



## Les aspects catalytiques de la production biotechnologique de l'hydrogène

Yvain Nicolet et Juan C. Fontecilla-Camps

### Summary Catalytic aspects of the bioproduction of hydrogen

It has been known for about a century that hydrogen can be metabolized by microorganisms. We know now that that enzymatic activity is mediated by NiFe and Fe-only hydrogenases, two different classes of metalloproteins. A surprising feature of the active sites of these enzymes, as shown by X-ray crystallography, is the common presence of an Fe center with a biologically unprecedented coordination by carbon monoxide and cyanide. The two unrelated proteins also display other convergent features such as channels connecting the molecular surface to the active site and a series of three FeS redox centers that transfer electrons from and to the active site. These centers are equally spaced in the two molecules and, again, they connect the active site to the molecular surface.

Our efforts are focused on a better understanding of the active site architecture and function that may become a source of inspiration for the design of improved and cheaper hydrogen catalysts, like the ones used in fuel cells. For instance, the CO, CN Fe coordination mentioned above, may modify the chemical properties of the Fe center, making it more similar to far more expensive transition metals, such as Pt, Pd and Ru.

**Mots-clefs** Cristallographie aux rayons X, catalysts, hydrogénase, monoxyde de carbone, cyanure.

**Key-words** X-ray crystallography, catalysts hydrogenase, carbon monoxide, cyanide.

Depuis un siècle environ, les biologistes connaissent l'existence de microorganismes capables de produire de l'hydrogène gazeux sous l'action de la lumière. Néanmoins, ce n'est qu'à partir des années 1970, et plus précisément du premier choc pétrolier, que le besoin s'est fait sentir de trouver de nouvelles sources d'énergie. L'intérêt s'est alors porté, entre autres, sur l'hydrogène et ses divers moyens potentiels de production ou consommation. Les systèmes naturels ont ainsi retenu l'attention des chercheurs, afin de comprendre leur fonctionnement et éventuellement de les mimer ou les adapter à l'utilisation industrielle de l'hydrogène. C'est dans ce cadre que se situent nos études sur les enzymes, appelées hydrogénases, capables de réaliser la réaction réversible d'oxydation de l'hydrogène moléculaire. Ces protéines se divisent en deux grandes familles définies à partir de leur contenu métallique : les hydrogénases contenant du nickel, appelées hydrogénases à nickel-fer et plutôt impliquées dans la consommation de l'hydrogène, et celles n'en contenant pas, les hydrogénases à fer seul, plutôt productrices d'hydrogène. Ces deux classes se différencient en outre par leurs propriétés catalytiques, ainsi que leurs séquences en acides aminés et donc leurs structures tridimensionnelles. En effet, les hydrogénases à fer sont beaucoup plus actives que les hydrogénases à nickel-fer, tant pour la production que la consommation de l'hydrogène. En revanche, elles sont bien plus sensibles aux inhibiteurs comme le monoxyde de carbone ou l'oxygène. En revanche, il semblerait qu'elles aient une affinité beaucoup plus faible pour leur substrat.

Cette différence est peut-être en rapport avec l'abondance relative d'hydrogène au cours des ères géologiques : initialement ce gaz était présent en quantité relativement importante, mais il est devenu plus rare avec, par exemple, la diminution de l'activité volcanique. Ainsi, les hydrogénases à fer, très efficaces en présence d'une concentration élevée d'hydrogène, seraient apparues avant les enzymes à nickel-fer, qui possèdent une très bonne affinité pour ce gaz et peuvent fonctionner en présence de très faibles concentrations de celui-ci.

### Les hydrogénases à nickel-fer

La première structure moléculaire d'une hydrogénase a été obtenue en 1995, dans notre laboratoire, à l'Institut de Biologie Structurale à Grenoble. Cette structure correspondait à un état oxydé inactif de l'hydrogénase à nickel-fer issue de la bactérie réductrice de sulfate *Desulfovibrio gigas* (figure 1). La détermination de ce modèle à l'échelle atomique a permis de voir pour la première fois le site actif d'une hydrogénase. Il est apparu que ce site actif était bien plus complexe que prévu et se trouve profondément enfoui au cœur de la protéine, à environ 30 Å (1 Å = 10<sup>-10</sup> m) de tout point de la surface. Il est constitué de deux atomes métalliques identifiés comme un atome de nickel et un atome de fer (figure 2). L'atome de nickel est lié à quatre atomes de soufre appartenant à des acides aminés cystéines, constituants de la protéine. Deux d'entre eux sont aussi liés à l'atome de fer. Ce dernier possède trois autres ligands diatomiques qui présentaient des densités électroniques allongées et qui ont été

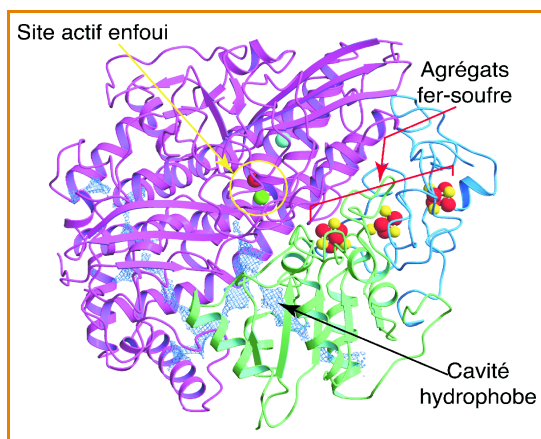


Figure 1 - **Structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à nickel-fer de la bactérie *Desulfovibrio gigas*.** La structure est représentée de façon simplifiée par un modèle en rubans correspondant à sa chaîne principale. Il est possible de remarquer la localisation du site actif enfoui au cœur de la protéine, ainsi que les agrégats fer-soufre dont les atomes sont représentés par des sphères. Les cavités hydrophobes sont représentées par une grille bleue.

caractérisés par spectroscopie infrarouge comme une molécule de monoxyde de carbone et deux ions cyanures. La présence de tels ligands au sein d'une protéine est sans précédent en biologie et semble avoir un rapport avec la fonction de ces enzymes. Enfin, dans cette forme oxydée inactive, un quatrième ligand non protéique a été identifié comme étant une espèce oxo, grâce notamment à des analyses spectroscopiques. Des études structurales ultérieures, sur l'enzyme activée et réduite, ont montré la disparition de ce ligand. Le site ainsi libéré entre les deux métaux est supposé correspondre au site de fixation de l'hydrogène. La connaissance de la structure tridimensionnelle du site actif des hydrogénases à nickel-fer dans différents états d'oxydo-réduction a permis d'approfondir les analyses spectroscopiques et de réaliser des modélisations, de façon à essayer de comprendre le mécanisme réactionnel de ces enzymes. Une des questions qui s'est posée était de savoir comment l'hydrogène peut-il accéder à ce site actif enfoui. Une analyse topologique a permis de mettre en évidence l'existence des grandes cavités hydrophobes assurant le lien entre le site actif et la surface de la protéine. Une étude cristallographique où du xénon (gaz très riche en électrons) a été diffusé sous pression dans les cristaux, a révélé que les atomes de gaz, mimant l'hydrogène, se fixent spécifiquement dans ces canaux d'accès. De plus, une modélisation par des calculs de dynamique moléculaire suggère que ces canaux pourraient être utilisés de manière

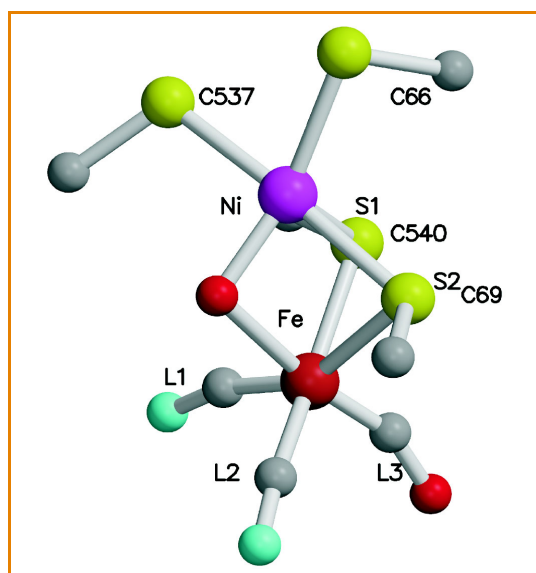


Figure 2 - **Site actif de l'hydrogénase à nickel-fer à l'état oxydé inactif, isolée à partir de la bactérie *Desulfovibrio fructosovorans*.** Les ligands L1 et L2 correspondent chacun à un ion cyanure et L3 à une molécule de monoxyde de carbone. Les ligands C66, C69, C537 et C540 correspondent à des acides aminés cystéine. S1 et S2 représentent les atomes de soufre.

exclusive pour transférer, voire stocker, l'hydrogène du site actif vers la surface ou inversement (figure 1).

## Les hydrogénases à fer

Les hydrogénases à fer, plus petites, ont quant à elles, été beaucoup moins étudiées. Les premières structures cristallographiques ont été résolues concomitamment par une équipe américaine et par nos soins à la fin de l'année 1998. Les aspects qui ont été plus particulièrement abordés sont : la structure du site actif et du possible site de fixation de l'hydrogène ainsi que la comparaison entre les deux familles d'hydrogénases. L'analyse de la structure de l'hydrogénase à fer issue de la bactérie réductrice de sulfate *Desulfovibrio desulfuricans*, résolue à Grenoble (figure 3), a permis d'avoir, pour la première fois, une image du site actif de ce type d'hydrogénase. Celui-ci correspond à un centre fer-soufre d'un type tout à fait nouveau en biologie (figure 4) et se trouve, comme chez les hydrogénases à nickel-fer, profondément enfoui au cœur de la protéine. Il est constitué de deux atomes de fer reliés entre eux par une petite molécule non protéique, modélisée, à partir de la densité électronique et de son environnement structural, comme une dithiométhylamine (figure 4). Chaque atome de fer est lié à deux ligand diatomiques, identifiés par



# PRODUCTION

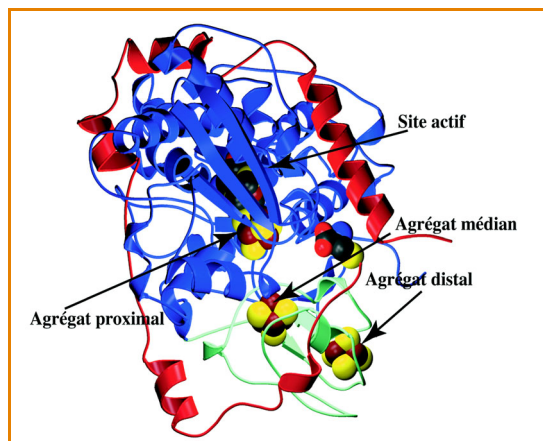


Figure 3 - Structure tridimensionnelle de l'hydrogénase à fer de la bactérie *Desulfovibrio desulfuricans*. La protéine est composée de deux sous unités représentées en bleu et en rouge. Comme pour les hydrogénases à nickel-fer (figure 1), le site actif est enfoui au cœur de la protéine. Les atomes de fer et de soufre, regroupés en agrégats, sont représentés par des sphères colorées en brun et jaune respectivement.

spectroscopie infrarouge comme une molécule de monoxyde de carbone et un ion cyanure. Il existe aussi un ligand diatomique pontant les deux atomes de fer, correspondant à une molécule de monoxyde de carbone supplémentaire. La présence de ces ligands diatomiques est donc une caractéristique

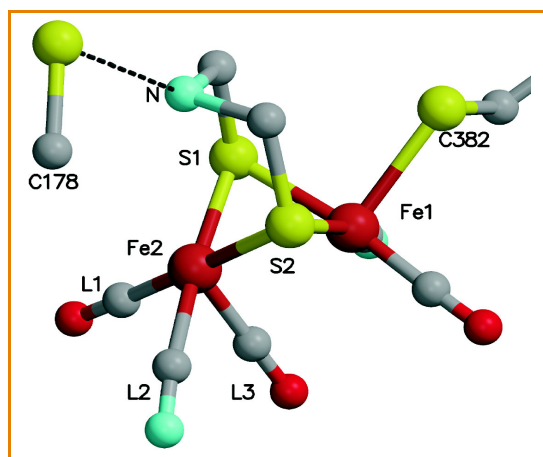


Figure 4 - Site actif dans l'état réduit de l'hydrogénase à fer issue de la bactérie *Desulfovibrio desulfuricans*. Les ligands de l'atome de fer Fe2, L1 et L3 correspondent chacun à une molécule de monoxyde de carbone, L2 correspond à un ion cyanure. Les mêmes types de ligands sont associés à l'atome de fer Fe1. Une petite molécule, modélisée comme une dithiométhylamine (N), relie les deux atomes de fer Fe1 et Fe2 grâce aux atomes de soufre S1 et S2. C382 représente la cystéine qui établit la seule liaison covalente entre ce site actif et le reste de la protéine.

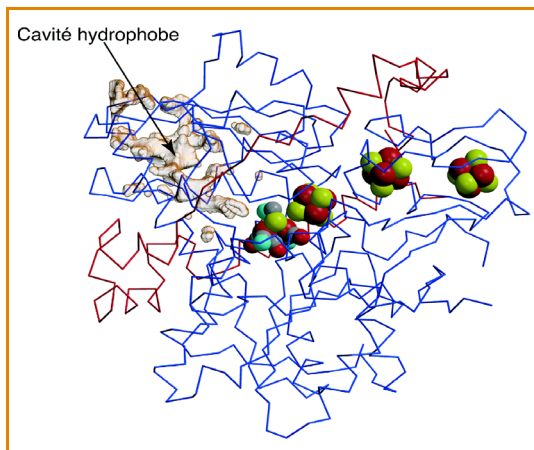


Figure 5 - Cavité hydrophobe reliant la surface de la protéine au site actif, dans le cas de l'hydrogénase à fer de la bactérie *Desulfovibrio desulfuricans*.

spécifique des hydrogénases. Un des atomes de fer (Fe1) est aussi lié à un atome de soufre d'une cystéine. Cette liaison est la seule liaison covalente qui relie le site actif à la protéine. Cette observation suggère que ce site actif proviendrait d'une molécule organométallique ancestrale, incorporée d'un seul bloc au sein d'une structure protéique, au cours de l'évolution. L'autre atome de fer (Fe2) présente, quant à lui, un site de coordination vacant, susceptible d'être le site de fixation de l'hydrogène moléculaire. L'étude topologique, coordonnée à une analyse cristallographique utilisant la diffusion de xénon sous pression dans les cristaux, a montré l'existence, comme pour les hydrogénases à nickel-fer, d'un canal hydrophobe reliant la surface de la protéine au site actif enfoui (figure 5). Ce canal débouche sur le site de coordination vacant du Fe2, ce qui semble confirmer son rôle de site de fixation de l'hydrogène moléculaire. Ces résultats sont confortés par l'analyse de la structure de la protéine en présence du monoxyde de carbone. En effet, ce dernier est un inhibiteur compétitif de l'enzyme et se fixe sur le site vacant du Fe2. L'analyse du site actif des hydrogénases à fer a aussi permis de proposer un mécanisme de coupure hétérolytique de l'hydrogène moléculaire, faisant intervenir l'atome d'azote central de la dithiométhylamine. De plus, l'analyse de différents états d'oxydoréduction de l'enzyme a révélé un mouvement du ligand monoxyde de carbone, pontant les deux atomes de fer qui, lors de la réduction de la protéine, quitte sa position symétrique entre les deux ions métalliques pour occuper une position terminale, lié à l'atome de Fe2 (figure 6).

Enfin, l'analyse de la structure tridimensionnelle des deux hydrogénases à fer résolues, combinée à

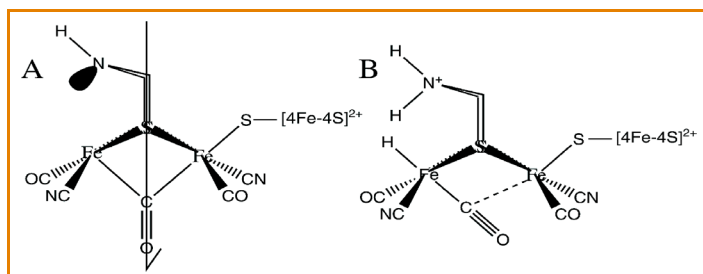


Figure 6 - Représentation du site actif des hydrogénases à fer dans l'état oxydé (A) avec le CO pontant les deux atomes de fer en position symétrique, et dans l'état réduit (B). Lors de la réduction, ce ligand se trouve lié uniquement à l'atome de fer Fe2 (figure 4).

une analyse de toutes les séquences en acides aminés disponibles, a permis de mettre en évidence un chemin reliant le site actif à la surface, pour l'accès ou l'évacuation des protons. Tous ces résultats sont très prometteurs quant à la compréhension du mécanisme réactionnel des hydrogénases à fer. En outre, l'obtention des structures des sites actifs des deux classes d'hydrogénases permet une analyse comparée de deux solutions naturelles à l'oxydation réversible de l'hydrogène moléculaire.

## Comparaison des deux familles d'hydrogénases

Les deux familles d'hydrogénases ne présentent aucune homologie, ni pour leurs séquences en acides aminés, ni pour leurs structures tridimensionnelles. Néanmoins, nous pouvons noter quelques fortes ressemblances. Et, étant donné qu'elles ont la même activité catalytique, toute analogie entre les deux enzymes peut être considérée comme importante pour cette fonction. Ainsi, les deux classes d'enzymes possèdent un site actif enfoui au cœur de la protéine et possèdent des canaux hydrophobes spécifiques pour l'accès de l'hydrogène à ce site actif. Elles présentent toutes deux des centres fer-soufre disposés entre le site actif et la surface pour assurer le transfert des électrons. En outre, les sites actifs, en apparence différents, présentent de fortes similitudes. En effet, les deux classes d'hydrogénases sont les seules enzymes connues à posséder des ligands de type monoxyde de carbone ou cyanure. La présence de tels ligands, par ailleurs toxiques, n'est pas le fruit du hasard. Ce type de ligands permet de favoriser la forme réduite de l'atome de fer et confère à cet ion des propriétés proches de celles de métaux de transition plus riches en électrons comme le platine ou le palladium. Cette caractéristique du site actif

peut être reliée à la fixation et/ou à la catalyse de l'hydrogène. Enfin, les atomes de fer des sites actifs des deux classes d'hydrogénases présentent la même sphère de coordination : deux soufre de ligands thiolates, trois ligands diatomiques (cyanure ou monoxyde de carbone) et un site vacant lorsque l'enzyme est active. Cette ressemblance suggère une similarité dans les mécanismes réactionnels.

L'étude des hydrogénases permet donc d'espérer comprendre les solutions naturelles pour réaliser les réactions de consommation ou de production de l'hydrogène. Il semble ainsi possible, à partir de ces résultats, d'élaborer des composés biomimétiques, reprenant les caractéristiques indispensables aux protéines et donc de créer des catalyseurs capables de réaliser les réactions qui nous intéressent. Dans ce cadre, les hydrogénases à fer semblent de meilleurs candidats puisque le site actif est assez indépendant de la structure protéique qui l'entoure. Déjà, des chimistes ont commencé à élaborer des composés imitant ce site actif et espèrent bientôt concevoir, sur la base de ces travaux, un composé bon marché capable de cliver ou produire de l'hydrogène sans faire appel à des métaux chers et rares. De là, il n'y a qu'un pas pour imaginer qu'un jour, de telles molécules trouveront place dans le moteur de nos voitures.

## Bibliographie

- Adams M.W., The structure and mechanism of iron-hydrogenases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1990**, 1020, p. 115-145.
- Nicolet Y., Lemon B.J., Fontecilla-Camps J.C., Peters J.W., A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases, *Trends Biochem. Sci.*, **2000**, 25, p. 138-43.
- Volbeda A., Charon M.-H., Piras C., Hatchikian E.C., Frey M., Fontecilla-Camps J.C., Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Nature (London)*, **1995**, 373, p. 580-587.



Y. Nicolet

### Yvain Nicolet

est stagiaire post-doctoral au laboratoire de cristallographie et de cristallogénèse des protéines à l'Institut de Biologie Structurale « Jean-Pierre Ebel » de Grenoble\*.



J.C. Fontecilla-Camps

### Juan C. Fontecilla-Camps

dirige ce même laboratoire\*.

\* CEA/CNRS, 41 rue Jules Horowitz, 38027 Grenoble Cedex 1.

Tél. : 04 38 78 59 20. Fax : 04 38 78 51 22.

E-mail : juan.fontecilla@ibs.fr