. *Biophys Biochem Acta* **37**:283-298.
15. **Das, D., D. Dutta, K. Nath, S. M. Kotay, A. K. Das, and T. N. Veziroglu.** 2006. Role of Fe-hydrogenase in biological hydrogen production. *Current Science* **90**:1627-1637.
16. **Das, D., and T. N. Veziroglu.** 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int J Hydrogen Energy* **26**:13-28.
17. **Doebbe, A., J. Rupprecht, J. Beckman, J. H. Mussnug, A. Hallmann, B. Hankamer, and O. Kruse.** 2007. Functional integration of the HUP1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii* : Impacts on biological H₂ production. *J Biotechnol* **131**:27-33.
18. **Dunn, S.** 2002. Perspectives towards a hydrogen future. *Cogeneration and on site Power Production* **3**:55-60.
19. **Dyer, J. K., and A. W. Anderson.** 1968. Isolation and Role of Nonheme Iron Protein in *Clostridium botulinum*. *Appl Microbiol* **16**:207-211.
20. **Eroglu, I., K. Aslan, U. Gunduz, M. Yucel, and L. Turker.** 1998. Continuous hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001, p. 143–151. *In* O. R. Zabrosky (ed.), *Biohydrogen*. Plenum press, London.
21. **Eroglu, I., K. Aslan, U. Gunduz, M. Yucel, and L. Turker.** 1999. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. *J Biotechnol* **70**:103-113.
22. **Fang, H., H. Liu, and T. Zhang.** 2005. Phototrophic hydrogen production from acetate and butyrate in wastewater. *Int J Hydrogen Energy* **30**:785-793.
23. **Ferreira, K. N., T. M. Iverson, K. B. Maghlaoui, J, and S. Iwata.** 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* **303**:1831-1838.
24. **Freedman, B., E. H. Pryde, and T. L. Mounts.** 1984. Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *J Am Oil Chem Soc* **61**:1638-1643.
25. **Garcin, E., X. Vernede, E. C. Hatchikian, A. Volbeda, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps.** 1999. The crystal structure of a reduced [Ni–Fe–Se] hydrogenase provides an image of the activated catalytic centre. *Struct Fold Des*:557-566.

26. **Gosse, J. L., J. B. Engel, F. E. Rey, C. S. Harwood, L. E. Scriven, and M. C. Flickinger.** 2007. Hydrogen Production by Photoreactive Nanoporous Latex Coatings of Nongrowing *Rhodospseudomonas palustris* CGA009. *Biotechnol Prog* **23**:124-130.
27. **Grunwald, S. K., D. P. Lies, G. P. Roberts, and P. W. Ludden.** 1995. Posttranslational regulation of nitrogenase in *Rhodospirillum rubrum* strains overexpressing the regulatory enzymes dinitrogenase reductase ADP-ribosyltransferase and dinitrogenase reductase activating glycohydrolase. *J Bacteriol* **177**:628-635.
28. **Hahn-Hägerdal, B., M. E. Himmel, C. Somerville, and C. Wyman.** 2008. Welcome to biotechnology for biofuels. *Biotechnol Biofuels* **1**:1.
29. **Hallenbeck, C. P., and J. R. Benemann.** 2002. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Int J Hydrogen Energy* **27**:1185 – 1193.
30. **Harry, M., V. Westen, G. M. Stephen, and C. Veeger.** 1978. Separation of hydrogenase from intact cells of *Desulfovibrio vulgaris* purification and properties. *FEBS Lett* **86**:122-126.
31. **Hillmer, P., and H. Gest.** 1977. H₂ metabolism in photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulatus*: H₂ production by growing cultures. *J Bacteriol* **129**:724-731.
32. **Johnston, J. A., and A. H. Brown.** 1954. The effect of light on the oxygen metabolism of the photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *Plant Physiology* **29**:177-182.
33. **Jordan, P., P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, and N. Krau.** 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial Photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**:909-917.
34. **Kamiya, N., and J. R. Shen.** 2003. Crystal structure of oxygen-evolving Photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**:98-103.
35. **Kim, E. J., M. S. Kim, and J. K. Lee.** 2007. Analyses of hydrogen evolution by *Rhodospirillum rubrum* Fe-only hydrogenase and formate-hydrogen lyase through their heterologous expression in *Rhodobacter sphaeroides*. Poster presentation. Korean Institute of Energy Research.
36. **King, P. W., M. C. Posewitz, M. L. Ghirardi, and M. Seibert.** 2006. Functional Studies of [FeFe] Hydrogenase Maturation in an *Escherichia coli* Biosynthetic System. *J Bacteriol* **188**:2163-2172.

37. **Kok, B.** 1973. Photosynthesis, Bio Solar Hydrogen Conversion Gibbs M, Hollaender MA, Kok B, Krampitz LO, San Pietro A., Bethesda, MD.
38. **Kothari, R., D. Buddhi, and R. L. Sawhney.** 2004. Sources and technology for hydrogen production: a review International Journal of Global Energy Issues **21**:154-178.
39. **Levin, D. B., L. Pitt, and M. Love.** 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int J Hydrogen Energy **29**:173-185.
40. **Livak, K. J., and T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2DDCT Method. Methods **25**:402-408.
41. **Ludden, P., and G. Robert.** 1995. The biochemistry and genetics of nitrogen fixation by photosynthetic bacteria, p. 929-947. In B. Blankenship, M. Madigan, and C. Bauer (ed.), Anoxygenic photosynthetic bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
42. **Maness, P. C., and P. F. Weaver.** 2001. Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. Appl Microbiol Biotechnol **57**:751-6.
43. **Mansure, J. J., and C. P. Hallenbeck.** 2008. *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough HydE and HydG interact with the HydA subunit of the [FeFe] hydrogenase. Biotechnol Lett. Biotechnol Lett. Pre-print.
44. **Melis, A.** 2006. Maximizing Light Utilization Efficiency and Hydrogen Production in Microalgal Cultures, p. 117-119. In U. S. D. o. Energy (ed.).
45. **Meyer, J.** 2007. [FeFe] hydrogenases and their evolution: a genomic perspective. Cell Mol Life Sci **64**:1063-1084.
46. **Momirlan, M., and T. N. Verizoglu.** 2002. Current status of hydrogen energy. Renewable and Sustainable Energy Reviews **6**:141-179
47. **Nagy, L. E., J. E. Meuser, S. Plummer, M. Seibert, M. L. Ghirardi, P. W. King, D. Ahmann, and M. C. Posewitz.** 2007. Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel [FeFe]-hydrogenase libraries. Biotechnol Lett **29**:421-430.
48. **Nath, K., and D. Das.** 2004. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. Appl Microbiol Biotechnol **65**:520-529.

49. **Nath, K., A. Kumar, and D. Das.** 2005. Hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* strain O.U.001 using spent media of *Enterobacter cloacae* strain DM11. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**:533-541.
50. **Neelis, M. L., H. J. van der Kooi, and J. J. C. Geerlings.** 2004. Exergetic life cycle analysis of hydrogen production and storage systems for automotive applications. *Int J Hydrogen Energy* **29**:537-545.
51. **Neilson, A. H., and S. Nordlund.** 1975. Regulation of nitrogenase in intact cells of *Rhodospirillum rubrum*: inactivation of nitrogen fixation by ammonia, L-glutamine and L-asparagine. *J Gen Microbiol* **91**:53-62.
52. **Oda, Y., S. K. Samanta, F. E. Rey, L. Wu, X. Liu, T. Yan, J. Zhou, and C. S. Harwood.** 2005. Functional Genomic Analysis of Three Nitrogenase Isozymes in the Photosynthetic Bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *J Bacteriol* **187**:7784-7794.
53. **Ooshima, H., S. Takakuwa, T. Katsuda, M. Okuda, T. Shirasawa, M. Azuma, and J. Kato.** 1998. Production of Hydrogen by a Hydrogenase deficient mutant of *Rhodobacter capsulatus*. *J Fermentation Bioeng* **85**:470-475.
54. **Posewitz, M. C., P. W. King, S. L. Smolinski, L. Zhang, M. Seibert, and M. L. Ghirardi.** 2004. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase. *J Biol Chem* **279**:25711 - 25720.
55. **Putz, S., P. Dolezal, G. Gelius-Dietrich, L. Bohacova, J. Tachezy, and K. Henze.** 2006. Fe-hydrogenase maturases in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*. *Eukaryot Cell* **5**:579-586.
56. **Roger, C. P., and S. K. Haroon.** 2005. The Photobiological Production of Hydrogen: Potential Efficiency and Effectiveness as a Renewable Fuel. *Critical Reviews in Microbiology* **31**:19-31.
57. **Rubach, J. K., X. Brazzolotto, J. Gaillard, and M. Fontecave.** 2005. Biochemical characterization of the HydE and HydG iron-only hydrogenase maturation enzymes from *Thermotoga maritima*. *FEBS Lett* **579**:5055-5060.
58. **Schultz, J. E., J. W. Gotto, P. F. Weaver, and D. C. YOCH.** 1985. Regulation of Nitrogen Fixation in *Rhodospirillum rubrum* Grown Under Dark, Fermentative Conditions. *J Bacteriol* **162**:1322-1324.
59. **Shi, X. Y., and H. Q. Yu.** 2005. Response surface analysis on the effect of cell concentration and light intensity on hydrogen production by *Rhodopseudomonas capsulatus*. *Process Biochem* **40**:2475-2481.

60. **Stroebel, D., Y. Choquet, J. L. Popot, and D. Picot.** 2003. An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature* **426**:413-418.
61. **Tanisho, S., N. Kamiya, and N. Wakao.** 1989. Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. *Biochem Biophys Acta* **973**:1-6.
62. **Uyar, B., I. Eroglu, M. Yücel, U. Gündüz, L. Türker, and d.** [10.1016/j.ijhydene.2007.07.002](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.002). 2007. Effect of light intensity, wavelength and illumination protocol on hydrogen production in photobioreactors. *Int J Hydrogen Energy* doi: [10.1016/j.ijhydene.2007.07.002](https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.07.002).
63. **Vignais, P. M., B. Billoud, and J. Meyer.** 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol*:455-501.
64. **You-Kwan, O., S. Eun-Hee, K. Mi-Sun, and P. Sunghoon.** 2004. Photoproduction of hydrogen from acetate by a chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4. *Int J Hydrogen Energy* **29**:1115-1121.
65. **Zhua, H., H. H. P. Fang, T. Zhang, and L. A. Beaudette.** 2007. Effect of ferrous ion on photo heterotrophic hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*. *Int J Hydrogen Energy*.
66. **Zouni, A., H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger, and P. Orth.** 2001. Crystal structure of Photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* **409**:739-743.