



SPF Economie, PME, Classes
Moyennes & Energie
Office de la Propriété intellectuelle

(11) 1027221 B1

(47) Date de délivrance : 18/11/2020

(12) BREVET D'INVENTION BELGE

(47) Date de publication : 18/11/2020

(21) Numéro de demande : BE2019/5783

(22) Date de dépôt : 13/11/2019

(62) Divisé de la demande de base :

(62) Date de dépôt demande de base :

(51) Classification internationale : C12N 9/00, C12N 9/02, C12P 3/00

(30) Données de priorité :

(73) Titulaire(s) :

H2WIN S.A.

1400, NIVELLES
Belgique

(72) Inventeur(s) :

GODAUX Damien

4000 LIEGE
Belgique

LORGE Philippe

1400 NIVELLES
Belgique

GHYSELS Bart

1020 LAEKEN
Belgique

JOB Nathalie

4051 VAUX-SOUS-CHÈVREMONT
Belgique

FRANCK Fabrice

4000 LIÈGE
Belgique

CALDARELLA Giuseppe

4430 ANS
Belgique

CARDOL Pierre

4800 VERVIERS
Belgique

REMACLE Claire

(54) Polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase, en particulier polypeptide monomérique recombinant présentant une activité hydrogénase

(57) La présente invention porte sur un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.

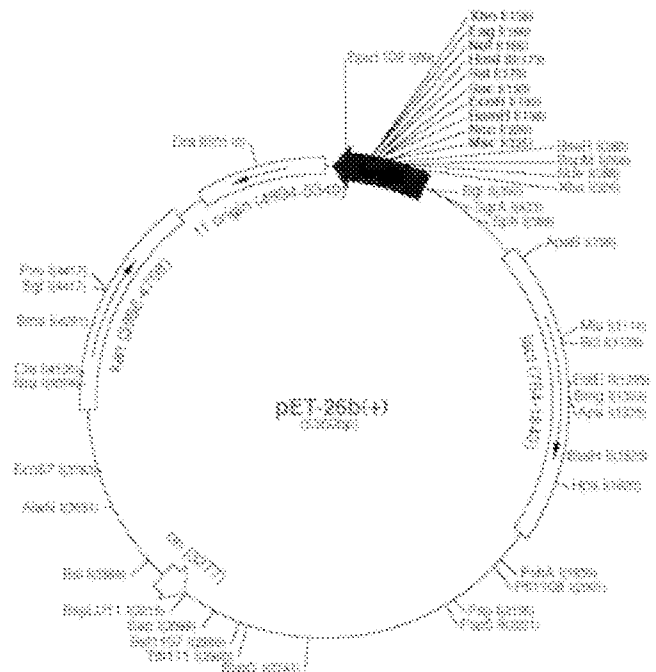


FIGURE 1

Polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase, en particulier polypeptide monomérique recombinant présentant une activité hydrogénase

5

La présente invention porte sur un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase, en particulier sur un polypeptide monomérique recombinant présentant une activité hydrogénase, sur une cellule hôte incluant ce polypeptide monomérique et sur une cellule hôte incluant un polynucléotide codant pour ce polypeptide monomérique. La présente invention porte également sur un procédé d'obtention d'un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase, en particulier sur un procédé d'obtention d'un polypeptide monomérique recombinant présentant une activité hydrogénase et sur l'utilisation d'un tel polypeptide monomérique, en particulier sur l'utilisation d'un tel polypeptide monomérique recombinant.

15

La disponibilité décroissante de sources d'énergie fossile et la crainte d'un changement climatique dramatique ont favorisé l'émergence de technologies propres et renouvelables. L'hydrogène (H₂) est considéré comme un vecteur d'énergie renouvelable prometteur en raison de sa forte teneur en énergie et de l'absence de pollution lors de son utilisation dans les piles à combustible. La production d'H₂ est actuellement réalisée par extraction chimique d'hydrocarbures fossiles, électrolyse de l'eau ou pyrolyse de biomasse. Cependant, le manque de systèmes de production à la fois non-polluants et commercialement viables est une limitation majeure. L'utilisation de méthodes de production biotechnologique d'H₂, aussi appelé bio-hydrogène, pourrait être une solution. Le nombre de recherches sur la production de bio-hydrogène a considérablement augmenté au cours de la dernière décennie. Cela inclut la production microbienne principalement par le processus de la fermentation dans les bactéries et de la photosynthèse dans les microalgues, mais aussi la génération enzymatique d'hydrogène par « électro-enzymologie ». Toutes ces méthodes reposent sur des enzymes particulières appelées hydrogénases.

25

30

Les hydrogénases sont des métallo-enzymes qui catalysent la réaction chimique : $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$. La réaction est réversible et sa direction

dépend du potentiel redox des composants capables d'interagir avec l'enzyme. En présence d'H₂ et d'un accepteur d'électrons, une hydrogénase consomme l'hydrogène. En présence d'un donneur d'électrons de faible potentiel, une hydrogénase utilise des protons comme accepteurs d'électrons et produit de l'H₂.

5 Les hydrogénases sont largement répandues parmi les microorganismes car nombre d'entre eux utilisent l'hydrogène comme vecteur ou source d'énergie. Ces enzymes comptent de nombreux représentants dans le domaine des bactéries et des archées et sont également présentes dans certains organismes eucaryotes unicellulaires. Malgré leur diversité à bien des égards (hôte, taille,
10 structure quaternaire, donneurs ou accepteurs d'électrons), les hydrogénases sont divisées en trois classes phylogénétiquement distinctes : les [Fe]-hydrogénases, les [FeFe]-hydrogénases et les [NiFe]-hydrogénases. Chaque classe est caractérisée par une composition métallique distinctive du site actif. Physiologiquement, il a été démontré que ces enzymes fonctionnent comme une
15 valve pour un excès d'électrons.

Le centre catalytique des [Fe]-hydrogénases ne contient aucun centre FeS ou Ni et a donc été nommé « hydrogénase libre de centre fer-soufre » ou [Fe]-hydrogénases (Shima and Thauer. 2007. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. Chem Rec 7:37-46). Les [Fe]-hydrogénases sont
20 limitées à certains microorganismes méthanogènes (Pilak et al. 2006. The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase. J Mol Biol 358:798-809) où elles sont essentielles à la croissance lors d'une carence en nickel (Thauer. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. Microbiology 144 (Pt
25 9):2377-2406). Associé à un cofacteur spécifique, ces enzymes ont des propriétés catalytiques très différentes des autres types d'hydrogénases. En effet, elles ne catalysent pas la réaction réversible de production d'H₂ (Vignais and Billoud. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. Chem Rev 107:4206-4272). Pour cette raison, ainsi
30 que par leur faible distribution, cette classe d'hydrogénases a été peu étudiée. La grande majorité des hydrogénases connues appartiennent aux deux autres classes.

Les [FeFe]-hydrogénases sont des enzymes monomériques dont le centre catalytique est hautement conservé. Il s'agit d'un site de fer bi-nucléaire lié à un centre [4Fe-4S] par un pont de cystéine. Les ligands non protéiques, le cyanure (CN) et le monoxyde de carbone (CO), sont liés aux atomes de fer du centre bi-nucléaire. Les atomes de fer partagent également deux ligands soufre (Nicolet et al. 2000. A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. Trends Biochem Sci 25:138-143, Nicolet et al. 2002. Fe-only hydrogenases: structure, function and evolution. J Inorg Biochem 91:1-8). Des domaines supplémentaires hébergent plusieurs centres FeS et assurent le transfert d'électrons entre la source d'électrons externe et le site actif intégré dans ces protéines monomériques. De plus, un canal hydrophobe relie la surface au site actif et fournit un accès pour les protons et une sortie pour les molécules d'H₂. Trois protéines chaperonnes nommées HydE, HydF et HydG sont connues comme nécessaires à l'assemblage correct des [FeFe]-hydrogénases (Vignais et al. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol Rev 25:455-501). Ces enzymes sont présentes dans les procaryotes anaérobies (genres *Clostridium* ou *Desulfovibrio*), mais aussi dans quelques eucaryotes inférieurs tels que les champignons anaérobies ou les microalgues unicellulaires (genres *Chlorella* ou *Chlamydomonas*) (Vignais and Billoud. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. Chem Rev 107:4206-4272). Les [FeFe]-hydrogénases favorisent thermodynamiquement la réoxydation du cofacteur (ferrédoxine ou NADH) et génèrent ainsi de l'H₂. Ces enzymes sont donc généralement impliquées dans l'élimination d'un excès de pouvoir redox dans la cellule afin d'éviter, par exemple, un arrêt de la fermentation. Elles sont également capables d'interagir avec la chaîne photosynthétique d'un groupe restreint de microalgues pour oxyder la chaîne photosynthétique et ainsi activer la fixation du carbone après une incubation anoxique (Ghysels et al. 2013. Function of the chloroplast hydrogenase in the microalga *Chlamydomonas*: the role of hydrogenase and state transitions during photosynthetic activation in anaerobiosis. PLoS One 8:e64161, Godaux et al. 2015. Induction of Photosynthetic Carbon Fixation in Anoxia Relies on Hydrogenase Activity and Proton-Gradient Regulation-Like1-Mediated Cyclic Electron Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol 168:648-658).

Les [NiFe]-hydrogénases forment des hétéro-multimères globulaires (Volbeda et al. 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373:580-587). Le site actif bi-métallique [NiFe] est situé dans la grande sous-unité où il est coordonné par quatre cystéines et
5 trois ligands non protéiques, une molécule de CO et deux CN, liés à l'atome de fer (Happe et al. 1997. Biological activation of hydrogen. *Nature* 385:126, Pierik et al. 1999. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. *NiFe(CN)₂CO*, Biology's way to activate H₂. *J Biol Chem* 274:3331-3337). Les autres sous-unités de l'hétéro-multimère contiennent
10 plusieurs centres FeS médiaux et distaux, qui conduisent les électrons entre le site actif et le donneur ou l'accepteur d'électrons physiologique. Le groupe [4Fe-4S] situé à proximité du site actif est considéré comme essentiel à l'activité (Albracht. 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim Biophys Acta* 1188:167-204). En plus des gènes structurels, il existe plusieurs
15 gènes accessoires impliqués dans la maturation et l'insertion de Ni, Fe, CO et CN dans le site actif de ces hétéro-multimères. En effet, la maturation des [NiFe]-hydrogénases suit une voie complexe impliquant au moins sept protéines auxiliaires (HypA-F et une endopeptidase) (Vignais and Billoud. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview.
20 *Chem Rev* 107:4206-4272). Une autre caractéristique du site actif des [NiFe]-hydrogénases est la forte affinité pour l'hydrogène. Ces enzymes agissent donc principalement en consommant l'H₂ chez le micro-organisme hôte, même si certaines [NiFe]-hydrogénases présentent une bonne capacité de production d'hydrogène. Les [NiFe]-hydrogénases sont des enzymes assez répandues
25 parmi les procaryotes avec de nombreux représentants chez les bactéries et les archées. La classification des [NiFe]-hydrogénases est basée sur les alignements de séquences en acides aminés des différentes sous-unités et divise les [NiFe]-hydrogénases en quatre groupes. Remarquablement, cette classification est en bon accord avec les groupes dérivés des fonctions
30 physiologiques (Vignais and Billoud. 2007. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chem Rev* 107:4206-4272).

L'extrême sensibilité des hydrogénases à l'oxygène aussi bien *in vitro* que *in vivo* est un problème lorsque l'on considère ces enzymes pour la

production d'hydrogène à un niveau industriel. L'oxygène se lie en tant que ligand au site actif, accepte les électrons et est réduit en espèce réactive de l'oxygène (ROS) piégée dans l'enzyme. Cela peut entraîner des dommages permanents lorsque le ROS survit suffisamment longtemps pour attaquer le centre catalytique vulnérable. Les [FeFe]-hydrogénases présentent une sensibilité grave à l'O₂ car l'enzyme est endommagée de manière irréversible après une exposition à de petites concentrations d'O₂ (Ghirardi et al. 1997. Oxygen sensitivity of algal H₂-production. Appl Biochem Biotechnol 63-65:141-151). Cependant, les [NiFe]-hydrogénases sont décrites comme étant plus résistantes que les [FeFe]-hydrogénases aux dommages causés par l'oxygène. De plus, les [NiFe]-hydrogénases sont inactivées de manière réversible par l'O₂. Certains micro-organismes, tels que *Ralstonia sp.*, ont même développé un site actif tolérant à l'oxygène, et sont capables d'oxyder l'hydrogène même en présence d'air (Van der Linden et al. 2004. The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. J Biol Inorg Chem 9:616-626). Ces diverses caractéristiques font des [NiFe]-hydrogénases de meilleurs candidats pour une utilisation technologique industriellement viable.

HoxEFUYH est une [NiFe]-hydrogénase bien caractérisée présente chez la cyanobactérie *Synéchocystis sp.* PCC6803. HoxEFUYH est une [NiFe]-hydrogénase pentamérique et cytoplasmique. HoxY et HoxH forment la partie « hydrogénase » tandis que HoxE, HoxF et HoxU constituent la partie en contact avec le cofacteur redox (Carrieri et al. 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour Technol 102:8368-8377). HoxH est la sous-unité responsable de l'activité catalytique, c'est-à-dire la sous-unité comprenant le site actif de la [NiFe]-hydrogénase. HoxH contient les résidus conservés pour la liaison des atomes de nickel et de fer. HoxY contient le groupe proximal [4Fe-4S] prèRs du centre catalytique NiFe. HoxF et HoxU sont des protéines de type fer-soufre responsables de l'interaction *in vivo* avec le substrat (NADH, flavodoxine ou ferrédoxine réduite). HoxFU contiennent les centres FeS médiaux et distaux transportant les électrons vers HoxYH. La fonction de HoxE n'est pas claire, mais il peut s'agir d'une sous-unité d'ancrage dans la membrane. Une analyse mutationnelle de la voie de maturation a identifié sept facteurs de

maturation essentiels, appelés HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW (Hoffmann et al. 2006. Mutagenesis of hydrogenase accessory genes of *Synechocystis* sp. PCC 6803. Additional homologues of hypA and hypB are not active in hydrogenase maturation. FEBS J 273:4516-4527). Un modèle de

5 maturation de HoxEFUYH a été proposé (Carrieri et al. 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour Technol 102:8368-8377, Cassier-Chauvat et al. 2014. Advances in the function and regulation of hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Int J Mol Sci 15:19938-19951). Au cours de l'assemblage de HoxHY, la sous-unité HoxH est

10 traitée par la protéase spécifique HoxW, puis le site [Ni-Fe] est ajouté à la sous-unité catalytique par le complexe HypABCDEF. Le génome complet de *Synechocystis* sp. PCC6803 a été séquencé. Les gènes *HoxEFUYH* ont été identifiés comme étant regroupés dans un opéron octacistronique, contrairement aux gènes *hypABCDEF* dispersés dans le chromosome de *Synechocystis*. Le

15 promoteur de l'opéron *hoxEFUYH* n'est pas très actif (Dutheil et al. 2012. The AbrB2 autorepressor, expressed from an atypical promoter, represses the hydrogenase operon to regulate hydrogen production in *Synechocystis* strain PCC6803. J Bacteriol 194:5423-5433). Il est régulé par diverses conditions environnementales, telles que les disponibilités en hydrogène, en lumière, en

20 nitrates, en nickel, en oxygène ou en soufre (Oliveira and Lindblad. 2009. Transcriptional regulation of the cyanobacterial bidirectional Hox-hydrogenase. Dalton Trans 9990-9996). Il est important de noter que les gènes *hox* sont exprimés de manière constitutive en présence d'oxygène (Kiss et al. 2009. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium

25 *Synechocystis* 6803. J Biotechnol 142:31-37), mais que l'enzyme, sensible à l'oxygène, est par conséquent inactive en conditions aérobies. La fonction physiologique précise fait encore l'objet de débats, mais HoxEFUYH fonctionnerait comme une valve de sécurité qui dissipe l'excès d'électrons en conditions redox défavorables, maintenant ainsi une balance oxydation/réduction

30 adéquate dans la cellule pendant la fermentation ou la photosynthèse (Carrieri et al. 2011. The role of the bidirectional hydrogenase in cyanobacteria. Bioresour Technol 102:8368-8377).

Il existe un grand nombre d'études sur HoxEFUYH. De nombreuses caractéristiques font de cette enzyme un bon candidat pour la production de biohydrogène. Premièrement, cette [NiFe]-hydrogénase présente un biais en faveur de la réduction des protons (McIntosh et al. 2011. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. J Am Chem Soc 133:11308-11319). L'opéron, et par conséquent l'enzyme, sont faiblement exprimés dans *Synechocystis* sp. PCC6803 en condition aérobie (Kiss et al. 2009. Transcriptional regulation of the bidirectional hydrogenase in the cyanobacterium *Synechocystis* 6803. J Biotechnol 142:31-37). L'inactivation de HoxEFUYH en présence d'oxygène est totale et presque instantanée. Cependant, HoxEFUYH peut être réactivé rapidement (délais de l'ordre de la minute) en condition redox (par exemple par réduction avec de l'hydrogène et/ou par élimination de l'oxygène) (Appel et al. 2000. The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. Arch Microbiol 173:333-338, Germer et al. 2009. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol Chem 284:36462-36472, McIntosh et al. 2011. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. J Am Chem Soc 133:11308-11319). Plusieurs protocoles de purification sont disponibles (Schmitz et al. 2002. HoxE--a subunit specific for the pentameric bidirectional hydrogenase complex (HoxEFUYH) of cyanobacteria. Biochim Biophys Acta 1554:66-74, Germer et al. 2009. Overexpression, isolation, and spectroscopic characterization of the bidirectional [NiFe] hydrogenase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. J Biol Chem 284:36462-36472) et de mise en œuvre en électrochimie (McIntosh et al. 2011. The [NiFe]-hydrogenase of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 works bidirectionally with a bias to H₂ production. J Am Chem Soc 133:11308-11319). La possibilité de catalyser efficacement la production d'hydrogène, et avec une sensibilité limitée à l'oxygène, a permis à HoxEFUYH d'être identifié comme un bon candidat.

Un procédé commun et efficace pour produire une grande quantité d'une protéine d'intérêt est la production recombinante de cette protéine au sein d'un hôte hétérologue. Ce processus biotechnologique implique l'introduction et

l'expression de gènes d'intérêts dans le génome de l'organisme hôte afin de produire une grande quantité de la protéine d'intérêt, avec un excellent degré de pureté. Il existe plusieurs systèmes de production recombinants. Le système procaryote reste le système le plus rapide et le plus facile afin de produire une

5 protéine d'intérêt, le système eucaryote étant plus lent et plus compliqué à mettre en œuvre. Chaque organisme a ses propres avantages et inconvénients. Il n'existe pas encore de système d'expression universellement applicable. Il est très difficile de prédire quel hôte fonctionnera le mieux pour une protéine particulière ou pour une utilisation finale particulière. *Escherichia coli* (*E. coli*) est

10 l'organisme de référence pour la production recombinante. En effet, cette bactérie est très connue du point de vue de l'ingénierie génétique et physiologique, avec par exemple : cellule optimisée (productivité élevée, utilisation de codons, inhibition des protéases endogènes), milieu de culture optimisé, temps de doublement court, faible contamination, disponibilité de

15 nombreux vecteurs commerciaux, mise à l'échelle industrielle, rendement de production important.

La production et l'ingénierie d'hydrogénases recombinantes, à l'instar des métalloprotéines en général, ont connu un succès limité. La littérature fournit des exemples de [FeFe]-hydrogénases exprimées de manière

20 hétérologue dans *E. coli* (King et al. 2006. Functional studies of [FeFe] hydrogenase maturation in an *Escherichia coli* biosynthetic system. *J Bacteriol* 188:2163-2172, Yacoby et al. 2012. Optimized expression and purification for high-activity preparations of algal [FeFe]-hydrogenase. *PLoS One* 7:e35886, Kuchenreuther et al. 2009. Tyrosine, cysteine, and S-adenosyl methionine stimulate in vitro [FeFe] hydrogenase activation. *PLoS One* 4:e7565). Les [FeFe]-

25 hydrogénases sont des enzymes monomériques nécessitant un nombre limité de facteurs de maturation.

La production hétérologue de [NiFe]-hydrogénases est qualifiée de difficile (English et al. 2009. Recombinant and in vitro expression systems for

30 hydrogenases: new frontiers in basic and applied studies for biological and synthetic H₂ production. *Dalton Trans* 9970-9978).

Premièrement, la difficulté provient de la complexité et de la spécificité du processus d'assemblage du site actif [NiFe], qui nécessite au moins

sept facteurs de maturation pour un assemblage fonctionnel.

Deuxièmement, le repliement correct de chacune des sous-unités de l'hétéro-multimère est requis, ce qui est particulièrement difficile à contrôler et à assurer lors d'une production hétérologue.

5 Troisièmement, l'assemblage correct de chaque sous-unité dans le complexe hétéro-multimérique est obligatoire. Un mauvais repliement peut mener à un phénomène d'agrégation et donc à une diminution de la quantité d'enzyme active (Singh et al. 2015. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact* 14:41).
10 L'obtention d'une séquence précise est nécessaire pour obtenir une activité enzymatique, ce qui peut s'avérer être difficile à contrôler et à assurer chez un hôte hétérologue.

Tout ceci explique pourquoi les [NiFe]-hydrogénases ne sont pas toujours actives lorsqu'elles sont produites par recombinaison hétérologue.
15 Cependant, il existe plusieurs cas dans la littérature où une [NiFe]-hydrogénase active a été produite dans *E. coli* (Kim et al. 2011. Production of biohydrogen by heterologous expression of oxygen-tolerant *Hydrogenovibrio marinus* [NiFe]-hydrogenase in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 155:312-319, Maier et al. 2015. Identification, cloning and heterologous expression of active [NiFe]-hydrogenase
20 2 from *Citrobacter* sp. SG in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 199:1-8, Schiffels et al. 2013. An innovative cloning platform enables large-scale production and maturation of an oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase from *Cupriavidus necator* in *Escherichia coli*. *PLoS One* 8:e68812, Weyman et al. 2011. Genetic analysis of the *Alteromonas macleodii* [NiFe]-hydrogenase. *FEMS Microbiol Lett* 322:180-
25 187).

En particulier, les travaux de Sun et de ces collaborateurs (Sun et al. 2010. Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. *PLoS One* 5:e10526) ont permis l'expression de la [NiFe]-hydrogénase de *Pyrococcus furiosus* en anoxie
30 dans *E. coli* par l'intermédiaire de quatre vecteurs d'expression permettant la co-expression de 13 gènes hétérologues (quatre gènes de structure et neuf facteurs de maturation). Plus spécifiquement, les travaux de Sun et al. ont permis d'obtenir une enzyme recombinante tétramérique de type [NiFe]-hydrogénase

comprenant les quatre sous-unités dénommées PF0891, PF0892, PF0893 et PF0894. Après purification, cette enzyme recombinante tétramérique s'est révélée être fonctionnellement similaire à l'enzyme native purifiée à partir de *P. furiosus*.

5 HoxEFUYH étant une protéine procaryote de la cyanobactérie *Synechocystis*, le système *E. coli* convient à sa production recombinante. Cette production dans *E. coli* a déjà été réalisée avec succès. En ce sens, Maeda et ses collègues ont montré une augmentation *in vivo* de la production d'hydrogène dans les cellules de *E. coli* exprimant, en condition anoxique, l'enzyme
10 HoxEFUYH cyanobactérienne (Maeda et al. 2007. Inhibition of hydrogen uptake in Escherichia coli by expressing the hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. BMC Biotechnol 7:25). Une telle production d'hydrogène accrue en présence de HoxEFUYH est due à l'inhibition de l'activité des hydrogénases endogènes 1 et 2 consommatrices d'H₂ chez *E. coli*.

15 Citons également Wells et ses collaborateurs qui ont introduit les gènes HoxEFUYH et ces facteurs de maturation associés dans *E. coli* (Wells et al. 2011. Engineering a non-native hydrogen production pathway into Escherichia coli via a cyanobacterial [NiFe] hydrogenase. Metab Eng 13:445-453). Ce travail a démontré la production d'hydrogène, en anoxie, aussi bien *in vivo* que *in vitro*
20 via HoxEFUYH dans un hôte nul pour les hydrogénases endogènes. Ils indiquent un couplage avec des systèmes de transfert d'électrons de l'hôte comme la fermentation et montrent le potentiel de HoxEFUYH dans l'ingénierie métabolique pour améliorer les rendements de production d'hydrogène.

Malheureusement, comme il ressort notamment de l'état de la
25 technique mentionné ci-dessus, il demeure plusieurs inconvénients freinant considérablement l'utilisation des [NiFe]-hydrogénases, et notamment l'utilisation de HoxEFUYH, pour une bio-production d'hydrogène commercialement rentable.

A ce jour, il existe donc un réel besoin de surmonter les obstacles freinant l'utilisation des [NiFe]-hydrogénases pour une production d'hydrogène
30 dès lors que, comme indiqué plus haut, les [NiFe]-hydrogénases présentent indéniablement un haut potentiel pour la production d'hydrogène.

Pour résoudre ces problèmes, il est prévu suivant l'invention, un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site

actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.

De préférence, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique comprend une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase.

De préférence, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique est constitué d'une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase.

De préférence, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique consiste en une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase.

Dans le cadre de la présente invention, il a été mis en évidence qu'un tel polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase et présentant une activité hydrogénase permet de s'affranchir au moins en partie des obstacles freinant l'utilisation des [NiFe]-hydrogénases pour une production d'hydrogène, ceci tout en garantissant une activité hydrogénase d'au moins $0,05 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

En effet, dès lors qu'il s'agit selon l'invention d'un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, les difficultés rencontrées avec les [NiFe]-hydrogénases, notamment pour assurer l'assemblage du site actif, pour assurer un repliement adéquat de chacune des sous-unités impliquées et pour assurer un assemblage correct de chaque sous-unité dans un complexe hétéro-multimérique, sont fortement réduites voire éliminées. Ceci permet d'augmenter la reproductibilité lors du processus d'obtention de la [NiFe]-hydrogénase puisqu'une seule sous-unité est impliquée. En effet, la production d'un seul polypeptide monomérique simplifie fortement le processus complexe de repliement en comparaison avec les enzymes dimérique, tétramérique et pentamérique pour lesquelles un assemblage correct du site actif, de chacune des sous-unités et enfin de l'enzyme entière est particulièrement difficile à contrôler et à garantir, ce qui constitue un obstacle à leur utilisation. Selon l'invention, le repliement adéquat d'une seule sous-unité est nécessaire et aucun assemblage entre différentes sous-unités n'est requis pour former un complexe

hétéro-multimérique.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que le procédé de fabrication d'un tel polypeptide monomérique selon l'invention peut être totalement réalisé en condition aérobie (pas de précaution requise par rapport à l'oxygène lors des
5 étapes d'expression et de purification), ce qui écarte les problématiques rencontrées avec les procédés de fabrication des [NiFe]-hydrogénases dimériques, tétramériques et pentamériques recombinantes rencontrées dans l'état de la technique et pour lesquelles les procédés de fabrication sont réalisés en anoxie. Comme mentionné plus haut, même si l'accumulation de biomasse
10 est réalisée en présence d'oxygène, la phase de production de l'hydrogénase recombinante est quant à elle réalisée en anoxie selon les procédés connus de l'état de la technique (Sun et al. 2010. Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. PLoS One 5:e10526, Wells et al. 2011. Engineering a non-native hydrogen
15 production pathway into Escherichia coli via a cyanobacterial [NiFe] hydrogenase. Metab Eng 13:445-453). L'absence d'oxygène est également rapportée (boîte anoxie, dithionite de sodium dans les tampons) lors des diverses étapes chromatographiques de la purification. Le maintien d'un tel niveau d'anoxie aux cours du procédé implique évidemment une augmentation des
20 coûts liés à la production recombinante, ce qui est solutionné par la présente invention.

De façon avantageuse suivant l'invention, la taille du polypeptide monomérique selon l'invention est nettement plus faible en comparaison avec l'hétéro-multimère, une augmentation de l'activité massique de l'enzyme (nombre
25 d'entité catalytiquement active par mg de protéine total) étant ainsi obtenue.

Une meilleure intégration et donc une densification du catalyseur enzymatique est également réalisable, par exemple, lors d'une mise en œuvre électrochimique du polypeptide monomérique selon l'invention, comme par exemple dans une pile à combustible.

30 En outre, la structure tridimensionnelle d'un polypeptide monomérique selon l'invention est facilement modélisable notamment pour déterminer les résidus exposés à la surface de la protéine, par exemple pour faciliter l'orientation ainsi que l'adsorption par rapport à une interface, par

exemple par rapport à une électrode de carbone. Cette caractéristique permet avantageusement, par exemple, d'améliorer la stabilité du lien entre l'interface et le catalyseur enzymatique, mais aussi une optimisation du transfert d'électrons direct entre l'interface et le site actif. Le rendement énergétique est dès lors
5 amélioré en l'absence de relais redox supplémentaires, ce qui limite les pertes énergétiques.

Dans le contexte de la présente invention, il a également été démontré que le polypeptide monomérique est bien actif et apte à la production par catalyse d'H₂ (test standard de production *in-vitro* d'H₂ par les hydrogénases utilisant le méthyl-viologène comme médiateur redox; mise en œuvre
10 électrochimique), sans présence du centre FeS proximal ni d'ailleurs d'aucun autres relais redox. Ceci est tout à fait surprenant puisqu'une simplification aussi poussée de l'enzyme hétéro-multimérique n'a jamais été proposée ni suggérée par l'état de la technique. Que du contraire, l'ensemble des travaux réalisés et
15 donc l'ensemble de l'état de la technique considère que le centre [4Fe-4S] situé à proximité du site actif est essentiel et indispensable à l'activité hydrogénase (Albracht. 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. Biochim Biophys Acta 1188:167-204) mais aussi que la réduction du nombre de sous-unité n'est ni favorable à l'activité ni à la stabilité de l'hydrogénase. De façon
20 d'autant plus avantageuse, alors que seule une production d'H₂ limitée est actuellement obtenue avec les [NiFe]-hydrogénases recombinantes connues (Sun et al. 2010. Heterologous expression and maturation of an NADP-dependent [NiFe]-hydrogenase: a key enzyme in biofuel production. PLoS One 5:e10526, Schiffels et al. 2013. An innovative cloning platform enables large-scale production and maturation of an oxygen-tolerant [NiFe]-hydrogenase from
25 Cupriavidus necator in Escherichia coli. PLoS One 8:e68812, Maier et al. 2015. Identification, cloning and heterologous expression of active [NiFe]-hydrogenase 2 from Citrobacter sp. SG in Escherichia coli. J Biotechnol 199:1-8), il a été montré que le polypeptide monomérique selon l'invention présente une activité
30 hydrogénase au moins équivalente voire même supérieure à celles obtenues avec les [NiFe]-hydrogénases (recombinantes) connues.

Selon un mode de réalisation suivant l'invention, le polypeptide monomérique est isolé de son environnement naturel, en particulier isolé d'une

protéine naturelle de type [NiFe]-hydrogénase.

A titre d'exemple, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique peut être issu/isolé d'un procaryote. Les exemples incluent, mais ne sont pas limité à un membre du genre *Escherichia* (comme par exemple *Escherichia coli*),
5 un membre du genre *Desulfovibrio* (comme par exemple *Desulfovibrio gigas*), un membre du genre *Hydrogenophilus* (comme par exemple *Hydrogenophilus thermoluteolus*), un membre du genre *Desulfomicrobium* (comme par exemple *Desulfomicrobium baculatum*), *Synéchocystis* (comme par exemple *Synéchocystis sp.* PCC6803), un membre du genre *Phormidium* (comme par
10 exemple *Phormidium ambiguum*) ou un membre du genre *Spirulina* (comme par exemple *Spirulina platensis*). Par exemple, ledit polypeptide monomérique peut être issu d'une cellule ou d'un microbe ou peut être produit *in vitro* ou *in vivo*.

Selon un mode de réalisation suivant l'invention, le polypeptide monomérique est recombinant ou hétérologue.

15 Avantageusement, selon l'invention, le polypeptide monomérique est purifié.

Préférentiellement, selon l'invention, le polypeptide monomérique présente une séquence en acides aminés tronquée ou non présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement
20 au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence
25 en acides aminés de SEQ ID NO:4.

De façon encore préférée, selon l'invention, le polypeptide monomérique présente une séquence en acides aminés tronquée ou non présentant au moins 81% d'identité, au moins 82% d'identité, au moins 83% d'identité, au moins 84% d'identité, au moins 85% d'identité, au moins 86%
30 d'identité, au moins 87% d'identité, au moins 88% d'identité, au moins 89% d'identité, au moins 90% d'identité, au moins 91% d'identité, au moins 92% d'identité, au moins 93% d'identité, au moins 94% d'identité, au moins 95% d'identité, au moins 96% d'identité, au moins 97% d'identité, au moins 98%

d'identité, au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:4.

De préférence, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique
5 présente une activité hydrogénase d'au moins $0,05 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, de préférence d'au moins $10 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

La présente invention porte également sur une cellule hôte incluant un polypeptide monomérique selon l'invention, ledit polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type
10 [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.

A titre d'exemple, selon l'invention, la cellule hôte, notamment pour l'expression dudit polypeptide monomérique, peut-être une cellule bactérienne hôte du genre *Escherichia* (comme par exemple *Escherichia coli*), du genre
15 *Bacillus* (comme par exemple *Bacillus subtilis*), du genre *Streptomyces* (comme par exemple *Streptomyces coelicolor*), du genre *Synéchocystis* (comme par exemple *Synéchocystis sp. PCC6803*), du genre *Synéchococcus* (comme par exemple *Synéchococcus WH8102*), ou toute autre cellule procaryote, une cellule eucaryote par exemple du genre *Chlamydomonas* (comme par exemple
20 *Chlamydomonas reinhardtii*), du genre *Saccharomyces* (comme par exemple *Saccharomyces cerevisiae*), de type *Pichia* (comme par exemple *Pichia pastoris*), ou un autre type de cellule eucaryotes.

Selon l'invention, ledit polypeptide monomérique inclus dans ladite cellule hôte peut lui-même mais non indispensablement être issu de l'expression
25 d'un gène inclus dans un vecteur d'expression, par exemple dans un plasmide inséré dans ladite cellule hôte.

Avantageusement, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique inclus dans ladite cellule hôte a une séquence en acides aminés tronquée ou non présentant au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au
30 moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à

la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:4.

De préférence, selon l'invention, ladite cellule hôte peut inclure un ou plusieurs facteurs de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase, de préférence un ou plusieurs facteurs de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase choisi dans, le groupe constitué des facteurs de maturation HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW

- a) dont les séquences respectives en acides aminés présente chacune au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par rapport aux séquences en acides aminés SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 ; ou
- b) codés ensemble par une séquence nucléotidique concaténaire présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID NO:19, laquelle code pour l'ensemble de ces facteurs de maturation.

La présente invention porte également sur une cellule hôte incluant un polynucléotide codant pour un polypeptide monomérique selon l'invention comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.

De préférence, selon l'invention, ledit polynucléotide codant pour un polypeptide monomérique présente une séquence nucléotidique ayant au moins

15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par rapport aux séquences, par rapport aux séquences nucléotidiques SEQ ID NO :1 et/ou SEQ ID NO :3.

A titre d'exemple, selon l'invention, la cellule hôte incluant un polynucléotide codant pour un polypeptide monomérique selon l'invention, et étant utilisée notamment pour l'expression dudit polypeptide monomérique, peut être une cellule bactérienne hôte du genre *Escherichia* (comme par exemple *Escherichia coli*), du genre *Bacillus* (comme par exemple *Bacillus subtilis*), du genre *Streptomyces* (comme par exemple *Streptomyces coelicolor*), une cellule bactérienne photosynthétique du genre *Synéchocystis* (comme par exemple *Synéchocystis* sp. PCC6803) ou *Synéchococcus* (comme par exemple *Synéchococcus* WH8102) ou toute autre cellule procaryote, une cellule eucaryote par exemple du genre *Chlamydomonas* (comme par exemple *Chlamydomonas reinhardtii*), du genre *Saccharomyces* (comme par exemple *Saccharomyces cerevisiae*), de type *Pichia* (comme par exemple *Pichia pastoris*), ou un autre type de cellule eucaryotes.

Selon l'invention, ledit polynucléotide inclus dans ladite cellule hôte peut lui-même mais non indispensablement être inclus dans un vecteur d'expression, par exemple dans un plasmide, inséré dans ladite cellule hôte.

Avantageusement, selon l'invention, ledit polypeptide monomérique codé par ledit polynucléotide inclus dans ladite cellule hôte a une séquence en acides aminés tronquée ou non présentant au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:4.

De préférence, selon l'invention, ladite cellule hôte incluant un

polynucléotide codant pour un polypeptide monomérique peut inclure un ou plusieurs facteurs de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase, de préférence un ou plusieurs facteurs de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase choisi dans, le groupe constitué des facteurs de maturation

5 HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW

a) dont les séquences respectives en acides aminés présente chacune au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins

10 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par rapport aux séquences en acides aminés SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID

15 NO:18 ; ou

b) codés ensemble par une séquence nucléotidique concaténaire présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement

20 encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID NO:19, laquelle code pour l'ensemble de ces facteurs de maturation.

25 La présente invention porte encore sur un procédé d'obtention, par exemple dans une cellule hôte (par exemple dans *E. coli*), d'un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase selon l'invention, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- modification d'un vecteur d'expression, par exemple d'un plasmide,
- 30 en y incluant un polynucléotide exogène dont au moins une partie code pour un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase ; et

- incubation dudit vecteur d'expression modifié selon des conditions d'incubation permettant d'assurer une expression dudit polynucléotide exogène pour produire un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.

Le procédé selon l'invention permet de réaliser une production de la seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase.

L'homme de métier est bien entendu à même de définir les conditions d'incubation requises et adéquates.

Selon l'invention, lors de l'étape de modification d'un vecteur d'expression, le polynucléotide peut lui-même mais non indispensablement être inclus dans un vecteur d'expression, par exemple dans un plasmide.

Avantageusement, selon l'invention, ladite étape de modification dudit vecteur d'expression consiste en une inclusion dans ledit vecteur d'expression dudit polynucléotide exogène dont au moins une partie code pour ledit polypeptide monomérique dont la séquence en acides aminés tronquée ou non présente au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:4.

De préférence, selon l'invention, ladite étape de modification dudit vecteur d'expression peut comprendre l'inclusion dans ledit vecteur d'expression d'un ou de plusieurs facteurs de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase, de préférence d'un ou de plusieurs facteurs de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase choisi dans, le groupe constitué des facteurs de maturation HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW

- a) dont les séquences respectives en acides aminés présente chacune au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus

5 préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par rapport aux séquences en acides aminés SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 ; ou

10 b) codés ensemble par une séquence nucléotidique concaténaire présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la
15 séquence nucléotidique SEQ ID NO:19, laquelle code pour l'ensemble de ces facteurs de maturation.

Selon l'invention, lors de l'étape de modification dudit vecteur d'expression, une séquence codant pour le facteur de maturation peut elle-même
20 mais non indispensablement être incluse dans un vecteur d'expression, par exemple dans un plasmide.

Avantageusement, le procédé selon l'invention comprend une étape subséquente d'isolation et/ou de purification dudit polypeptide monomérique.

25 La présente invention porte encore sur une utilisation d'un polypeptide monomérique suivant l'invention comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase et étant présent ou non dans une cellule, pour produire ou consommer de l'hydrogène par
30 incubation dudit polypeptide monomérique selon des conditions d'incubation permettant d'assurer une production ou une consommation d'hydrogène.

La présente invention porte encore sur une utilisation d'un polypeptide monomérique suivant l'invention comportant une seule sous-unité

comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase et étant présent ou non dans une cellule, pour revêtir une surface, en particulier pour revêtir une surface d'un conducteur électrique, par exemple pour revêtir une surface d'une anode ou d'une cathode.

Définitions

Par le terme « polypeptide », il est entendu, au sens de la présente invention, une chaîne unique composée d'un minimum de deux acides aminés liés entre eux par un lien peptidique entre le groupement carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine de l'acide aminé suivant. Le terme « polypeptide » inclut également les molécules qui contiennent plus qu'un polypeptide, ceux-ci liés entre eux, par exemple par des ponts disulfures, ou des complexes de polypeptides, ceux-ci liés entre eux par exemple de manière covalente ou non-covalente, et formant un multimère (par exemple un dimère, un trimère, un quadrimère, un pentamère). Un polypeptide peut aussi contenir des ligands non-protéiques, comme par exemple le fer inorganique (Fe), le nickel (Ni), un centre fer-soufre (FeS), ou autre ligand organique comme par exemple le monoxyde de carbone (CO), le cyanure (CN) ou une flavine. Les termes peptide, polypeptide, enzyme, sous-unité ou protéine sont tous inclus dans la définition du polypeptide et ces termes peuvent être interchangeables. La définition de « polypeptide » ne tient pas compte de la longueur dudit polypeptide ni de la façon dont ledit polypeptide est produit.

Par le terme « polypeptide recombinant » ou « polypeptide hétérologue », il est entendu, au sens de la présente invention, un polypeptide qui n'est pas naturellement présent dans l'environnement, en particulier dans une cellule hôte, et dont la production est réalisée par des techniques recombinantes, par exemple par ajout de matériel génétique dans une cellule hôte.

Par les termes « polypeptide monomérique », il est entendu, au sens de la présente invention, une chaîne unique composée d'un minimum de deux acides aminés liés entre eux par un lien peptidique entre le groupement carboxylique d'un acide aminé et le groupement amine de l'acide aminé suivant. Par opposition au terme « polypeptide », le terme « polypeptide monomérique »

inclut seulement les molécules qui ne contiennent qu'un polypeptide, c'est-à-dire sans interaction avec d'autre polypeptide, et cela peu importe la nature du lien. Par exemple, il ne s'agit en aucun cas d'un multimère (par exemple un dimère, un trimère, un quadrimère, un pentamère, ...). Un polypeptide monomérique peut

5 aussi contenir des ligands non-protéiques, comme par exemple le fer inorganique (Fe), le nickel (Ni), les centres fer-soufre (FeS), ou autre ligand organique comme par exemple le monoxyde de carbone (CO), le cyanure (CN) ou une flavine. La définition de « polypeptide monomérique » ne tient pas compte de la longueur dudit polypeptide ni de la façon dont ledit polypeptide est produit.

10 Par les termes « polypeptide monomérique recombinant » ou « polypeptide monomérique hétérologue », il est entendu, au sens de la présente invention, que le polypeptide monomérique n'est pas naturellement présent dans l'environnement, en particulier dans une cellule hôte, et dont la production est réalisée par des techniques recombinante, par exemple par ajout de matériel

15 génétique dans une cellule hôte.

Par les termes « polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase », il est entendu, au sens de la présente invention, que le polypeptide monomérique est apte à catalyser la réaction réversible $H_2 \leftrightarrow 2H^+ + 2e^-$.

20 Par les termes « site actif », il est entendu, au sens de la présente invention, la partie du polypeptide qui, lorsque la structure tertiaire est formée, est responsable de l'activité catalytique dudit polypeptide, par exemple de l'activité hydrogénase. La partie du polypeptide peut comprendre, par exemple, plusieurs portions de la séquence en acides aminés et/ou la liaison avec un ou

25 plusieurs ligands non-protéiques.

Par le terme « polynucléotide », il est entendu, au sens de la présente invention, une chaîne unique composée d'un minimum de deux nucléotides liés entre eux, par exemple par un lien covalent, peu importe qu'il s'agisse de ribonucléotides ou de désoxynucléotides. Cela inclut donc les RNA

30 et les DNA, simple brin ou double brin. La définition de « polynucléotide » ne tient pas compte de la longueur dudit polynucléotide, ni de la fonction, ni de la forme, ni de la façon dont ledit polynucléotide est produit. Un polynucléotide peut être, par exemple, un plasmide, une partie d'un plasmide, un gène ou un fragment de

gène.

Par les termes « polynucléotide exogène », il est entendu, au sens de la présente invention, un polynucléotide qui n'est pas normalement présent dans la cellule hôte. Par exemple, le polynucléotide exogène peut être une
5 séquence codante pour un polypeptide qui n'est pas naturellement présent dans la cellule hôte ou un plasmide.

Par le terme « concaténaire », il est entendu, au sens de la présente invention, un enchainement de plusieurs séquences afin de n'en former qu'une seule, par exemple de séquences polynucléotidiques ou de séquences
10 polypeptidiques.

Par le terme « plasmide », il est entendu, au sens de la présente invention, une molécule d'ADN double brins distinct de l'ADN chromosomique, exogène, capable de réplication autonome, grâce à sa propre origine de réplication, et non essentielle à la survie de la cellule. Le plasmide peut comporter
15 également d'autres séquences d'intérêts, comme par exemple un gène codant pour un facteur de sélection (résistance à un antibiotique, etc), un site de clonage multiple permet l'ajout de polynucléotide, et/ou des séquences de régulation de la transcription. Les termes « plasmide » ou « vecteur d'expression » sont interchangeables.

Par le terme « cellule hôte », il est entendu, au sens de la présente invention, une cellule qui a subi une modification. Cette modification peut par exemple être l'introduction d'un polynucléotide exogène dans la cellule, par exemple un plasmide.

Par les termes « facteur de maturation », il est entendu, au sens de la présente invention, toute molécule, biologique, ou non, qui participe à la formation de la structure d'une autre molécule biologique, par exemple d'une
25 protéine.

Par le terme « isolé », il est entendu, au sens de la présente invention, toute molécule qui a été retirée de son environnement naturel, par exemple qui a été retirée d'une [NiFe]-hydrogénase naturelle.
30

Par le terme « purifié », il est entendu au sens de la présente invention, toute molécule qui a été esseulée par l'intermédiaire de techniques biochimiques. Cette définition ne tient pas compte de la façon dont est produite

la molécule, par exemple de manière naturel ou par recombinaison, synthétisée chimiquement ou enzymatiquement, ni des techniques biochimiques mises en œuvre pour la purification, comme par exemple une chromatographie d'affinité ou un tamis moléculaire. Par exemple, un polynucléotide, un polypeptide ou l'H₂ peuvent être purifiés. De manière préférentielle, une substance est purifiée lorsqu'elle représente au minimum 60% par rapport aux autres composants qui lui sont associés, préférentiellement 75% par rapport aux autres composants qui lui sont associés, préférentiellement 90% par rapport aux autres composants qui lui sont associés.

10 Par le terme « homogénéité apparente », il est entendu, au sens de la présente invention, toute molécule purifiée représentant minimum 90% par rapport aux autres composants qui lui sont associés.

Par le terme « identité », il est entendu, au sein de la présente invention, une similarité structurelle entre deux polynucléotides ou deux polypeptides. La similarité structurelle est déterminée par un alignement entre les deux séquences, alignement qui optimise le nombre de nucléotides identiques ou le nombre d'acides aminés identiques le long de la séquence. Les trous dans une ou les deux séquences sont permis afin d'optimiser l'alignement et donc la similarité structurelle. Les séquences des nucléotides ou des acides aminés doivent cependant rester les mêmes.

20 D'autres caractéristiques, détails et avantages de l'invention ressortiront des exemples donnés ci-après, à titre non limitatif et en faisant référence aux figures annexées.

La figure 1 illustre la carte du plasmide pET-26b(+) (5360pb).

25 La figure 2 illustre l'analyse par gel d'agarose de la digestion du vecteur d'expression pET26b(+) + HoxH par les enzymes de restrictions NdeI et BlnI.

La figure 3 illustre la carte du plasmide pACYCDuet-1 (4008pb).

30 La figure 4 illustre l'analyse par gel d'agarose de la digestion du vecteur d'expression pACYCDuet-1 + HypABCDEFGHoxW par les enzymes de restrictions NcoI et HindIII.

La figure 5 illustre l'analyse par gel d'agarose de la digestion du vecteur d'expression pET26b(+) + HoxH, issus de l'ADN plasmidique d'une

colonie d'*E. coli*, par les enzymes de restrictions NdeI et BlnI.

La figure 6 illustre l'analyse par gel d'agarose de la digestion du vecteur d'expression pACYCDuet-1 + HypABCDEFHoxW, issus de l'ADN plasmidique d'une colonie d'*E. coli*, par les enzymes de restrictions NcoI et HindIII.

La figure 7 illustre la méthode de purification de la protéine recombinante d'intérêt HoxH. NA, échantillon non-absorbé sur la colonne d'affinité Ni-NTA. Lavage, échantillon élué avec le tampon de lavage contenant 10mM en Imidazole. 50mM, échantillon élué à une concentration de 50mM en imidazole. 100mM, échantillon élué à une concentration de 100mM en imidazole. 150mM, échantillon élué à une concentration de 150mM en imidazole. 200mM, échantillon élué à une concentration de 200mM en imidazole. 250mM, échantillon élué à une concentration de 250mM en imidazole.

La figure 8 illustre l'analyse par SDS-PAGE de la composition protéique de diverses fractions récoltées lors de la chromatographie d'affinité. Charge, surnageant appliqué sur la colonne d'affinité Ni-NTA et issus de la lyse des cellules de *E. coli* recombinante ; NA, échantillon non-absorbé sur la colonne d'affinité Ni-NTA. Lavage, échantillon élué avec le tampon de lavage contenant 10mM en Imidazole. M, marqueur de poids moléculaire. 50mM, échantillon élué à une concentration de 50mM en imidazole. 100mM, échantillon élué à une concentration de 100mM en imidazole. 150mM, échantillon élué à une concentration de 150mM en imidazole. 200mM, échantillon élué à une concentration de 200mM en imidazole. 250mM, échantillon élué à une concentration de 250mM en imidazole.

La figure 9 illustre l'analyse par immuno-détection (Western blot) de la présence de HoxH dans diverses fractions récoltées lors de la chromatographie d'affinité. M, marqueur de poids moléculaire. Charge, surnageant appliqué sur la colonne d'affinité Ni-NTA et issus de la lyse des cellules de *E. coli* recombinante. NA, échantillon non-absorbé sur la colonne d'affinité Ni-NTA ; 50mM, échantillon élué à une concentration de 50mM en imidazole. 200mM, échantillon élué à une concentration de 200mM en imidazole.

La figure 10 est une représentation schématique de la structure de HoxEFUYH, la [NiFe]-hydrogénase de *Synéchocystis* sp. PCC 6803. HoxE,

19KDa et 1 centre FeS ; HoxF, 57.5KDa, 2 centres FeS et un centre FMN ; HoxU, 26KDa et 4 centres FeS ; HoxY, 20KDa et un centre FeS ; HoxH, 53KDa et le site actif.

La figure 11 est une représentation schématique (flèche grisée) du transfert d'électrons et des interactions attendues avec le NADPH et le methylviologène (MV) chez HoxEFUYH, la [NiFe]-hydrogénase de *Synéchocystis sp.* PCC 6803.

La figure 12 est une représentation schématique où le point d'interrogation pose la question de savoir si le site actif de la protéine recombinante HoxH peut accepter ou non les électrons directement du MV et donc produire de l'hydrogène en l'absence de relais redox additionnels.

La figure 13 illustre la production d'hydrogène qui résulte de l'ajout de la protéine recombinante HoxH à un réactif contenant du methylviologène préalablement réduit par du dithionite de sodium en absence d'oxygène. Le niveau d'hydrogène dissout dans le réactif est mesuré en continu à l'aide d'un micro-senseur (Unisense, Danemark). La flèche montre le moment où l'ajout de la protéine recombinante HoxH est réalisé, moment concomitant avec l'augmentation du niveau d'hydrogène dissout détecté par le micro-senseur.

20

Exemples

1. Construction d'un vecteur d'expression de HoxH

25

1.1. Séquence « simple » de HoxH

30

HoxH correspond à la grande sous-unité comprenant le site actif de la [NiFe]-hydrogénase HoxEFUYH chez *Synéchocystis sp.* PCC6803. Le numéro d'accès de la protéine dans Genbank est BAA18091.1. Le point isoélectrique théorique de HoxH est de 5,86 pour une masse moléculaire théorique de 52996.53 Daltons. La séquence en nucléotides (1425bp) de HoxH est la suivante et est nommée SEQ ID NO:1 dans le cadre de la présente invention :

atgtctaaaaccattgttatcgatcccgttaccggttgaaggccatgccaaaatctccatttctcaacgacc
 agggcaacgtagatgatgttcgtttccatgtggtggagtagtcggggtttgaaaaatttgcgaaggctgccat
 gtgggaaatggctggtattaccgcccgtatttgcggcatttgcgggttagccatctgctctgtgcggctaaaacc
 ggggataagttactggcgggtgcaaatccctccagccggggaaaaactgcgccgttaatgaatttagggcaa
 5 attaccaatcccacgccttaagtttttccatctcagcagtcctgattttctgcttgggtgggacagtgtcccgtc
 ctgcgaatgtgttgggttaattgctgctgaccccgatttagctagggcagggtattcggttacggcaatttggcaa
 acggttaattgaacttttgggagctaaaaaaatccactctgcttggtcagtgcccggtggagtccgatcgccgttg
 tcggaagaaggcagacaatggattgtggaccgtttaccagaagcaaaagaaaccgtttatttagccttaaattt
 gtttaaaaatatgttgaccgcttccaaacagaagtggcagaatttggcaaatttccctccctatttatgggcttag
 10 ttgggaaaaataatgaatgggaacattatggcggctccctgcggttaccgacagtgaaggcaatattgtcgcg
 gacaatctcagtgaagataattacgctgattttattggtgaatcgggtggaaaaatggctctatttaaatttcccta
 ctacaaatctctgggttatcccgatggcatttatcgggttgggtccccttggccgccttaattgttgcacacattggc
 accccggaagcagaccaagaattagaagaatatcggaacgggctggagggtgtggccacgtcctctttctttt
 atcattacgcccgttgggtggaaattcttgcctgtttagaagccatcgaattgtaattggctgaccctgatattttgtc
 15 caaaaattgtcgagctaaggcagaaattaattgtaccgaagcgggtgggagtgaagcgaagcaccgccgggta
 ctttattccaccattacaagatagatgaagatggtctaattaagaaagtgaattgatcattgccacgggcaaca
 ataactagccatgaataaaaccgtggcccaaattgccaaacactacattcgcaatcatgatgtgcaagaag
 gggttttaaacggggtggaagcgggtattcgttgtatgatccctgccttagttgttctacccatgcagcgggacaa
 atgccattgatgatcgatttagttaaccctcagggggaactaattaagtccatccagcgggattaa
 20

La séquence en acides aminés (474 aa) de HoxH est la suivante et est nommée SEQ ID NO:2 dans le cadre de la présente invention :

MSKTIVIDPVTRIEGHAKISIFLNDQGNVDDVRFHVVEYRGFEKFCEGRPMWE
 25 MAGITARICGICPVSHLLCAAKTGDKLLAVQIPPAGEKLRLMLNLGQITQSHAL
 SFFHLSSPDFLLGWSDPATRNVFGLIAADPDLARAGIRLRQFGQTVIELLGAK
 KIHSAWSVPGGVRSPLSEEGRWIVDRLPEAKETVYLALNLFKNMLDRFQTE
 VAEFGKFPSLFMGLVGKNNEWEHYGGSLRFTDSEGNIVADNLSEDNYADFIG
 ESVEKWSYLKFPYYKSLGYPDGIYRVGPLARLNVCHHIGTPEADQEELEYRQR
 30 AGGVATSSFFYHYARLVEILACLEAIELLMADPDILSKNCRAKAEINCTEAVGVS
 EAPRGTLFHHYKIDEDGLIKKVNLIATGNNNLAMNKTVAQIAKH YIRNHDVQEG
 FLNRVEAGIRCYDPCLSCSTHAAGQMPLMIDL VNPQGELIKSIQRD

La figure 1 représente la carte du plasmide pET26b(+) utilisé pour
 35 construire le vecteur d'expression de HoxH par insertion de SEQ ID NO:3 dans
 pET26b(+). pET26b(+) est un plasmide de 5360pb possédant une origine de
 réplication pour *E. coli*, un gène de résistance à la kanamycine, un site de
 clonage multiple (MCS) contenant de nombreux sites de restriction, le promoteur
 T7 et le terminateur de transcription T7. Il contient également le gène *lacI* codant
 40 pour un répresseur de transcription. Cette répression de la transcription peut être

levée par ajout d'IPTG.

1.2. Séquence « optimisée » de *HoxH*

Optionnellement, selon un mode de réalisation suivant l'invention, les séquences SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:2 sont optimisées pour l'usage des codons chez *E. coli*. En particulier, les sites de restriction NdeI (*catatg*) et BlnI (*gctnagc*) sont ajoutés respectivement en début et en fin de la séquence de nucléotides pour le clonage dans le plasmide pET26b(+) et la séquence caccaccaccaccatcac (soulignée ci-dessous) est également ajoutée (séquence codant pour l'étiquette poly-histidines proche de l'extrémité N-terminal de la protéine).

La séquence de nucléotides optimisée (1453bp) est la suivante et est nommée SEQ ID NO:3 dans le cadre de la présente invention :

*catatgagccaccaccaccaccatcac*aaaaaccatcgatcgacccagtcacccgcatcgaaggccacg
ccaaaattagcattttctgaacgaccagggcaacgctgcagcagctccgctttcacgtgtgaataccgtggctt
cgaaaaattttgtgaaggctgctccgatgtgggaaatggccggtatcacggcacgtattgtggaattgtccggt
gagccatctgctgtgctgccgaaaaaccggagataaactgctggcagtcagattccgccggcaggtgaaa
aactgctgctgctgatgaatctgggtcagattacacagtcgcatgcactgtctttctttcatctgagtagcccagatt
ttctgctggggtgggatagcgacccggcaacacgtaaatgtgttggctgattgcggctgatccggatctggcgc
gtgccggtattcgtctgctgagtttggtcagacagttattgagctgctggggcgaaaaagattcatagtgcag
gtctgtgccgggtggtgttcgtagtcgctgagtgagaaggctgctcagtggttgcctgctgccggaggc
aaaagaaacggtctatctggcactgaatctgtttaaaaatatgctggatcgttccagacagaagtgcagaatt
tggaattttccgtcactgtttatgggtctggttggtaaaaataatgaatgggaacactatggtggtagcctgcgtt
tcacggactctgaaggtaatatgttgcggataatctgagcgaagacaattatgcagattttatcggtgaaagtgt
ggaaaaatggagctatctgaaattccgtattacaaaagccgtgggctatccggatgggatctaccgtgttgac
cgctggcacgctctgaacgtttgtcatcatattggtaccccggaagcagatcaggaactggaagaatatcgta
gcgtgccgggtggtgttgcgactagcagctttttatcattatgcacgtctggttgaaattctggcctgtctggaggc
aattgaactgctgatggcagatcctgatattctgtctaaaaattgtcgtgcaaaagcagaaattaactgtaccga
ggcagttggtgttagtgaggcgccgctggtaccctgtttcatcactataaaattgacgaagatggtctgattaaa
aaggtaatctgattatcgcaaccggtaacaataatctggcaatgaataaaaccgttcacagattgcaaaac
actacattcgcaaccacgatgttcaggaagggtttctgaatcgtgtagaagccggcattcgctgttatgatccgt
gtctgagctgtagcaccatgcagcaggtcagatgcctctgatgattgacctggttaatccgcagggtgagctg
attaaaagcattcagcgtgattaagctgagc

La séquence en acides aminés (480 aa) optimisée est la suivante et est nommée SEQ ID NO:4 dans le cadre de la présente invention :

MSHHHHHKTIVIDPVTRIEGHAKISIFLNDQGNVDDVRFHVVEYRGFEKFCEG
 RPMWEMAGITARICGICPVSHLLCAAKTGDKLLAVQIPPAGEKLRRMLNLGQIT
 QSHALSFFHLSSPDFLLGWDSDPATRNVFGLIAADPDLARAGIRLRQFGQTVE
 5 LLGAKKIHSASVPGGVRSPLEEGRQWIVDRLPEAKETVYLALNLFKNMLDR
 FQTEVAEFGKFPSLFMGLVGKNNEWEHYGGSLRFTDSEGNIVADNLSEDNYA
 DFIGESVEKWSYLKFPYYKSLGYPDGIYRVGPLARLNVCHHIGTPEADQELEE
 YRQRAGGVATSSFFYHYARLVEILACLEAIELLMADPDILSKNCRAKAEINCTEA
 VGVSEAPRGTLFHHYKIDEDGLIKKVNLIATGNNNLAMNKTVAQIAKHYYRNHD
 10 VQEGFLNRVEAGIRCYDPCLSCSTHAAGQMPLMIDLVPQGELIKSIQRD

Le plasmide pET26b(+) est utilisé pour construire le vecteur d'expression de HoxH par insertion de SEQ ID NO:3 dans pET26b(+).

La figure 2 montre l'analyse de la digestion du vecteur d'expression
 15 pET26b(+) + HoxH (SEQ ID NO:3) par les enzymes de restrictions NdeI et BlnI.
 Deux fragments d'ADN à environ 5300pb (pET26b(+) linéarisé) et à environ
 1500pb (séquence HoxH excisé du plasmide pET26b(+)) sont mis en évidence.
 Ceci confirme la présence de la séquence HoxH d'intérêt dans le vecteur
 d'expression pET26b(+).

20

2. Construction du vecteur d'expression d'au moins un facteur de maturation

Au moins les facteurs de maturation suivants sont considérés dans
 25 le cadre de la présente invention : HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et
 HoxW.

HypA est une protéine d'expression/formation de la [NiFe]-
 hydrogenase HoxEFUYH chez *Synéochystis* sp. PCC6803. Le numéro
 d'accèsion de la protéine dans Genbank est BAA18357.1. Le point isoélectrique
 30 théorique de HypA est de 4,94 pour une masse moléculaire théorique : 12773,47
 Daltons. La séquence en nucléotides (342bp) de HypA est la suivante et est
 nommée SEQ ID NO:5 dans le cadre de la présente invention :

atgcacgaagttagtctgatggagcaaactttggcgatcgccattgccagggcggaagaccatggagccagc
 35 caaatccatcggttaaccctgcgggtggggcaacagtctgggtgtggccgatgccctacgggttcggttgaa
 gtggtgcgacaaaataccatggccgagggcgagattggaaattgaagaaattcccggttacctgtcggtgcc

aacactgccacgaaaatttcagccagaggattggattaccgctgtcccactgcgaccagattagccaaac
agtaatggatggcaaacagttggaactagcatccctagaactgagttga

La séquence en acides aminés (113 aa) de HypA est la suivante et
est nommée SEQ ID NO:6 dans le cadre de la présente invention :

MHEVSLMEQTLAIAIAQAEDHGASQIHRLTLRVGQQSGVVADALRFAFEVVRQ
NTMAAEARLEIEEIPVTCRCQHCHENFQPEDWIYRCPHCDQISQTVMDGKQL
ELASLELS

10

HypB est une protéine d'expression/formation de la [NiFe]-
hydrogénase HoxEFUYH chez *Synéchocystis* sp. PCC6803. Le numéro
d'accession de la protéine dans Genbank est BAA18312.1. Le point isoélectrique
théorique de HyB est de 5,75 pour une masse moléculaire théorique : 31242,97
Daltons. La séquence en nucléotides (858bp) de HypB est la suivante et est
nommée SEQ ID NO:7 dans le cadre de la présente invention :

15

atgtgccaaaactgcggtttagtgcggtgggaaccgttggccatagccaccatcaccatggcgatggaaattt
tgcccacagccatgatgaccatgaccagcaagaacatcatcaccaccatggcaactacagcaaaagtcca
agtcagcagactgtgaccattgaacccgatcgccagtcattgcccattggccaaggcattctcagcaagaatg
accgcctagcggaaaggaatcggggctatttcagggctaagggcttactgggtgatgaatttcctctcttcccg
gagccggtaaaactgctctgatcgaaaaaatggtcggcgatcgacaaaagaccatcccaccgccgctcatt
gtgggggatttagccaccgataacgatgcccacgtctccgcagtgccggggcgatcgccattcaggtcacc
acaggaaatatttgccatctggaagcggaaatggtggccaaggcggccaaaagttagatttagacaatatc
gatcaattgatcattgaaaaatgttgtaatttggttggccaccacctatgatctaggggaagattacgggtcgt
attatttccgtcacagaaggggaggataaacccctaaatatcccgccacctcaaatcagcccagggtatttta
gtcaccaaacaggacattgccgcccagtggtttgatgcagagctggcttggcaaacctacggcaagtg
gcccccaagcccaaattttgcagtgtctgccgcacggggaaggattgcagtcctggtatgagtattggat
caatggcaactccaacactattcgccgttggtgatccagcattggcctaa

30

La séquence en acides aminés (285 aa) de HypB est la suivante et
est nommée SEQ ID NO:8 dans le cadre de la présente invention :

MCQNCGCSAVGTVAHSHHHHGDGNFAHSHDDHDQQEHHHHHGNYSKSPS
QQTVTIEPDRQSIAGQGILSKNDRLAERNRGYFQAKGLLVMNLFSSPGAGKT
ALIEKMVGDRQKDHPTAVIVGDLATDNDAAQRLRSAGAIQVTTGNICHLEAEM
VAKAAQKLDLDNIDQLIENVGNLVCPTTYDLGEDLRVVLFSVTEGEDKPLKYP

35

ATFKSAQVILVTKQDIAAAVDFDAELAWQNLRQVAPQAQIFAVSARTGKGLQS
WYEYLDQWQLQHYSPLVDPALA

HypC est une protéine d'expression/formation de la [NiFe]-
hydrogenase HoxEFUYH chez *Synéchocystis sp.* PCC6803. Le numéro
d'accèsion de la protéine dans Genbank est BAA18180.1. Le point isoélectrique
théorique de HypC est de 4,20 pour une masse moléculaire théorique : 7987,42
Daltons. La séquence en nucléotides (231bp) de HypC est la suivante et est
nommée SEQ ID NO:9 dans le cadre de la présente invention :

atgtgtctagccctacctggccaggtgtcagtttaatgcccactccgatcccctgttactgacgggaaagggtta
gctttgggggcatcattaaaaccattagccttgccctacgtacccgaggttaagggtgggggattacgtgattgtcc
atgtgggctttgccattagcattgtggacgaagaggcgcccaggaaactttgatagacttggcagaaatggg
agttaa

La séquence en acides aminés (76 aa) de HypC est la suivante et
est nommée SEQ ID NO:10 dans le cadre de la présente invention :

MCLALPGQVVSLMPNSDPLLLTGKVSFGGIIKTISLAYVPEVKVGDYVIVHVG
AISIVDEEAAQETLIDLAEMGV

HypD est une protéine d'expression/formation de la [NiFe]-
hydrogénase HoxEFUYH chez *Synéchocystis sp.* PCC6803. Le numéro
d'accèsion de la protéine dans Genbank est BAA16622.1. Le point isoélectrique
théorique de HypD est de 6,31 pour une masse moléculaire théorique de
40632,94 Daltons. La séquence en nucléotides (1125bp) de HypD est la suivante
et est nommée SEQ ID NO:11 dans le cadre de la présente invention :

atgaaatacgttgatgaatatcgggatgccaggcggtggcccattaccgtcaggcgatgccaggagata
accaaaccttgacgtgatggagattgcggcgccagaccacagcattgtcaaatatggcttgatgctt
gttgccgaagaatttgactctgatccatggtcccggtgtcctgtgtgcgtcactccgatggaattaattgaccag
gctttgtggttagctaagcaaccggagatcatttttgttcctttggcgatatgttgcggtgcccggcagtggggc
ggatttgctgagcattaaagcccaggcgccgatgtgcgcattgtctattctcctttggattgtttggcgatcgcca
gggagaatcctaactcggaagtggatatttcggagtaggtttgaaactacagcccctgccacggccatgact
ctccaccaagctagggcccagggaattagcaatttcagttactttgcgcccattgtattggtgccccggctatg
gaggctttattaggcaatcccaattccctcgtgcagggtttttggcgccagggcattgtctgtacggtgaccggg
gaaagggcctatcaacatatcgctgaaaaataccaagtaccattgtcatcactggcttgaacctgtggatatt

atgcagggcatctttgcctgtgtgcgccaactggagtcgggacaattcacctgcaacaatcaatatcggcgatc
 ggtccaacccagggaatgcccattgctcagaaaattattgaccaagtgtttgagccagtcgatcgccattgg
 cggggtttgggattaattccggccagcgggtttgggttaaggccagcatttggccctgggatgccgcagttaaa
 ttcgccaatttattgcaaaccatggccccaacgatgggagaaacagtgtgtattagcggggaaatttacaggg
 5 acaacggaagcccagcagattgtccagcctttggtactatctgcaccccagaacaacccttgggggctcccatg
 gtttctcggaaggagcctgtgccgcctattaccgttatcgccaacaattaccggaaccagtgggagcggcca
 gagtttag

La séquence en acides aminés (374 aa) de HypD est la suivante et
 10 est nommée SEQ ID NO:12 dans le cadre de la présente invention :

MKYVDEYRDAQAVAHYRQAIAREITKPWTLMEICGGQTHSIVKYGLDALLPKN
 LTLIHGPGCPVCVTPMELIDQALWLAKQPEIIFCSFGDMLRVPGSGADLLSIKA
 QGGDVRIYVSPDLCLAIARENPNREVFFGVGFETTAPATAMTLHQARAQGIS
 15 NFSLLCAHVLVPPAMEALLGNPNLSLVQGFLAAGHVCTVTGERAYQHIAEKYQV
 PIVITGFEPVDIMQGIFACVRQLESGQFTCNNQYRRSVQPQGNHAHQKIIDQVF
 EPVDRHWRGLGLIPASGLGLRPAFAPWDAAVKFANLLQTMAPTMMGETVCISG
 EILQGQRKPSDCPAFGTICTPEQPLGAPMVSSEGACAAYRYRQQLPEPVGA
 ARV

20

HypE est une protéine d'expression/formation de la [NiFe]-
 hydrogénase HoxEFUYH chez *Synéchocystis* sp. PCC6803. Le numéro
 d'accèsion de la protéine dans Genbank est BAA17478.1. Le point isoélectrique
 théorique de HypE est de 4,93 pour une masse moléculaire théorique de
 25 36425,60 Daltons. La séquence en nucléotides (1038bp) de HypE est la suivante
 et est nommée SEQ ID NO:13 dans le cadre de la présente invention :

gtgaacttagtctgtcccgttccccttgatcggtatccccaggtagttagccacggcgggcggtgaagtga
 gccaacaattacttaagcaaatTTTTTaccggcctttggcgcttctgaaacgggtagtcatgatcgggcggtttta
 30 ctgccaaccaaagttcttagctttcaccaccgactcctatgtgatcaatcccctcttttctggggcgatattgg
 ttctttggcagtcacggcacctgtaacgacccctgctatatcagcgttggtttt
 atcctcgaagaaggattgcccattggagaccctctggcggtggcccaatccctagggcaagcgggccaaa
 actgtgggtggaaattctaccggtgataccaaagtgggtggaccgggtaaggagacggcattttcatcaa
 caccagcggcattggttccctcgaccatcaaaaactatccatcccaatcaggtagcaggtaggcgatgccta
 35 attttgagcgggtgatttgggacgtcatggcatggccattatggcagtcgccaaggattagaatttgaaaccacc
 attgaaagtgtattcgccccgggtcacagagaagtgcaggcattattgtcggcagggatcccaatccattgtct
 gcgggatttaaccagggggggattagccagtgcggttaataaaattgccaaactccggggtaaccatggct
 ttacgagaaacgttaatcccgggtggaggccgaagtacaagccgcctgtgaactgttggtttgacccctctat
 gtggccaatgaggaagattcctggccattgtgccccggaagcagaacagaagaccgtggaattttgca

aactttccatccccaagctacggcgatcggtagtaacaggcaaaagtcacaaacctggggtagtcagt
ttggaaagttccattggtgcccccggtgctagacatgatcagtgaggagcaattaccccgattttag

La séquence en acides aminés (345 aa) de HypE est la suivante et
5 est nommée SEQ ID NO:14 dans le cadre de la présente invention :

MNLVCPVPLDRYPQVLLAHGGGGKLSQQLLKQIFLPAFGASETGSHDAAVFT
ANQSSLAFTTDSYVINPLFFPGGDIGSLAVHGTVNDLAMAGATPRYISVGFILE
EGLPMETLWRVAQSLGQAAQNCGVEILTGDTKVVDGRGKGDGIFINTSGIGSLD
10 HQTTHPNQVQVGDRILSLGDLGRHGMMAIMAVRQGLEFETTIESDSAPVHREV
QALLSAGIPIHCLRDLTRGGLASAVNEIAQTSGVTMALRETLPVEAEVQAACEL
LGFDPLYVANEGRFLAIVPPEAEQKTVEILQTFHPQATAIGTVTGKSAQTLGLV
SLESSIGAPRLDMISGEQLPRIC

15 HypF est une protéine d'expression/formation de la [NiFe]-
hydrogénase HoxEFUYH chez *Synéchocystis* sp. PCC6803. Le numéro
d'accession de la protéine dans Genbank est BAA10154.1. Le point isoélectrique
théorique de HypF est de 8,19 pour une masse moléculaire théorique de
85358,25 Daltons. La séquence en nucléotides (2304bp) de HypF est la suivante
20 et est nommée SEQ ID NO:15 dans le cadre de la présente invention :

atgttaaaaaccgttgccatacaggtccagggaaggggtgcaaggagtgggttttcgtcccttgtttatacccttg
cccaggaaatgggactgaatggttgggtgaataattccactcaaggagctaccgtgtcattaccgccgacga
aaaggcgatcgccgactttacggagagattaacgaagacattacccccctggttgattgaacaattagccg
25 ttgaacagttaccgctggaaagttttactaactttactatccgccccagtagtgatggccctaaaactgcgagtatt
ttaccgatttatccactgttccgcctgcttaacagaactatttgaccctagcgatcgccggttatctttaccccttatt
aactgtacccattgcggtccccgtacaccattattgaagccctaccttacgaccgtgtcgtaccaccatggct
aggtttcgccaatgtaccgactgtgaaaggaatataagcaaccaggcgatagacgcttccatgcccacct
aatgcctgtcctcgctgtggcccccaactggcttttgaaccgacaaggccaagtaattgcagaagcaaatg
30 aagctttaaactttgctgtagataatttaaaagtcggcaatattatcgctattaaaggcttaggtggcttccatttg
ttgtgatgccactgattttgaagctgtggaaaaattaagattaaggaaacatcgaccggataaaccttggcggt
aatgtatggtaatcttggtcaaattgtggagcattaccaacctaataatctagaagttgaattgttacaagtgcc
gccgccccctattgtgtattaaacaaaaaaaacaattaatttggtggaataattgccccaggcaacccccg
agtggcgtaattgttagcctatactccttgcacacttattactaaaaaaattaagaaacccatggtagctacc
35 agtggtaacttagctggggagcaaatgtcattgataatattgacgcttaaccgggtacaaaatattgctgacg
gtttctcgttcattgatcgccgattgttgcagtggtgattccgtgtccaaatagtagctgggaagccattatt
ttgcgtcgagccccgggttacgctcctcaacccattactttaccaaagcctactcaaaaaaaactattggcgat
gggaggtcattataaaaaatacagtggcgatcgccaaacaaatcaagcttacgtcagccaacattgggcga
ttgaattctgctccacctaccaaatttgaagaagccattgcccatttaagccagctatacgatttctctcccca

ggaaattgtgcagattacacctgattattcagtcacatgctgaaaaccaagcttgcctgtcactttgtg
 cagcatcactatgctcatatttttagcggttatggcgggaacatggagttatggaggagtcggtgtaggtattgctg
 ggatggcactggctacggcatggacgggtactatttgggggggagaatttttaaaatcacccaaggtacttggc
 agagaattgctcatctacaaccatttcatttattaggaatcaacaagccattaaatatcccatcggttgccttg
 5 gcggtgttatggcccacttttgggtgatgattttctgctgattctttaggaaattgggtgaatttcaataatgggttataaa
 acaagataaacagcagggttaaatacaggatctaacaacaaaaatttacgtcaactttggcaacgagggcaa
 gcaccgctcacttcgagtatgggaagattattgacgggtattgcgacactgataggattgattaacgaagtaactt
 ttgaaggcaggcggccatagctctggaagctcagattatgccaaatttaactgaggagtattatcctttgactct
 aaacaacaaggaaaaaaaattagctgttgattggcgcccctaattaaagctataaccacagaagatagaa
 10 gcaaaactaacctaatagccactaaattccacaacagtttagtaaatataattatcactattgcccacagcagg
 gaatcgaaaaagttgctctggggggaggttgcttcaaaattgttattgcttgcagtagcattactgcctcaaa
 aaagctggttttctcctttgtggccagagaactaccgccaacgacgggtgccattgcatgggtcaactgttag
 ctaaaattcaggctcggcaatatatctgtaa

15 La séquence en acides aminés (767 aa) de HypF est la suivante et
 est nommée SEQ ID NO:16 dans le cadre de la présente invention :

mlktvaiqvqgrvqgvgrpfvytlaqemglnwvnnstqgatvvitadekaiadfterltklpppglieqlaveq
 lplesfnftrpssdgpktsilpdlstcsactelfdpsdrrylpfincthcgpryitiialpydrcttmarfrqctdc
 20 ereykqpgdrrfhaqpnacprcgpqlafwnrqgviaeanealnfvadnlkvgniiakglggfhlccdatdfe
 aveklrlrkhrpdkplavmygnlgqivehyqpnnlevellqsaaapivlnkkkqlilveniapgnpvrgvmlayt
 plhhlllkkklkpmvatsgnlageqicidnidaltrlqniadgflvhdrpivcpvddsvvqvigakplfrrargyapq
 pitltpkptqkklamgghykntvaiakqnqayvsqhlgdlnsptyqnfeeaiahlsqlydfspqeivadlhpdy
 fshqyaenqalpvtfvqhhyahilavmaehgvmeesvlgiawdgtgygmdgtiwggeflkitqgtwqriah
 25 qpffhlgnqqaikyphrialallwptfgddfsadslgnwlnfnngfknkinsrlnqdlnnknrlqlwqrgqapltss
 mgrlfdgiatlignevtfegqaaialeaqimpnlteeyypitlnnekkklavdwrplikaittedrsktnliatkfhns
 lvnliitiaqqqgiekvalgggcfqncyllastitalkkagfsplwprelppndgaicmgqllakiqarqyc

HoxW est une protéine hypothétique chez *Synéchocystis sp.*
 30 PCC6803. Le numéro d'accèsion de la protéine dans Genbank est BAA17680.1.
 Le point isoélectrique théorique de HoxW est de 4,93 pour une masse
 moléculaire théorique de 17129,53 Daltons. La séquence en nucléotides (474bp)
 de HoxW est la suivante et est nommée SEQ ID NO:17 dans le cadre de la
 présente invention :

35 atgcaggccaatccaccaagtcactttaatcatcggttacggcaataccctgcggggggacgacggcggtg
 gggcggttacctagcgggaagaaattgctcagcaaaaactggccccattgtggagttattccacccatcaactcac
 ccagaattggccgagggcgatcgccgctgtggaccgggtaattttcattgatgccaaactgcaggaatcagca
 aacgaaccatcgggtggaagttgtggccttaaaaaccctggaaccaacgaactgtcaggggatttggggca

ccggggtaatcccaggggaactcttgaccctggctaaaattctctacggcggtgaggttaaaggcttggtgggtgtt
gattccggccttcaccttgattatggagagaaaattgtctcccctgaccgcccgggccaagccgaagccttag
cccagatccgccccttggtattgggggagagataa

5 La séquence en acides aminés (157 aa) de HoxW est la suivante
et est nommée SEQ ID NO:18 dans le cadre de la présente invention :

MPGQSTKSTLIIGYGNTLRGDDGVGRYLAEIEAQQNWP HCGVISTHQLTPELA
EAIAAVDRVIFIDAQLQESANEPSVEVVALKTLEPNELSGDLGHRGNPRELLTL
10 AKILYGVEVKAWWWLIPAFTFDYGEKLSPLTARAQAEALAQIRPLVLGER

Optionnellement, selon un mode de réalisation suivant
l'invention, l'ensemble des facteurs de maturations HypA, HypB, HypC, HypD,
HypE, HypF et HoxW sont assemblés sous forme d'une séquence nucléotidique
15 concaténaire (6515bp). Cette séquence nucléotidique comporte le site de
restriction NcoI (CCATGG) en début de séquence et le site de restriction AvrII
(CCTAGG) en fin de séquence pour réaliser le clonage dans le plasmide
pACYCDuet-1. Cette séquence nucléotidique concaténaire est la suivante et est
nommée SEQ ID NO:19 dans le cadre de la présente invention :

20 ccatggcccacgaagttagcctgatggaacagacgctggccattgccattgcgcaggcgggaagaccacgg
ggcgagccaaattcacggttaacgctgcgcgttggcgagcagtcgggtgtgttcagatgcattacgctttgc
atttgaagttgttcgccagaacacaatggctgcagaagcagctctggaaatcgaggaaattccggttacctgtc
gttgcagcattgtcatgaaaatttcagccggaggattggatatagatgtccccattgtgaccagattagtcaa
25 accggtatggacggcaaacagctggagttagcaagcctggaactgagctaagcatggaaaggaggtcgttat
tatgtgccagaactgtgggtgtagcgcggttgggaccgttgcgcatagccaccatcaccacggggatggcaa
ctttgcgcatagccatgacgaccacgaccagcaggagcaccaccaccacggtaactattcaaaatcac
catcacagcagaccgtaaccatagaaccagacagacaaagcatagcaattggccaaggaattctgagcaa
aaacgatcgtctggcagaacgcaaccgcggtacttcaggccaaaggctgttagtaataatttctgagc
30 agcccgggagcaggcaaaaccgcactgatcgaaaaaatggttggtgatcgtcagaaagatcatccgaccg
cagttattgttggtgatctggcaaccgataatgatgcacagcgtctgcgtagcgcagggtgaattgcaattcagg
ttaccaccggtaataatttgcacatctggaagcagaaatggttgcaaaagcagcagaaactggatctggataat
attgatcagctgattattgaaaatgttggaatctggttgcgaccacctatgatctgggtgaagatctgcgtgtt
gttctgttttagcgttacccaagggtgaagataaaccgctgaaatatccggcaacctttaaagcgcacaggttatt
35 ctggttaccaaacaggatattgcagcagcagttgattttgatgcagaactggcatggcagaatctgcgtcaggtt
gcaccgcaggcacagattttgcagttagcgcacgtaccggtaaaggctgcagagctggatgaatatctgg
atcagtgccagctgcagcattatagcccgtggttgatccggcactggcataagagttgaaaggaggtttcctc
catgtgcctggcggtaccggggcaggttgttcgttaatgccgaactcggatccgctgttattaaccgggaaagtt
agcttgggtggtattattaaaaccattagcctggcgtatgtccggaagttaaagttggcgattatgttattgtcatgt

tggtttgctatcagtattgttgatgaagaagcagcacaggagacactgattgatctggccgagatgggcgttta
 attcctaaaaggagggttttagccatgaagtacgttgacgaataccgcgacgcgcaggcagttgcccactaccg
 ccaggccattgcccgtgaaattaccaaaccgtggacgctgatggaaatttggtggggccagaccatagcat
 cgttaaataatggtctggatgcattattaccgaaaaacttaacctaatccacgggtccgggtgtccggttgtgttac
 5 gccgatggaactgattgatcaggcattatggctggcaaaacagccggagattatTTTTtagcttgggtgatag
 ctgcgcgtgccgggtagtggtgcagatctgctgagcattaaagcacaggggggagacgttcgtatagttattct
 ccgtagattgtctggcgattgcgcgtgaaaatccgaatcgtgaagttgttttttgggtgggtttgaaactaccg
 cccgggcaaccgcaatgacactgcatcaggcacggggccagggtattagcaatttagcttattatgtgcaca
 cgtgttagttccgccggcgatggaagctctgctgggtaacccgaatagcctgggtcaagggttttagcagcag
 10 gtcatgtttgtacgggtaccggtgagcggcgctatcagcatattgcagagaaatatcagggtccgatagttattac
 cggtttgaaccggtgatattatgcagggtattttgcatgtgttcgtcagctggagagcgggcagttacatgtaa
 taatcagtaccggcggtcgggtcagccgcagggtaacgcacatgccagaaaattattgaccagggttttgaac
 cgggtgatcgtcattggcggtgattaggtcttattccggcctcagggttaggtttacgtccggcatttgcaccgtgg
 gacgcagcagttaaattcgcaaatctgttacagacaatggctccgacaatgggtgaaaccgtttgtattctggc
 15 gaaattttacagggtcagcgcaaacctagtattgtctctcatttgggtaccatctgcacccccggaacaaccgct
 gggcgccccctatggttagcagtgaaggcgctgtgcccgcctattatcgttatcgtcagcaattaccggaaccggt
 tgggtccgcacgtgttaattttgcaaaggaggctcctgccaatgaacctgggtgtgtccggtgccgctggaccgct
 acccgccagggtttactggcacacggggggggggggaagctgagtcagcagctgttaaacagattttctgcc
 ggcgttgggtgcatcagaaaccggttagccatgatgcagcagttttaccgcaaatcagagcagcttagcattta
 20 caacagattcctatgttatcaatccgctgttttctcgtggtgatattggtagtcttgacgttcattggaaccgtta
 gatttagcaatggcagggtgcaacaccgctgtatattagcgttgggttattctggaggagggttaccgatggag
 acactttggcggtgttgcaaaagcctgggtcaggcagcacagaattgtggagtgaatatataacagggtgatac
 caaagttgtgatcgtgggaaggagatggtattttattaatacatcgggtatcggttagtttagatcaccagcaa
 accattcatccgaatcagggtcagggttggtgatcgtctgattctgagtggtggttaggacggcatggtatggcaa
 25 ttatggcagttcgtcagggcctggaatttgaaacaaccattgaaagcgatagcgcaccgggttcacgtgaggtt
 caggctctgctgagcgcagggtattccgattcactgtctgctgacttaaacggtggtggtctggcaagcgccgt
 gaacgaaattgcacaaacctcagggtttacaatggctctgctgaaaccttaattccggttgaggcggaagttc
 aagccgcctgtgaactgctgggtttgatcctttatatgttgcaaacgaaggccgtttcctggccattgttccgccg
 gaagccgaacagaaaaccgttgaaattctgcagaccttaccggcaggcgaccgcaattggtaccgttacc
 30 ggcaagagtgcacagaccttaggtctggttagcctggagagtagcatagggtgccccacgtctgttagatatgat
 tagcgggagaacaactgccacgtatttgtaagactccaaaggaggctagattaatgctgaaaaccgttgccatt
 cagggtcaggggcgcgttcaggggggtggtttcggccgtttgtttacaccttagcccaggaaatgggtctgaatg
 gctgggttaataactctacgcagggtgcaaccgtgttattaccgcagatgagaaagcaattgcagattttaccg
 aacgtctgacaaaacactgccgccaccgggactgatcgaacaactggcagtgaacagctgccgctgga
 35 aagctttaccaactttaccattagaccgagtagcgatggtccgaaaaccgcaagcatcctgccagatctgagc
 acatgtagcgctgtctgaccgaattatttgatccagtgatcgtcgttatctgtacccttttattaattgtaccactg
 tggctctcgctataccattattgaagcactgccttatgaccgttgctgtaccacaatggctcgttttcgtcagtgta
 ggattgtgaacgtgaatataagcagccgggggaccgcccgttttcatgcacagccaaacgcgtgtccgcgttgt
 ggtccgcagctggcattctggaaccgtcaggggtcaagttattgcagaagccaatgaagcactgaatttcgcag
 40 tagataatttaaagggtcggttaatatatcgcaatcaaagggtctgggtggttttattatgtgtgatgaaccgattt
 gaagccgttgaaaaactgcgtttacgtaaacatcgccgggataagccgctggccgttatgtacggtaattctgg
 gtcagattgttgagcattatcagccgaataatttagaagttgagctgctgcagagcgcagcagcacctattgttct
 tctgaataaaaagaaacagctgattctggttgaaaatattgcaccgggcaatccgcgtgtgggtgttatgctggc

atataccccgttacatcacctgttacttaaaaagttaaagaagccgatggttgcaacctccggttaacttagcagg
 cgaacagatttgattgacaatattgacgcactgacctgttacaaaatattgccgacggcttctggttcacgatc
 gtccgattgttgccggttgacgatagtgtgttcagattgtggcaggtaaaccgttatTTTtaagaagagcccgcg
 gttatgcaccgcagccgattacccttcttaaacccacccagaaaaagttattagcaatgggaggccattataa
 5 aaataccgttgcaattgcaaagcagaatcaggcataatgaagccagcatttaggtgatttaaacagcgcacca
 acctaccaaatttcgaagaggcgatagccatttatcacagctgtatgactttagccccaggaaattgtcgcga
 gatctgcatccggattacttttagccatcagtacgcagaaaaaccaagccctgccggtgacgtttgtacagcatca
 ttatgcacatatctggcagttatggcagaacatgggtgtatggaagaaagcgttttaggcattgcatgggatggc
 accggttatggtatggatggtaccattgggggtggtgaatttctgaaaattacgcaggggacctggcaagaatt
 10 gcacatctgcagccgtttcatctgttagggaatcagcaggcaattaaatatccgcaccggattgcacttgctctg
 ctgtggccgacattcggggacgatttttagcgcgatagtctgggtaattgggttaaatttaacaacggtttcaaga
 acaagatcaacagccgttttaaccaagacttaataataagaacctgagacaactgtggcagcgtgggcag
 gcaccgctgacctcgagcatgggcagattatttgatggtatcgcaacactgattggtctgatcaatgaagtaac
 ctttgaaggccaggcagcaattgcattagaggcacaaattatgccgaatctgaccgaagaatactatccgctt
 15 acctgaataacaaagaaaaaaaactggcagttgattggcgtccgctgattaaagcaattaccaccgaagat
 cgtagcaaaaaccaatctgattgcaaccaaatttcataatagccctgggttaatctgattattaccattgcacagcagc
 agggattgaaaaagttgactgggtggtggtgtttcagaattgttatctgtggcaagcaccattaccgcactg
 aaaaaagcaggttttagcccgctgtggccgcgtgaactgccgccgaatgatggtgcaatttgatgggtcagct
 gctggcaaaaattcaggcacgtcagtatattgttaactcaacaaaggaggagctgggttatgccgggtcagag
 20 caccaaaagcaccctgattatcgggtacgggaacaccttacgtggggacgatgggggtggggcgctacctgg
 cagaagaaatagcacagcagaactggccgcactgtggtgttattagcacacatcagctgaccccggaactg
 gccgaagcaattgcagcagtgatagagtatttttattgacgcccaactgcaggaaagtgc aaatgaaccgt
 cagttgaagtgttgccctgaaaaccttagaacccaatgaattaagtggagatctgggtcatctggttaatccgc
 gtgagctgtgaccttagccaaaatattatatggtgtgaagtcaaagcgtgggtggttctgattccggcccttacc
 25 tttgattatggtgagaaattatcgcccttaacagcacgtgctcaggccgaagcactggcacagattcgtccgctg
 gttctgggggaacgttaacctagg

La figure 3 représente la carte du plasmide pACYCDuet-1 utilisé
 pour construire le vecteur d'expression d'au moins un des facteurs de maturation
 30 HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW par insertion de SEQ ID NO:5
 et/ou SEQ ID NO:7 et/ou SEQ ID NO:9 et/ou SEQ ID NO:11 et/ou SEQ ID NO:13
 et/ou SEQ ID NO:15 et/ou SEQ ID NO:17 et/ou SEQ ID NO:19 dans pACYCDuet-
 1. pACYCDuet-1 est un plasmide de 4008pb, possédant une origine de
 réplication pour *E. coli*, un gène de résistance au chloramphénicol, deux sites de
 35 clonage multiple (MCS) contenant de nombreux sites de restriction, le promoteur
T7 et le terminateur de transcription *T7*. Il contient également le gène *lacI* codant
 pour un répresseur de transcription. Cette répression de la transcription peut être
 levée par ajout d'IPTG.

La figure 4 montre l'analyse de la digestion du vecteur d'expression pACYCDuet-1 + HypABCDEFHoxW (séquence concaténaire SEQ ID NO:19) par les enzymes de restrictions NcoI et HindIII. Deux fragments d'ADN à environ 6000pb et à environ 4000pb sont mis en évidence, comme attendu pour une telle digestion enzymatique du vecteur d'expression pACYCDuet-1 + HypABCDEFHoxW. Ceci confirme la présence de la séquence HypABCDEFHoxW dans le vecteur d'expression pACYCDuet-1.

3. Introduction des vecteurs d'expressions pET26b(+) + HoxH et pACYCDuet-1 + HypABCDEFHoxW chez *E. coli*.

Les cellules compétentes BL21 (DE3) d'*E. coli* ont été utilisées pour l'expression recombinante de la sous-unité HoxH de la [NiFe]-hydrogénase HoxEFUYH de *Synéchocystis sp.* PCC6803. Ces cellules sont utilisées en routine pour la production de protéine recombinante sous le contrôle du promoteur T7.

Les deux vecteurs d'expression « pET26b(+) + HoxH » et « pACYCDuet-1 + HypABCDEFHoxW » ont été introduits dans ces cellules par co-transformation selon la méthode traditionnelle du choc thermique bien connue de l'homme de métier. Les transformants présentant la double résistance à la kanamycine (50µg/ml) et au chloramphénicol (25µg/ml) ont été conservés sur milieu gélosé à 4°C.

4. Vérification de la présence des séquences d'ADN d'intérêts chez *E. coli*.

Il est possible que certaines colonies possèdent les deux plasmides permettant la résistance aux marqueurs de sélections utilisés sans pour autant posséder les séquences d'ADN d'intérêts, à savoir HoxH et HypABCDEFHoxW. Par conséquent, il est important de vérifier la présence de ces séquences d'ADN d'intérêts. Une expérience, bien connue de l'homme de métier et consistant en une extraction de l'ADN plasmidique de la colonie suivie par une digestion enzymatique de cet ADN plasmidique par les enzymes de restrictions utilisés lors

de l'insertion des séquences d'ADN d'intérêts dans les plasmides, a été réalisé.

Ainsi, une extraction d'ADN plasmidique, selon un protocole bien connu de l'homme de métier, a été réalisée sur une colonie présentant la double résistance à la kanamycine et au chloramphénicol.

5 La digestion enzymatique a ensuite été réalisée, selon un protocole bien connu de l'homme de métier. La digestion du vecteur d'expression pET26b(+) + HoxH par les enzymes de restriction NdeI et BlnI donne deux fragments d'ADN, respectivement le plasmide pET26b(+) linéarisé à 5300pb et le fragment d'ADN d'intérêt HoxH à 1500pb (voir **figure 5**). La digestion du
10 vecteur d'expression pACYCDuet-1 + HypABCDEFHoxW par les enzymes de restriction NcoI et HindIII donne deux fragments d'ADN, respectivement le plasmide pACYCDuet-1 linéarisé à 4000pb et le fragment d'ADN d'intérêt HypABCDEFHoxW à 6500pb (voir la **figure 6**). Ceci confirme la présence dans la colonie bactérienne de la séquence HoxH et HypABCDEFHoxW,
15 respectivement dans les vecteurs d'expression pET26b(+) et PACYCDuet-1.

5. Production recombinante et purification par chromatographie d'affinité de HoxH chez *E. coli*.

20 Pour obtenir la forme recombinante de la sous-unité HoxH de la [NiFe]-hydrogénase HoxEFUYH de *Synéchocystis sp.* PCC6803, une colonie d'*E. coli* contenant les deux vecteurs d'expressions a été utilisée pour ensemencer 4 erlenmeyers d'un volume de 250ml chacun. Le milieu de culture utilisé est le milieu 2XYT (16g de tryptone, 10g d'extrait de levure, 5g de NaCl
25 par litre) complété par FeAmCi 100µM, NiSO₄ 50µM, cystéine 50µM, kanamycine 50µg/ml et chloramphénicol 25µg/ml. A une densité optique (DO 600nm) de 1.2, 0,2mM IPTG sont ajoutés à la culture afin d'induire la production recombinante de la sous-unité HoxH à 18°C et sous agitation (vitesse d'agitation) de 200rpm. La durée de la production est de 20h à 18°C. Les cellules sont ensuite récoltées
30 par centrifugation (15min à 4500rpm) avant d'entamer le processus de purification.

Une méthode de purification a été mise au point afin de confirmer la production de la forme recombinante de la sous-unité HoxH de la [NiFe]-

hydrogénase HoxEFUYH de *Synéchocystis* sp. PCC6803. Cette méthode (voir **figure 7**) permet de purifier HoxH jusqu'à une apparente homogénéité en une seule étape de chromatographie d'affinité. La méthode implique une chromatographie d'affinité avec un métal immobilisé (IMAC). L'agent chélatant est l'acide nitrilotriacétique (NTA) qui permet la liaison entre la phase immobile et l'ion métallique. Le métal immobilisé est le nickel (Ni). Cette chromatographie permet une séparation très spécifique de protéines contenant une étiquette poly-histidines. Après 20 h de production recombinante de HoxH à 18°C, 1 litre de culture d'*E. coli* est récolté par centrifugation (15min à 4500rpm). Les cellules sont re-suspendues dans 25ml de tampon de lyse (tampon sodium phosphate 20mM pH 7.5 300mM KCl + 2µl benzonase + 50µl MgCl₂ 1M + 1 pastille composée d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA) et ensuite lysées par la presse de French. Le surnageant (25ml) est récupéré par centrifugation (15min à 15000rpm), filtré (0,45µm) et appliqué sur la colonne Ni-NTA (1ml) préalablement équilibré dans le tampon de lavage (tampon sodium phosphate 20mM pH 7.5 300mM KCl + 10mM imidazole). La colonne est ensuite lavée avec 35ml de tampon de lavage (tampon sodium phosphate 20mM pH 7.5 300mM KCl + 10mM imidazole) jusqu'à ce que l'absorbance à 280nm (représentative de la concentration en protéine) retombe à zéro. L'élution est alors réalisée par l'intermédiaire de 5 paliers avec concentration croissante en imidazole, respectivement 50mM, 100mM, 150mM, 200mM et 250mM) (voir **figure 7**).

L'analyse SDS-PAGE des diverses fractions obtenues lors de la chromatographie montre une bande prédominante proche de 54kDa, ce qui est la taille attendue pour la sous-unité HoxH, dans les fractions éluées à une concentration de 100mM, 150mM, 200mM et 250mM en imidazole (voir **figure 8**). HoxH montre par ailleurs un excellent degré de pureté puisqu'aucune bande supplémentaire n'est visualisable dans les fractions éluées à des concentrations de 150mM, 200mM et 250mM en imidazole. Ceci nous permet de conclure que HoxH a été purifié jusqu'à une apparente homogénéité en une seule étape de chromatographie d'affinité.

Afin de confirmer qu'il s'agit bien de la forme recombinante de la sous-unité HoxH comprenant le site actif de la [NiFe]-hydrogénase HoxEFUYH de *Synéchocystis* sp. PCC6803, une immuno-détection à l'aide d'un anticorps

anti-étiquette poly-histidines a été réalisée (voir **figure 9**). Un marqueur de poids moléculaire contenant une protéine marquée d'une étiquette poly-histidines a été ajouté afin de servir de contrôle positif. La protéine recombinante HoxH est bien détectée dans la charge, c'est-à-dire le surnageant issu de la lyse des cellules d'*E. coli* et appliqué sur la colonne d'affinité Ni-NTA. La protéine recombinante HoxH est également présente dans la fraction non-absorbée par la colonne Ni-NTA. Cela indique que la capacité de chargement de la colonne Ni-NTA est dépassée et qu'une proportion de la protéine recombinante HoxH n'a pas pu s'y fixer. Aucun signal n'apparaît dans la « fraction élution 50mM ». La protéine recombinante HoxH reste accrochée à la colonne Ni-NTA à cette faible concentration en imidazole. Enfin, la présence de la protéine recombinante HoxH est confirmée par immuno-détection dans la fraction 200mM à la taille attendue, c'est-à-dire proche de 54 kDa. Ceci confirme de manière non-ambiguë la purification de la protéine recombinante HoxH en une seule étape de chromatographie d'affinité. Lorsque la protéine recombinante HoxH est mise en évidence par immuno-détection dans une fraction, quelques bandes de faible intensité apparaissent également à des poids moléculaires inférieurs à 54kDa. Il s'agit vraisemblablement de la protéine recombinante HoxH partiellement dégradé à l'extrémité C-terminal. La proportion de protéines recombinantes HoxH dégradées semble minimum car l'analyse SDS-PAGE ne montre pas la présence de ces bandes. Pour rappel, l'immuno-détection est une méthode extrêmement sensible mettant en évidence de très petite quantité de protéine.

6. Mise en évidence de l'activité hydrogénase chez la protéine recombinante HoxH

La faculté d'exprimer de manière recombinante les [NiFe]-hydrogénases permet une large gamme de possibilité dans l'optique de produire des formes mutantes aux propriétés très différentes de l'enzyme native. La **figure 10** montre la structure de HoxEFUYH, la [NiFe]-hydrogénase de *Synéchocystis sp.* PCC 6803. Le NADPH est le cofacteur de HoxEFUYH *in vivo* chez *Synéchocystis sp.* PCC 6803. Le méthyl-viologène (MV) est utilisé comme médiateur redox lors du test standard d'activité *in vitro* des [NiFe]-hydrogénases.

La **figure 11** est une représentation schématique (flèche grisée) du transfert d'électrons et des interactions attendues entre HoxEFUYH et le NADPH et/ou le MV.

Il est généralement acquis de l'homme de métier que le MV peut transmettre directement les électrons à un ou plusieurs centres FeS en évitant le FMN. Cependant, comme illustré à la **figure 12**, il n'est pas connu à ce jour si la seule sous-unité HoxH, contenant le site actif de la [NiFe]-hydrogénases HoxEFUYH de *Synéchocystis sp.* PCC 6803, peut accepter les électrons directement du MV et donc produire de l'hydrogène en l'absence de relais redox additionnel. Dans le cadre de la présente invention, pour tester cette possibilité, a été mis en oeuvre le test standard d'activité *in vitro* des [NiFe]-hydrogénases en présence de la protéine recombinante HoxH et de MV (voir **figure 13**). Ce test standard d'activité *in vitro* des [NiFe]-hydrogénases, selon un protocole bien connu de l'homme de métier, inclut l'utilisation d'une fiole de 2ml fermée par un septum, étanche à l'air et dégazé à l'azote. 1ml de mélange réactionnel, composé de 100mM de dithionite de sodium et 10mM de MV dissout dans du tampon phosphate 10mM pH 6.8 et également dégazé à l'azote, est ajouté dans la fiole à l'aide d'une seringue. 200µg de protéines recombinantes HoxH sont également ajoutés au mélange réactionnel. La production d'hydrogène démarre dès le moment où les protéines recombinantes HoxH sont ajoutées (moment indiqué par une flèche sur la **figure 13**). Le contenu en protéines a été déterminé par la méthode Bradford (Bradford. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254). La production d'hydrogène est monitorée en continu à l'aide d'un micro-senseur à hydrogène préalablement calibré (Unisense, Aarhus, Danemark).

L'activité de la protéine recombinante HoxH peut donc être calculée puisque la quantité de protéine recombinante HoxH ajoutée (en mg.ml⁻¹) est connue tout comme la vitesse de dégagement d'hydrogène (µmol H₂.min⁻¹) pour cette quantité spécifique de protéine recombinante ajoutée. Cette activité spécifique peut, par exemple, être de 0.1 µmol H₂.min⁻¹.mg⁻¹.

De façon inattendue et surprenante, le fait que la seule sous-unité catalytique HoxH contenant le site actif de la [NiFe]-hydrogénase HoxEFUYH de

Synéchocystis sp. PCC6803 puisse catalyser la réduction des protons, acceptant les électrons d'un médiateur redox (par exemple, le méthyl-viologène) sans l'intermédiaire de centres FeS additionnel servant de relais redox, a été mis en évidence dans le cadre de la présente invention.

5 En l'absence de l'expression des autres sous-unités du pentamère HoxEFUYH, les problèmes inhérents à l'état de la technique sont solutionnés au moins en partie : la protéine recombinante HoxH est capable à elle seule de catalyser la réduction des protons, acceptant les électrons d'un médiateur redox (par exemple le méthyl-viologène) sans l'intermédiaire de centres FeS
10 additionnel servant de relais redox. Cette caractéristique exceptionnelle démontre le grand avantage de la présente invention, en particulier la production recombinante d'une seule sous-unité possédant le site actif d'une [NiFe]-hydrogénase et étant catalytiquement active.

 La présente invention a été décrite en relation avec des modes de
15 réalisations spécifiques, qui ont une valeur purement illustrative et ne doivent pas être considérés comme limitatifs. D'une manière générale, il apparaîtra évident pour l'homme du métier que la présente invention n'est pas limitée aux exemples illustrés et/ou décrits ci-dessus.

 L'usage des verbes « comprendre », « inclure », « comporter », ou
20 toute autre variante, ainsi que leurs conjugaisons, ne peut en aucune façon exclure la présence d'éléments autres que ceux mentionnés.

 L'usage de l'article indéfini « un », « une », ou de l'article défini « le », « la » ou « l' », pour introduire un élément n'exclut pas la présence d'une pluralité de ces éléments.

25

Revendications

1. Polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.
5
2. Polypeptide monomérique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est isolé de son environnement naturel, en particulier isolé d'une protéine naturelle de type [NiFe]-hydrogénase.
10
3. Polypeptide monomérique selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est recombinant ou hétérologue.
4. Polypeptide monomérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il est purifié.
15
5. Polypeptide monomérique selon l'une quelconque des revendications précédentes dont la séquence en acides aminés tronquée ou non présente au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:4.
20
25
6. Polypeptide monomérique selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il présente une activité hydrogénase d'au moins $0,05 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, de préférence d'au moins $10 \mu\text{mol H}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.
30

7. Cellule hôte incluant un polypeptide monomérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

5 8. Cellule hôte selon la revendication 7, caractérisée en ce qu'elle inclut en outre au moins un facteur de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase, de préférence au moins un facteur de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase choisi dans le groupe constitué des facteurs de maturation HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW

10

a) dont les séquences respectives en acides aminés présente chacune au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par rapport aux séquences en acides aminés SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 ; ou

15

20

b) codés ensemble par une séquence nucléotidique concaténaire présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID NO:19, laquelle code pour l'ensemble de ces facteurs de maturation.

25

30

9. Cellule hôte incluant un polynucléotide codant pour un polypeptide monomérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

10. Cellule hôte selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'elle inclut en outre au moins un facteur de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase, de préférence au moins un facteur de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase choisi dans le groupe constitué des facteurs de maturation HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW

a) dont les séquences respectives en acides aminés présente chacune au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par rapport aux séquences en acides aminés SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 ; ou

b) codés ensemble par une séquence nucléotidique concaténaire présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID NO:19, laquelle code pour l'ensemble de ces facteurs de maturation.

11. Procédé d'obtention, par exemple dans une cellule hôte, d'un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- modification d'un vecteur d'expression, par exemple d'un plasmide,

en y incluant un polynucléotide exogène dont au moins une partie code pour un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase ; et

5

- incubation dudit vecteur d'expression modifié selon des conditions d'incubation permettant d'assurer une expression dudit polynucléotide exogène pour produire un polypeptide monomérique comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase.

10

12. Procédé d'obtention d'un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase selon la revendication 11, caractérisé en ce que ladite étape de modification dudit vecteur d'expression consiste en une inclusion dans ledit vecteur d'expression dudit polynucléotide exogène dont au moins une partie code pour ledit polypeptide monomérique dont la séquence en acides aminés tronquée ou non présente au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:2 et/ou par rapport à la séquence en acides aminés de SEQ ID NO:4.

20

25

13. Procédé d'obtention d'un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase selon la revendication 11 ou 12, caractérisé en ce que ladite étape de modification dudit vecteur d'expression comprend en outre l'inclusion dans ledit vecteur d'expression d'au moins un facteur de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase, de préférence d'au moins un facteur de maturation de ladite protéine de type [NiFe]-hydrogénase choisi dans le groupe constitué des facteurs de maturation

30

HypA, HypB, HypC, HypD, HypE, HypF et HoxW

- 5 a) dont les séquences respectives en acides aminés présente chacune au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 99% d'identité, respectivement par
- 10 rapport aux séquences en acides aminés SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:18 ; ou
- 15 b) codés ensemble par une séquence nucléotidique concaténaire présentant au moins 15% d'identité, de préférence au moins 20% d'identité, plus préférentiellement au moins 40% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 60% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 80% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 90% d'identité, plus préférentiellement encore au moins 95% d'identité, plus
- 20 préférentiellement encore au moins 99% d'identité, par rapport à la séquence nucléotidique SEQ ID NO:19, laquelle code pour l'ensemble de ces facteurs de maturation.
- 25 14. Procédé d'obtention d'un polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comprend une étape subséquente d'isolation et/ou de purification dudit polypeptide monomérique.
- 30 15. Utilisation d'un polypeptide monomérique selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comportant une seule sous-unité comprenant le site actif d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase, ledit polypeptide monomérique présentant une activité hydrogénase et étant présent ou non dans une cellule, pour produire ou consommer de l'hydrogène par

incubation dudit polypeptide monomérique selon des conditions d'incubation permettant d'assurer une production ou une consommation d'hydrogène ou pour revêtir une surface, en particulier pour revêtir une surface d'un conducteur électrique, par exemple pour revêtir une surface d'une anode ou d'une cathode.

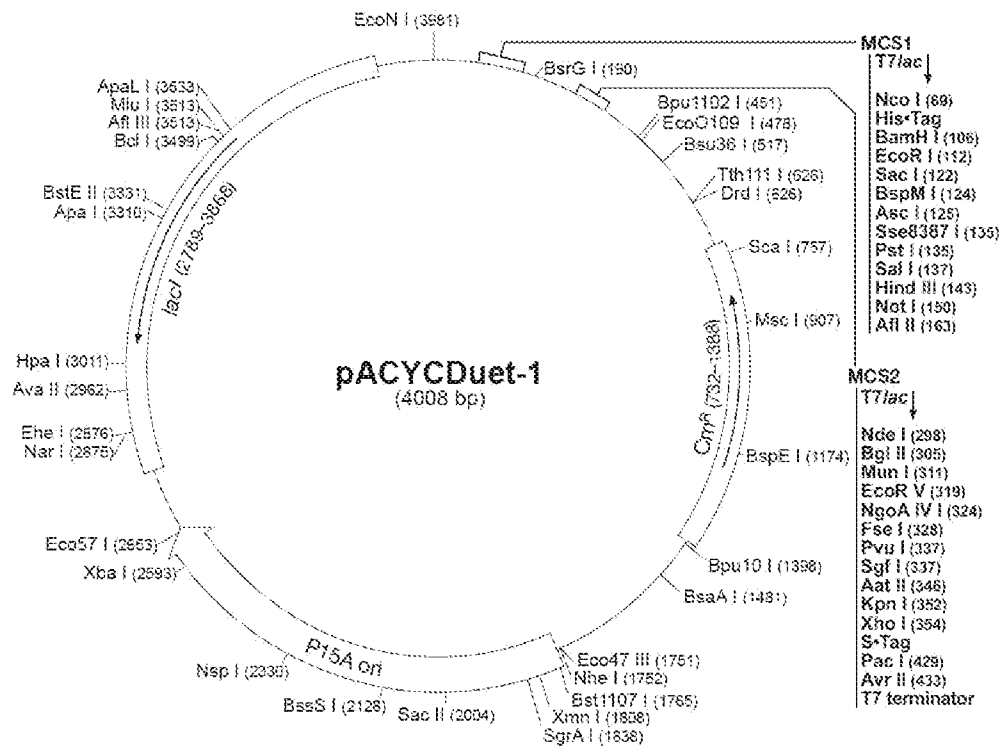


FIGURE 3

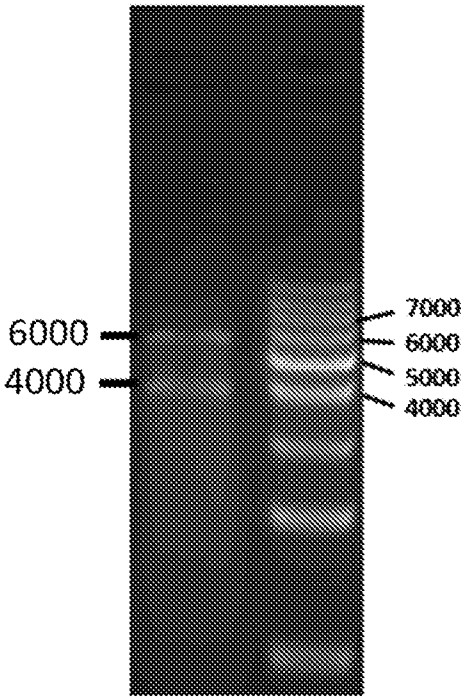
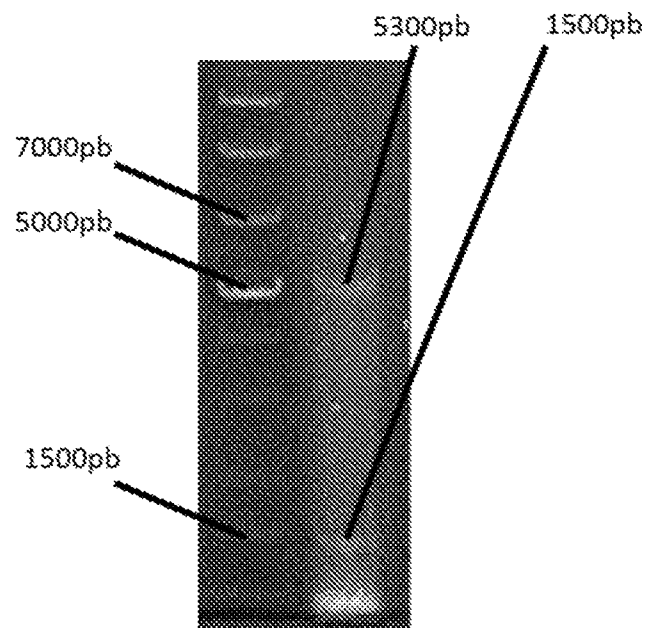
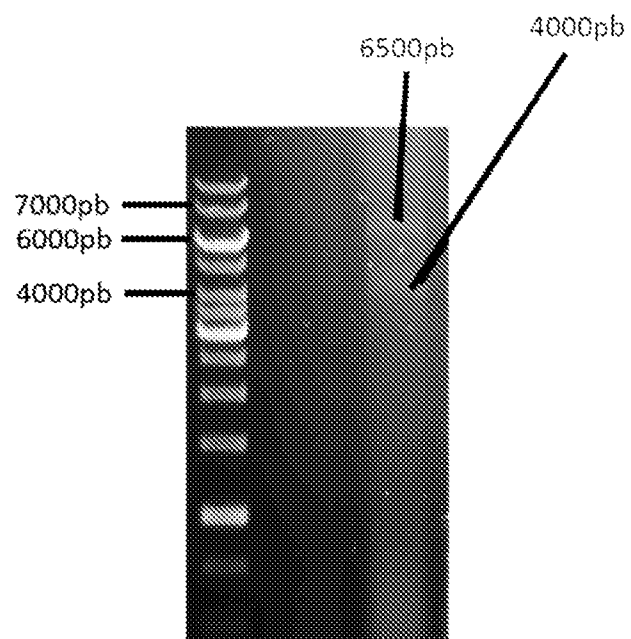


FIGURE 4

**FIGURE 5****FIGURE 6**

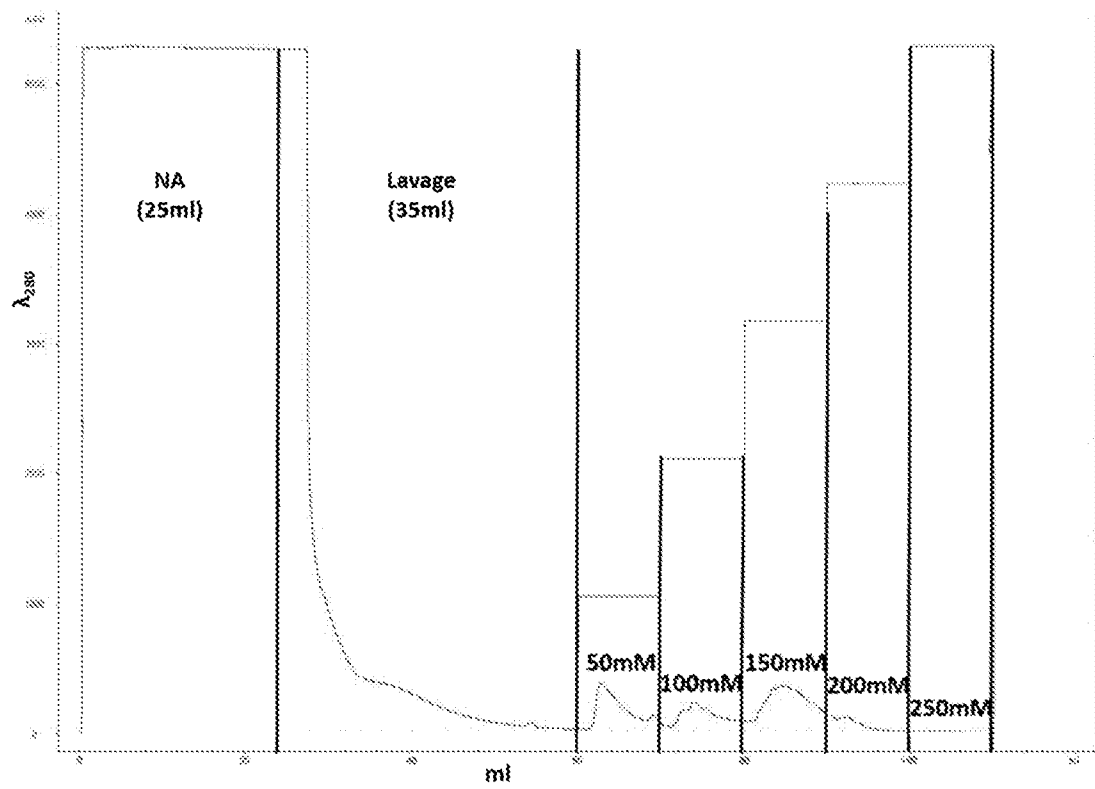


FIGURE 7

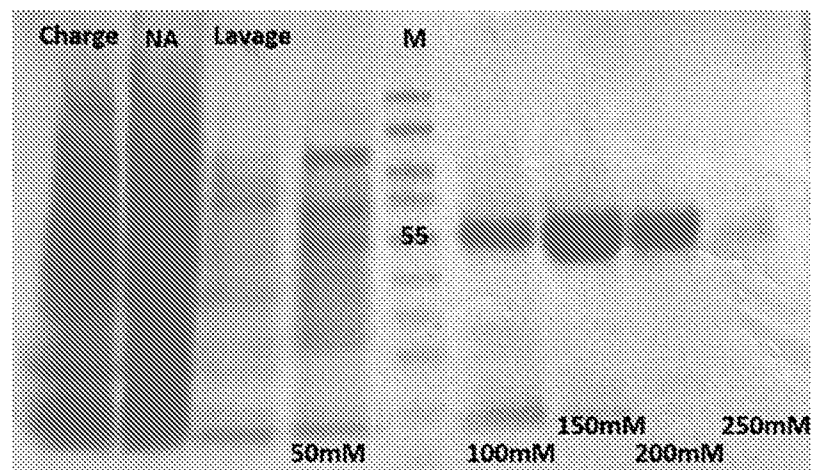


FIGURE 8

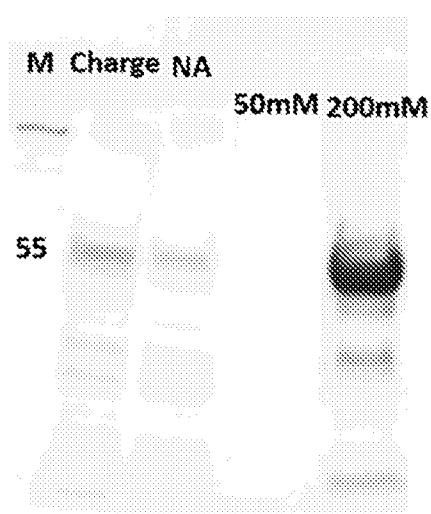


FIGURE 9

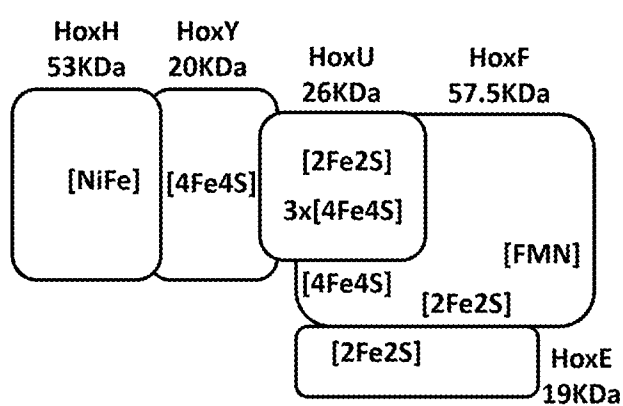


FIGURE 10

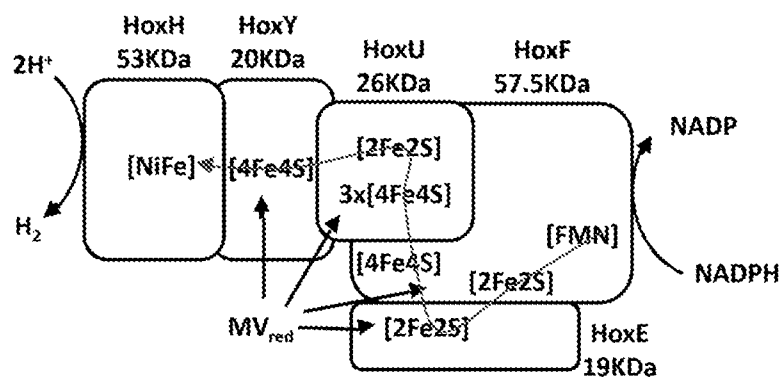
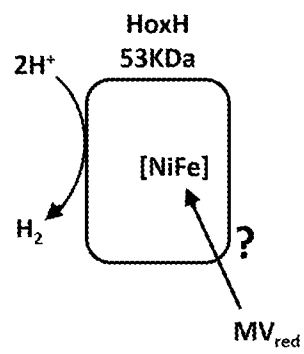
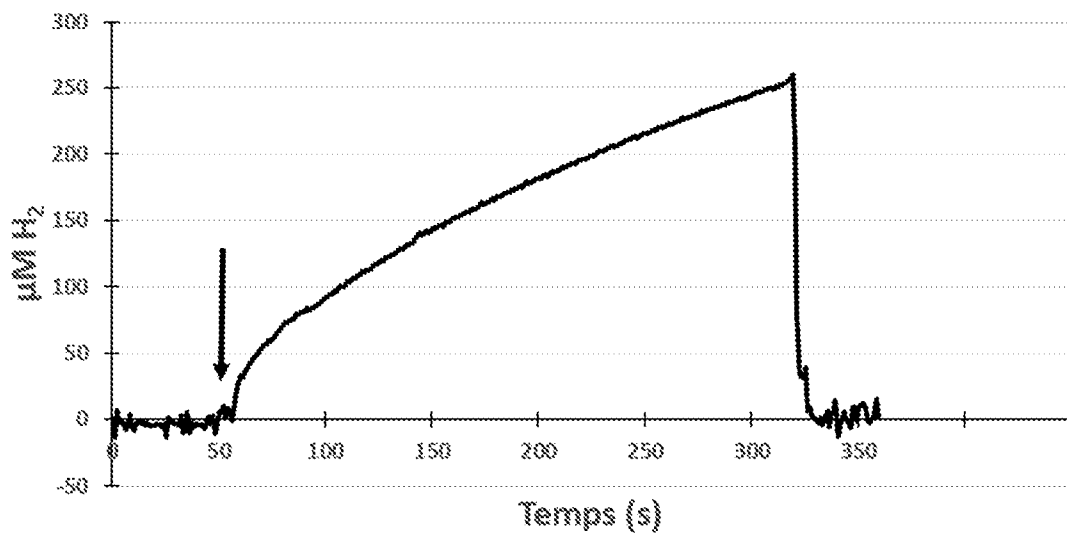


FIGURE 11

**FIGURE 12****FIGURE 13**



22.05.20.

Office européen des brevets
80298 MUNICH
ALLEMAGNE

Des questions sur cette notification ?

Contactez notre Service clientèle sur www.epo.org/contact



ABYOO
Centre Monnet
Avenue Jean Monnet 1
1348 Louvain-La-Neuve
BELGIQUE

Date

18.05.20

Référence T888EPprio	Demande n° / Brevet N° 19208856.5 - 1111
Demandeur / Titulaire H2Win S.A.	

Communication

Le rapport de recherche européenne élargi est joint.

Le rapport de recherche européenne élargi comprend, conformément à la règle 62 CBE, le rapport de recherche européenne (r. 61 CBE) ou le rapport partiel de recherche européenne / la déclaration selon laquelle une recherche est impossible (r. 63 CBE) et l'avis accompagnant le rapport de recherche européenne.

Des copies des documents cités dans le rapport de recherche européenne sont jointes.

☒ 0 copie(s) supplémentaire(s) de ces documents est (sont) jointe(s) également.

Les données suivantes ont été approuvées :

☒ Abrégé

☒ Titre

☐ L'abrégeé ayant été modifié, le texte définitif est joint à cette notification.

La (Les) figure(s) suivante(s) sera (seront) publiée(s) avec l'abrégeé :

Remboursement de la taxe de recherche

Si les conditions de l'article 9 du Règlement relatif aux taxes le justifient, une notification séparée de la Section de dépôt au sujet du remboursement de la taxe de recherche vous parviendra ultérieurement.

Si vous souhaitez poursuivre la procédure de la demande en phase d'examen, votre attention est attirée sur les dispositions de la règle 70bis CBE. Une invitation à répondre au rapport de recherche européenne élargi sera émise après la date à laquelle le Bulletin européen des brevets mentionne la publication du rapport de recherche européenne (r. 69(1), r. 70(2) CBE).



DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
X	<p>MASSANZ CHRISTIANSCHMIDT S ET AL: "Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of Alcaligenes eutrophus", JOURNAL OF BACTERIOLOGY,, vol. 180, no. 5, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 1023-1029, XP002633957, ISSN: 0021-9193 * le document en entier *</p>	1-15	<p>INV. C12N9/00 C12N9/02 C12P3/00</p>
X	<p>HORNHARDT S ET AL: "Characterization of a native subunit of the NAD-linked hydrogenase isolated from a mutant of Alcaligenes eutrophus H16", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 68, no. 1, 1 janvier 1986 (1986-01-01), pages 15-24, XP026762918, ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/S0300-9084(86)81063-X [extrait le 1986-01-01] * le document en entier *</p>	1-15	<p>DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)</p>
X	<p>PRZYBYLA A E ET AL: "Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 88, no. 2, 1 février 1992 (1992-02-01), pages 109-135, XP023941530, ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB04960.X [extrait le 1992-02-01] * tableau 2 *</p>	1-15	<p>C12N C12P</p>
<p>Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications</p>			
Lieu de la recherche		Date d'achèvement de la recherche	Examineur
La Haye		30 avril 2020	Lejeune, Robert
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>			

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
X	MORITZ SENGHER ET AL: "Proteolytic cleavage orchestrates cofactor insertion and protein assembly in [NiFe]-hydrogenase biosynthesis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 292, no. 28, 14 juillet 2017 (2017-07-14), pages 11670-11681, XP055686488, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M117.788125 * le document en entier *	1-5	
X	CONSTANZE PINSKE ET AL: "Efficient electron transfer from hydrogen to benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of Escherichia coli is dependent on the coexpression of the iron-sulfur cluster-containing small subunit", ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 193, no. 12, 30 juin 2011 (2011-06-30), pages 893-903, XP019979455, ISSN: 1432-072X, DOI: 10.1007/S00203-011-0726-5 * le document en entier *	1-15	
T	SVEN HARTMANN ET AL: "A membrane-bound [NiFe]-hydrogenase large subunit precursor whose C-terminal extension is not essential for cofactor incorporation but guarantees optimal maturation", MICROBIOLOGYOPEN, 16 mars 2020 (2020-03-16), XP055686031, ISSN: 2045-8827, DOI: 10.1002/mbo3.1029 * le document en entier *		
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
1	Lieu de la recherche La Haye	Date d'achèvement de la recherche 30 avril 2020	Examineur Lejeune, Robert
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (IPC)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes			
A	WO 2009/075798 A2 (UNIV GEORGIA RES FOUND [US]; ADAMS MICHAEL W W [US] ET AL.) 18 juin 2009 (2009-06-18) * page 17 - page 18 *	1-15		
A	S P BALLANTINE ET AL: "Nickel-containing hydrogenase isoenzymes from anaerobically grown Escherichia coli K-12.", JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 163, no. 2, 1 janvier 1985 (1985-01-01), pages 454-459, XP055686519, ISSN: 0021-9193, DOI: 10.1128/JB.163.2.454-459.1985 * le document en entier *	1-15		
				DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (IPC)
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications				
Lieu de la recherche La Haye		Date d'achèvement de la recherche 30 avril 2020	Examineur Lejeune, Robert	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire				

EP 19 20 8856

30-04-2020

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2009075798 A2	18-06-2009	CA 2708108 A1	18-06-2009
		EP 2229446 A2	22-09-2010
		US 2011020875 A1	27-01-2011
		US 2014308700 A1	16-10-2014
		WO 2009075798 A2	18-06-2009

Informations sur la stratégie de recherche

Phase pilote (cf. JO OEB 2015, A86)

La nature des indications contenues sur cette feuille pourra varier au cours du projet pilote afin d'améliorer l'utilité de ce nouveau service.

Numéro de la demande

EP 19 20 8856

TITRE DE L'INVENTION: POLYPEPTIDE MONOMÉRIQUE PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ HYDROGÉNASE, EN PARTICULIER POLYPEPTIDE MONOMÉRIQUE RECOMBINANT PRÉSENTANT UNE ACTIVITÉ HYDROGÉNASE

DEMANDEUR: H2Win S.A.

CLASSIFICATION CIB: C12N9/00, C12N9/02, C12P3/00

EXAMINATEUR: Lejeune, Robert

BASES DE DONNÉES CONSULTÉES: NPL, WPI, BIOSIS, COMPDX, EMBASE, EPODOC, FSTA, INET, TXT+, EBI

SYMBOLES DE LA CLASSIFICATION DÉFINISSANT L'ÉTENDUE DE LA RECHERCHE:

CIB:

CPC: C12N9/00, C12N9/0067, C12P3/00, C12Y112/01002

FI/F-TERMS:

MOTS-CLÉS OU AUTRES ÉLÉMENTS FIGURANT DANS L'INVENTION:

[NiFe] hydrogenase monomeric subunit having hydrogenase activity; maturation; NADPH, methyl viologen, HoxH

Datum
Date cf Form 1507
Date

Blatt
Sheet 1
Feuille

Anmelde-Nr:
Application No: 19 208 856.5
Demande n°:

Les pièces suivantes de la demande servent de fondement à l'examen:

Description, Pages

1-44 version initiale

Listage des séquences, SEQ ID NO

1-19 version initiale

Revendications, No.

1-15 version initiale

Dessins, Feuilles

1/6-6/6 version initiale

Il est fait référence aux documents suivants. Les numéros d'ordre qui leur sont attribués ci-après seront utilisés dans toute la suite de la procédure :

- D1 MASSANZ CHRISTIANSCHMIDT S ET AL: "Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*", JOURNAL OF BACTERIOLOGY,, vol. 180, no. 5, 1 mars 1998 (1998-03-01), pages 1023-1029, XP002633957, ISSN: 0021-9193
- D2 HORNHARDT S ET AL: "Characterization of a native subunit of the NAD-linked hydrogenase isolated from a mutant of *Alcaligenes eutrophus* H16", BIOCHIMIE, MASSON, PARIS, FR, vol. 68, no. 1, 1 janvier 1986 (1986-01-01), pages 15-24, XP026762918, ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/S0300-9084(86)81063-X [extrait le 1986-01-01]
- D3 PRZYBYLA A E ET AL: "Structure-function relationships among the nickel-containing hydrogenases", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB,

vol. 88, no. 2, 1 février 1992 (1992-02-01), pages 109-135, XP023941530,
ISSN: 0378-1097, DOI: 10.1111/J.1574-6968.1992.TB04960.X
[extrait le 1992-02-01]

D4 MORITZ SENGHER ET AL: "Proteolytic cleavage orchestrates cofactor
insertion and protein assembly in [NiFe]-hydrogenase biosynthesis",
JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY,
vol. 292, no. 28, 14 juillet 2017 (2017-07-14), pages 11670-11681,
XP055686488,
US
ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M117.788125

D5 CONSTANZE PINSKE ET AL: "Efficient electron transfer from hydrogen to
benzyl viologen by the [NiFe]-hydrogenases of Escherichia coli is
dependent on the coexpression of the iron-sulfur cluster-containing small
subunit",
ARCHIVES OF MICROBIOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE,
vol. 193, no. 12, 30 juin 2011 (2011-06-30), pages 893-903, XP019979455,
ISSN: 1432-072X, DOI: 10.1007/S00203-011-0726-5

La présente demande concerne l'observation que le polypeptide HoxH de
Synechocystis P6803, co-exprimé dans E. coli avec les peptides de maturation
HypABCDEFHHoxW, est capable de catalyser la réduction du méthyl viologène en
présence de NADPH.

Le document D1 décrit l'expression du polypeptide HoxH en l'absence de HoxF, HoxU
et HoxY dans *Alcaligenes eutrophus*. Les peptides nécessaires à la maturation sont
naturellement présents dans la souche utilisée. L'activité hydrogénase du monomère
obtenu est déterminée selon une méthode différente de la méthode utilisée dans la
présente demande. Aucune activité selon cette méthode n'est détectée pour le
monomère décrit dans D1.

Deux conclusions sont possibles:

1. à la lumière de D1 il apparaît que l'invention n'est pas exposée de façon
suffisamment claire et complète pour que l'homme du métier puisse l'exécuter (Art
83 CBE). Seule le monomère HoxH de *Synechocystis* PCC 6803 est
suffisamment décrit.

2. Les conditions de mesure de l'activité étant différentes, on ne peut conclure que le monomère décrit dans D1 soit inactif. Par conséquent D1 décrit un monomère d'une protéine de type [NiFe]-hydrogénase présentant une activité hydrogénase, et l'objet de la revendication 1 (et pour les mêmes raisons les revendications 2-10) n'est pas nouveau (Art 54 CBE).

Le document D2 décrit la souche mutante *Alcaligenes eutrophus* HF14, dans laquelle un polypeptide monomérique de type [NiFe]-hydrogénase est présent. Des activités faibles mais présentes sont démontrées. Par conséquent, l'objet des revendications 1-10 n'est pas nouveau au regard de D2.

Le document D3 décrit dans le tableau 2 plusieurs hydrogénases de type [NiFe] monomérique. D3 commente dans le second alinéa de la colonne de droite (page 114): *These observations with the monomeric hydrogenases strongly suggest that the large subunit of the heterodimeric (NiFe) hydrogenase has the potential for catalysing various hydrogenase activities in the absence of a small subunit.*

Par conséquent, l'objet des revendications 1-10 n'est pas nouveau au regard de D3

Le document D4 décrit l'expression de HybC (sous-unité de l'hydrogénase-2 d'*E. coli*) et sa maturation in vitro pour obtenir une hydrogénase de type [NiFe] sous forme de monomère. Les auteurs n'ont pas déterminé l'activité en l'absence de la sous-unité HybO. Les mêmes conclusions que pour le document D1 peuvent être tirées: absence de nouveauté pour les revendications 1-6, ou manque d'exposé de l'invention.

Le document D5 décrit l'absence d'activité de la grande sous-unité (HyaB, HybC et hycE, sous-unités de resp. Hyd-1, 2 et 3) hydrogénase d'*E. coli* dans le cas où la petite sous-unité (resp. hyaA, HybO et hycG) est absente. L'activité est mesurée par la réduction du benzyl viologène par H₂ (méthode n'utilisant pas le NADPH). Les mêmes conclusions que pour le document D1 peuvent être tirées: absence de nouveauté pour les revendications 1-6, ou manque d'exposé de l'invention.

Il semble que mettre à disposition un monomère d'une hydrogénase de type [NiFe] pourrait être inventif parce que l'art antérieur semble considérer la présence de la petite sous-unité comme essentielle.

La formulation de revendications pouvant se baser sur cette activité inventive pour être brevetable devront surmonter d'importantes objections:

- la présente demande mesure l'activité hydrogénase en présence de NADPH et du méthyl viologène. Il semble qu'une généralisation à "une activité hydrogénase" ne soit pas justifiée.
- des revendications concernant le monomère ne sont pas nouveau: l'art antérieur décrit de nombreux monomère de la grande sous-unité d'hydrogénase du tyoe [NiFe]
- la présence de toutes les activités de maturation est essentielle. La demande ne montre pas de possibilité d'exprimer un monomère actif autrement.
- il y de sérieux doutes que l'invention puisse être mise en oeuvre dans toute la portée des revendications.