



HAL
open science

Dégradation d'un composé xénobiotique récalcitrant : métabolisme du méthyl tert-butyl éther (MTBE) par mycobacterium austroafricanum IFP 2012

Alan François

► **To cite this version:**

Alan François. Dégradation d'un composé xénobiotique récalcitrant : métabolisme du méthyl tert-butyl éther (MTBE) par mycobacterium austroafricanum IFP 2012. Autre [q-bio.OT]. INAPG (AgroParisTech), 2002. Français. NNT : . tel-00005701

HAL Id: tel-00005701

<https://pastel.hal.science/tel-00005701>

Submitted on 5 Apr 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE À

L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'INA P-G

Spécialité : Microbiologie

PAR

Alan FRANÇOIS

Sujet de la thèse :

DÉGRADATION D'UN COMPOSÉ XÉNOBIOTIQUE RÉCALCITRANT :
MÉTABOLISME DU MÉTHYL *tert*-BUTYL ÉTHER (MTBE) PAR
MYCOBACTERIUM AUSTRORAFRICANUM IFP 2012.

Soutenue le jeudi 28 novembre 2002 devant le jury composé de :

Monsieur	C. GAILLARDIN	Président du jury
Madame	N. TRUFFAUT	Rapporteur
Monsieur	Y. JOUANNEAU	Rapporteur
Monsieur	P. BÉGUIN	Directeur de thèse
Madame	F. FAYOLLE	Examineur

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé aux départements « Microbiologie » de l'Institut Français du Pétrole (IFP) et « Microbiologie et Environnement » de l'Institut Pasteur (IP).

Tout d'abord, je tiens à exprimer ma gratitude aux rapporteurs qui ont accepté d'examiner ce manuscrit malgré leur charge de travail : madame Nicole TRUFFAUT, professeur à l'Université Technologique de Compiègne, et monsieur Yves JOUANNEAU, directeur de recherche au CEA de Grenoble.

Je tiens également à remercier monsieur Claude GAILLARDIN, directeur de recherche à l'INRA de Grignon d'avoir su se rendre disponible pour superviser ce travail tout au long de ces trois années et d'avoir prodiguer des conseils avisés sur les résultats et les perspectives.

Je remercie également Pierre Béguin, chef du laboratoire à l'Institut Pasteur, qui a contribué à ce que ce travail soit une réussite par ses critiques constructives, ses conseils avisés et ses encouragements.

Toute ma reconnaissance va à Françoise FAYOLLE, ingénieur de recherche à l'IFP, pour m'avoir proposé ce sujet de recherche et pour avoir, tout au long de ces trois ans, fait son maximum pour que cette étude soit une réussite. Un grand merci pour ses conseils, son dynamisme, sa disponibilité et sa patience à mon égard. Je tiens à remercier Frédéric MONOT, chef de projet à l'IFP, pour ses conseils avisés (professionnels et linguistiques !), son soutien et son humour.

Je remercie également Rémy MARCHAL, ingénieur de recherche à l'IFP, pour ses connaissances en chimie, sa bonne humeur et ses démonstrations de demi-tours réglementaires. Bien évidemment, je remercie Marcel ROPARS pour nos sorties boisées ou footballistiques, ses conseils et lui suis très reconnaissant de sa contribution à mon intégration professionnelle. Je tiens à remercier Hugues MATHIS pour son aide et ses mails et qu'il ne doute pas qu'un jour il aura une Aston-Martin !

Je remercie Sylvie CHAUVAUX, chargé de recherche à l'IP, pour sa gentillesse, ses conseils et son aide précieuse lors de la transformation des Mycobactéries. Merci à Isabelle MIRAS (et ses canards) pour sa gentillesse et ses nombreux protocoles modulables, à Nicole DESNOUES pour sa gentillesse et son aide et à Gérard GUGLIELMI pour son aide. Je remercie également Corinne Le DANTEC, thésarde à l'IP, pour m'avoir fourni le plasmide pCL4D et de précieux conseils pour cultiver les Mycobactéries.

Mention spéciale aux cuisiniers de l'IP qui ont contribué à faire de chaque séjour dans cet institut un endroit encore plus enrichissant. Merci également à Rose-Hélène pour sa gentillesse à la cantine de l'IFP.

Merci à Kim, Nicole, Claudine, Gisèle, Fernande, Marie-Jeanne, Arnaud et Thomas de l'IP ainsi qu'aux personnes du département de Microbiologie qui ont contribué au bon déroulement de mon séjour. Enfin, je souhaite bonne chance à Agnès, Sophie et Nicolas de l'IFP et Anne de l'IP en espérant un bon déroulement de leur thèse.

Je tiens aussi à remercier Catherine FOUCAUD, chargé de recherche à l'INRA de Jouy en Josas, qui m'a initié à la recherche en 1995 et, qui depuis, ne cesse de suivre mon parcours professionnel en me conseillant toujours de juste façon.

Une pensée particulière pour mes parents et ma femme que je remercie pour leur soutien et leurs conseils tout au long de mes études.

PUBLICATIONS

Publications présentées :

François, A, Piveteau, P, Fayolle, F, Marchal, R, Béguin, P, Monot, F. 2001. Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization. Bioremediation of MTBE, Alcohols and Ethers. Magar VS, Gibbs, JT, O'Reilly KT, Hyman MR, Leeson A (eds). Battelle Press, Columbus, Ohio. 1 : 153-160.

François, A, Mathis, H, Godefroy, D, Piveteau, P, Fayolle, F, Monot, F. 2002. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Appl. Environ. Microbiol. 68 : 2754-2762.

François, A, Mathis, H, Garnier, L, Fayolle, F, Monot, F. 2002. Roles of *tert*-butyl alcohol, *tert*-butyl formate and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012. Accepté pour publication à Appl. Microbiol. Biotechnol.

François, A, Garnier, L, Mathis, H, Fayolle, F, Monot, F. 2002. Comparison of MTBE and TAME degradation pathways in *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Soumis pour publication.

Communications à colloques :

François, A, Piveteau, P, Fayolle, F, Marchal, R, Béguin, P, Monot, F. 2001. Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization. The 6th International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. San Diego, Californie. 4-7 juin. Affiche.

François, A, Piveteau, P, Garnier, L, Mathis, H, Fayolle, F, Monot, F. 2002. Fuel oxygenates-degradative capacities of microcosms and a MTBE-growing strain *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. International Union of Microbiological Societies. Paris, France. 27 juillet – 1 août. Affiche.

Brevets :

Hernandez-Perez, G, François, A, Piveteau, P, Fayolle, F, Monot, F. 2000. Procédé de traitement bactérien d'effluents contenant au moins un éther par *Gordona terrae* CIP-I 2594. Brevet international 00/03113.

Fayolle, F, François, A, Monot, F. 2001. Procédé de traitement d'effluents aqueux contenant du méthyl *tert*-butyl éther par *Mycobacterium* sp. CIP-I 2562. Brevet français 01/13299.

Abréviations

ADH	Alcool déshydrogénase
BTEX	Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes (<i>ortho</i> , <i>meta</i> et <i>para</i>)
CPG	Chromatographie en phase gazeuse
DO	Densité optique
EDH	Éthanol déshydrogénase
ETBE	Éthyl <i>tert</i> -butyl éther
HIBA	Acide 2-hydroxyisobutyrique
HMBA	Acide 2-hydroxy 2-méthylbutyrique
HPLC	Chromatographie en phase liquide
LB	Luria-Bertani (milieu de culture)
MDH	Méthanol déshydrogénase
MM	Milieu minimum
MMO	Méthane mono-oxygénase
MON	Indice d'octane moteur
MTBE	Méthyl <i>tert</i> -butyl éther
NDMA	<i>p</i> -N, N' diméthyl nitrosoaniline
RON	Indice d'octane recherche
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SSC	Solution saline de sodium et de citrate
TAA	<i>tert</i> -amyl alcool
TAF	<i>tert</i> -amyl formiate
TAME	<i>tert</i> -amyl méthyl éther
TBA	<i>tert</i> -butyl alcool
TBF	<i>tert</i> -butyl formiate

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1- ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I. Production et composition des essences.....	4
II. Contraintes liées au fonctionnement des moteurs.....	6
II.1. Masse volumique et volatilité.....	6
II.2. Indice d'octane.....	6
III. Contraintes liées à la protection de l'environnement.....	9
IV. Utilisation des composés oxygénés : alcools ou éthers-carburants.....	10
IV.1. Considérations physico-chimiques.....	10
IV.2. Considérations économiques.....	12
IV.3. Considérations écologiques.....	13
V. Les éthers-carburants.....	14
V.1. Procédés de fabrication.....	14
V.2. Impact de l'utilisation des éthers-carburants dans l'environnement.....	14
V.2.A. Contamination de l'environnement.....	14
V.2.B. Évaluation de l'atténuation naturelle.....	16
V.3. Impact de l'utilisation des éthers-carburants sur les organismes supérieurs.....	18
V.3.A. Toxicité/carcinogénicité.....	18
V.3.B. Métabolisme des éthers-carburants chez les Eucaryotes supérieurs.....	19
V.4. Biodégradation des éthers-carburants.....	21
V.4.A. Biodégradation par des microcosmes et des cultures mixtes.....	22
V.4.B. Biodégradation par cométabolisme.....	24
V.4.C. Biodégradation d'éthers utilisés comme source de carbone et d'énergie.....	28
V.4.D. Voies de dégradation proposées.....	30
VI. Activités enzymatiques impliquées dans la dégradation du MTBE.....	35
VI.1. Les mono-oxygénases.....	35
VI.1.A. Généralités.....	35
VI.1.B. Les cytochromes P450.....	36
VI.1.C. Mono-oxygénases liées à l'utilisation des alcanes gazeux.....	38
VI.1.D. Inactivateurs et inhibiteurs des mono-oxygénases.....	40
VI.2. Les estérases.....	43
VI.3. Les décarboxylases.....	45
VI.3.A. Généralités.....	45
VI.3.B. Dégradation de xénobiotiques.....	46
VI.3.C. Importance des ions dans les activités décarboxylases.....	46
VI.3.D. Cas particulier de l'ion cobalt.....	48
VI.4. Les déshydrogénases.....	49
VI.4.A. Généralités.....	49
VI.4.B. Les alcools déshydrogénases NAD(P)-dépendantes.....	50
VI.4.C. Les alcool déshydrogénases NAD(P)-indépendantes.....	51
VI.4.D. Les alcool oxydases.....	52
VI.4.E. Les alcool : NDMA oxydoréductases.....	53
CHAPITRE 2- MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	55
I. Méthodes microbiologiques.....	55
I.1. Micro-organismes et plasmides.....	55
I.2. Milieux de culture.....	57
I.3. Suivi de l'activité biologique.....	59
I.3.A. Suivi de la croissance.....	59
I.3.B. Détermination des taux de minéralisation et de recouvrement en carbone.....	61
I.3.C. Activités des cellules non proliférantes.....	62
II. Méthodes analytiques.....	62
II.1. Chromatographies.....	62
II.1.A. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).....	62
II.1.B. Chromatographie en Phase Liquide (HPLC).....	63
II.2. Analyse de la biomasse et de son contenu.....	64
II.2.A. Dosage de la biomasse.....	64

II.2.B.	Extraits cellulaires	64
II.2.C.	Fraction protéique soluble	64
II.2.D.	Fraction protéique membranaire	65
II.2.E.	Dosage des protéines	65
II.3.	Électrophorèses	66
II.4.	Mise en évidence d'activité monooxygénase	67
II.4.A.	Mono-oxygénase hémique	67
II.4.B.	Mono-oxygénase non hémique	68
II.5.	Activité alcool : NDMA oxydoréductase :	68
III.	Biologie moléculaire	69
III.1.	Identification génétique de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	69
III.2.	Préparation de cellules compétentes et transformation bactérienne	69
III.3.	Extraction plasmidique	70
III.4.	Construction du vecteur pMS100	71
III.4.A.	Préparation du vecteur	73
III.4.B.	Élution de l'insert de 4,9 kb de pGT222	73
III.4.C.	Ligature du vecteur et de l'insert	73
III.5.	Hybridation sur colonies de <i>Mycobactéries</i>	74
III.5.A.	Préparation de la sonde radioactive des gènes <i>eth</i>	74
III.5.B.	Fixation de l'ADN des <i>Mycobactéries</i> sur filtres	74
III.5.C.	Hybridation avec les gènes <i>eth</i>	75
CHAPITRE 3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION		76
I.	Minéralisation du MTBE par cométabolisme dans des consortia reconstitués	78
I.1.	Étude des capacités de dégradation du TBA par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	78
I.1.A.	Substrats de croissance de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	78
I.1.B.	Croissance sur TBA de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	79
I.2.	Étude de la dégradation du MTBE par des consortia reconstitués	81
Article 1	: Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization	82
II.	Étude de la dégradation du MTBE par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	91
Article 2	: Biodegradation of methyl <i>tert</i> -butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, <i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	93
III.	Étude des facteurs limitant la croissance de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012 sur MTBE	103
Article 3	: Roles of <i>tert</i> -butyl formate, <i>tert</i> -butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl <i>tert</i> -butyl ether degradation by <i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	107
Article 4	: Comparison of MTBE and TAME degradation pathways in <i>Mycobacterium</i> <i>austroafricanum</i> IFP 2012	132
IV.	Mise en évidence d'une activité alcool déshydrogénase dans le métabolisme du TBA par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	142
IV.1.	Identification d'une protéine induite lors de la croissance de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012 sur TBA.	142
IV.2.	Mise en évidence d'une activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase chez <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	143
IV.3.	Détermination des constantes cinétiques de l'activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase	146
V.	Transformations plasmidiques des <i>Mycobactéries</i>	147
V.1.	Intérêt de la transformation génétique par les gènes <i>eth</i>	147
V.2.	Transformations des <i>Mycobactéries</i> par pCL4D	148
V.3.	Transformation des <i>Mycobactéries</i> par pMS100	149
V.4.	Croissance de <i>M. smegmatis</i> mc2 155 (pMS100) sur ETBE	150
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES		153
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		159

Liste des illustrations (hors articles)

Tableau 1 : Composition typique des carburants par origine des bases.	4
Tableau 2 : Répartition des constituants pour une essence commerciale	5
Tableau 3 : Principales caractéristiques des essences et des composés oxygénés	8
Tableau 4 : Variations des émissions gazeuses dues à l'emploi de carburants oxygénés	13
Tableau 5 : Étude de la présence de MTBE dans des eaux souterraines aux Etats-Unis	16
Tableau 6 : Biodégradation du MTBE par des microcosmes en conditions aérobies	18
Tableau 7 : Activités de dégradation de composés oxygénés par des micro-organismes	23
Tableau 8 : Activités oxygénases testées vis-à-vis du MTBE et du TBA	25
Tableau 9 : Fréquence des cofacteurs identifiés des décarboxylases	48
Tableau 10 : Conditions de culture des micro-organismes utilisés	56
Tableau 11 : Principales caractéristiques des plasmides utilisés	56
Tableau 12 : Substrats de croissance de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	78
Tableau 13 : Taux de croissance et pourcentage de minéralisation du TBA	80
Tableau 14 : Index de déperditions énergétiques sur MTBE et ses intermédiaires	105
Figure 1 : Structure des éthers-carburants et des alcools associés	11
Figure 2 : Évolution de la production des principaux produits chimiques aux États-Unis	15
Figure 3 : Biotransformation du MTBE et de l'ETBE chez les rats	21
Figure 4 : Principe général du cométabolisme	26
Figure 5 : Organisation des gènes <i>eth</i> de <i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001	29
Figure 6 : Métabolismes proposés pour la dégradation du MTBE par cométabolisme	32
Figure 7 : Voies de dégradation du MTBE	33
Figure 8 : Schémas des deux types de systèmes enzymatiques à cytochrome P450	37
Figure 9 : Mécanismes d'inhibition des cytochromes P450	41
Figure 10 : Structure de la métyrapone	43
Figure 11 : Représentation de la triade catalytique de la diène lactone hydrolase	44
Figure 12 : Voie de dégradation du <i>n</i> -hexane chez HxN1	47
Figure 13 : Schéma de la méthylmalonyl-CoA transcarboxylase	49
Figure 14 : Construction du plasmide pMS100	72
Figure 15 : Respirométrie de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012 sur TBA	80
Figure 16 : Croissance de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012 sur 2-propanol ± MTBE	92
Figure 17 : Profils protéiques de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	143
Figure 18 : Réduction du NDMA en présence d'éthanol ou de méthanol	144
Figure 19 : Réduction du NDMA en présence d'éthanol ou de 2-propanol	145
Figure 20 : Activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase	146
Figure 21 : Profils de restriction de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012 (pCL4D)	149
Figure 22 : Hybridation de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (pMS100) avec les gènes <i>eth</i>	150
Figure 23 : Croissance de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (pMS100) sur ETBE	151
Figure 24 : Production de TBA à partir d'ETBE par des cellules quiescentes de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (pMS100)	152
Schéma 1 : Culture mixte <i>R. ruber</i> / <i>B. cepacia</i> pour dégrader le MTBE	77
Schéma 2 : Dégradation du MTBE par <i>H. flava</i> ENV 735 et <i>R. gelatinosus</i> PM1	153
Schéma 3 : Voie de dégradation du MTBE chez <i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	158

INTRODUCTION

Du fait de leur utilisation massive et largement répandue, les produits pétroliers sont des polluants majeurs de l'environnement. Les composés regroupés sous ce terme générique regroupent néanmoins des hydrocarbures de structures chimiques et de propriétés physiques diverses. Ainsi, les essences sont constituées de plus de 200 composés individuels. Au cours du temps, la composition des essences a évolué de manière à prendre en compte deux facteurs importants :

- les spécifications fixées par l'industrie automobile qui sont la conséquence de l'évolution des capacités de carburation des moteurs,
- les normes autorisées en matière de rejets gazeux, fixées par l'Union Européenne.

Lors d'une pollution des eaux et des sols par des essences, l'impact environnemental sera dépendant de la composition de ces dernières. A cet égard, la présence d'additifs comme les éthers-carburants, incorporés pour en améliorer la qualité sera donc importante.

Pour cette raison, le devenir de chacun des constituants des essences, lors de pollutions, est un élément essentiel à déterminer correspondant en fait à la résultante de plusieurs facteurs :

- (i) La biodégradabilité intrinsèque de chacun des constituants, déterminée en mettant en œuvre des microflore adaptées. Il s'agit d'élucider les mécanismes de biodégradation de ces produits.
- (ii) La distribution de micro-organismes ayant des capacités de dégradation. Des tests mettant en œuvre un grand nombre de microflore d'origines variées, sols ou aquifères provenant de sites pollués ou non, peuvent permettre d'obtenir une évaluation de cette répartition dans l'environnement.
- (iii) Les facteurs physico-chimiques préexistants sur le site de la pollution qui seront déterminants au cours de la biodégradation car ils seront à l'origine d'éventuelles limitations : teneur en oxygène dans les nappes aquifères, température, pH.

La biodégradabilité de certaines familles de composés des essences a été bien étudiée. Ainsi, la biodégradation des hydrocarbures mono-aromatiques ou BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et les trois isomères du xylène, *para-*, *ortho-* et *meta-*) est bien documentée. De nombreux micro-organismes aérobies, capables de les utiliser, ont été isolés

et les voies de dégradation ainsi que les enzymes impliquées sont connues. C'est également le cas d'une autre famille d'hydrocarbures, les *n*-alcane.

Par contre, la biodégradabilité d'autres familles chimiques comme les cycloalcanes, les isoalcanes et certains « additifs » comme les éthers-carburants est mal connue. Ce manque de connaissances est soit lié au fait que des études approfondies n'ont pas été conduites, soit à la difficulté à isoler des micro-organismes dégradant ces produits.

A cet égard, le cas des éthers-carburants est très intéressant. Ces composés, méthyl *tert*-butyl éther (MTBE), éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) ou *tert*-amyl méthyl éther (TAME), n'ont été introduits dans la formulation des essences qu'au début des années 80. Le but recherché était d'augmenter l'indice d'octane des essences tout en améliorant la qualité des rejets atmosphériques des gaz d'échappement (monoxyde de carbone, en particulier). Ces propriétés intéressantes ont fait du MTBE un des constituants majeurs des essences et un des principaux produits de l'industrie chimique (25 millions de tonnes produites en 1999). Aucune étude de la biodégradabilité de ces composés n'ayant été préalablement effectuée, il s'est avéré qu'après plusieurs années d'utilisation, de nombreuses nappes aquifères présentaient des niveaux divers de contamination par le MTBE. Au cours d'études de biodégradabilité, ce composé s'est révélé, au mieux, difficilement biodégradable, les raisons de cette faible biodégradabilité étant controversées.

L'objectif du travail, effectué dans le cadre d'une collaboration entre les laboratoires « Microbiologie » de l'Institut Français du Pétrole et « Microbiologie et Environnement » de l'Institut Pasteur, a consisté à étudier la biodégradabilité intrinsèque du MTBE par une souche de Mycobactérie isolée d'une boue activée de station d'épuration d'eaux usées urbaines.

Dans un premier temps, des cultures mixtes ont été employées. Puis, après la mise en évidence de la propriété particulièrement intéressante de dégradation du MTBE d'une des souches bactériennes utilisées, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, l'étude physiologique de ses capacités générales de dégradation a été effectuée. Cette étude a permis la caractérisation des paramètres de croissance, la détermination des intermédiaires de dégradation et de facteurs permettant de l'améliorer. La connaissance des systèmes enzymatiques responsables du métabolisme est également un aspect essentiel et nous avons pu mettre en évidence plusieurs activités enzymatiques impliquées dans la voie de dégradation du MTBE.

Plusieurs raisons à la mauvaise biodégradabilité des éthers-carburants ont été avancées et nous avons essayé de déterminer les plus pertinentes dans le cas de

M. austroafricanum IFP 2012. A cet égard, nous avons pu montrer l'importance des mécanismes de régulation intervenant dans les étapes initiales du catabolisme du MTBE. La comparaison de la biodégradabilité du MTBE avec celle du TAME, portant tous deux un groupement méthoxy, nous a également apporté des éléments de réponse.

Nous avons ensuite cherché à améliorer les capacités de dégradation du MTBE de *M. austroafricanum* IFP 2012 en introduisant par transformation dans cette souche les gènes d'un cluster *eth* provenant d'un autre micro-organisme, *Rhodococcus ruber* IFP 2007, capable de réaliser les premières étapes de la dégradation du MTBE.

CHAPITRE 1- ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Production et composition des essences.

Le fractionnement du pétrole brut par distillation aboutit à des coupes d'essence dites « Straight Run » qui ne répondent pas aux spécifications requises du fait de leur faible indice d'octane.

Pour pallier à ce problème, les raffineurs utilisent des bases de formulation provenant de quatre différents procédés de raffinage :

- Le réformage catalytique des essences lourdes qui permet la transformation des *n*-alcane et des alcane cycliques en hydrocarbures aromatiques (réformat).
- L'isomérisation des essences plus légères qui permet la transformation des *n*-alcane en *iso*-alcane.
- Le craquage catalytique qui permet la transformation des hydrocarbures lourds issus des distillats sous vide en hydrocarbures légers par rupture des liaisons carbone-carbone.
- L'alkylation qui permet de produire des isoalcane en C8 à partir de butène et d'isobutane.

Les pondérations effectuées par les raffineurs à partir de ces différentes bases aboutissent à différentes catégories d'essences (Tableau 1).

Tableau 1 : Compositions typiques des carburants par origine des bases. D'après Guibet (1997).

Type de base	Super à 0,15 g Pb.L-1 (% vol)	EuroSuper (% vol)	Super 98 (% vol)
Coupe C4	2-4	2-4	2-4
Essence de distillation directe (SR)	5-10	0-8	0-5
Essence de craquage catalytique (FCC)	20-40	15-35	10-25
Réformat	30-60	35-60	45-80
Isomérat	0-5	0-5	0-8
Alkylat	0-10	0-15	0-20
MTBE	0-3	0-5	0-9

Du point de vue de la composition chimique, l'analyse d'une essence fait apparaître la présence de plus de 200 composés dont le nombre d'atomes de carbone varie de 4 à 13 et qui peuvent être répartis en différentes familles (Tableau 2).

La composition des essences joue un rôle environnemental important :

- sur la pollution atmosphérique par la qualité de la carburation qu'elles permettront et l'émission des moteurs engendrée.
- en cas de déversement accidentel au cours des chaînes de production et de commercialisation (transport, stockage, distribution), du fait de la plus ou moins grande biodégradabilité de leurs différents composants.

En fait, la composition des essences résulte d'un compromis entre les contraintes liées au fonctionnement des moteurs et les contraintes liées à la protection de l'environnement.

Tableau 2 : Répartition des constituants par nombre d'atomes de carbone et par familles chimiques pour une essence commerciale classique. D'après Guibet (1997).

Nombre d'atomes de carbone	Familles (% en masse)						Total
	<i>n</i> -Alcanes	<i>iso</i> -Alcanes	Cycloalcanes	Aromatiques	Alcènes	Oxygénés	
4	5,14	0,30			1,49		6,93
5	1,26	7,84			10,11	0,50	19,71
6	0,64	6,34	1,19	1,23	5,07	3,00	17,47
7	0,65	3,22	1,05	8,11	1,56		14,59
8	0,48	11,47	0,43	13,61	0,34		26,33
9	0,11	1,12	0,16	9,49	0,07		10,95
10	0,01	0,09	0,09	2,80	0,02		3,01
11		0,10		0,25			0,35
12		0,61					0,61
13		0,01					0,01
Total	8,29	31,10	2,92	35,49	18,66	3,50	99,96

II. Contraintes liées au fonctionnement des moteurs.

Les propriétés physiques -masse volumique, volatilité et indice d'octane- des essences sont primordiales pour l'alimentation et la combustion du moteur. Ces caractéristiques sont normalisées dans chaque pays et les producteurs de carburants définissent des formulations qui leur permettent de satisfaire à ces spécifications.

II.1. Masse volumique et volatilité.

Les spécifications concernant la masse volumique sont très similaires dans toutes les parties du monde. Le carburant sans plomb de type EuroSuper doit avoir une masse volumique entre 0,725 et 0,780 kg.dm⁻³ à 15°C. Il faut noter que l'addition de produits oxygénés, comme les éthers-carburants, n'a pas d'impact sur la masse volumique ($\rho_{15\text{MTBE}} = 0,745 \text{ kg.dm}^{-3}$).

La volatilité ou pression de vapeur, est déterminée par la méthode de pression de vapeur Reid (PVR). Cette valeur fixée par une norme européenne (Norme EN228) varie selon la période de l'année de 70 kPa en été à 90 kPa en hiver pour l'EuroSuper sans plomb. La nécessité de contrôler cette valeur a un impact dans le choix des additifs. En particulier, l'incorporation de composés oxygénés comme le méthanol ou l'éthanol provoquerait une augmentation non négligeable de la valeur PVR (15 kPa pour une addition de 1% en volume de méthanol, 5 kPa pour le même volume d'éthanol).

II.2. Indice d'octane.

L'indice d'octane est une valeur correspondant à la nécessité d'établir des normes de qualité des essences. Le cliquetis du moteur est une donnée importante correspondant à la faculté d'auto-inflammation des carburants. La résistance au cliquetis est déterminée comparativement par rapport à deux hydrocarbures de référence : le *n*-heptane, propice au cliquetis (indice d'octane = 0) et le 2,2,4-triméthylpentane (isooctane), résistant au cliquetis (indice d'octane = 100). L'indice d'octane s'exprime donc par un nombre sans unité compris entre 0 et 100, avec possibilité d'extrapolation jusqu'à 120. Deux procédures normalisées permettent de déterminer l'indice d'octane : détermination de l'indice d'octane moteur

(MON) ou de l'indice d'octane recherche (RON). Chaque méthode se caractérise par des conditions expérimentales (vitesse de rotation, température du moteur) spécifiques, tandis que la technique de détermination proprement dite est identique. Le MON correspond plutôt à une utilisation du moteur à haut régime et le RON à une utilisation à bas régime avec des vitesses de rotation du moteur de 900 et 600 tr.min⁻¹, et un mélange carburé à 149 et 37°C, respectivement.

En Europe, l'essence la plus répandue est l'EuroSuper sans plomb, définie par la directive européenne du 16 décembre 1985 (EN 228). Elle doit avoir un RON minimum de 95 et un MON minimum de 85. Les indices d'octane RON et MON des hydrocarbures dépendent étroitement de leur structure chimique. Pour une même famille de produits, les indices d'octane diminuent avec le nombre d'atomes de carbone mais augmentent avec la ramification des radicaux hydrocarbonés

Les alkyles de plomb ont constitué les principaux additifs utilisés pendant plus de 50 ans pour augmenter l'indice d'octane des essences. Ils exercent un effet inhibiteur sur les réactions d'oxydation des composés organiques et contribuent ainsi à allonger le délai d'auto-inflammation. Avec une teneur en plomb d'environ 0,8 g.L⁻¹, il était possible d'augmenter le RON d'une essence de 15 points. De 1935 à 1970, les teneurs maximales autorisées en plomb étaient de l'ordre de 0.5-0.6 g.L⁻¹, et jusqu'à 0,8 g.L⁻¹ dans quelques cas exceptionnels.

Les alcools et les éthers se caractérisent par des indices d'octane élevés généralement supérieurs à 100 (Tableau 3).

Tableau 3

III. Contraintes liées à la protection de l'environnement.

La réglementation a conduit dans les années 70 de nombreux pays à bannir l'usage des alkyles de plomb comme additifs en raison de leur toxicité (Yule et al., 1983) et de leur rôle dans l'empoisonnement des catalyseurs de post-traitement. Ainsi, alors que dans les années 1935-1970 environ, la teneur maximale en plomb autorisée était de l'ordre de 0,50-0,60 g Pb.L⁻¹, en 1992, les essences contenant plus de 0,40 g Pb.L⁻¹ ont complètement disparues. Finalement, depuis 2000, alors que les teneurs autorisées avaient entre-temps été ramenées à 0,15 g Pb.L⁻¹, plus aucune essence ne contient de plomb en France (Guibet, 1997).

L'optimisation de la combustion du moteur et l'utilisation de dispositifs de post-traitement (pots catalytiques) diminuent considérablement les émissions de polluants. Néanmoins, l'utilisation de ces technologies nouvelles ne permet pas à elle seule d'atteindre les critères fixés pour la qualité de l'air dans les zones urbaines (norme européenne 98/70/CE, Clean Air Act aux USA). A l'heure actuelle, la composition des carburants répond à cette nécessité de protection de l'environnement.

Ainsi, pour les essences :

- La teneur en aromatiques a été limitée à 42%. Celle en benzène passant de 5 à 1%.
- La teneur en oléfines (hydrocarbures insaturés) est limitée à 18 %.
- La teneur en soufre est limitée à 150 ppm.
- La teneur en oxygène est limitée à 2,7%.

Ces spécifications ont des conséquences sur la formulation. Ainsi, les proportions de réformat (riche en aromatiques), d'essence de craquage catalytique (source d'oléfines et de soufre) et de coupe légère (volatilité) ont dû diminuer.

Enfin, les spécifications pour l'année 2005 tendront encore à diminuer les teneurs en aromatiques à 35%, en soufre à 50 ppm et la teneur en oléfines devra être comprise entre 8 et 18%. La teneur en benzène est maintenue à 1%. L'abandon des alkyles de plomb ainsi que la forte limitation en aromatiques rendent difficile le maintien de l'indice d'octane. Ceci peut néanmoins être résolu par l'incorporation de produits à haut indice d'octane comme les composés oxygénés.

IV. Utilisation des composés oxygénés : alcools ou éthers-carburants.

Les différents composés oxygénés ayant des valeurs élevées d'indice d'octane sont les éthers-carburants, le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE), l'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) ou le *tert*-amyl méthyl éther (TAME), les alcools correspondants, l'alcool *tert*-butylique (TBA) ou l'alcool *tert*-amylique (TAA) (Figure 1) ainsi que l'éthanol ou le méthanol. Le choix de l'un ou l'autre de ces composés doit prendre en compte les contraintes physico-chimiques, économiques et écologiques que leur utilisation peut poser.

IV.1. Considérations physico-chimiques.

Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces composés oxygénés sont présentées dans le Tableau 3.

Les produits peuvent influencer l'indice d'octane, la démixtion et la capacité de corrosion des essences reformulées :

- *Effet sur l'indice d'octane :*

Sachant qu'un taux d'oxygène maximal est requis dans les essences, le MTBE est préféré au méthanol puisqu'une teneur de 15% (vol) en MTBE correspond à 4% (masse) de méthanol introduit sous forme d'une combinaison chimique. De même, à une teneur de 11% (vol) d'ETBE – ce qui correspond à 5% d'éthanol-, le gain pour le MON est de 1,4 point contre 0,7 point si l'on ajoute uniquement 5% d'éthanol.

- *Effet sur la démixtion :*

Dans les essences, la présence éventuelle d'eau ne pose pas de problème, à température ambiante, jusqu'à une concentration d'environ 50 mg.L⁻¹ car le mélange eau/essence est homogène. Au-delà de cette valeur, l'eau décante sans affecter la phase hydrocarbonée. Par contre, en présence de méthanol, la présence de traces d'eau peut provoquer une démixtion totale en deux phases : l'une constituée d'un mélange eau-alcool, l'autre d'hydrocarbures émulsionnés. La tendance à la démixtion s'exprime par la température de trouble, c'est à dire la température à laquelle le mélange carburant-alcool cesse d'être limpide, ce qui constitue le premier signe de l'insolubilité.

Figure 1 : Structure des éthers-carburants et des alcools associés.

Pour remédier à cette situation, il faut que le méthanol soit accompagné d'un cosolvant. L'un des produits les plus efficaces à cet égard est le TBA : à teneurs en eau et en méthanol sensiblement identiques, l'adjonction de 2% de TBA permet de réduire de 30°C la température de démixtion.

Par contre, dans les essences contenant des éthers, la présence d'eau ne pose pas de problèmes réels, en effet, ni le MTBE ni l'ETBE n'entraînent de problèmes de démixtion.

- *Effet sur les matériaux :*

Un inconvénient important dans l'ajout du méthanol dans les essences est la tenue des matériaux. Certains matériaux organiques (durites, flexibles, joints, ...) utilisés dans les circuits de distribution et d'alimentation en carburant, peuvent subir des altérations (perméabilité accrue, gonflement) en présence de faibles quantités de méthanol.

L'addition d'éthanol peut contribuer à accroître l'encrassement des soupapes d'admission.

IV.2. Considérations économiques.

Economiquement, le méthanol (entre 110 et 120 €.tonne⁻¹) ou le MTBE (entre 225 et 235 €.tonne⁻¹) sont beaucoup plus intéressants que l'éthanol. Le coût de l'éthanol (entre 780 et 940 €.tonne⁻¹) est un frein important à l'utilisation de ce composé comme tout ou partie des carburants et seule une volonté politique, par l'octroi d'aides spécifiques, peut favoriser le développement de l'éthanol comme carburant. L'éthanol, produit à partir de blé ou de betteraves, est incorporable dans le supercarburant sans plomb sous forme d'ETBE. Pour favoriser la production d'éthanol à intérêt non alimentaire, un revenu agricole minimal de 76 €/ha de cultures non alimentaires est garanti à tous les producteurs (INRA – ESR : Atelier Economie de la production – Novembre 2000). C'est pourquoi, l'ETBE est exclusivement utilisé en Espagne et en France, pays dans lesquels les gouvernements favorisent ce composé compte-tenu de leurs potentiels agricoles.

IV.3. Considérations écologiques.

L'addition dans les essences de MTBE, d'ETBE ou d'éthanol a un impact positif sur la qualité de l'air car elle permet de réduire les taux de monoxyde de carbone et d'hydrocarbures imbrûlés dans les gaz d'échappement (Tableau 4). C'est pourquoi, elle a été préconisée dans les essences de certaines zones urbaines aux Etats-Unis (essences reformulées).

Cependant, aucune étude sur l'impact des éthers-carburants en cas de rejet accidentel dans les eaux et les sols n'existait préalablement à leur utilisation.

En cas de pollution par une essence contenant de l'éthanol, celui-ci serait le composé préférentiellement dégradé par les micro-organismes de l'eau et du sol. Cependant, à des concentrations en éthanol de l'ordre de 100 ppm, ce composé aurait une demande en oxygène plus importante que n'importe lequel des autres constituants. De ce fait, en cas de pollutions souterraines, la dégradation de l'éthanol conduirait à une chute de la quantité d'oxygène dissous et pourrait alors rapidement favoriser le développement de conditions anaérobies. L'effet de la présence d'éthanol dans les cas de pollution influencerait donc fortement la dégradation de composés toxiques comme le benzène puisque ce composé a un temps de demi-vie d'environ deux jours en aérobie mais supérieur à 200 jours en anaérobie.

Tableau 4 : Variations des émissions gazeuses (en pourcentage par rapport à celles relevées avec une essence standard) dûes à l'emploi de carburants oxygénés.
D'après Guibet (1997)*.

Polluants	Ethanol : 10%	MTBE : 15%	ETBE : 17%
HC	-4,9	-6,5	-5,2
CO	-13,4	-9,3	-14,6
NOx	+5,1	+3,6	+5,5
Formaldéhyde	+19,3	+15,8	+17,1
Acétaldéhyde	+159	-0,9	+256
Evaporation			
•Parking	+30,3	-5,8	-5,0
•Arrêt après fonctionnement	+50,1	+13,0	+9,5

* : Résultats Auto/Oil Américain.

V. Les éthers-carburants.

L'ensemble de ces éléments a contribué à un usage massif des éthers-carburants, et en particulier du MTBE, dans les essences, notamment pour maintenir le niveau d'indice d'octane requis.

V.1. Procédés de fabrication

En 1999, la production mondiale de MTBE, qui a été multipliée par 5 en 10 ans, était de 25 millions de tonnes (Figure 2). La production de TAME est beaucoup moins importante, 1,5 millions de tonnes. L'ETBE est utilisé exclusivement en France et en Espagne et sa production était de 374 000 tonnes à partir d'éthanol de betteraves ou de blé dans les proportions deux tiers/un tiers. L'éthanol, destiné à la fabrication d'ETBE, est produit par Total-Fina-Elf à Feyzin pour 92 900 tonnes d'ETBE incorporant 550 000 hl d'éthanol ainsi qu'à Dunkerque et Gonfreville pour 59 000 tonnes d'ETBE soit 350 000 hl d'éthanol, chacune.

Le MTBE est produit par addition du méthanol sur l'isobutène.

En France, où l'utilisation d'ETBE est parallèle à celle du MTBE, l'industrie pétrolière fabrique l'ETBE par un procédé analogue à celui du MTBE, l'éthanol réagissant avec de l'isobutène pour produire l'ETBE.

Le TAME est produit par la réaction du méthanol avec l'isoamylène. Le TAME est moins utilisé que le MTBE du fait de l'utilisation des isoamylènes à d'autres fins.

V.2. Impact de l'utilisation des éthers-carburants dans l'environnement.

V.2.A. Contamination de l'environnement

L'usage massif des éthers-carburants a engendré des problèmes particuliers de pollution des eaux et des sols qui sont liés à la forte solubilité de ces produits (Tableau 3), à leur faible biodégradation ainsi qu'à leur faible rétention par la matière organique du sol. Le MTBE peut pénétrer ces environnements lors de fuites de stockage dans les raffineries, lors du transport par les pipelines ou dans les stations-services ; mais il existe aussi des pertes par évaporation lors du remplissage des véhicules ainsi que lors des émissions de MTBE imbrûlé par les automobiles et les bateaux. Ce n'est que récemment que le problème spécifique de

contamination des eaux par le MTBE a été soulevé et étudié à grande échelle, aux États-Unis essentiellement. Le premier cas important de contamination des eaux par le MTBE s'est produit en 1996 à Santa Monica (Californie) à la suite d'une fuite d'essence dans un réservoir de stockage d'une station service. Le haut niveau de pollution (jusqu'à $600 \mu\text{g.L}^{-1}$) de certains captages d'eau destinée à la consommation a alors entraîné la fermeture de la moitié des puits utilisés à cette fin (USEPA, 1999). La contamination des nappes aquifères par le MTBE concerne principalement les zones urbanisées. En effet, 27% de 210 puits et sources testés dans huit régions urbaines aux États-Unis contre 1,3% de 549 puits et sources testés en zone rurale présentaient des teneurs en MTBE supérieures ou égales à $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Squillace, 1996).

Année

Figure 2 : Évolution de la production des principaux produits chimiques aux États-Unis.
D'après Johnson et al. (2000).

En 1999, lors d'une étude sur l'étendue de la pollution dans les eaux souterraines, effectuée par l'U.S. Geological Survey, du MTBE a été détecté dans 21% des échantillons d'eaux prélevés dans tous les endroits où des fuites d'essence avaient été constatées (stockage de stations-service, principalement). Un récapitulatif de l'état de la pollution aux USA est présenté dans le tableau 5. Le nombre de sites de stockage souterrains ayant donné lieu à des pollutions au MTBE est estimé à 250 000 aux États-Unis (Johnson et al., 2000). Le déplacement des nappes de MTBE dans les sous-sols a fait, par ailleurs, l'objet d'études afin d'essayer de prédire les contaminations des eaux potables (Dernbach et al., 2000).

Tableau 5 : Étude de la présence de MTBE dans des eaux souterraines aux USA.
D'après Stocking et al. (2000).

Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Maine ¹ n=496	California ² n=793	USGS ³ n=5 418	USGS ³ n=376
Non détecté	85,0% ($<0,2\mu\text{g/L}$)	85,1% ($<0,2\mu\text{g/L}$)	98,7% ($<3\mu\text{g/L}$)	82,2% ($<0,2\mu\text{g/L}$)
<5	12,0%	13,6%	0,5%	16,2%
5-35	1,9%	1,3%	0,3%	1,0%
>35	1,1%	0,0%	0,2%	0,5%

Adapté de 1) Maine DHS 1999 ; 2) Californie DHS 1999 ; 3) Moran et al., 1999.
USGS : United State Geological Survey.

Achten et al. (2002a et b) ont récemment confirmé, au cours d'une étude menée en Allemagne, la présence de MTBE à l'état de traces dans de nombreuses rivières, dans les eaux à l'arrivée des stations d'épuration des eaux urbaines mais aussi après traitement dans celles-ci, confirmant la capacité médiocre d'épuration de ces unités au regard du MTBE.

En France, en juillet 1999, une pollution de la nappe phréatique de Liévin (62), à la suite d'une fuite accidentelle d'essences contenant de l'ETBE, a privé 60 000 personnes d'eau potable pendant plusieurs jours. Au plus fort de la contamination, une concentration en ETBE de $360 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a été mesurée dans la nappe. Le rétablissement de l'eau potable a nécessité un traitement coûteux au charbon actif. Cet accident a révélé, pour la première fois en France, les risques potentiels d'une contamination par l'ETBE.

Ces faits devraient constituer une forte incitation pour la mise en place, en France et dans l'Union Européenne, d'une surveillance des teneurs en ETBE et en MTBE dans les eaux souterraines et les systèmes de distribution d'eau potable.

V.2.B. Évaluation de l'atténuation naturelle.

Dans les nappes aquifères, l'atténuation naturelle d'un polluant est essentiellement contrôlée par sa biodégradation et sa dispersion. Dans ces environnements, seule la biodégradation peut permettre une disparition totale du composé.

Les données disponibles sur les éthers-carburants concernent exclusivement le MTBE.

Contrairement à des composés comme les BTEX, également présents dans les essences, le MTBE présente trois caractéristiques qui vont influencer sa dispersion : (i) sa

grande solubilité dans l'eau (Tableau 3), (ii) sa faible capacité de rétention sur la matière organique ($\text{Log } K_{oc} = 0,55 \text{ à } 0,91$) et enfin, (iii) sa faible biodégradabilité, point qui sera détaillé plus bas.

Toutes ces caractéristiques expliquent pourquoi les pollutions d'eaux souterraines par le MTBE génèrent des nappes polluantes relativement grandes pouvant atteindre plusieurs centaines de mètres (Odenchantz, 1998). Par ailleurs, des simulations montrent que dans les années à venir, la longueur des panaches de pollution par le MTBE va augmenter (Johnson et al., 2000).

Dans les eaux de surface (lacs,...) où l'interface air/eau est importante, la volatilisation est le phénomène prédominant et elle suit une cinétique exponentielle. Reuter et al. (1998) ont dans ce cas mesuré une durée de demi-vie de 14 jours.

Dans l'atmosphère, une dégradation photochimique permet de décomposer ce produit et Smith et al. (1991) ont calculé, dans ce cas, une durée de demi-vie du MTBE de 3 jours.

Par conséquent, il apparaît que les contaminations les plus problématiques sont celles des nappes aquifères et que le processus de dépollution prédominant est la biodégradation. C'est pourquoi l'atténuation naturelle du MTBE en conditions aérobies a été évaluée lors d'études en laboratoire à partir de prélèvements d'origines diverses (Tableau 6). Ces études montrent que les temps de demi-vie du MTBE, dans ces conditions, sont généralement longs. Ces données laissent supposer que dans les nappes aquifères polluées, où des conditions limitantes (oxygène, pH, ...) s'établissent rapidement, l'atténuation naturelle sera très faible. D'après Schirmer et al. (1998), à cause de la faible vitesse de dégradation du MTBE, l'atténuation est sans doute insuffisante dans les aquifères une fois que l'oxygène du site est consommé. Des calculs prévoient un temps de demi-vie du MTBE d'au moins deux ans dans la plupart des systèmes souterrains (Johnson et al., 2000). Celui-ci est à comparer avec le temps de demi-vie des BTEX dans les mêmes conditions qui est de deux ou trois mois seulement (Johnson et al., 2000). Le MTBE a d'ailleurs été utilisé comme traceur pour évaluer l'atténuation naturelle du benzène et du toluène dans un site pollué par une essence (Robbins et Gilbert, 2000).

Tableau 6 : Biodégradation du MTBE par des microcosmes en conditions aérobies.
D'après Stocking et al. (2000).

Culture	Concentration initiale (mg.L ⁻¹)	Temps de demi-vie du MTBE en jours (phase de latence)	Références
Microcosmes d'eau souterraine	5-80	2 (14)-69 (21)	Salanitro et Wisniewski, 1996
	≈ 1	693 (20) similaire au benzène	Borden et al.; 1997
	Nd	578	Schirmer et al. ; 1998
	0,15 (0,4 pour le TBA)	<56 (<15 pour du TBA)	Bradley et al. ; 1999

V.3. Impact de l'utilisation des éthers-carburants sur les organismes supérieurs.

L'exposition de l'homme aux éthers carburants peut être due : (i) aux vapeurs lors du remplissage des réservoirs de stockage ou des véhicules, en conduisant, dans les parkings et dans les garages (Dourson et Felter, 1997), (ii) à des expositions directes par ingestion d'eau provenant de nappes aquifères contaminées lors de fuites sur des cuves de stockage, (iii) au contact dermique mais cette voie d'exposition est marginale.

V.3.A. Toxicité/carcinogénicité.

Les données concernent essentiellement le MTBE. Le goût et l'odeur de l'eau contaminée par du MTBE font que, lors de son ingestion, les consommateurs en détectent la présence rapidement, même à faible dose. A partir de ces seuils de détection, l'USEPA (1999) a défini une concentration limite en MTBE de 40 µg.L⁻¹ pour que l'eau soit considérée consommable. Cette valeur prend également en considération les éventuelles conséquences sur la santé humaine de l'ingestion de MTBE.

A l'heure actuelle, l'évaluation de la toxicité et de la carcinogénicité du MTBE est déduite d'études de toxicité effectuées sur les rongeurs. Après inhalation de fortes doses de MTBE, celui-ci se trouve réparti dans le cerveau, les reins et le foie, où il est métabolisé en TBA et formaldéhyde (Hong et al., 1997a ; Turini et al., 1998). L'effet sur des rats mâles, d'ingestion de TBA ajouté dans leur eau de boisson à des teneurs de 0 à 5 mg/mL pendant deux ans a été étudié. Ces rats ont présenté des tumeurs rénales alors que rien ne fût observé chez les femelles (Cirvello et al., 1995).

D'autres études effectuées au cours d'expositions chroniques de rongeurs au MTBE suggèrent que ce produit est cancérigène pour ces animaux (Belpoggi et al., 1997 ; Bird et al., 1997). L'effet cancérigène sur les humains fait encore l'objet de débats, les mécanismes de cancérogenèse pouvant être différents chez l'homme et chez les rongeurs (Hartley et al., 1999). Cependant par précaution et en absence d'une estimation fiable des risques liés à une faible exposition au MTBE, l'USEPA (1999) a classé ce composé comme potentiellement cancérigène. Pour sa part, le « Comité Californien d'Identification des Produits Cancérigènes » a décidé de ne pas considérer le MTBE comme dangereux, compte tenu du fait qu'aucune recherche scientifique n'a pu mettre en évidence un effet du MTBE sur le développement ou la reproduction humaine (Ahmed, 2001).

Par ailleurs, une étude récente sur l'effet de l'exposition chronique d'organismes aquatiques à du MTBE a conclu que les concentrations en MTBE dans les eaux de surface généralement détectées aux USA ($< 100 \mu\text{g.L}^{-1}$) ne représente pas un risque pour ceux-ci (Mancini et al., 2002).

V.3.B. Métabolisme des éthers-carburants chez les Eucaryotes supérieurs.

-Métabolisme du MTBE :

L'étude du devenir de MTBE radiomarké introduit chez des rats (voies intraveineuse, orale ou dermique) a montré que la majorité du MTBE est rapidement expiré (20 à 70% selon la dose), le reste étant éliminé par les urines (Miller et al., 1997). Turini et al. (1998) ont montré que, en utilisant des microcosmes de foies de rongeurs, le MTBE est oxydé par une enzyme de type cytochrome P450, ce qui conduit à la production de TBA et de formaldéhyde. Cette activité est fortement inhibée par la présence de métyrapone, un inhibiteur des cytochromes P450. Le formaldéhyde est très réactif et certainement complètement métabolisé dans le foie. Le TBA produit est ensuite métabolisé en 2-méthyl-1,2-propanediol puis en acide 2-hydroxyisobutyrique (Hutcheon et al., 1996 ; Bernauer et al., 1998). Par ailleurs, Cederbaum et Cohen (1980) et Savolainen et al. (1985) avaient suggéré que le TBA pourrait être un inhibiteur compétitif de la dégradation du MTBE chez les rats.

Chez les humains, après exposition au MTBE, ce dernier disparaît rapidement du sang alors que la teneur en TBA demeure élevée pendant un temps significatif même après la disparition du MTBE. Cette observation fait du TBA un meilleur marqueur à une exposition au MTBE que le MTBE lui-même (Poet et al., 1997 ; Nihlén et al., 1998). Hong et al. (1997b) ont démontré que le foie humain métabolise le MTBE en TBA. Cette activité de dégradation

était localisée dans la fraction microsomale mais pas dans le cytosol. La formation du TBA est NADPH-dépendante et fortement inhibée par la présence de monoxyde de carbone ; ce résultat est en faveur de l'intervention d'une enzyme de type cytochrome P450. Les auteurs ont confirmé l'intervention d'une telle enzyme dans le métabolisme de l'éther. Récemment, Williams et Borghoff (2000) ont montré que l'exposition de microcosmes hépatiques au MTBE induit des cytochromes P450 intervenant également dans le métabolisme de la testostérone.

-Métabolisme de l'ETBE :

Turini et al. (1998) ont montré que l'ETBE est également oxydé par une enzyme de type cytochrome P450 aboutissant à la production de TBA et d'acétaldéhyde chez le rat. Cette activité est fortement inhibée par la présence de métyrapone, comme dans le cas du MTBE. Ceci laisse supposer que la même enzyme est impliquée dans les deux cas. L'ETBE est métabolisé en TBA, par des microsomes de foie de rat ainsi que par des tissus de poumons et par le sang (Ahmed, 2001). Le TBA est ensuite dégradé en 2-méthyl-1,2-propanediol et HIBA, deux composés excrétés par les urines. Bernauer et al. (1998) ont également mis en évidence chez des rats exposés à l'ETBE, la production de TBA-glucuronide (Figure 3).

Chez l'homme, l'excrétion d'ETBE et de TBA par les urines est faible (moins de 1% de l'ETBE ingéré), ce qui indique une dégradation du TBA par notre métabolisme ou d'autre(s) voie(s) d'élimination. La teneur en acétone dans le sang d'individus exposés à l'ETBE indique que ce composé est un produit de dégradation de l'ETBE. Comme dans le cas du MTBE, le TBA est un meilleur marqueur d'une exposition à l'ETBE que l'éther lui-même. L'intervention de cytochromes P450 au cours du métabolisme de l'ETBE a également été montré chez l'homme (Ahmed, 2001).

Figure 3 : Biotransformation du MTBE et de l'ETBE chez les rats.

D'après Bernauer et al. (1998).

-Métabolisme du TAME :

Chez les rats, le TAME est oxydé par des cytochromes P450 de foie (2B1 et 2E1) en formaldéhyde et alcool *tertio*-amylique (TAA). Le TAA est ensuite métabolisé par deux systèmes de cytochromes P450 différents en 2,3-dihydroxy-2-méthyl-butane, et la

conjugaison avec du glucuronate conduit au TAA glucuronide, ce produit étant analogue à ce qui a été trouvé dans le cas du MTBE et de l'ETBE (Ahmed, 2001).

V.4. Biodégradation des éthers-carburants.

La persistance du MTBE dans les nappes aquifères polluées laissait supposer que sa biodégradation par les micro-organismes de l'environnement est faible voire inexistante. Il faut d'ailleurs noter que les éthers-carburants sont l'exemple même de composés xénobiotiques introduits dans l'environnement exclusivement par l'activité humaine et de façon récente. Néanmoins, des composés biodégradables présentant des liaisons éther dans leur structure chimique sont fréquents dans l'environnement, que leur origine soit naturelle (la lignine) ou non (phénoxyalcanoate et diphenyl éther utilisés comme herbicide, éthoxylates utilisés comme détergents ou encore les polyéthers) (White et al., 1996).

Dès la mise en évidence de l'étendue de la contamination et au regard de la toxicité possible de ces composés, l'acquisition de connaissances sur leur biodégradabilité est apparue cruciale.

V.4.A. Biodégradation par des microcosmes et des cultures mixtes.

- *En conditions aérobies :*

Les premières études réalisées (Jensen et Arvin, 1990) ont conclu à l'absence de biodégradation du MTBE et du TAME par des microcosmes d'origines diverses (nappes aquifères, sols, boues activées) malgré des durées d'incubation longues (40 à 60 jours).

Néanmoins, Salanitro et al. (1994) ont pu obtenir une culture mixte, BC-1, capable d'utiliser le MTBE comme seule source de carbone et d'énergie à partir de boues activées d'une unité de traitement des eaux d'une usine de produits chimiques. Le MTBE étant dégradé avec une accumulation transitoire de TBA (Tableau 7). Cette culture composée de plusieurs types de micro-organismes pouvait être maintenue au cours de repiquages successifs. Une souche pure appartenant au genre *Rhodococcus* sp. nov. SC-100 responsable de la dégradation du MTBE a été isolée de cette culture mixte (Salanitro et al., 2001).

Depuis lors, plusieurs études ont montré la biodégradation du MTBE par des microcosmes d'origines diverses (Park et Cowan, 1997 ; Bradley et al., 1999 ; Bradley et al., 2001c ; Fortin et al., 2001 ; Kane et al., 2001 ; Landemeyer et al., 2001). Néanmoins, les

vitesse de dégradation étant très faibles (de 0,5 mg de MTBE dégradé.L⁻¹.jour⁻¹ à 3,4 µg de MTBE dégradé.L⁻¹.jour⁻¹). Si ces études n'ont pas permis l'isolement des micro-organismes responsables de la dégradation du MTBE, elles ont mis en évidence les capacités endogènes de microflore naturelle pour la biodégradation aérobie du MTBE ainsi que la lenteur du processus qui confirmait bien la mauvaise biodégradabilité du MTBE.

-En conditions anaérobies :

Yeh et Novak (1991) ont étudié la biodégradation du MTBE, de l'ETBE et du TBA par des microcosmes de sols provenant d'origines géographiques diverses et prélevés à différentes profondeurs. Différents accepteurs d'électrons ont été testés, NO₃⁻, SO₄²⁻ ou

Tableau 7 : Activités de dégradation de composés oxygénés par des micro-organismes purs et des cultures mixtes.

Micro-organismes et consortia	Source de carbone	Activité de dégradation du MTBE (nmoles.min ⁻¹ .mg protéines ⁻¹)	Activité de dégradation du TBA (nmoles.min ⁻¹ .mg protéines ⁻¹)	Activité de dégradation de l'ETBE (nmoles.min ⁻¹ .mg protéines ⁻¹)	Références
Culture BC-1	MTBE	13	6,3	Nd	1
<i>Graphium</i> sp.	Butane	0,4	+ (Nd)	Nd	2
<i>Pseudomonas putida</i> CAM	Camphre	0,4	Nd	Nd	3
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	Propane	+(Nd)	+(Nd)	+(Nd)	3
<i>Nocardia</i> sp. ENV 425	Propane	4,6	1,8	+(Nd)	3
Souche ENV 421	Propane	9,2	2,4	+(Nd)	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pentane	3,9	0,95	Nd	4
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	Hexane	21	Nd	Nd	5
<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	2-méthylpentane	17,1	Nd	Nd	5
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Butane	15,0	Nd	Nd	5
<i>Arthrobacter</i> sp.	Butane	6,8	Nd	Nd	6
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	2-méthylbutane	14,9	Nd	Nd	5
<i>Pseudomonas mendocina</i>	2-méthylpentane	4,0	Nd	Nd	5
Culture utilisant le cyclohexane	Cyclohexane	2,4	0,46	0,62	7
<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	MTBE	19	+(Nd)	Nd	8
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001	ETBE	14	-	59	9
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2007	Ethanol	15,6	-	Nd	10
<i>Burkholderia cepacia</i> IFP 2003	TBA	-	16	-	11
<i>Rhodococcus</i> sp. CT2	Propane	11,7	Nd	Nd	12
<i>Rhodococcus</i> sp. CT2	Pentane	18,3	Nd	Nd	12
<i>Rhodococcus</i> sp. CT2	Isobutane	4,6	Nd	Nd	12
<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV 735	MTBE	46	+(Nd)	Nd	13,14

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE : LES ÉTHERS-CARBURANTS.

<i>Comamonas testosteroni</i> E1	ETBE	Nd	Nd	0,64	15
Souche E2	ETBE	Nd	Nd	0,45	15

Nd : non déterminé.

+ : dégradation.

- : pas de dégradation

1 : Salanitro et al. (1994) ; 2 : Hardison et al. (1997) ; 3 : Steffan et al. (1997) ; 4 : Garnier et al. (1999) ; 5 : Hyman et O'Reilly (1999) ; 6 : Liu et al. (2001) ; 7 : Corcho et al (2000) ; 8 : Deeb et al. (2000) ; 9 : Hernandez-Perez et al. (2001) ; 10 : Piveteau et al. (2000) ; 11 : Piveteau et al. (2001) ; 12 : Hyman et al. (2000) ; 13 : Steffan et al. (2000) ; 14 : Hatzinger et al. (2001) ; 15 : Kharoune et al. (2001).

H₂/CO₂, et la biodégradabilité des produits oxygénés a été variable selon le composé et l'accepteur d'électrons testés. Ainsi, le TBA a été dégradé dans toutes les conditions testées, l'ETBE dans quelques cas et bien que le MTBE se soit révélé être particulièrement récalcitrant, sa dégradation a pu être observée en conditions méthanogènes à un pH de 5,5. Suflita et Mormile (1993) et Mormile et al. (1994) n'ont observé, pour leur part, aucune dégradation des trois éthers avec des sédiments incubés en conditions sulfato-réductrices ou dénitrifiantes mais une dégradation partielle du MTBE en TBA a été observée après 180 jours d'incubation en conditions méthanogènes. Les mêmes auteurs n'ont observé aucune dégradation des éthers-carburants en utilisant des souches pures de bactéries acétogènes capables de dégrader les méthyl phényl éthers. La biodégradation anaérobie des éthers-carburants semble donc très rare (Bradley et al., 1999, Puig-Grajales et al., 2000). Néanmoins, Wilson et Cho (2000) ont observé une biodégradation du MTBE en liaison avec une activité méthanogène et une réduction de fer associée dans un aquifère contaminé. Récemment, Somsamak et al. (2001) ont montré, en conditions sulfato-réductrices, une dégradation complète du MTBE et du TAME en quantités stoechiométriques de TBA et TAA, respectivement. La première étape de la dégradation dans ces conditions est une O-déméthylation. Bradley et al. (2001a) ont également montré la minéralisation du MTBE en conditions dénitrifiantes sans accumulation de TBA à partir de 2 microcosmes d'origines différentes.

V.4.B. Biodégradation par cométabolisme.

Le fait qu'aucun micro-organisme capable d'utiliser le MTBE comme source de carbone et d'énergie n'ait pu être isolé à partir de microcosmes dégradant ce composé pouvait suggérer que le cométabolisme était un mécanisme impliqué dans la dégradation du MTBE. Il est, par ailleurs, bien connu que ce mécanisme particulier intervient souvent dans la dégradation des composés xénobiotiques (Figure 4), par exemple dans le cas des solvants chlorés. Comme, par ailleurs, il est admis que l'attaque initiale sur le MTBE en aérobiose est une oxydation, plusieurs auteurs ont recherché des micro-organismes présentant une activité de dégradation du MTBE par co-oxydation (Tableau 7). Les résultats obtenus avec les divers micro-organismes testés et lorsque la nature de l'enzyme mise en œuvre était connue, sont résumés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Activités oxygénases testées pour leur capacité à dégrader le MTBE et le TBA.

Substrat	Micro-organisme	Oxygénase	Oxydation du MTBE	Oxydation du TBA	Références	
Méthane	<i>Methylosinus trichosporium</i> OB3b	Méthane mono-oxygénase	-	nd	1	
Propane	<i>Mycobacterium vaccae</i> JOB5	Propane mono-oxygénase	+ ^a	+ ^a	2	
	<i>Xanthobacter</i> sp.	Propane mono-oxygénase	+ ^a	+ ^a	2	
Butane	<i>Nocardia</i> sp. ENV425	Cytochrome P450	+ ^a	+ ^a	3	
	<i>Graphium</i> sp.	Cytochrome P450	+ ^a	nd	4	
	<i>Arthrobacter</i> ATCC27778	Butane mono-oxygénase	+ ^a	+ ^a	5	
Alcanes	<i>Rhodococcus rhodocrous</i> 116	2 cytochromes P450	-	-	3	
	<i>Pseudomonas oleovarans</i> Gp1	Alcane hydroxylase	-	nd	3	
Cyclohexane	Culture mixte	Cytochrome P450	+ ^a	+ ^a	6	
Propylène	<i>Xanthobacter</i> Py2	Propylène mono-oxygénase	-	nd	1	
Toluène	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	Toluène <i>ortho</i> -mono-oxygénase	-	nd	1	
	<i>Pseudomonas mendocina</i> KR1	Toluène <i>para</i> -mono-oxygénase	-	nd	3	
	<i>Pseudomonas putida</i> F1	Toluène di-oxygénase	-	nd	1	
	Ammonium	<i>Nitrosomonas europae</i> ATCC 19178	Ammonium mono-oxygénase	-	nd	1
	Lignine	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Lignine peroxydase	-	nd	7
Farine de soja	<i>Streptomyces griseus</i>	Cytochrome P450 soy	-	nd	5	
Camphre	<i>Pseudomonas putida</i> CAM	Cytochrome P450 cam	+ ^a	nd	3	
ETBE	<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001	Cytochrome P450	+ ^a	-	8	
	<i>Comamonas testosteroni</i> E1	Cytochrome P450	+ ^a	nd	9	
	Souche E2	Cytochrome P450	+ ^a	nd	9	
MTBE	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	MTBE monooxygenase	+ ^b	-	10	
	<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV735	MTBE monooxygenase	+ ^b	-	11	
TBA	<i>Burkholderia cepacia</i> IFP 2003	TBA monooxygenase	-	+ ^b	12	
	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	TBA monooxygenase	-	+ ^b	10	
	<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV735	TBA monooxygenase	-	+ ^b	11	

^a Dégradation du MTBE et du TBA par cométabolisme

^b MTBE ou TBA utilisés comme source de carbone et d'énergie.

nd : non déterminé.

1 : Hyman et O'Reilly (1999) ; 2 : Hyman et al. (1998) ; 3 : Steffan et al. (1997) ; 4 : Hardison et al. (1997) ; 5 : Liu et al. (2001) ; 6 : Corcho et al. (2000) ; 7 : Kay-Shoemake et Watwood (1996) ; 8 : Hernandez-Perez et al. (2001) ; 9 : Kharoune et al. (2001) ; 10 : Deeb et al. (2000) ; 11 : Hatzinger et al. (2001) ; 12 : Piveteau et al. (2001).

Figure 4 : Principe général du cométabolisme.

-Microorganismes poussant sur alcanes :

Aucune dégradation n'a été observée en utilisant un micro-organisme capable de croissance sur méthane, *Methylosinus trichosporium* OB3B, qui est pourtant connu pour sa capacité à oxyder un large spectre de substrats (Hyman et O'Reilly, 1999 ; Liu et al., 2001).

Steffan et al. (1997) ont testé la capacité de différentes souches poussant sur propane à dégrader les éthers. Cette étude concernait *Mycobacterium vaccae* JOB5 et trois nouvelles souches de bactéries nocardioformes, ENV 420, ENV 421 et ENV 425. Toutes ces souches se sont révélées être capables de dégrader le MTBE, l'ETBE, le TAME et le TBA en resting-cells après croissance sur propane. *Nocardia* sp. ENV 425 accumulait de façon transitoire le TBA, ce composé étant également dégradé par cométabolisme puisque la souche est incapable d'utiliser ce substrat comme seule source de carbone et d'énergie. L'existence d'un cytochrome P450 induit lors de la croissance sur propane fut démontrée pour *Nocardia* sp. ENV 425. Hyman et al. (1998) ont décrit le rôle d'une mono-oxygénase induite après croissance de *M. vaccae* JOB5 et d'une souche de *Xanthobacter* sur propane. En utilisant des inhibiteurs spécifiques, alcènes et alcynes, ils ont montré que l'activité mono-oxygénase

permettant l'attaque des éthers par ces souches n'impliquait pas un cytochrome P450. Ils ont aussi remarqué que le TBF est le premier intermédiaire détectable lors de la dégradation du MTBE. Le TBA produit est ensuite dégradé également par cométabolisme.

Hardison et al. (1997) ont étudié la dégradation du MTBE par cométabolisme chez le champignon filamenteux *Graphium* sp. après croissance sur diéthyl éther ou *n*-butane. La dégradation du MTBE s'accompagne de la production de *tert*-butyl formiate (TBF) et de TBA. L'inhibition de cette activité par les alcènes et les alcynes est en faveur de l'intervention d'un cytochrome P450 dans l'oxydation initiale du MTBE.

Hyman et O'Reilly (1999) ont confirmé que des souches capables de pousser sur alcanes gazeux ou isoalcanes, *M. vaccae* JOB5, *A. eutrophus* et *P. mendocina*, ont également la capacité de dégrader le MTBE. Plus récemment, Liu et al. (2001) ont montré la minéralisation du MTBE par *Arthrobacter* ATCC 27778 après croissance sur butane.

A partir de ces résultats, Hyman et al. (2000) suggèrent donc que l'addition ou la présence d'alcanes à courte chaîne (ou d'*iso*-alcanes) dans les aquifères peut stimuler la croissance des micro-organismes capables de dégrader le MTBE.

Une souche de *Pseudomonas putida* capable de croître sur *n*-alcanes liquides (pentane, hexane, heptane) a été isolée à partir d'un site contaminé par Garnier et al. (1999). Cette souche était capable de dégrader le MTBE par cométabolisme. Du TBA était accumulé mais l'addition de pentane permettait de le dégrader, prouvant ainsi que sa dégradation était également cométabolique.

-Micro-organismes poussant sur cyclohexane :

Corcho et al. (2000) ont sélectionné une culture mixte capable de croître sur un hydrocarbure récalcitrant, le cyclohexane, comme seule source de carbone et d'énergie. Après croissance sur ce substrat, la culture est capable de cométaboliser les trois éthers-carburants et le TBA. Lors de la dégradation du MTBE, le TBA est tout d'abord accumulé stœchiométriquement puis il est dégradé lentement. Un cytochrome P450 est induit lors de la dégradation de ces deux composés par cette culture.

-Micro-organismes poussant sur ETBE :

Fayolle et al. (1998) ont isolé un micro-organisme capable de croissance sur ETBE, *Gordonia terrae* IFP 2001, mais incapable de pousser sur MTBE ou TAME. Néanmoins, Hernandez-Perez et al. (2001) ont par la suite montré que *G. terrae* IFP 2001 avait également

la capacité de dégrader le MTBE et le TAME en présence d'un substrat de croissance alternatif, le 2-propanol ou l'éthanol (ou ETBE). Nous reviendrons en détail sur les capacités de cette souche dans la suite de cette présentation.

-Micro-organismes poussant sur différents substrats :

La dégradation du MTBE a été montrée avec des cellules non proliférantes de *Pseudomonas putida* CAM cultivée sur camphre grâce à la présence d'un cytochrome P450cam induit par ce substrat (Steffan et al., 1997).

Parmi les autres substrats testés dont l'utilisation nécessite une oxydation, le toluène par *Burkholderia cepacia* G4, *Pseudomonas mendocina* KR1 ou *P. putida* F1 (Steffan et al., 1997, Hyman et O'Reilly, 1999), le propylène par *Xanthobacter* Py2 (Hyman et O'Reilly, 1999), les ions ammonium par *Nitrosomonas europaeae* (Hyman et O'Reilly, 1999), la lignine par *Phanerochaete chrysosporium* (Kay-Shoemake et Watwood, 1996) ou la farine de soja par *Streptomyces griseus* (Liu et al., 2001), aucun ne s'est avéré capable d'induire la dégradation du MTBE.

V.4.C. Biodégradation d'éthers utilisés comme source de carbone et d'énergie.

- Micro-organismes poussant sur ETBE :

Rhodococcus ruber IFP 2001 et *Rhodococcus equi* IFP 2002 ont été isolés à partir de boues activées de station d'épuration d'eaux urbaines pour leur capacité à croître sur ETBE comme seule source de carbone et d'énergie (Fayolle et al., 1998). L'ETBE est dégradé en TBA qui s'accumule dans le milieu sans être dégradé ultérieurement et en un composé en C2 qui permet la croissance des souches (Fayolle et al., 1998). Hernandez-Perez et al. (2001), au cours de l'étude des capacités de dégradation de *R. ruber* IFP 2001 ont ensuite montré la stoechiométrie entre l'ETBE et l'oxygène consommé par des cellules non proliférantes. Par ailleurs, l'analyse du spectre des extraits cellulaires obtenus après croissance sur ETBE a permis de mettre en évidence l'intervention d'un cytochrome P450 induit lors de la dégradation de cet éther (Tableau 8). *R. ruber* IFP 2001, qui n'est pas capable d'utiliser le MTBE comme seule source de carbone peut, néanmoins, dégrader cet éther en TBA et formiate après croissance sur ETBE (Tableau 7). Un mutant de cette souche, *R. ruber* IFP 2007, dans lequel l'expression du cytochrome P450 est constitutive a également été obtenu (Tableau 7).

Chauvaux et al. (2001) ont caractérisé la structure du cluster portant les gènes *eth* impliqués dans la dégradation de l'ETBE (Figure 5). La structure génétique impliquée, assez instable, est flanquée de deux séquences directes répétées permettant l'élimination du fragment d'ADN porteur des gènes *eth*. L'implication des gènes *eth* dans la dégradation du MTBE fut par la suite confirmée (Urios et al., 2002). Il s'agit de la première caractérisation génétique d'un cytochrome P450 impliqué dans la croissance sur un éther-carburant.

Figure 5 : Organisation des gènes *eth* de *Rhodococcus ruber* IFP 2001 codant pour la dégradation de l'ETBE et du MTBE (Urios et al., 2002).

A : les gènes *eth* (quadrillés) codent pour un activateur putatif de transcription (*ethR*), une ferredoxine réductase (*ethA*), le cytochrome P450 inductible par l'ETBE (*ethB*), une ferredoxine (*ethC*) et une protéine inconnue induite par l'ETBE (*ethD*). Ces gènes sont flanqués par deux répétitions directes (transposons) d'un fragment de 5,6 kpb (hachurés).

B et C : la recombinaison homologue entre les deux transposons conduit à la perte d'un transposon et de la région portant les gènes *eth*.

L'existence d'un mutant constitutif, *R. ruber* IFP 2007, capable de dégrader le MTBE en présence d'un substrat de croissance comme l'éthanol, a conduit à l'utilisation de cette souche en association avec une souche dégradant le TBA comme *Burkholderia cepacia* IFP 2003 (Piveteau et al., 2000).

Kharoune et al. (2001) ont isolé deux souches, *C. testosteroni* E1 et une souche E2, capables de croissance sur ETBE et sur TBA. Dans les deux cas, la croissance sur ETBE nécessitait l'induction d'un cytochrome P450 (Tableaux 7 et 8).

- Micro-organismes poussant sur MTBE :

Mo et al. (1997) ont isolé trois souches, appartenant aux genres *Methylobacterium*, *Rhodococcus* et *Arthrobacter*, qui minéralisaient partiellement le [U-¹⁴C]MTBE en ¹⁴CO₂ en une à deux semaines.

Hanson et al. (1999) ont isolé une bactérie Gram négative, PM-1, à partir d'un biofiltre alimenté en MTBE. Lors d'expériences réalisées avec du [U-¹⁴C]MTBE, environ 50% du carbone était récupéré sous forme de ¹⁴CO₂, avec un rendement cellulaire de 0,18 g (masse sèche).g⁻¹ MTBE (Tableau 7). Par la suite, la souche PM1 fut identifiée par Deeb et al. (2001) comme *Rubrivivax gelatinosus*. Les résultats suggèrent que deux mono-oxygénases différentes sont responsables de la dégradation du MTBE et du TBA (Tableau 8).

Steffan et al. (2000) ont également isolé une bactérie Gram négative, *Hydrogenophaga flava* ENV 735, qui pousse lentement sur MTBE. L'addition de 100 mg.L⁻¹

d'extrait de levure dans le milieu de culture permet d'améliorer la croissance sur MTBE et du TBA est accumulé de façon transitoire. Hatzinger et al. (2001) ont obtenu, pour *H. flava* ENV 735, un rendement cellulaire de 0,4 g (masse sèche).g⁻¹ de MTBE en présence d'extrait de levure (0,01%). Deux mono-oxygénases différentes sont impliquées dans la dégradation du MTBE et du TBA (Tableau 8). L'accumulation du TBA au cours de la croissance fait suspecter aux auteurs une limitation qui pourrait être dûe soit (i) à un intermédiaire toxique produit lors des étapes initiales de la dégradation du MTBE (le formaldéhyde, par exemple), soit (ii) à une limitation dans l'utilisation des produits de dégradation du TBA par la souche.

V.4.D. Voies de dégradation proposées

En 1995, Salanitro a proposé une voie de dégradation basée sur l'identification du TBA comme intermédiaire de dégradation du MTBE par la culture BC-1. Par la suite, un certain nombre d'intermédiaires furent identifiés et Steffan et al. (1997) ont proposé plusieurs voies possibles pour la dégradation du MTBE en CO₂ (Figure 6). Ce schéma est hypothétique pour une grande part.

L'ensemble des données confirmées concernant la voie de dégradation a été collecté (Figure 7). Abstraction faite du TBA, tous les intermédiaires présentés dans cette figure ont été détectés lors de la dégradation du MTBE par co-métabolisme.

Cette voie de dégradation fait intervenir une attaque initiale par une mono-oxygénase permettant la conversion du MTBE en un hémiacétal, le *tert*-butoxy méthanol. Deux voies peuvent alors être envisagées aboutissant au TBA. L'une est basée sur la détection du formaldéhyde par Hardison et al. (1997) qui serait alors produit par un clivage, supposé spontané, de l'hémiacétal en TBA et formaldéhyde. La deuxième permet d'expliquer la détection de *tert*-butyl formiate (TBF) dans certains cas ; l'oxydation de l'hémiacétal, qui pourrait faire intervenir une alcool déhydrogénase (Hardison et al., 1997 ; Hyman, communication au congrès international de l'IFP : « Microbiology of hydrocarbons : state of the art and perspectives », Rueil-Malmaison, France, 6-7 juin 2002), conduirait à la production de TBF qui serait ensuite hydrolysé en formiate et TBA. L'intervention d'une mono-oxygénase à cytochrome P450 au cours de cette première étape a été démontrée avec certains micro-organismes, en particulier dans les cas de cométabolisme (Tableau 8). Dans le cas de la croissance de *R. gelatinosus* PM1 sur MTBE, aucun intermédiaire de dégradation n'a pu être détecté. La nature de l'oxygénase impliquée dans la dégradation du MTBE n'est pas connue (Deeb et al., 2000).

Concernant la dégradation du TBA, deux intermédiaires, le méthyl 2-hydroxy 1-propanol et l'acide 2-hydroxyisobutyrique (HIBA), avaient été identifiés lors de la dégradation par cométabolisme du MTBE en présence de propane par *Nocardia* sp. ENV 425 (Steffan et al., 1997). Hatzinger et al. (2001) ont confirmé la présence de HIBA dans les surnageants de culture de *H. flava* ENV735 sur MTBE. Cette étape, encore plus méconnue que la première, semble nécessiter l'induction de systèmes enzymatiques spécifiques pour l'attaque du TBA différents de ceux induits au cours de l'attaque initiale du MTBE, aussi bien chez *R. gelatinosus* *PM1* que chez *H. flava* ENV735. Dans ce dernier cas, l'accumulation transitoire de TBA a été démontrée ainsi que l'intervention d'une mono-oxygénase qui ne serait pas un cytochrome P450 d'après les études d'inhibition/inactivation (Hatzinger et al., 2001).

Figure 6 : Voies métaboliques proposées pour la dégradation par cométabolisme du MTBE par des souches oxydant le propane.
La voie de dégradation de l'acide 2-hydroxyisobutyrique est hypothétique.
D'après Steffan et al. (1997).

Figure 7 : Voies de dégradation du MTBE.

Des intermédiaires et des activités enzymatiques ont été identifiés par Steffan et al. 1997 ①, Hardison et al. 1997 ②, Hernandez-Perez et al. 2001 ③, Hyman et al. 1998 ④, Salanitro et al. 1994 ⑤, Hatzinger et al. 2001 ⑥.

En résumé, peu de données sont disponibles, en particulier à propos des souches capables de croissance sur MTBE. Or, la connaissance de la voie de dégradation ainsi que des enzymes impliquées dans celle-ci est cruciale pour déterminer les étapes limitantes et les raisons de la mauvaise biodégradabilité du MTBE.

Il apparaît que plusieurs classes d'enzymes sont impliquées dans la voie métabolique :

- les mono-oxygénases, qui interviennent dans l'oxydation du MTBE, du TBA et éventuellement de l'acétone ;
- les estérases, qui interviendraient éventuellement dans le clivage du TBF en formiate et TBA.
- les décarboxylases, qui interviennent dans la décarboxylation du HIBA en 2-propanol.
- les déshydrogénases, qui interviennent à plusieurs niveaux dans le schéma métabolique proposé dans la figure 6.

VI. Activités enzymatiques impliquées dans la dégradation du MTBE.

VI.1. Les mono-oxygénases.

VI.1.A. Généralités.

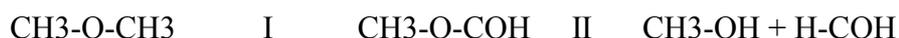
White et al. (1996) ont effectué une revue des systèmes enzymatiques impliqués dans la dégradation de liaisons éther. Ces auteurs distinguent plusieurs mécanismes d'attaque: les oxydations par des oxygénases (à cytochrome P450 ou non), le transfert d'un groupement hydroxyle, l'hydrolyse, l'O-déalkylation anaérobie des alkyle-aryle éthers, l'oxydation en acide carboxylique, les réductions et les clivages des liaisons carbone-oxygène par des lyases.

En fonction des résultats déjà connus concernant la dégradation du MTBE (voir Tableau 8), nous ne considérerons ici que l'action des mono-oxygénases. En effet, d'une part, la dégradation du MTBE par cométabolisme est effectuée par des cytochromes P450, ou par des mono-oxygénases non hémiques induites lors de la croissance sur des *n*-alcanes gazeux. D'autre part, si l'on considère les deux souches capables de croissance sur MTBE, les quelques informations disponibles sur la nature des mono-oxygénases impliquées concernent *H. flava* ENV 735 et ont été obtenues via l'action d'inhibiteurs ou d'inactivateurs de ces enzymes.

-Mécanismes d'action des mono-oxygénases sur les éthers:

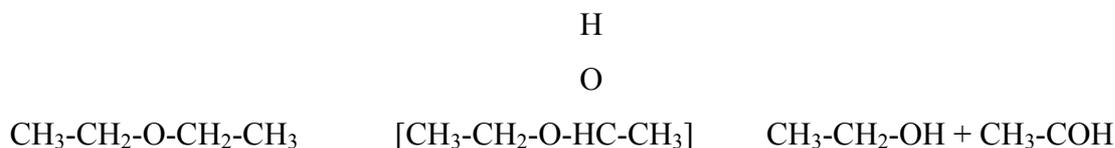
Les mono-oxygénases sont responsables de l'introduction d'un atome d'oxygène dans une molécule : $R-H + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow R-OH + H_2O$.

Stirling et al. (1980) ont pu mettre en évidence la dégradation du diméthyl éther par la méthane mono-oxygénase avec des cellules non proliférantes de *Methylococcus capsulatus*. Les produits de cette oxydation sont le méthanol et le formaldéhyde. Ce résultat conduit les auteurs à supposer que la mono-oxygénase (I) produit l'hémiacétal qui par scission spontanée (II) va donner les deux produits cités:



Plus récemment, Hur et al. (1997) ont testé la capacité de la toluène-2-monooxygénase de *Burkholderia cepacia* G4PR1 à dégrader des éthers. Après croissance sur lactate, cette souche est capable d'utiliser le diéthyl éther comme seule source de carbone et d'énergie. Des cellules non proliférantes préparées après croissance sur lactate sont capables de dégrader le diéthyl éther, le diéthyl sulfure, le 2-chloroéthyl éther, le butyl méthyl

éther mais pas le MTBE. Utilisant une toluène-2-mono-oxygénase purifiée, les auteurs ont montré qu'une mole de diéthyl éther était oxydée en une mole d'acétaldéhyde et une mole d'éthanol. L'oxydation du diéthyl éther sur le carbone subterminal conduit à un produit instable qui spontanément va se scinder pour donner les produits ci-dessus :



Par conséquent, la rupture de la liaison éther par des mono-oxygénases passe par la formation d'un composé instable (un hémiacétal) qui se scinderait ensuite spontanément.

VI.1.B. Les cytochromes P450.

Les mono-oxygénases à P450 sont des enzymes très étudiées du fait de leur fréquente implication dans la dégradation des composés xénobiotiques. Klingenberg (1958) a observé la présence d'un pigment absorbant à 450 nm après fixation de monoxyde de carbone dans des microsomes de foie de rat traités par un agent réducteur. La nature hémique des cytochromes P450 a été établie en 1964 par Omura et Sato. La fonction enzymatique du cytochrome P450 et son rôle dans le métabolisme des composés xénobiotiques et dans l'hydroxylation des stéroïdes a ensuite été montrée. La masse molaire des différents cytochromes P450 caractérisés est comprise entre 450 et 60 kDa.

-Classification des cytochromes P450 :

Les cytochromes P450 sont présents chez les Eucaryotes supérieurs mais aussi chez les levures et les bactéries.

Ces enzymes sont divisées en trois classes :

-les cytochromes de classe I correspondant aux enzymes mitochondriales et bactériennes, qui sont solubles. Ils comprennent trois protéines : une ferrédoxine réductase contenant un coenzyme flavinique (FAD), une petite protéine contenant du fer et du soufre (la ferrédoxine) et le cytochrome P450. La chaîne de transfert des électrons du NAD(P)H au P450 est décrite dans la figure 8.

Figure 8 : Représentation schématique des deux types de systèmes enzymatiques à cytochrome P450. D'après Poupin, 1999.

Dans de nombreux systèmes bactériens, les gènes codant pour le cytochrome P450, la ferrédoxine et la protéine réductase sont regroupés en opéron, généralement inductible (Peterson et al., 1990 ; Peterson et al., 1992 ; Nagy et al., 1995 ; Chauvaux et al., 2001). Ce type de cytochrome est peu spécifique et peut catalyser l'oxydation de nombreux composés.

-les cytochromes de classe II, qui comprennent les enzymes microsomiales et qui sont membranaires, comprennent seulement deux protéines, une réductase contenant deux coenzymes (FAD et FMN) et le cytochrome P450. La chaîne de transfert des électrons est décrite dans la Figure 8.

-un cytochrome P450 (P450 BM-3) de classe III, CYP 102, a été isolé chez *Bacillus megaterium*. Cette enzyme de haut poids moléculaire (119 kDa) intervient dans le métabolisme des acides gras à longue chaîne et est intermédiaire entre les classes I et II. Ce cytochrome ne nécessite que la présence de NADPH pour oxyder les acides gras (Narhi et Fulco, 1986). Il est composé de deux domaines séparables : un polypeptide de 66 kDa contenant les deux coenzymes flaviniques (FAD et FMN) et un polypeptide de 55 kDa correspondant au cytochrome P450 (Narhi et Fulco, 1987). Ces deux domaines présentent plus de similitudes avec la réductase et le cytochrome P450 à deux composants (type II) qu'avec les systèmes bactériens (type I). Ce cytochrome est soluble.

- *Mise en évidence d'un cytochrome P450 :*

L'existence d'un cytochrome P450 peut être mise en évidence directement par la détection d'un pic à 450 nm d'après la technique décrite par Omura et Sato (1964) après induction sur le substrat de la mono-oxygénase. L'utilisation de différents inactivateurs ou inhibiteurs spécifiques peut contribuer à sa mise en évidence : le monoxyde de carbone, les alcènes, les alcynes, la métyrapone ou le 1-aminobenzotriazole. Nous reviendrons sur le mode d'action de ces composés dans la suite de l'exposé.

- *Distribution des cytochromes P450 bactériens. Implication dans la dégradation du MTBE :*

Les cytochromes P450 bactériens sont nombreux et reconnus comme étant capables d'utiliser des substrats variés ce qui les rend responsables de l'oxydation de nombreux composés xénobiotiques. Quarante-neuf séquences nucléotidiques de cytochromes P450 de

bactéries à Gram positif sont connues, avec une prédominance de Mycobactéries et de Streptomyces, et seulement seize chez les bactéries à Gram négatif.

Dans le cas du MTBE, plusieurs cytochromes P450 induits après croissance sur différents substrats sont capables d'oxyder ce composé : sur propane avec *Nocardia* sp. ENV 425, sur butane avec *Graphium* sp., sur cyclohexane avec une culture mixte, sur camphre avec *P. putida* CAM, sur ETBE avec *R. ruber* IFP 2001 et *C. testosteroni* E1 (Tableau 8).

En effet, deux cytochromes P450 impliqués dans la croissance sur un éther-carburant, l'ETBE, ont été mis en évidence chez *R. ruber* IFP 2001 (Hernandez et al., 2001) et chez *C. testosteroni* E1 (Kharoune et al., 2001). Chauvaux et al. (2001) ont identifié les gènes responsables de la dégradation de l'ETBE par *R. ruber* IFP 2001. Cette caractérisation génétique a notamment été possible grâce à l'instabilité de la capacité de dégradation de l'ETBE qui a permis la sélection d'un mutant ETBE⁻, *R. ruber* IFP 2006. Les gènes, *ethRABCD* organisés en cluster, codent respectivement pour un régulateur transcriptionnel de la famille AraC/XylS, pour une ferrédoxine réductase, un cytochrome P450, une ferrédoxine et une petite protéine de 10 kDa de fonction inconnue (Figure 5).

VI.1.C. Mono-oxygénases liées à l'utilisation des alcanes gazeux.

Les bactéries oxydant les alcanes peuvent être classées en 3 groupes sur la base de la longueur de chaîne de l'alcane.

- Les bactéries oxydant le méthane n'utilisent que cet alcane comme substrat et son oxydation nécessite une méthane mono-oxygénase (MMO) qui, chez certaines espèces, peut être soit soluble soit associée à la membrane en fonction de la teneur en cuivre dans le milieu de culture (Hanson et Hanson, 1996).

-Les bactéries poussant sur éthane, propane et butane. Les micro-organismes concernés appartiennent principalement au groupe des *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium-Rhodococcus* (Ashraf et al., 1994). Néanmoins, quelques souches de *Pseudomonas* spp. sont capables de croissance sur ces alcanes (Hou et al., 1983 ; Takahashi, 1980). La mono-oxygénase correspondante catalyse l'oxydation du propane en 1-propanol et du butane en 1-butanol initiant la dégradation de ces composés. Il n'existe à l'heure actuelle aucune publication concernant la purification de ces mono-oxygénases du fait de leur très forte instabilité. De même, il n'y a pas eu de caractérisation des gènes codant pour ce groupe de mono-oxygénases (Hamamura et al., 2001).

-Enfin, le troisième groupe est constitué de bactéries oxydant les alcanes liquides (C5 à C12). Dans ce groupe, l'alcane hydroxylase de *P. oleovorans* a été bien caractérisée, elle est composée de 3 polypeptides : une alcane hydroxylase (AlkB, 47 kDa), une rubrédoxine (AlkG, 19 kDa) et une rubrédoxine réductase (AlkT, 41 kDa) (Eggink et al., 1988).

Hamamura et al. (1999) ont déterminé un certain nombre de caractéristiques pour définir l'activité mono-oxygénase de trois souches capables de pousser sur butane, *P. butanovora*, *M. vaccae* JOB5 et *Nocardioides* sp. CF8 :

(i) la présence d'oxygène est requise pour la dégradation du butane par les 3 souches.
(ii) les trois souches sont capables de produire de l'époxyde d'éthylène à partir d'éthylène selon la réaction suivante catalysée par la mono-oxygénase :

(iii) du 1-butanol est produit lors de l'oxydation du butane.

(iv) l'acétylène agit comme un inactivateur à la fois sur l'oxydation du butane et sur la production de 1-butanol. Il inactive également la production d'époxyde d'éthylène à partir d'éthylène.

Cette capacité d'inactivation par l'acétylène est due à la liaison covalente de ce composé avec un polypeptide de 30 kDa comme cela a été montré avec *Nocardioides* sp. CF8 en utilisant du [¹⁴C] acétylène (Hamamura et al., 1999). Les mono-oxygénases AMO (ammonium mono-oxygénase oxydant l'ammonium en nitrite) et pMMO (méthane mono-oxygénase particulaire oxydant le méthane en méthanol), qui toutes deux nécessitent du cuivre dans leur site actif, contiennent également une protéine de 27 kDa capable d'établir une liaison covalente avec l'acétylène (Hyman et Wood, 1985 ; Prior et Dalton, 1985 ; Hyman et Arp, 1992).

VI.1.D. Inactivateurs et inhibiteurs des mono-oxygénases.

En raison de l'instabilité de certaines de ces enzymes, il est souvent nécessaire d'étudier l'effet sur les mono-oxygénases de différents inhibiteurs ou inactivateurs dont l'action est spécifique afin de pouvoir les caractériser. Les inhibiteurs ou activateurs les plus employés sont présentés ci-dessous.

- *Monoxyde de carbone (CO)* :

Le cytochrome P450 présente une affinité importante pour ce ligand gazeux résultant en un complexe CO-hémoprotéine (Figure 9A). Le monoxyde de carbone est un inhibiteur

spécifique de cette classe d'enzyme et est utilisé pour la mise en évidence *in vitro* d'un pic spécifique à 450 nm en conditions réductrices (Testa et Jenner, 1981).

-Alcènes :

Les cytochromes P450 sont inactivés par les alcènes. Cette inactivation met en jeu l'addition d'un atome d'oxygène activé dans la structure porphyrinique puis l'interaction covalente de l'alcène avec cette structure aboutissant au complexe N-(2-hydroxyalkyl) hème (Ortiz de Montellano et Mico, 1980) comme montré sur la Figure 9B.

Hamamura et al. (1999) ont également montré que l'éthylène avait un effet négatif plus ou moins marqué sur l'activité oxydante de souches contenant des butane mono-oxygénases qui ne sont pas des cytochromes P450. Ceci est vraisemblablement lié à la production d'époxyde d'éthylène toxique vis-à-vis des cellules. Cet effet indirect peut être différencié de l'effet sur les cytochromes P450 en étudiant l'addition de l'époxyde considéré sur la réaction d'oxydation. Cet effet est plus ou moins marqué selon la souche testée (Hamamura et al., 1999).

Figure 9 : Mécanismes d'inhibition des cytochrome P450 par le monoxyde de carbone (A ; d'après Testa et Jenner, 1981), les alcènes ou les alcynes (B, d'après Ator et Ortiz de Montellano, 1990) et le 1-aminobenzotriazole (C, d'après Ator et Ortiz de Montellano, 1990).

- *Alcynes* :

Les alcynes terminaux, et particulièrement l'acétylène sont des inactivateurs des cytochromes P450 (Ortiz de Montellano et Kunze, 1980). Le mécanisme est similaire à celui décrit pour les alcènes. L'inactivation est due à l'addition d'un atome d'oxygène activé dans la structure porphyrinique puis à l'interaction covalente de l'alcyne avec cette structure aboutissant au complexe N-(2-oxoalkyl) hème (Ortiz de Montellano et Mico, 1980) (Figure 9B).

L'acétylène est également un inactivateur de nombreuses mono-oxygénases non-hémiques, comme l'AMO, la pMMO (Hyman et Wood, 1985, Hyman et al., 1988) et également de certaines butane mono-oxygénases (Hamamura et al., 1999).

- *Allylthiourée (ATU)* :

L'allylthiourée est un agent chélatant des ions cuivre qui inhibe irréversiblement les mono-oxygénases contenant du cuivre dans leur site actif. Ainsi, l'ATU est un inhibiteur irréversible de mono-oxygénases comme l'AMO et la pMMO (Bédard et Knowles, 1989). Dans le cas des butane mono-oxygénases, l'effet de l'addition d'ATU est variable depuis l'absence d'effet jusqu'à une inhibition supérieure à 90% de l'activité d'oxydation du butane (Hamamura et al., 1999).

- *1-aminobenzotriazole (ABT)* :

L'oxydation du 1-aminobenzotriazole qui peut s'oxyder en benzyne aboutit à l'inactivation des cytochromes P450 par formation d'un complexe avec l'hème dans lequel le cycle benzénique di-substitué en *ortho* établit une liaison entre l'atome de fer et un atome d'azote. selon le mécanisme présenté dans la Figure 9C (Ator et Ortiz de Montellano, 1990).

- *Méthimazole* :

Le 2-mercapto-1-méthylimidazole ou méthimazole est un inhibiteur compétitif classique des flavine mono-oxygénases. Ce composé est connu pour avoir une très grande affinité pour les flavine mono-oxygénases de mammifères par lesquelles il est sélectivement oxydé. Une telle mono-oxygénase, spécifiquement inhibée par le méthimazole, est impliquée dans le métabolisme des phénols polychlorés par *Pseudomonas cepacia* AC11000 (Tomasi et al., 1995).

- Métyrapone :

La métyrapone est un dérivé pyridinique (Figure 10) inhibiteur spécifique et puissant des cytochrome P450. Ce ligand a une affinité pour la forme réduite et pour la forme oxydée du cytochrome P450, et il peut entrer en compétition aussi bien avec le substrat au cours de sa liaison avec l'hème qu'avec l'oxygène au cours de sa liaison avec le complexe substrat-hème (Testa et Jenner, 1981).

Figure 10 : Structure de la métyrapone.

Hatzinger et al. (2001) ont tenté une caractérisation des mono-oxygénases impliquées dans l'oxydation du MTBE ou dans celle du TBA chez *H. flava* ENV735 en utilisant différents inhibiteurs. Dans le cas de la MTBE mono-oxygénase, il y a un effet de l'ABT mais pas d'effet de l'acétylène et du monoxyde de carbone. Par contre, l'acétylène exerce un faible effet sur la TBA mono-oxygénase.

VI.2. Les estérases.

Les estérases appartiennent au groupe des hydrolases (carboxylester hydrolases ; E.C.3.1.1) qui catalysent la formation ou la coupure des liaisons esters de composés solubles dans l'eau.

- *Mécanisme d'action* :

Le mécanisme d'action est hydrolytique et est semblable, pour la plupart des estérases, au mécanisme des lipases et des protéases à sérine. Toutes ces enzymes contiennent une triade catalytique constituée par trois résidus, sérine, histidine et acide aspartique. Le résidu sérine est inclus dans une séquence consensus G-X-S-X-G dans le site actif et l'hydrolyse de l'ester s'effectue via une attaque nucléophile par la sérine sur le groupement carbonyle du substrat impliquant un mécanisme de transfert d'électrons avec les deux autres résidus, histidine et acide aspartique (Figure 11). Ces trois résidus sont proches dans le site catalytique du fait d'un repliement α/β spécifique des hydrolases (Ollis et al., 1992).

Figure 11 : Représentation schématique de la triade catalytique de la diène lactone hydrolase de *Pseudomonas* sp. B13.

① : Résidu nucléophile (Serine), ② : Histidine, ③ : Acide aspartique.

D'après Ollis et al., 1992.

- *Fonction des estérases* :

La fonction de nombreuses estérases n'est pas élucidée car leur substrat naturel n'a pas été identifié. C'est, par exemple, le cas d'*Acinetobacter* sp. ADP1 capable de dégrader les alcanes contenant plus de douze atomes de carbone (Geissdörfer et al., 1999) où un gène, *estB*, codant pour une estérase de fonction inconnue, est inclus dans un opéron codant également pour une rubrédoxine et la rubrédoxine réductase, *rubA* et *rubB*, impliquées dans la dégradation de l'alcane. Il faut néanmoins remarquer que, dans un certain nombre de cas, ces estérases sont associées à des oxygénases. C'est également le cas de EstF1 chez *P. fluorescens* dont le gène *estF1* est voisin d'un ORF codant pour une cyclohexanone mono-oxygénase (Khalameyzer et al., 1999) et qui présente une forte activité envers les lactones.

Certaines estérases sont impliquées dans les voies de dégradation qui permettent l'assimilation de certains substrats carbonés, comme les acétyl- et cinnamoyl-estérases impliquées dans la dégradation des hémicelluloses par *Butyvirbio fibrisolvens* E14 ou *Pseudomonas fluorescens* (Ferreira et al., 1993 ; Dalrymple et al., 1996). Chez les Eucaryotes, ces enzymes joueraient aussi un rôle important de détoxification des biocides et la résistance aux insecticides se traduit souvent par une amplification des gènes codant pour des estérases capables d'hydrolyser ces composés (Blackman et al., 1995).

VI.3. Les décarboxylases.

VI.3.A. Généralités

Les décarboxylases font partie du groupe des lyases (carbone-carbone lyases, carboxy-lyases E.C. 4.1.1.) et catalysent l'élimination d'un groupement carboxylique. Certaines décarboxylases sont des carboxyltransférases et catalysent le transfert du groupement d'un composé à un autre.

De plus, certaines décarboxylases ont des activités particulières ; ainsi, la méthylmalonyl-CoA décarboxylase, l'oxaloacétate décarboxylase et la glutaconyl-CoA décarboxylase constituent une famille unique puisque l'énergie libérée par la décarboxylation de leur substrat respectif permet le transport actif d'ions Na^+ à travers la membrane (Dimroth, 1987).

74 décarboxylases sont actuellement répertoriées (www.expasy.ch). La majorité correspond à des enzymes intervenant dans le métabolisme central (pyruvate décarboxylase, oxalate décarboxylase, phosphoénolpyruvate carboxylase,...) ou le métabolisme des acides aminés (aspartate 1-décarboxylase, valine décarboxylase, méthionine décarboxylase,...). Hormis ce rôle dans le métabolisme central, les décarboxylases sont étudiées pour leur intérêt dans la synthèse de composés aromatiques pour l'industrie alimentaire. Ainsi, de nombreuses études traitent des pyruvate et α -acétolactate décarboxylases lors de la synthèse de deux arômes importants : le diacétyl et l'acétoïne.

Certaines décarboxylases, comme la gallate décarboxylase, sont très instables en présence d'oxygène et, de ce fait, sont difficiles à purifier. En 1998, Zeida et al. ont montré qu'après stabilisation par des agents réducteurs ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ et dithiothreitol) de telles enzymes pouvaient être purifiées.

VI.3.B. Dégradation de xénobiotiques.

Les études sur la biodégradation de composés aromatiques en conditions anaérobies a conduit à la mise en évidence de décarboxylases. Contrairement à la biodégradation aérobie des noyaux aromatiques qui fait intervenir des oxygénases pour l'ouverture du cycle, il semblerait que des décarboxylases ou des carboxylases soient nécessaires pour faciliter l'attaque initiale de ces noyaux en anaérobiose. Ceci a été notamment montré pour les hydroxybenzoates et les phénols. Cependant, seules deux décarboxylases dont l'activité est dirigée contre des xénobiotiques ont été purifiées et/ou caractérisées : la 4,5-dihydroxyphthalate décarboxylase (Nakazawa et Hayashi, 1978) et la 4-hydroxybenzoate

décarboxylase (He et Wiegel, 1995 ; Huang et al., 1999). Ce type d'activité est également suspecté lors de la dégradation de l'alcool 3,5-dichloro *p*-anisyle, un composé organohalogéné polluant. Une activité décarboxylase est supposée intervenir dans la dégradation du 3,5-dichloro-4-hydroxybenzoate (DHBA) en 2,5-dichlorophénol (Verhagen et al., 1998).

Récemment, Wilkes et al. (2002) ont proposé une voie de dégradation anaérobie du *n*-hexane par une souche dénitrifiante (HxN1) qui fait intervenir une décarboxylase qui aurait une activité transcarboxylase (Figure 12). A ce jour, les enzymes responsables de ces activités n'ont pas été caractérisées.

Depuis peu, l'implication de décarboxylases dans la dégradation de composés alkylés est envisagée. Steffan et al. ont proposé en 1997, une voie de dégradation aérobie du MTBE dans laquelle l'acide 2-hydroxyisobutyrique (HIBA), métabolite intermédiaire avéré, subirait ensuite une décarboxylation conduisant au 2-propanol (Figure 6).

VI.3.C. Importance des ions dans les activités décarboxylases.

42% des 74 décarboxylases répertoriées nécessitent la présence d'un cofacteur. Pour ces 31 enzymes, le pyridoxal phosphate (52%) et la thiamine pyrophosphate (23%) sont les plus souvent mis en évidence (Tableau 9). Cependant, certaines décarboxylases nécessitent la présence d'ions métalliques pour être actives : l'oxaloacétate décarboxylase (Na^+ ou Mn^{2+}), l'indole-pyruvate décarboxylase (Mg^{2+}) et la 5-guanidino-2-oxopentanoate décarboxylase (cations divalents).

Figure 12 : Voie de dégradation du *n*-hexane chez HxN1. D'après Wilkes et al. (2002).
D : deuterium.

Tableau 9 : Fréquence des cofacteurs identifiés des décarboxylases.

Pyridoxal phosphate	Thiamine pyrophosphate	Pyruvate	Ions métalliques	Biotine	NAD^+	ATP
52 %	23%	16%	10%	10%	3%	3%

La somme dépasse 100% car plusieurs cofacteurs peuvent être nécessaires pour une même activité. D'après les données obtenues sur www.expasy.com.

La recherche des cofacteurs nécessaires à la décarboxylation est réalisée par l'étude de l'effet de l'addition du cofacteur ou d'un inhibiteur de ce dernier. Dans le cas de la 4-hydroxybenzoate décarboxylase, le Zn^{2+} (2mM) désactive totalement l'enzyme mais aucun effet n'a été détecté avec les autres ions (He et Wiegel, 1995).

La formation du crotonyl-CoA à partir du glutaconyl-CoA par l'activité glutaconyl-CoA décarboxylase de *Fusobacterium nucleatum* (subsp. *nucleatum*) a été observée en présence de Na^+ dans le milieu (Beatrix et al., 1990).

La gallate décarboxylase de *Pantoea agglomerans* T71 (Zeida et al., 1998) est totalement inhibée par des oxydants comme K_2CrO_4 , $(NH_4)_2S_2O_8$ et H_2O_2 , par Ag_2SO_4 , par $HgCl_2$ et par $CuCl_2$. Aucun effet n'a été observé avec d'autres cations comme le Na^+ , le Co^{2+} , le Mn^{2+} , le Mg^{2+} . Cependant, cette activité enzymatique nécessite la présence d'ions Fe^{2+} .

Les acides aromatiques décarboxylases ne nécessitent généralement pas d'ions comme cofacteurs : seule la gallate décarboxylase de la souche anaérobie *Pelobacter acidigallici* était reconnue comme dépendante de l'ion Mg^{2+} (Brune et Schink, 1992).

VI.3.D. Cas particulier de l'ion cobalt.

Cet ion constitue un cas intéressant puisqu'il est souvent nécessaire sous forme de vitamine B12 pour l'activité de nombreuses enzymes. Cependant, des études récentes ont fourni des informations sur quelques protéines contenant du cobalt non pas sous la forme porphyrinique mais sous forme d'ions Co^{2+} . En 1999, Kobayashi et Shimizu ont recensé huit enzymes de ce type : une méthionine aminopeptidase, une prolidase, une nitrile hydratase, une glucose isomérase, une aldéhyde decarbonylase, une lysine-2,3-aminomutase, une bromoperoxydase et une méthylmalonyl-CoA transcarboxylase.

Cette dernière enzyme catalyse le transfert d'un groupement carboxyl du méthylmalonyl-CoA au pyruvate pour former du propionyl-CoA et de l'oxaloacétate chez

Propionibacterium shermanii (Harmon et al., 1982). Les ions cobalt interviennent à différents niveaux (Figure 13).

Figure 13 : Schéma de la méthylmalonyl-CoA transcarboxylase (TC) de *P. shermanii* et de sa dissociation en sous-unités en fonction du pH.

XS : coefficient de sédimentation des différents états.

Le complexe 26S-TC correspond à la forme active de l'enzyme en pH acide. Chaque sous-unité 5S_E contient un ion Co²⁺ nécessaire à l'activité catalytique. D'autres ions cobalt se lient à pH 8 et 9 à la transcarboxylase et ses sous-unités (12S_H et 6S_E) afin de stabiliser les structures quaternaires. D'après Harmon et al. (1982).

VI.4. Les déshydrogénases.

VI.4.A. Généralités

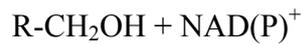
L'utilisation des alcools, des aldéhydes et des cétones sont des réactions essentielles chez les Eucaryotes aussi bien que chez les Procaryotes. Les alcool déshydrogénases (ADH) catalysant ces réactions appartiennent à la classe des oxydoréductases et utilisent différents accepteurs d'électrons dont la nature permet de les classer en quatre familles: (1) les alcools déshydrogénases NAD(P) dépendantes, (2) les ADH NAD(P) indépendantes, utilisant alors la pyrroloquinoline quinone (PQQ), un groupement hémique en association avec la PQQ ou le cofacteur F420, (3) les alcool oxydases qui catalysent une oxydation irréversible des alcools (Reid et Fewson, 1994) et (4) les alcool : NDMA oxydoréductases.

Les ADH sont impliquées dans les voies métaboliques de nombreux substrats et peuvent oxyder des alcools primaires ou secondaires, à chaîne linéaire ou branchée, aliphatiques ou aromatiques ainsi que des aldéhydes et des cétones (MacKintosh et Fewson, 1987). Les micro-organismes possèdent généralement plusieurs ADH et leurs rôles physiologiques respectifs sont alors difficiles à identifier.

Les ADH sont impliquées dans des processus aussi divers que la production d'acide acétique par *Acetobacter* sp., la croissance des bactéries méthylophiles et l'oxydation des alcools aromatiques chez les bactéries du genre *Pseudomonas* lors de la dégradation des hydrocarbures aromatiques.

VI.4.B. Les alcools déshydrogénases NAD(P)-dépendantes.

Il s'agit de la classe d'ADH la mieux caractérisée. Ces enzymes catalysent la réaction :



Les ADH NAD(P)-dépendantes constituent, en fait, une superfamille divisée en trois groupes (Jörnvall et al., 1987b) :

-ADHs zinc-dépendantes (Groupe I) :

Ce groupe correspond aux ADH zinc-dépendantes à longue chaîne. C'est le groupe le plus étudié (Brändén et al., 1975 ; Jörnvall et al., 1987a,b ; Yokoyama et al., 1990 ; Sun et Plapp, 1992). L'enzyme modèle est l'ADH de foie de cheval (HLADH). L'HLADH est un dimère de 2 sous-unités de 40 kDa comportant 374 acides aminés arrangés en un domaine catalytique contenant deux atomes de zinc et un domaine de liaison au coenzyme séparés par un sillon. Le mécanisme catalytique a été étudié par Dalziel (1975) dans le cas de l'éthanol. C'est un mécanisme ordonné : la liaison de l'enzyme avec le NAD^+ s'effectue d'abord, l'oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde est la deuxième étape, suivie par la libération du coenzyme réduit NADH à partir du complexe formé avec l'enzyme et c'est cette étape qui semble limitante (Plapp et al., 1986).

Les ADH de ce groupe appartiennent aux Eucaryotes, aux champignons, aux levures ou aux bactéries

-ADH zinc-indépendantes (Groupe II) :

Ce groupe correspond aux ADH à courte chaîne (250 acides aminés par sous unité) et n'est pas bien caractérisé. Il comprend une vingtaine d'ADH. Ces enzymes ont un large spectre d'action et ont été isolées principalement de drosophiles et de Procaryotes. Les enzymes actives sont des dimères ou des tétramères composés de sous-unités de 27 kDa. Aucun ion métallique n'est nécessaire pour la structure ou la fonction catalytique (Reid et Fewson, 1994).

-ADH à fer (Groupe III) :

Ce groupe correspond aux ADH à fer dont la taille des sous-unités est autour de 385 acides aminés. Toutes les enzymes de ce groupe ont été isolées chez des bactéries. La présence de fer a été identifiée dans la ZM ADHII de *Zymomonas mobilis*. Dans ce cas, le Fe^{2+} peut être remplacé par le Co^{2+} aboutissant à une enzyme plus stable et active (Kintoshita et al., 1985). Il semble toutefois que les besoins en ions métalliques soient variables parmi les ADH de ce groupe (Mac Kenzie et al., 1989b). Dans ces ADH, 3 résidus histidine semblent être impliqués dans la liaison avec le fer (Jörnvall et al., 1987b).

VI.4.C. Les alcool déshydrogénases NAD(P)-indépendantes.

Les alcool déshydrogénases NAD(P)-indépendantes catalysent la réaction suivante :



où $2\text{X}_{(\text{ox})}$ et $2\text{X}_{(\text{réd})}$ sont, respectivement, les formes oxydée et réduite de l'accepteur d'électrons.

-Méthanol et éthanol déshydrogénases :

Les méthanol déshydrogénases (MDH) ont un pH optimal élevé et sont majoritairement des homo-dimères ou des homo-tétramères dont les sous-unités ont des tailles d'environ 66 kDa. Ces enzymes sont capables d'oxyder de nombreux alcools primaires. L'activité MDH est nécessaire chez les bactéries méthylophiles afin d'oxyder le méthanol en formaldéhyde. La structure primaire de cette enzyme est connue seulement pour deux micro-organismes, *Paracoccus denitrificans* (Harms et al., 1987) et *Methylobacterium organophilum* (Machlin et Hanson, 1988). Le pourcentage de similarité entre les deux gènes correspondant est de 82%.

La synthèse des MDH chez les bactéries méthylophiles est un processus complexe qui nécessite l'activation de 10 ou 11 gènes chez *P. denitrificans* (Harms et al. 1987) et *M. organophilum* (Machlin et Hanson 1988), respectivement. Ces gènes sont regroupés en clusters localisés dans trois régions séparées du chromosome. Un complexe multi-enzymatique composé de trois enzymes, une MDH, une aldéhyde déshydrogénase NAD(H)-dépendante et une NADH déshydrogénase, a été mis en évidence chez une bactérie à Gram-positif par Duine et al. (1984). La MDH dans sa forme dissociée n'a aucune activité réductrice mais celle-ci est restaurée en présence de la déshydrogénase NAD(H)-dépendante.

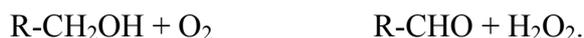
Les éthanol déshydrogénases NAD(P)-indépendante (EDH) de certaines bactéries ont un pH d'activité optimale bas et ont peu ou pas d'activité sur le méthanol (Inoue et al., 1989). Elles forment des complexes membranaires avec un cytochrome c et le PQQ afin d'être active (Tamaki et al., 1991 ; Takemura et al., 1993). L'EDH est un monomère de 63 kDa et est associée à un cytochrome de 44 kDa et à d'autres protéines dont les fonctions sont inconnues (Takemura et al., 1993). Une organisation génétique similaire dans les opérons et une forte similarité entre les séquences nucléotidiques indiquent que les MDH et les EDH ont vraisemblablement une origine commune (Reid et Fewson, 1994).

-Alcool déshydrogénases F₄₂₀ dépendantes :

Certaines bactéries méthanogènes peuvent utiliser des alcools primaires, secondaires, et des alcools cycliques comme donneurs d'hydrogène pour la réduction du CO₂. Dans certains cas, l'oxydation des alcools est catalysée par une ADH F₄₂₀ dépendante. De telles enzymes ont été purifiées chez *Methanogenium liminatans* et *Methanobacterium palustre*. Ces enzymes ont des sous-unités de 39 kDa et ne semblent pas contenir de zinc (Bleicher et Winter, 1991).

VI.4.D. Les alcool oxydases.

L'oxydation du méthanol en formaldéhyde chez les levures méthylotrophes et chez les champignons filamenteux est réalisée par des alcool oxydases. Ces enzymes diffèrent des ADH car il s'agit d'une oxydation irréversible de l'alcool en aldéhyde avec la production concomitante d'eau oxygénée (Veenhuis et al., 1983) :



La masse moléculaire d'une sous-unité d'alcool oxydase est généralement comprise entre 72 et 75 kDa. Ce sont des protéines à flavine contenant un groupement prosthétique FAD par sous-unité. Elles sont localisées dans les peroxisomes, ces organelles membranaires contenant plusieurs protéines dont des catalases (Veenhuis et al. 1992). Deux régions dans la séquence en acides aminés sont très conservées, l'une d'elle, impliquée dans la structure secondaire de la protéine, permet la liaison du FAD dans la région N-terminale (Sakai et Tani, 1992), l'autre semble impliquée dans le site actif (Frederick et al., 1990). Le formaldéhyde produit est ensuite converti en CO₂ ou métabolisé dans la voie du xylulose monophosphate. L'eau oxygénée est convertie en H₂O et O₂ par une catalase.

VI.4.E. Les alcool : NDMA oxydoréductases.

Ce type d'activité a été mis en évidence chez des bactéries à Gram positif appartenant aux genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus* et *Amycolatopsis*.

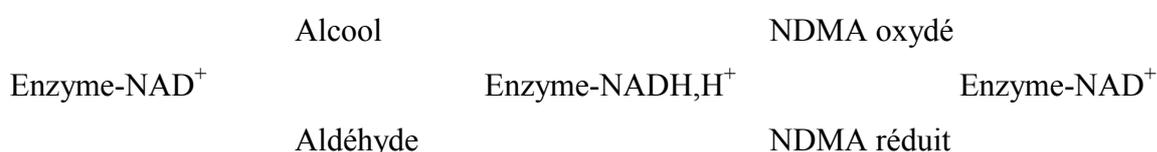
Lors d'une étude sur la HLADH, Dunn et Bernhard (1971) ont utilisé la *p*-N,N'-diméthylnitrosoaniline (NDMA) comme accepteur artificiel d'électrons permettant la régénération du coenzyme NAD⁺. La NDMA présente la particularité d'avoir un pic d'absorption à 440 nm très intense qui permet de la détecter à très faible concentration. En effet, le coefficient d'extinction molaire de ce composé est de 35 400 M⁻¹ cm⁻¹ à cette longueur d'onde. Ainsi, même une faible réduction de ce composé aura des conséquences

visibles sur le pic à 440 nm puisque le produit issu de la réduction de la NDMA, la quinone diminium, n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

Bystrykh et al. (1993a), en utilisant la NDMA comme accepteur d'électrons, ont montré la présence d'une activité méthanol : NDMA oxydoréductase (MNO) dans des cellules d'*Amycolatopsis methanolica* et de *Mycobacterium gastri* après croissance sur méthanol. Ces enzymes sont actives sur le méthanol et divers alcools primaires, aboutissant à l'aldéhyde correspondant et à la réduction du NDMA mais pas du NAD exogène. Elles sont actives aussi sur les polyols et sur le formaldéhyde. Bystrykh et al. (1993b) ont purifié les 2 enzymes, ce sont des protéines décameriques de masse moléculaire 490 kDa (sous-unités de 49 kDa) et 500 kDa (sous-unités de 50 kDa) pour *A. methanolica* et *M. gastri*, respectivement. Ces deux enzymes contiennent des ions Zn^{2+} et Mg^{2+} en quantités significatives et possèdent un cofacteur NADP lié de façon étroite mais non-covalente à l'enzyme. Par ailleurs, ces enzymes ont un fort pourcentage de similarités, 63% en ce qui concerne les 27 résidus N-terminaux. Le système accepteur d'électrons qui permet aux MNO de fonctionner *in vivo* n'a pas encore été découvert.

Plus récemment, une activité déshydrogénase a pu être mise en évidence en utilisant la NDMA comme accepteur artificiel d'électrons. Schenkels et Duine (2000) ont ainsi montré une activité NDMA-alcool déshydrogénase, np-ADH (pour nicotinoprotéine-alcool déshydrogénase) chez *Rhodococcus erythropolis* DSM 1069 après croissance sur alcool benzylique. Cette activité est indépendante de l'addition de cofacteur NAD(P). Cette protéine est un homotétramère d'un poids moléculaire de 150 kDa qui a une forte similarité avec les 2 MNO précédentes (77 % de similarité pour les 22 résidues N-terminaux). Ces auteurs pensent que la np-ADH pourrait jouer un rôle dans la conversion des alcools et des aldéhydes dans des conditions particulières (limitation en NAD(P) disponible).

La NDMA participerait à l'oxydation des alcools selon le schéma suivant :



La réduction du NAD⁺ lié à l'enzyme n'induit pas de changements structuraux majeurs de l'enzyme mais conduit à l'apparition d'un pic d'absorption à 326 nm (Piersma et al., 1998). La réaction enzymatique suit un mécanisme ping-pong (Kato et al., 1986 ; Bystrykh et al., 1993).

CHAPITRE 2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Méthodes microbiologiques

I.1. Micro-organismes et plasmides.

Deux souches, *Mycobacterium* sp. IFP 2012 (P. Piveteau, communication personnelle) et *Burkholderia cepacia* IFP 2003 (Piveteau et al, 2001), ont été isolées pour leur capacité à utiliser le TBA comme source de carbone et d'énergie. MTBE. L'utilisation de la souche *Mycobacterium* sp. IFP 2012, rebaptisée *M. austroafricanum* IFP 2012 après analyse génétique (cf. III-1 et article 2), faisant l'objet d'un brevet français (01/13299), des cultures ont été déposées à la Collection Nationale de Culture de Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur sous la référence I-2562. *M. austroafricanum* IFP 2012 est conservé à -80°C dans du glycérol à 20% (v/v).

Rhodococcus ruber IFP 2007 (ex *Gordonia terrae* IFP 2007, Hernandez-Perez et al., 2002) est un variant constitutif de *R. ruber* IFP 2001 pour la capacité de dégradation de l'ETBE et du MTBE.

Durant les expériences de biologie moléculaire quatre souches sont utilisées : *Escherichia coli* TG1, *E. coli* S17-1, *M. austroafricanum* IFP 2012 et *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. *E. coli* TG1 est utilisé comme témoin de la capacité de transformation et comme amplificateur de minipréparations plasmidiques d'ADN extraits de transformants de Mycobactéries. Les cellules compétentes d'*E. coli* S17-1 sont utilisées lors de la construction du plasmide pMS100. *M. smegmatis* mc² 155 est une Mycobactérie à croissance rapide hypercompétente pour les transformations génétiques.

Les principales caractéristiques des souches et des plasmides utilisés sont présentées dans les Tableaux 10 et 11, respectivement. En particulier, le plasmide pCL4D correspond à un dérivé hyperrépliatif, portant un gène de résistance à la kanamycine, du plasmide pUC19 dans lequel a été introduit un fragment (fragment 4D) permettant sa répliation chez les Mycobactéries (Picardeau et al., 2000). Originellement sensibles à la kanamycine, les souches *E. coli* TG1 et *E. coli* S17-1 ainsi que *M. smegmatis* mc² 155 et *M. austroafricanum* IFP 2012 sont capables de croissance en présence de cet antibiotique si elles ont préalablement intégré le plasmide pCL4D par transformation.

Tableau 10: Conditions de culture des micro-organismes utilisés.

Souche	Milieu de culture	Température de croissance	Milieu de sélection des transformants.	Référence
<i>E. coli</i> TG1	Luria-Bertani (LB)	37°C	LB + kanamycine (50 µg/mL)	Gibson, 1984.
<i>E. coli</i> S17-1	LB	37 °C	LB + kanamycine (50 µg/mL)	Simon et al., 1983
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	7H9 Middlebrook	37°C	LB + kanamycine (20 µg/mL)	Snapper et al., 1990.
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	7H9 Middlebrook	30 °C	LB + kanamycine (20 µg/mL)	Cette étude.

Tableau 11 : Principales caractéristiques des plasmides utilisés.

Plasmide	Résistance	Caractéristiques	Référence
pGT 222	kanamycine	Vecteur navette <i>R. ruber</i> IFP 2001/ <i>E. coli</i> TG1 Contient les gènes <i>eth</i> .	Chauvaux et al. (2001)
pCL4D	kanamycine	Vecteur navette Mycobactéries/ <i>E. coli</i> TG1 (dérivé Kana ^R de pUC 19) Contient le fragment 4D	Picardeau et al. (2000)

I.2. Milieux de culture.

-Milieu minéral :

Le milieu minéral (MM) est utilisé pour les précultures et les tests de dégradation (sauf indication contraire). La composition de ce milieu est la suivante :

1,5 g NaNO_3 ,
 0,5 g $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$,
 0,04 g $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$,
 1 mL d'une solution de $\text{FeCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$ à $1,2 \text{ g.L}^{-1}$
 1 mL d'une solution 1 d'oligo-éléments,
 1 mL d'une solution 2 d'oligo-éléments,
 1 mL d'une solution de vitamines,
 10 mL solution phosphate,
 H_2O qsp 1L.
 pH 7

Solution 1 d'oligo-éléments : $1 \text{ g.L}^{-1} \text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$,
 $1 \text{ g.L}^{-1} \text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$,
 $1 \text{ g.L}^{-1} \text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$,
 $0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$,
 $0,25 \text{ g.L}^{-1} \text{NiCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$,
 $0,1 \text{ g.L}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$,
 $0,1 \text{ g.L}^{-1} \text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$.

Solution 2 d'oligo-éléments : $1 \text{ g.L}^{-1} \text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$,
 $1 \text{ g.L}^{-1} \text{Na}_2\text{WO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$.

Solution de vitamines : 200 mg.L^{-1} biotine,
 100 mg.L^{-1} pyridoxine,
 50 mg.L^{-1} riboflavine,
 50 mg.L^{-1} acide nicotinique,
 50 mg.L^{-1} panthoténate de sodium,
 50 mg.L^{-1} acide *p*-aminobenzoïque,
 50 mg.L^{-1} acide lipoïque,

20 mg.L⁻¹ acide folique,
15 mg.L⁻¹ thiamine,
1,5 mg.L⁻¹ cyanocobalamine.

Solution phosphate : 1,4 g.L⁻¹ KH₂PO₄
 1,7 g.L⁻¹ K₂HPO₄

Le milieu dépourvu de FeCl₃, 6H₂O, phosphate et de vitamines est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. La solution de phosphate est autoclavée indépendamment, dans les mêmes conditions, et est ajoutée après refroidissement. La solution de chlorure de fer est préparée extemporanément, stérilisée par filtration (0,22 µm) et ajoutée au milieu refroidi. Les vitamines sont ajoutées après filtration (0,22 µm).

Après ensemencement, les cultures sont incubées à 30°C en aérobiose sous agitation (150 tr.min⁻¹).

Certaines expérimentations sont réalisées en absence d'ions cobalt ; dans ce cas, le milieu est préparé en supprimant ce composé de la solution d'oligo-éléments décrite ci-dessus.

-Source de carbone :

Quand le substrat carboné est du glucose, celui-ci est ajouté au milieu de culture avant stérilisation à raison de 1 g.L⁻¹. Les autres substrats carbonés sont filtrés à 0,22 µm avant d'être ajoutés stérilement au milieu de culture à la concentration désirée.

-Milieu complet :

M. austroafricanum IFP 2012 est, dans certains cas, cultivé sur milieu liquide complet Luria-Bertani (LB) (Ausebel et al., 1990) ou sur milieu 7H9 Middlebrook (milieu complet lyophilisé et distribué par Difco).

Dans tous les cas, le volume gazeux est suffisant pour éviter toute limitation en oxygène pendant la croissance.

-Milieu solide :

Le milieu de culture solide utilisé pour contrôler la pureté de la souche est le milieu LB contenant 20 g.L⁻¹ d'agar.

I.3. Suivi de l'activité biologique

I.3.A. Suivi de la croissance.

Sauf indication contraire, *M. austroafricanum* IFP 2012 est précultivé sur milieu MM contenant 1 g.L⁻¹ de TBA comme substrat carboné. La croissance peut être suivie de façon discontinue, soit en estimant l'augmentation de la biomasse par spectrophotométrie soit en suivant la production de CO₂. Le suivi continu se fait par respirométrie.

- *Suivi discontinu :*

Un suivi cinétique discontinu de la croissance sur substrat carboné peut être effectué par l'évolution de la concentration en biomasse ou de la production de CO₂.

La concentration cellulaire est estimée en mesurant la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}) de la culture avec un spectrophotomètre UV-1601 (Shimadzu Corporation, Japon). En général, les cultures sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer fermées de façon hermétique pour éviter les pertes en substrat volatil. Les précultures sont réalisées sur MM contenant 1 g.L⁻¹ de TBA. Les cellules sont récoltées par centrifugation et le culot cellulaire est lavé deux fois avec du milieu MM sans substrat carboné avant d'être utilisé comme inoculum. Les cultures sont incubées à 30°C sous agitation (150 tr.min⁻¹) et des prélèvements réguliers sont effectués stérilement sous hotte microbiologique.

La croissance peut également être suivie par analyse du CO₂ produit au cours du temps. Comme précédemment, une préculture est lavée et la culture ensemencée afin d'obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,1. Dans ce cas, les cultures sont réalisées dans des fioles pénicilline de 250 mL contenant 50 mL de volume utile. La quantité de substrat ajoutée est définie de façon à ce que les 200 mL de ciel contiennent une quantité suffisante d'oxygène pour permettre la dégradation totale du substrat. Après ensemencement et addition du substrat, les fioles sont fermées avec un bouchon en butyl et serties avec une capsule d'aluminium. Elles sont ensuite incubées à 30°C sous agitation (150 tr.min⁻¹). Un échantillon de ciel gazeux de 250 µL est prélevé quotidiennement avec une seringue étanche au gaz (SGE). Le CO₂ contenu dans cet échantillon est alors analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

- *Suivi continu.*

Un suivi cinétique des cultures sur substrat carboné peut être effectué par la mesure de la consommation d'oxygène réalisée grâce à un équipement respirométrique (Sapromat D12-S, Voith, Allemagne).

Le principe de fonctionnement des 12 postes du respiromètre est le suivant :

- Une fiole d'essai de 500 mL est fermée hermétiquement et reliée directement à un générateur d'oxygène lui-même connecté à un manomètre. L'ensemble, placé dans une enceinte thermostatée à 30°C sous agitation magnétique, est indépendant des variations de pression atmosphérique et de température extérieure.
- L'activité microbienne s'accompagne d'une production de CO₂. Au fur et à mesure de sa formation, le CO₂ est piégé par de la chaux sodée en excès placée dans le ciel de la fiole contenant la suspension cellulaire. Le piégeage conduit à une dépression dans l'enceinte de la fiole. Cette dépression provoque la mise en contact de deux électrodes présentes dans le manomètre qui génère l'envoi d'un signal électrique à un générateur produisant de l'oxygène par voie électrolytique. Lorsque l'équilibre de pression est rétabli, le contact manométrique ainsi que la production d'oxygène cessent.
- La mesure de la consommation d'oxygène est fournie par celle de la quantité d'électricité consommée par le générateur électrolytique. L'unité de stimulation du générateur (86 mA pendant 36 sec) correspond à une production de 0,25 mg d'oxygène. Les données sont collectées par un ordinateur sous le logiciel Sapromat.

Dans le cas des cultures en respiromètre, celles-ci sont préparées de la façon suivante. Après préculture sur milieu MM supplémenté en TBA, les cellules sont centrifugées à 23 000 g pendant 15 minutes puis les culots cellulaires lavés deux fois avec du MM sans substrat carboné. Les conditions de centrifugation sont les mêmes après chaque lavage. Le culot cellulaire est finalement remis en suspension dans 250 mL de milieu de culture préparé dans des fioles Sapromat de 500 mL. Les substrats carbonés sont apportés à la concentration désirée et l'ensemencement est réalisé de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale proche de 0,1. Les fioles sont alors introduites dans le bain thermostaté à 30°C, connectées au générateur d'oxygène et les cultures sont aérées par agitation magnétique. L'acquisition est automatique. A l'issue de la croissance, les valeurs peuvent être exportées vers un tableur de type Excel afin d'être traitées. Afin de défalquer la respiration endogène des cellules, des essais sont également réalisés avec des cellules auxquelles aucun substrat n'est ajouté.

I.3.B. Détermination des taux de minéralisation et de recouvrement en carbone.

Les expériences permettant de calculer les taux de minéralisation et de recouvrement sont réalisées avec *M. austroafricanum* IFP 2012 précultivé sur milieu MM contenant 1 g.L⁻¹ TBA. A l'issue de la préculture, les cellules sont récoltées par centrifugation, lavées deux fois avec du milieu MM, et remises en suspension dans 80 mL de MM dans des fioles à tubulure de 670 mL. La source de carbone est ajoutée à la concentration désirée.

Pour chaque expérience, quatre essais sont réalisés. Dans l'un d'entre eux, la croissance est suivie en mesurant soit la production de CO₂ (taux de minéralisation) soit la DO₆₀₀ et la concentration résiduelle en substrat (taux de recouvrement en carbone). Quand le facteur suivi se stabilise, 2,4 mL de HNO₃ (68% vol/vol) sont ajoutés par la tubulure dans les trois fioles non exploitées et la concentration finale en CO₂ est dosée dans la phase gazeuse. Un témoin contenant des cellules tuées par autoclavage (120°C, 20 min) est réalisé.

La production de biomasse basée sur la variation de DO₆₀₀ entre le début et la fin de l'expérience est calculée grâce à la relation DO₆₀₀/masse sèche déterminée (cf. I.4.C., Mesure de la biomasse). La proportion de carbone contenue dans la biomasse est estimée en considérant que la composition de la biomasse répond à la formule C₄H₈NO₂ (Van Dijken et Harder, 1975).

$$= \left(\frac{(S)_{T_0} - [r \times (S)_{T_f}]}{(S)_{T_0}} \right) \times 100$$

$$r = \frac{(S_{(abiotique)})_{T_0} - (S_{(abiotique)})_{T_f}}{(S_{(abiotique)})_{T_0}}$$

(S) = concentration en substrat dans les fioles contenant les cellules vivantes

(S_(abiotiques)) = concentration en substrat dans les fioles contenant nonensemencées

T₀ = temps initial

T_f = temps final (en fin de production de CO₂)

$$= \frac{n(C \text{ du } CO_2)_{(cell.vivantes)}}{n(C \text{ du } S_{(cell.vivantes)})_{T_0}} \times 100$$

n(C du CO₂)_(cell.vivantes) = nombre de moles de carbone du CO₂ produit dans les fioles contenant les cellules vivantes

$n(C \text{ du } S_{(cell. \text{ vivantes})})$ = nombre de moles de carbone du substrat dans les fioles contenant les cellules vivantes
 T_0 = temps initial
 T_f = temps final (en fin de production de CO₂)

I.3.C. Activités des cellules non proliférantes.

Après culture en MM avec du MTBE ou du TBA comme source de carbone, ou en milieu LB, les cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012 sont récoltées en phase exponentielle de croissance par centrifugation à 23 000 x g pendant 15 minutes et lavées deux fois par du tampon phosphate (20 mM, pH7). Les cellules sont remises en suspension dans des fioles pénicilline de 250 mL fermées hermétiquement à une DO₆₀₀ de 0,4 dans 40 mL de tampon phosphate (20 mM, pH7) contenant le substrat à la concentration désirée. Les fioles sont alors incubées à 30°C sous agitation orbitale. Un échantillon de 2 mL est prélevé et filtré (0,22 µm) avant analyse chromatographique. La dégradation des substrats est suivie sur une période de 24h.

Pour les essais en conditions anaérobies, les cellules obtenues à partir d'une culture aérobie sont transférées dans une chambre anaérobie sous des conditions d'anaérobiose stricte. Avant utilisation, le tampon phosphate est désaéré par bullage sous un flux de N₂ pendant une heure avant d'être introduit dans la chambre anaérobie. Le substrat est ajouté dans la chambre.

Afin de ne prendre en compte que la dégradation biotique des substrats, des témoins abiotiques sont réalisés.

Lors de ces essais chaque expérience est répétée trois fois afin de déterminer des moyennes et des écart-types.

II. Méthodes analytiques

II.1. Chromatographies.

II.1.A. Chromatographie en Phase Gazeuse (CPG).

Cette méthode est utilisée afin de détecter et de quantifier les substrats et les produits de la dégradation des éthers-carburants et de leurs alcools associés.

- *Dosage des produits solubles :*

L'analyse des métabolites solubles en CPG est réalisée sur un chromatographe Varian 3300 (Varian, France) équipé d'un passeur automatique Varian 8200 Cx. La séparation s'effectue sur une colonne capillaire CP Porabond Q 0,32 mm x 25 m dont l'épaisseur de

phase est 5 μm (Varian, France). Le gaz vecteur est l'hélium à 1,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La température initiale de la colonne est de 105°C et, à une vitesse de 10°C $\cdot\text{min}^{-1}$, atteint 200°C. L'injecteur, dont la température initiale est de 110°C, atteint 250°C à une vitesse de 100°C $\cdot\text{min}^{-1}$. Le détecteur à ionisation de flamme (FID) a une température constante de 280°C. Les échantillons, préalablement filtrés (0,22 μm), sont introduits dans un flacon passeur. Les flacons sont ensuite disposés dans le passeur automatique et 1 μL d'échantillon est injecté. Par cette technique, le MTBE, l'ETBE, le TAME, le TBA, le TAA, le méthanol, l'éthanol, le TBF, le TAF, le 2-propanol, l'acétone et l'oxyde de propylène sont détectés. La zone de linéarité entre la réponse CPG et la concentration en substrat est déterminé par l'établissement d'une gamme étalon à partir de solutions standard réalisées avec les produits commerciaux. Ensuite, un calibrage est réalisé lors de chaque série de dosages par l'emploi d'étalons externes.

- Dosage du CO₂ :

Le dosage du CO₂ est effectué sur un chromatographe VARIAN 3800 équipé d'un détecteur à conductivité thermique des gaz (catharomètre) et d'une colonne capillaire Porapak Q (1,83 m x 2 mm). Le gaz vecteur est de l'hélium à un débit de 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La température du four et du détecteur sont respectivement de 100 et 130°C. Les valeurs de concentration sont évaluées par rapport à un mélange étalon contenant du CO₂. L'échantillon à doser (250 μL) est prélevé dans le ciel de la fiole de culture avec une seringue étanche au gaz et injecté directement dans la colonne.

Dans les deux cas, l'analyse des chromatogrammes se fait par le logiciel Borwin (JMBS Développements, France) et la quantification de chaque produit est effectuée par rapport à des standards préparés par pesée pour les substrats solubles ou par rapport à un standard commercial dans le cas du CO₂.

II.1.B. Chromatographie en Phase Liquide (HPLC).

Les acides formés lors de la dégradation des substrats carbonés sont dosés par chromatographie liquide à haute performance (Metrohm, Suisse) sur une colonne Dual 2 (Polyméthacrylate avec groupe d'ammonium quaternaires, 75 x 4,6 mm). L'éluant est du tampon bicarbonate (1,3 mM Na₂CO₃, 2 mM NaHCO₃). Le débit est de 0,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ et la colonne est à température ambiante. Le chromatographe est équipé en sortie d'un suppresseur

chimique Metrohm 753. Les acides sont détectés par un conductimètre Metrohm 732 IC. L'injection de 20 μL d'échantillon est effectuée grâce à un passeur automatique d'échantillons SP 8880 (Spectra Physics, USA).

II.2. Analyse de la biomasse et de son contenu.

II.2.A. Dosage de la biomasse.

La détermination de la biomasse peut-être effectuée par une mesure de la densité optique à 600 nm (DO_{600}) par un spectrophotomètre Shimadzu UV-1601.

Une correspondance entre la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ et la masse sèche cellulaire a pu être établie. En fin de culture, la quantité de biomasse a été estimée après filtration sous vide d'un volume défini du milieu de culture sur un filtre (0,22 μm ; Whatman) préalablement séché et pesé sur une balance à dessiccation infrarouge Mettler P100. Le filtre est ensuite lavé avec un demi-volume d'eau, puis séché sur la balance Mettler P100 pendant 20 minutes. La quantité de biomasse sèche correspond alors à la différence entre les deux pesées. Ainsi, avec 28 mesures différentes, nous avons pu déterminer qu'une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 1 correspond à $0,43 \pm 0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de biomasse pour *M. austroafricanum* IFP 2012 après croissance sur milieu MM supplémenté en TBA.

II.2.B. Extraits cellulaires.

Après croissance sur le substrat désiré, les cellules sont récoltées à une DO_{600} environ égale à 1 par centrifugation à 23 000 g pendant 15 minutes. Après deux lavages par du tampon phosphate (20 mM, pH 7), elles sont remises en suspension dans 5 mL du même tampon. Les cellules sont ensuite cassées à 4°C par trois passages dans une presse de French ($13,8 \cdot 10^9 \text{ Pa}$ ou 1 200 bar). Les débris cellulaires sont éliminés par deux centrifugations successives à 1 000 g pendant 2 minutes. Le surnageant est utilisé comme extrait brut pour les essais enzymatiques et la réalisation de gels d'électrophorèse de protéines.

II.2.C. Fraction protéique soluble.

Les protéines sont concentrées par précipitation à l'acétone. Pour cela, un volume d'extrait cellulaire est repris par deux volumes d'acétone ; puis centrifugé 10 minutes à 21 000 g à 4°C, l'acétone est prélevé et le culot asséché. Une fois sec, ce dernier est repris par

15 μL d'eau +15 μL « tampon d'échantillon » 2X (5 mL de Tris 0,25M, pH 6,8, 2 mL de Sodium Dodécyle Sulfate 20%, 1 mL de β -mercaptoéthanol, 2 mL de glycérol et quelques grains de bleu de bromophénol).

II.2.D. Fraction protéique membranaire.

Comme pour la fraction soluble, une précipitation des protéines à l'acétone est réalisée. Afin de solubiliser les protéines membranaires, le culot est repris par 150 μL de « tampon d'échantillon » et bouilli pendant 5 minutes. Les protéines membranaires sont recueillies dans le surnageant après centrifugation (Mikroliter) pendant 10 minutes. Comme il n'est pas possible de réaliser un dosage des protéines une fois qu'elles ont été traitées au SDS, différents volumes (de 10 à 30 μL) de cette suspension sont déposés sur gel afin d'obtenir une migration avec une résolution suffisante.

II.2.E. Dosage des protéines.

A l'issue de la préparation, un dosage des protéines totales contenues dans l'extrait est réalisé avec le réactif de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Allemagne). L'extrait brut est dilué 200 fois avec de l'eau déminéralisée. 800 μL de cette solution sont ajoutés à 200 μL de Dye Reagent BioRad. Après homogénéisation, cette solution est laissée à température ambiante pendant 7 minutes. Parallèlement, une gamme étalon est réalisée avec des concentrations de Sérum Albumine Bovine (SAB) allant de 0 à 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

La DO à 595 nm (DO_{595}) est mesurée à l'issue des 7 minutes de réaction, la cuve de référence contenant 200 μL de Dye Reagent additionné de 800 μL d'eau. La concentration protéique de l'échantillon est déterminée d'après la courbe étalon de SAB sans oublier le facteur de dilution de l'échantillon.

II.3. Électrophorèses

Des gels d'électrophorèse (Laemmli, 1970) en conditions dénaturantes sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE ; Sodium Dodécyle Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) sont réalisés à partir des extraits cellulaires précédemment préparés. Selon la taille des protéines et la résolution recherchée, les gels seront réalisés soit à 7,5% (séparation des poids moléculaires supérieurs à 43 kDa) soit à 15% (bonne résolution des protéines de masse moléculaire inférieure à 43 kDa) de polyacrylamide.

Deux types de gels, mini ou grand, peuvent être effectués. Pour les premiers, 20 µg de protéines sont déposés dans chaque puits, 50 µg pour les seconds contenus dans 30 µL de tampon d'échantillon. 10 ou 20µL, respectivement, d'une solution de marqueurs de poids moléculaire (7702S) sont également déposés sur chaque type de gel.

La séparation des différentes protéines est effectuée par migration à 100 V pour le gel de concentration puis à 200 V pour le gel de séparation dans le cas d'un minigel et, respectivement, à 150 V et 200 V dans le cas d'un grand gel. Les migrations réalisées en tampon de migration (3,03 g de TrisHCl, 14,4 g de glycine, 0,1% SDS, H₂O qsp 1L) sont arrêtées quand le marqueur de poids moléculaire (7702S Kbladder, BioLabs) a totalement migré. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie pendant 30 minutes pour révéler les bandes protéiques puis décoloré par une solution d'acide acétique 10% et d'éthanol 10%.

Certaines électrophorèses ont été réalisées afin de récupérer les protéines potentiellement intéressantes. Dans ce cas, il faut réaliser un grand gel SDS-PAGE et déposer une masse plus importante de protéines dans chaque puits (75 µg). De plus, il est préférable de déposer le même échantillon dans trois puits consécutifs afin de faciliter le découpage ultérieur des bandes d'intérêt. Enfin, à l'issue de la migration, les bandes sont colorées en deux étapes. Il faut fixer les protéines en baignant, deux fois trente minutes, le gel dans une solution composée de 50% de méthanol, 10% d'acide acétique et 40% d'eau. Ensuite la coloration est réalisée jusqu'à bonne visualisation des bandes protéiques par une solution composée de 45% de méthanol, 10% d'acide acétique, 45% d'eau et 0,003% AmidoBlack.

Les bandes d'intérêt sont découpées directement sur le gel et les protéines correspondantes sont séquencées au Laboratoire de Microséquençage des Protéines de l'Institut Pasteur.

Quand cela est nécessaire (recherche de cytochromes P450, cf. II.3.A), des gels en conditions non dénaturantes sont réalisés. Dans ce cas, le SDS et le β-mercaptoéthanol sont

retirés de toutes les solutions. De plus, les protéines ne sont ni précipitées à l'acétone ni bouillies avant le dépôt sur gel.

II.4. Mise en évidence d'activité monooxygénase.

Deux types d'activité ont été recherchées. La première correspond à une monooxygénase hémique (cytochrome P450) alors que la seconde est associée à une monooxygénase non hémique. Aucune activité n'étant mesurée dans les extraits bruts, ces activités ont été mises en évidence de façon indirecte.

Afin d'étudier l'inhibition de la croissance cellulaire par l'acétylène (pour mettre en évidence l'activité monooxygénase), des cellules cultivées sur 1 g.L^{-1} de TBA sont récoltées, lavées et remises en suspension ($\text{DO}_{600} = 0,2$) dans 40 mL de MM dans des fioles fermées hermétiquement de 250mL. Le substrat carboné approprié est ajouté. L'acétylène (0,4%, vol/vol) est ajouté immédiatement après ensemencement. La croissance est suivie par la DO_{600} .

II.4.A. Mono-oxygénase hémique.

- *Détermination par absorption spectrophotométrique :*

Le protocole de Schoene et al. (1972) est suivi pour rechercher la présence d'un cytochrome P450 dans les extraits cellulaires préparés extemporanément. La suspension est répartie dans deux cuves pour spectrophotomètre en quartz. Quelques granules de dithionite de sodium, composé réducteur, sont ajoutés dans la cuve d'essai. Les contenus des deux cuves sont mis sous un courant de monoxyde de carbone pendant une minute. A l'issue de ce contact, un spectre entre 400 et 500 nm est réalisé par différence d'absorption entre la cuve de référence (extrait brut non réduit et bullé) et la cuve d'essai (extrait brut réduit et bullé). L'obtention d'un pic d'absorption à 450 nm est alors caractéristique de la présence d'un cytochrome P450 dans l'extrait.

- *Coloration spécifique sur gel d'acrylamide :*

La présence d'un cytochrome P450 peut également être mise en évidence par une coloration spécifique au TMBZ (3,3',5,5' tétraméthyl benzidine) sur gel d'électrophorèse. Dans ces conditions, il faut procéder à une électrophorèse en conditions non dénaturantes.

Après dépôt et migration des protéines natives à l'abri de la lumière, le gel est immergé pendant une heure, avec agitation, dans une solution de TMBZ (45 mg TMBZ dans 30 mL méthanol + 70 mL solution d'acétate de sodium pH 5). Enfin, 340 μ L d' H_2O_2 sont ajoutés et l'agitation est maintenue pendant 15 minutes. En cas de présence de cytochromes, ces derniers apparaissent colorés en bleu.

II.4.B. Mono-oxygénase non hémique.

- *Epoxydation du propylène* :

Ce test de mise en évidence de l'activité d'époxydation du propylène dans des cellules quiescentes a été mis au point par F. Fayolle (communication personnelle). *M. austroafricanum* IFP 2012 est cultivé sur MM supplémenté en MTBE ou TBA. A DO_{600} égale à 0,5, les cellules sont récoltées, lavées deux fois et remises en suspension dans 15 mL de tampon phosphate (20 mM, pH 7) afin d'obtenir une DO_{600} égale à 1. Les suspensions cellulaires sont disposées dans des fioles pénicilline fermées hermétiquement. L'expérience démarre par l'injection de propylène (40% [vol/vol] dans la phase gazeuse). Les fioles sont incubées à 40°C sous agitation magnétique. Des échantillons de la culture filtrés à 0,22 μ m sont analysés par CPG et la cinétique de production d'époxyde de propylène est suivie pendant 2 h.

Pour étudier l'effet de l'acétylène sur l'époxydation du propylène, les cellules en suspension en tampon phosphate 20 mM, pH 7 sont mises en présence d'acétylène (40% [vol/vol] de la phase gazeuse) pendant 10 minutes sous agitation à 30°C. L'acétylène est éliminé en ventilant les échantillons à l'air pendant 15 minutes. Le propylène est alors ajouté et la cinétique de production de l'époxyde est suivie comme indiqué précédemment.

II.5. Activité alcool : NDMA oxydoréductase :

Cette activité est mesurée sur des extraits bruts (Schenkels et Duine, 2000). Le volume réactionnel correspond à 20 μ L de *p*-N,Ndiméthylnitrosoaniline (NDMA, 1mM), l'alcool étudié à la concentration souhaitée, 200 μ g de protéines totales et le volume est complété à 2 mL par du tampon phosphate 0,1 M, pH 6,9.

La réaction est démarrée par l'ajout de l'extrait brut contenant 200 µg de protéines totales et est suivie par l'absorption à 440 nm par un spectrophotomètre Shimadzu UV-1601.

Lorsque la NDMA est réduite, la coloration jaune dans la cuve diminue et l'absorbance également. Des témoins sans alcool sont également réalisés. Le coefficient d'absorption molaire de la NDMA est de 35 400 M⁻¹.cm⁻¹.

III. Biologie moléculaire

III.1. Identification génétique de *M. austroafricanum* IFP 2012.

L'identification de la souche de Mycobactérie isolée pour sa capacité à dégrader le MTBE a été réalisée par des analyses de l'ADN 16S et du gène *hsp65*. Ce travail a été effectué par le Laboratoire de Référence des Mycobactéries de l'Institut Pasteur (75-Paris).

L'amplification de l'ADN 16S est réalisée avec l'amorce reverse 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTAG-3' (amorce Bott 2) et l'amorce 5'-TGCACACAGGCCACAACCCA-3' (amorce Bott 1). Les produits d'amplification ont été purifiés avec le kit Qiagen et la séquence est déterminée en utilisant l'amorce 244 (5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAG-3').

L'amplification du gène *hsp65* est réalisée en utilisant l'amorce Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') et l'amorce reverse Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') comme décrit par Telenti et al. (1993). Les produits d'amplification sont purifiés par le kit Quiagen, et la séquence est déterminée en utilisant Tb11. Dans tous les cas, les similarités sont déterminées en utilisant la banque de données EMBL/GenBank avec le logiciel d'alignement Blast.

Les séquences de l'ADN 16S et du gène *hsp65* de la nouvelle bactérie *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 ont été déposées dans la banque de données de séquences GenBank avec les numéros AF487529 et AF487530, respectivement.

III.2. Préparation de cellules compétentes et transformation bactérienne.

Compte tenu du fait que les protocoles standards de préparation des cellules compétentes étaient inefficaces avec les cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012, un nouveau protocole a été défini par S. Chauvaux (communication personnelle). Ce protocole décrit ci-

dessous permet de produire aussi bien des cellules compétentes de *M. austroafricanum* IFP 2012 que de *M. smegmatis* mc² 155.

M. austroafricanum IFP 2012 ou *M. smegmatis* mc² 155 sont cultivées dans 500 mL de 7H9 Middlebrook (7H9 ; Difco) jusqu'à une DO₆₀₀ de 0,4-0,6. Les cellules sont lavées deux fois dans l'eau à 4°C et une fois dans une solution de glycérol 10% (vol/vol), Tween 80 0,1% (vol/vol) à 4°C. Ces cellules, électrocompétentes, sont remises en suspension dans 500 µL d'une solution de glycérol 10%, Tween 80 0,1% à 4°C et conservées à -80°C sous forme d'aliqots de 100 µL. La transformation est réalisée en mélangeant sur glace 1 µg d'ADN et 100 µL de cellules électrocompétentes. Le mélange est disposé dans une cellule d'électroporation Equibio de 0,1 cm de trajet puis soumis à une électroporation de 2,5 kV sous 25 µF et 200 Ω. Afin de permettre la répllication des plasmides (phase d'expression), les cellules électroporées sont mises en suspension dans 1 mL de 7H9 et incubées sous agitation pendant la nuit à 30°C pour *M. austroafricanum* IFP 2012 et pendant 2 h à 37°C pour *M. smegmatis* mc² 155.

Les cellules compétentes d'*E. coli* TG1 sont préparées et transformées par électroporation (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω, cuve de 0,2 cm) selon Sambrook et al. (1989). Les cellules compétentes d'*E. coli* S17-1 sont préparées en chlorure de calcium et transformées par choc thermique (30 min à 4°C, 5 min à 45°C puis 5 min dans la glace) selon Sambrook et al. (1989). Les cellules transformées sont mises en suspension dans 1 mL de LB et incubées à 37°C pendant 1 h afin de permettre l'expression des plasmides.

Afin de sélectionner les transformants à l'issue de la phase d'expression, les suspensions bactériennes sont étalées sur milieu sélectif (LB gélosé contenant de la kanamycine en quantité appropriée) et incubées à 30°C ou 37°C selon les bactéries considérées jusqu'à obtention de colonies. Afin d'estimer la proportion de faux positifs, des cellules sont électroporées sans ADN puis traitées dans les mêmes conditions que les autres échantillons.

III.3. Extraction plasmidique.

Une colonie de cellules d'*E. coli* TG1 ou de *M. smegmatis* mc² 155 ayant poussé sur LB supplémenté en kanamycine est prélevée et mise en culture à 37°C sous agitation dans 5 mL de LB contenant de la kanamycine. Cette culture est réalisée à 30°C dans le cas de

M. austroafricanum IFP 2012. Après obtention d'une culture cellulaire dense, les cellules sont récoltées par centrifugation et les plasmides sont extraits à l'aide du kit Nucleobond AX (Macherey-Nagel). Pour l'extraction des plasmides portés par les Mycobactéries, 30 μL d'une solution de lysozyme (50 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sont ajoutés à la solution S1 (TrisHCl, EDTA, RNase A, pH 8) et ce mélange est incubé une nuit à 37°C.

III.4. Construction du vecteur pMS100.

Un insert de pGT222, portant les gènes *ethRABCD* (codant respectivement pour un activateur de transcription, une ferrédoxine réductase, un cytochrome P450, une ferrédoxine et une protéine inconnue) est cloné dans le vecteur pCL4D pour obtenir le plasmide pMS100 (Figure 14). Pour cela, les plasmides pCL4D et pGT222 sont digérés pendant 1 h à 37°C selon le protocole suivant :

Quantité de plasmide	: 3 μg d'ADN
Tampon TU 10X	: 2 μL
Enzyme Sac I (GibcoBRL)	: 10 unités
Enzyme EcoRI (Gibco BRL)	: 10 unités
H ₂ O pyrolysée	: qsp 20 μL

Le tampon de digestion universel concentré 10 fois (noté TU 10X) filtré (0,22 μm) et conservé à -20°C a la composition suivante (I. Miras, communication personnelle) :

100 mM Tris-HCl pH 7,5
500 mM NaCl
100 mM MgCl₂, 6H₂O
10 mM dithiothréitol.

Afin de vérifier l'efficacité de la digestion, 1 μL de la suspension est prélevé et mélangé à 18 μL d'eau pyrolysée et à 1 μL de bleu de migration. L'échantillon est ensuite déposé sur un gel d'agarose 0,7% contenant 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromure d'éthidium (BET, Eurobio). Le marqueur de poids moléculaire est le 1 kb Ladder (Gibco BRL). La migration de l'ADN est effectuée à 90 V en tampon TBE 0,5 X (45 mM Tris-HCl pH 8, Borate, 1 mM EDTA)

Figure 14 : Construction du plasmide pMS100.

Les gènes *ethRABCD* (codant respectivement pour un activateur de transcription, une ferrédoxine réductase, un cytochrome P450, une ferrédoxine et une protéine inconnue) constituent un cluster requis pour la dégradation du MTBE et de l'ETBE chez *Rhodococcus ruber* IFP 2001.

III.4.A. Préparation du vecteur.

La totalité de la digestion (volume) de pCL4D par *EcoRI* et *SacI* est précipitée par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M pH 5 et 3 volumes d'éthanol 100% froid (-20°C). Après centrifugation pendant 30 minutes à 21 000 g à 4°C, le culot est rincé avec un volume d'éthanol 70% froid (-20°C) et centrifugé 10 min à 21 000 g à 4°C. Le culot est repris dans 10 µL d'eau pyrolysée et cette solution est conservée à -20°C.

III.4.B. Éluion de l'insert de 4,9 kb de pGT222.

La totalité de la solution plasmidique de pGT222 digérée par *EcoRI* et *SacI* est déposée sur gel d'agarose 0,7%. A l'issue de la migration, la bande de 4,9 kb est découpée sous UV et l'ADN est élué à l'aide du kit QIAexpress (Qiagen).

III.4.C. Ligature du vecteur et de l'insert.

La ligature est réalisée à 16°C pendant 30 min en mélangeant :

- 10 µL de Ligase TaKaRa mix du DNA Ligation Kit (TaKaRa Biomedicals)
- 2 µL de la solution contenant l'insert,
- 1 µL de la solution contenant le vecteur,
- 7 µL eau pyrolysée.

Des cellules compétentes de *E. coli* S17-1 sont transformées avec 8 µL du mélange de ligature. A l'issue des transformations et des expressions, tout le volume de transformation est étalé sur LB + kanamycine par aliquot de 100 µL par boîte de Petri.

La construction du plasmide pMS100 est vérifiée par extraction de l'ADN plasmidique de colonies poussant sur milieu sélectif et par digestion enzymatique de l'ADN par *EcoRI* et *SacI* suivie d'une migration sur gel d'agarose.

III.5. Hybridation sur colonies de Mycobactéries.

Compte tenu des faibles rendements des minipréparations standards d'ADN plasmidique avec *M. austroafricanum* IFP 2012, des essais d'hybridation sur colonies sont réalisés. Des transformants *M. smegmatis* mc² 155 (pMS100) sont utilisés comme témoins positifs des expériences.

III.5.A. Préparation de la sonde radioactive des gènes *eth*.

Un fragment de 3,5 kb, correspondant aux gènes *ethRAB*, généré par digestion de pGT222 est purifié à partir d'un gel d'agarose préparatif. L'ADN est élué par centrifugation dans des nacelles Spin-X (Costar). 35 µL d'éluat sont repris avec de l'eau pyrolysée (qsp 45 µL). Le marquage au ³²P est réalisé par un marquage de type Random Prime en suivant le protocole Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech).

Afin de doser l'activité de la sonde radioactive, 5 µL de la sonde d'ADN dénaturée (5 min dans de l'eau bouillante) sont ajoutés à 3 mL de liquide à scintillation et le dosage est réalisé par un compteur à scintillations.

III.5.B. Fixation de l'ADN des Mycobactéries sur filtres.

Après transformation, les colonies sont patchées sur filtre Hybond déposé sur boîte LB supplémenté en kanamycine. Ces boîtes sont incubées à 30°C.

A la fin de la croissance bactérienne, pour lyser les cellules, chaque filtre est incubé à 43°C pendant 4 h dans 10 mL de tampon de lyse (100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA, Triton X100) supplémenté avec 65 mg de lysozyme. Puis le tampon de lyse est prélevé et le filtre est baigné dans une solution de dénaturation (1,5 M NaCl, 2% NaOH, 0,1% SDS) pendant 15 min à 60°C. Ensuite, deux bains de 5 min sont réalisés dans une solution de neutralisation (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,5). Le filtre est ensuite rincé avec 20 mL d'une solution de 2X SSC (300 mM NaCl, 30 mM citrate de sodium).

Enfin, après séchage sur papier Whatman 3MM, le filtre est exposé aux UV pendant 5 min afin d'y fixer l'ADN.

Durant toutes ces étapes, il est nécessaire d'éviter de trop déplacer le filtre afin de limiter les déplacements des ADN.

III.5.C. Hybridation avec les gènes *eth*.

Les filtres sont préhybridés dans des tubes à hybrider avec 10 mL de solution RapidHyb Buffer (Amersham Pharmacia Biotech) pendant 30 min à 65°C dans un four à hybridation. La sonde est dénaturée pendant 5 min à 100°C. 30 μL de sonde à 83 000 cps. μL^{-1} de ^{32}P sont ajoutés dans les tubes et l'hybridation est réalisée pendant la nuit à 65°C dans du tampon RapidHybond Buffer.

A l'issue de l'hybridation, le marquage non spécifique est lavé par une solution SSC 1X-0,1% SDS puis 2 bains de 30 min à 65°C, dans le four à hybrider, avec cette même solution.

Après séchage, les colonies marquées sont révélées par autoradiographie.

CHAPITRE 3 - RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Lorsque ce travail de thèse a été engagé, il n'existait pas de souches pures capables de pousser sur MTBE comme source de carbone. Par contre, la dégradation du MTBE avait été étudiée en utilisant différentes souches capables de le dégrader par cométabolisme (voir bibliographie).

Fayolle et al. (1998) avaient isolé une souche capable de pousser sur ETBE, *Gordonia terrae* IFP 2001, ensuite identifiée comme *Rhodococcus ruber*, qui était capable de dégrader efficacement l'ETBE ($59 \pm 4 \mu\text{mol d'ETBE.g}^{-1} \text{ protéines.min}^{-1}$) et de pousser sur le composé en C2 produit lors de la coupure de la liaison éther. Cette capacité était inductible. Cette souche pouvait également dégrader le MTBE (Hernandez-Perez et al., 2001) par coupure de la liaison éther (activité spécifique : $14 \pm 0,5 \mu\text{mol de MTBE.g}^{-1} \text{ protéines.min}^{-1}$) selon la réaction :



Le MTBE ne pouvait pas être utilisé comme substrat de croissance car la souche ne poussait pas sur les composés en C1.

A partir de *R. ruber* IFP 2001, un mutant constitutif *R. ruber* IFP 2007 avait été obtenu par repiquages successifs sur milieu minimum contenant de l'ETBE comme seule source de carbone. Cette souche présentait donc l'avantage de pouvoir être cultivée sur un milieu riche (milieu LB) ou sur un substrat facilement assimilable comme l'éthanol ou le 2-propanol, tout en exprimant la capacité de dégrader le MTBE.

La dégradation du MTBE par *R. ruber* IFP 2007 en croissance sur éthanol ou 2-propanol pouvait alors être envisagée. Néanmoins, le problème posé était alors la dégradation du TBA formé.

Piveteau et al. (2001) ont, par la suite, isolé une bactérie, *Burkholderia cepacia* IFP 2003, capable de croissance sur TBA et montré le rôle du cobalt au cours de cette croissance. La mise en œuvre d'un consortium reconstitué pouvait alors être envisagée selon le schéma 1 dans le but de traiter des effluents contenant du MTBE :

2-propanol CO₂+ biomasse

MTBE

TBA + formiate

CO₂ + biomasse*R. ruber**B. cepacia*

IFP 2007

IFP 2003

Schéma 1 : Mise en œuvre de la culture mixte *R. ruber* IFP 2007/ *B. cepacia* IFP 2003 pour la dégradation du MTBE en présence de 2-propanol.

Néanmoins, en raison du caractère pathogène opportuniste de *B. cepacia*, impliquée dans des affections respiratoires graves chez les malades souffrant de mucoviscidose, son utilisation dans des procédés de bioremédiation n'était pas envisageable et les essais d'isolement ont été poursuivis afin d'obtenir des souches alternatives capables de croissance sur TBA.

Au cours de ces essais, une souche nouvelle a été isolée à partir de boues d'une station d'épuration des eaux urbaines. Il s'agissait d'une bactérie à Gram positif, aérobie stricte, ne sporulant pas et formant des colonies jaunes sur milieu gélosé LB. D'après les caractéristiques phénotypiques, cette souche fut identifiée comme appartenant à la classe des Mycobactéries à croissance rapide, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Nous nous sommes dans un premier temps attachés à déterminer ses substrats de croissance et sa capacité de croissance sur TBA que nous avons comparée avec celle de *B. cepacia* IFP 2003.

I. Minéralisation du MTBE par cométabolisme dans des consortia reconstitués.

La dégradation du MTBE par cométabolisme a été envisagée et comparée avec les cultures mixtes suivantes : *R. ruber* IFP 2007/ *B. cepacia* IFP 2003 et *R. ruber* IFP 2007/ *M. austroafricanum* IFP 2012. Les capacités de dégradation du MTBE en TBA par *R. ruber* IFP 2007 (Hernandez-Perez et al., 2001) ainsi que les capacités de dégradation du TBA par *B. cepacia* IFP 2003 (Piveteau et al., 2001) avaient été étudiées auparavant. Préalablement à son utilisation dans des consortia, l'étude des capacités de dégradation du TBA par *M. austroafricanum* IFP 2012 a été réalisée.

I.1. Etude des capacités de dégradation du TBA par *M. austroafricanum* IFP 2012.

I.1.A. Substrats de croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012.

Un certain nombre d'alcools ont été testés afin de préciser le spectre des substrats de croissance de cette souche (Tableau 12). Nous avons également testé les capacités de croissance de la souche sur trois intermédiaires de la dégradation du TBA, l'acide α -hydroxy-isobutyrique (HIBA), le 2-propanol et l'acétone, proposés en 1997 par Steffan et al. (Figure 5).

Tableau 12 : Substrats de croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012.

Substrat	Croissance
Ethanol	+
Propanol	+
<i>n</i>-Butanol	+
<i>n</i>-Pentanol	+
2-Propanol	+
2-Butanol	+
2-Pentanol	+
Acetone	+
TBA	+
TAA	+
HIBA	+

+ : croissance détectée.

Les différents substrats ont été testés à une concentration initiale de 200 mg/L.

M. austroafricanum IFP 2012 est capable de croître sur les alcools linéaires ou tertiaires. De plus, les trois intermédiaires potentiels dans la voie de dégradation du TBA sont également des substrats de croissance de cette souche.

I.1.B. Croissance sur TBA de *M. austroafricanum* IFP 2012.

Afin de savoir si la capacité de dégradation du TBA est inductible chez *M. austroafricanum* IFP 2012, l'influence du substrat de préculture sur la croissance sur TBA a été étudiée. Après préculture sur glucose ou TBA, la croissance de la souche est suivie par la consommation d'oxygène mesurée par un respiromètre. Les profils obtenus lors de la croissance sur 400 mg.L⁻¹ de TBA après une préculture sur TBA ou sur glucose sont différents (Figure 15). Le fait que la consommation totale d'oxygène soit identique quelle que soit la préculture indique que celle-ci n'a aucune incidence sur la consommation globale du substrat. D'ailleurs, à partir de la valeur de la D.Th.O. (demande théorique en oxygène) calculée pour le TBA (2,59 mgO₂.mg⁻¹ TBA) et de la consommation réelle d'oxygène fournie par le respiromètre SaproMat, il est possible de calculer le taux de minéralisation (en négligeant la quantité d'oxygène incorporée dans la biomasse et les métabolites) et, quelle que soit la préculture, le taux de minéralisation est de 60% (Tableau 13).

Cependant, d'un point de vue cinétique, les cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012 précultivées sur glucose sont moins performantes. En effet, le substrat utilisé pour réaliser la préculture a une influence sur deux facteurs : la phase de latence et le taux de croissance. Des cellules précultivées sur glucose nécessitent une phase d'adaptation d'environ 20 h avant que la dégradation du TBA soit effective alors que la croissance des cellules précultivées sur ce substrat ne présente pas de phase de latence. De même, le taux de croissance maximum de cellules précultivées sur glucose est égal au tiers de celui obtenu avec des cellules cultivées sur TBA (0,036 contre 0,103 h⁻¹).

Cette expérience de suivi de la croissance par respirométrie a permis de mettre en évidence le caractère inductible de la capacité de dégradation du TBA par *M. austroafricanum*. IFP 2012. Lors du passage de cellules cultivées sur glucose en TBA, un temps d'adaptation est nécessaire et une phase de latence durant laquelle les cellules induisent les systèmes enzymatiques appropriés est observée ; la croissance des cellules sur TBA se fait donc progressivement. Au contraire, des cellules précultivées sur TBA ont déjà pu induire tous les systèmes enzymatiques adaptés et la croissance est alors immédiate.

Figure 15 : Consommation d'oxygène lors de la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur TBA après préculture sur glucose (rouge) ou TBA (noire). Ces courbes correspondent à la moyenne de trois répétitions. La DO₆₀₀ initiale est de 0,08 et la concentration initiale en TBA est 400 mg.L⁻¹.

Tableau 13 : Taux de croissance et pourcentage de minéralisation du TBA de *M. austroafricanum* IFP 2012 selon les conditions de préculture.

	Préculture Glucose	Préculture TBA
μ (h ⁻¹)	0,036	0,103
% minéralisation	60	61

La concentration initiale en TBA est 400 mg.L⁻¹.

I.2. Étude de la dégradation du MTBE par des consortia reconstitués.

Les capacités de dégradation du TBA étant très similaires chez *M. austroafricanum* IFP 2012 et *B. cepacia* IFP 2003, nous avons alors étudié la possibilité de dégradation du MTBE par deux consortia : *R. ruber* IFP 2007/*B. cepacia* IFP 2003 ou *R. ruber* IFP 2007/*M. austroafricanum* IFP 2012 selon le schéma 1.

Ce travail a fait l'objet d'une publication présentée ci-après (article 1).

L'utilisation de *M. austroafricanum* IFP 2012 dans une culture mixte avec *R. ruber* IFP 2007 a également fait l'objet d'un brevet :

Hernandez, G, François, A, Piveteau, P, Fayolle, F, Monot, F. 2000. Procédé de traitement bactérien d'effluents contenant au moins un éther par *Gordona terrae* CIP-I-2594. Brevet international 00/03113.

ARTICLE 1: **Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization.** Alan François, Pascal Piveteau, Françoise Fayolle, Rémy Marchal, Pierre Béguin et Frédéric Monot. 2001. p.153-160. In V.S. Magar, J.T. Gibbs, K.T. O'Reilly, M.R. Hyman and A. Leeson (eds), Bioremediation of MTBE, alcohols, and ethers. Battelle Press, Columbus, Ohio.

II. Étude de la dégradation du MTBE par *M. austroafricanum* IFP 2012.

Lors de l'étude présentée ci-dessus, la dégradation de MTBE (60 mg.L⁻¹) par *R. ruber* IFP 2007 en présence de 2-propanol s'est révélée être plus rapide avec *M. austroafricanum*. IFP 2012, qu'avec *B. cepacia* IFP 2003 (70 h au lieu de 95 h). De même, la disparition du MTBE est plus rapide avec *M. austroafricanum* IFP 2012 alors que ces deux souches ont des activités de dégradation du TBA apparemment identiques. L'influence de la co-culture sur l'attaque initiale du MTBE ne peut s'expliquer que si *M. austroafricanum* IFP 2012 est également capable de participer activement à la dégradation du MTBE.

Afin d'élucider ce point, nous avons donc étudié la capacité de dégradation de *M. austroafricanum* IFP 2012, seule, en croissance sur 2-propanol avec ou sans MTBE dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. Les résultats présentés sur la Figure 16 montrent que (1) la croissance sur 2-propanol est identique en absence (Figure 16A) et en présence (Figure 16B) de MTBE (70 h et densité optique finale identique). Dans les deux cas, le 2-propanol est dégradé en acétone qui s'accumule partiellement de façon transitoire puis est dégradé, (2) que *Mycobacterium* sp. IFP 2012 est bien en effet capable de dégrader le MTBE. Le TBA est produit de façon transitoire puis reconsumé même après utilisation du 2-propanol et de l'acétone.

Cette expérience qui montre les capacités très intéressantes de *M. austroafricanum* IFP 2012 pour la biodégradation du MTBE ne permettait néanmoins pas de conclure sur le mode de dégradation : cométabolisme en présence de 2-propanol ou utilisation comme seule source de carbone et d'énergie.

Une étude complémentaire nous a permis de mettre en évidence que la souche étudiée est en fait capable d'utiliser le MTBE comme seule source de carbone et d'énergie. Lors de la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur ce substrat, le *tert*-butyl formiate (TBF), le TBA et l'acide 2-hydroxy-isobutyrique (HIBA) comme intermédiaires métaboliques, l'implication possible du même système enzymatique dans l'oxydation du MTBE et du TBA et la nécessité de l'ion cobalt pour permettre une bonne croissance sur HIBA ont été montrés. Ces résultats sont présentés dans l'article 2.

Figure 16 : Croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur 2-propanol (A) et sur 2-propanol et MTBE (B).

La DO₆₀₀ (◆) et les concentrations résiduelles en MTBE (▲), TBA (Δ), 2-propanol (◇) et acétone (x) sont suivies.

L'utilisation de cette première souche à Gram positif, capable de dégrader le MTBE comme seule source de carbone et d'énergie, dans un procédé de dépollution a fait l'objet d'un dépôt de brevet :

Fayolle, F, François, A, Monot, F. 2001. Procédé de traitement d'effluents aqueux contenant du méthyl *tert*-butyl éther par *Mycobacterium* sp. CIP-I 2562. Brevet français 01/13299.

ARTICLE 2 : Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Alan François, Hugues Mathis, Davy Godefroy, Pascal Piveteau, Françoise Fayolle et Frédéric Monot. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68 (6) : 2754-2762.

III. Étude des facteurs limitant la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur MTBE.

Bien que *M. austroafricanum* IFP 2012 soit capable d'utiliser le MTBE comme seule source de carbone et d'énergie, cette croissance est lente (article 2 ; François et al., 2002). D'une façon générale, la mauvaise biodégradabilité des éthers, et du MTBE en particulier, est un problème encore mal cerné. White et al. (1996) soulignent qu'une bonne analyse du processus microbiologique de coupure des liaisons éthers requiert de satisfaire les points suivants :

- 1- L'isolement de micro-organismes capables de les dégrader.
- 2- L'élucidation des mécanismes de coupure de la liaison éther par ces micro-organismes ainsi que la caractérisation et, si possible, la purification des enzymes impliquées.
- 3- L'isolement et l'analyse des séquences génétiques codant pour les enzymes impliquées.
- 4- La détermination des configurations structurales des substrats qui facilitent le clivage des liaisons C-O-C par les micro-organismes isolés.
- 5- La sélection de nouveaux micro-organismes, éventuellement en ayant recours au génie génétique, avec des capacités de dégradation des liaisons éthers améliorées.

Dans le cas du MTBE, une telle analyse n'en est encore qu'à son début puisque c'est seulement récemment que des micro-organismes capables d'utiliser ce substrat comme seule source de carbone et d'énergie ont été isolés : *Rubrivivax gelatinosus* PM1 (Hanson et al., 1999), *Hydrogenophaga flava* ENV 735 (Hatzinger et al., 2001) et *M. austroafricanum* IFP 2012 (François et al., 2002).

L'isolement de ces trois souches répond à la première question. Le second point est en court d'élucidation puisque, chez *M. austroafricanum* IFP 2012, le *tert*-butyl formiate (TBF) a été mis en évidence comme intermédiaire de dégradation du MTBE ; ceci étant en faveur de la formation d'un hémiacétal instable par oxydation du MTBE, scindé ensuite en TBF et formiate.

L'enzyme responsable de l'attaque de la liaison éther n'a pu être purifiée car aucune activité d'oxydation du MTBE n'a été mise en évidence dans des extraits bruts de *M. austroafricanum* IFP 2012 probablement du fait d'une forte instabilité du système

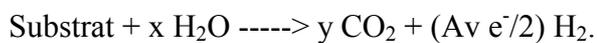
enzymatique, ce qui est fréquent avec certaines mono-oxygénases (Hamamura et al., 1999). Cependant, au niveau physiologique, l'implication d'une activité mono-oxygénase, identifiée selon les critères proposés par Hamamura et al (1999), a pu être mise en évidence lors de l'attaque initiale du MTBE ainsi que pour celle du TBA.

La compréhension des facteurs limitant la croissance des micro-organismes sur MTBE est cruciale afin de savoir comment améliorer cette dégradation. Parmi les raisons invoquées, la déperdition énergétique qui pourrait se produire pendant le métabolisme du MTBE est à envisager. La stabilité de la liaison éther peut être expliquée par l'énergie importante nécessaire à sa rupture, 360 kJ/mole (White et al., 1996). Afin d'évaluer les possibilités de pertes d'énergie lors du métabolisme du MTBE, Fortin et al. (2001) ont proposé de calculer un index de déperdition énergétique (δ_e) qui correspond au rapport entre le rendement théorique en biomasse et le rendement expérimental :

$$\delta_e = \frac{Y_{théo_{X/S}}}{Y_{exp_{X/S}}}$$

Où $Y_{théo_{X/S}}$ et $Y_{exp_{X/S}}$ sont exprimés en g (masse sèche). mol⁻¹.

$Y_{théo_{X/S}} = 3,07 Av e^-$ où $Av e^-$ correspond au nombre d'électrons libérés lors de l'hydrolyse du substrat considéré (Payne et Wiebe, 1978) :



Des valeurs de δ_e supérieures à 1 sur un substrat donné impliquent une déperdition énergétique au cours du métabolisme de ce composé. Comme référence, le rendement de croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur glucose est caractérisé par une valeur de δ_e de 1,1 correspondant à une déperdition énergétique nulle (Fortin et al., 2001).

Des valeurs de δ_e peuvent être calculées lors de la dégradation du MTBE, du TBA et de l'HIBA par les différentes souches isolées (Tableau 14). Les valeurs de δ_e obtenues lors de la croissance des trois souches utilisant le MTBE comme seule source de carbone et d'énergie sont toujours bien supérieures à 1. Cependant, l'index de déperdition énergétique est deux fois plus grand pour *R. gelatinosus* PM1 (5,8) que pour *H. flava* ENV735 et *M. austroafricanum* IFP 2012 (2,6 et 2,7, respectivement). La comparaison des valeurs de δ_e sur le MTBE et ses intermédiaires de dégradation est très intéressante puisqu'elle permet de mettre en évidence que chez *M. austroafricanum* IFP 2012, les déperditions énergétiques diminuent en progressant dans le métabolisme : $\delta_{e_{MTBE}} > \delta_{e_{TBA}} > \delta_{e_{HIBA}}$. La valeur $\delta_{e_{HIBA}}$ est très proche de

1 ce qui implique de faibles déperditions énergétiques de la souche sur ce substrat. Ce résultat semble donc bien confirmer la présence d'une déperdition énergétique spécifiquement liée à l'étape de conversion du MTBE en TBA.

Tableau 14 : Index de déperditions énergétiques sur MTBE et ses intermédiaires de dégradation par différentes souches et consortia.

Micro-organisme ou culture	Substrat	$Y_{X/S}^{exp}$ (g masse sèche. mol ⁻¹)	Av e ⁻	$Y_{X/S}^{theo}$ (g masse sèche. mol ⁻¹)	δe
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2012 (François et al., 2002)	MTBE	33,4	30	92,1	2,8
	TBA	45,1	24	73,7	1,6
	HIBA	43,9	18	55,3	1,3
<i>R. gelatinosus</i> PM1 (Hanson et al, 1999)	MTBE	15,8	30	92,1	5,81
<i>H. flava</i> ENV735 (Hatzinger et al., 2001)	MTBE	35,2	30	92,1	2,6
<i>B. cepacia</i> IFP 2003 (Piveteau et al., 2001)	TBA+Co ²⁺	40,0	24	73,7	2,0
	TBA-Co ²⁺	13,3	24	73,7	6,0
Culture BC1 (Salanitro et al., 1994)	MTBE	26,4	30	92,1	3,5
Consortium F (Fortin et al., 2001)	MTBE	8,8	30	92,1	10,5
	TBA	17,8	24	73,7	4,1

Une baisse du même ordre de l'indice δe est observée suivant le substrat de croissance du consortium F, capable de dégrader le MTBE, isolé par Fortin et al. (2001) : $\delta e_{MTBE} > 2 (\delta e_{TBA})$.

Dans le cas de *M. austroafricanum* IFP 2012, les valeurs présentées ont été obtenues lors de croissances sur milieu minéral contenant du cobalt. L'importance du cobalt pour la dégradation du TBA est confirmée en comparant les valeurs de δe obtenues lors de croissance de *B. cepacia* IFP 2003 sur TBA puisque la valeur de déperdition énergétique est multipliée par trois en absence de Co²⁺. Ce résultat montre combien est difficile l'assimilation du TBA

en absence de cobalt. La valeur de δ_e en présence de cobalt est la même chez *B. cepacia* IFP 2003 et *M. austroafricanum* IFP 2012.

L'ensemble des résultats sur les index de déperditions énergétiques ainsi que le rôle de l'ion Co^{2+} permettent d'identifier deux étapes potentielles de déperditions importantes :

(1) : la conversion du MTBE en TBA.

(2) : la minéralisation de l'HIBA.

La possibilité d'une limitation liée à l'utilisation d'un des intermédiaires de dégradation du TBA était d'ailleurs évoquée par Hatzinger et al. (2001) pour *H. flava* ENV 735. Les résultats présentés dans l'article 2 montraient notamment la nécessité d'ions cobalt pour une bonne dégradation de l'HIBA chez *M. austroafricanum* IFP 2012. Les raisons de la limitation au cours de la première étape restent à élucider. Salanitro (1995) suggérait que l'oxygénase responsable de la coupure de liaison éther du MTBE pouvait être soumise à des régulations négatives par ses métabolites.

Ce point a fait l'objet d'une attention particulière, d'autant plus que chez *M. austroafricanum* IFP 2012, la même mono-oxygénase est responsable de la dégradation du MTBE et du TBA, et qu'il y a compétition entre ces deux substrats pour cette même mono-oxygénase.

Les résultats obtenus à ce sujet sont présentés dans l'article 3.

ARTICLE 3: Roles of *tert*-butyl formate, *tert*-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Alan François, Lauriane Garnier, Hugues Mathis, Françoise Fayolle et Frédéric Monot. 2002. Accepté pour publication dans Appl. Microbiol. Biotechnol.

**Roles of *tert*-Butyl Formate, *tert*-Butyl Alcohol and Acetone in the
regulation of Methyl *tert*-Butyl Ether Degradation by
Mycobacterium austroafricanum IFP 2012.**

Alan François, Lauriane Garnier, Hugues Mathis, Françoise Fayolle* and Frédéric Monot.
Institut Français du Pétrole, Département de Microbiologie, 1 & 4, avenue de Bois-Préau,
92852 Rueil-Malmaison Cedex, France.

*corresponding author:

Françoise Fayolle

Mailing address: Institut Français du Pétrole, Département de Microbiologie, 1 & 4 avenue de
Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France

Phone: (33) 1-47-52-68-64

Fax : (33) 1-47-52-70-01

e-mail: francoise.fayolle@ifp.fr

ABSTRACT

Mycobacterium austroafricanum IFP 2012 is a Gram-positive strain able to grow on methyl *tert*-butyl ether (MTBE) as a sole carbon and energy source. The effect of two downstream metabolites of MTBE, *tert*-butyl formate (TBF) and *tert*-butyl alcohol (TBA) on MTBE degradation was investigated using resting cells. The addition of low concentrations of TBF decreased the MTBE degradation rate by about 30%. In contrast, the addition of TBA did not have a significant effect on MTBE degradation rate even at high concentrations and it was also shown that TBA degradation occurred only once MTBE was exhausted. At neutral pH, TBF hydrolysis involved mainly an esterase-type activity regulated by the presence of TBA. The TBF degradation rate was about 4 times lower than the MTBE degradation rate. Furthermore, acetone was identified as an intermediate during TBA degradation. An acetone monooxygenase activity, inhibited by methimazole but not by acetylene, was suggested. It was different from the MTBE/TBA monooxygenase and, thus, acetone did not appear to compete with MTBE and TBA for the same enzyme. These new results show that the metabolic regulation of the early steps of MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 is complex involving inhibition and competition phenomena.

INTRODUCTION

Oxygenated compounds, mainly methyl *tert*-butyl ether (MTBE), have been added to gasoline over the last fifteen years as octane boosters to reduce carbon monoxide and hydrocarbon emissions by motor vehicles (Swain 1999). The large scale use of MTBE has led to the contamination of numerous aquifers (Squillace et al. 1996; Achten and Puttmann 2000; Johnson et al. 2000). Initial studies on MTBE biodegradation (Jensen and Arvin 1990) concluded that MTBE was a persistent compound in contaminated aquifers. The first mixed culture able to degrade MTBE was described by Salanitro et al. (1994) and MTBE degradation by microcosms from different origins was also reported (Bradley et al. 2001a; Bradley et al. 2001b; Kane et al. 2001). MTBE degradation by co-metabolism has also been observed (Steffan et al. 1997; Garnier et al. 1999; Hyman and O'Reilly 1999; Hyman et al. 2000; François et al. 2001; Piveteau et al. 2001).

Recently, two Gram-negative aerobic bacteria able to grow on MTBE as a sole carbon and energy source, *Rubrivirex gelatinosus* PM1 (Hanson et al. 1999; Deeb et al. 2001) and *Hydrogenophaga flava* ENV 735 (Steffan et al. 2000; Hatzinger et al. 2001) have been obtained. François et al. (2002) isolated the first Gram-positive aerobic bacterium, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, that is able to grow on MTBE. Such new strains are suitable tools to provide information on the physiology and biochemistry of MTBE transformation and, accordingly, to study limitations on its degradation.

In the case of *M. austroafricanum* IFP 2012, cultivation on media containing MTBE as a sole carbon and energy source was characterised by a long lag phase corresponding to the stoichiometric conversion of MTBE to *tert*-butyl formate (TBF) and *tert*-butanol (TBA) followed by growth on TBA produced (François et al. 2002). In addition to TBA and TBF, 2-hydroxyisobutyric acid (HIBA) was detected as an intermediate of the MTBE degradation pathway. In contrast to what was observed with *H. flava* ENV 735 and *R. gelatinosus* PM1, a

sole non hemic enzymatic system was involved in the oxidation of both MTBE and TBA in *M. austroafricanum* IFP 2012.

The role of intermediates in the metabolic regulation of MTBE degradation has only been studied in rat liver (Savolainen et al. 1985). Using microcosms, Mo et al. (1997) observed that MTBE degradation was affected by the addition of TBA, 2-propanol or acetone. As suggested by Salanitro (1995), the mode of regulation of MTBE degradation by microorganisms has to be documented in order to better understand the limitations of MTBE catabolism in the environment. The present study brings new insights on the biodegradability of MTBE by *M. austroafricanum* IFP 2012 through investigations on the occurrence of i) the inhibition or a feedback regulation of MTBE degradation by one or more of its metabolites and ii) possible competition between MTBE and its downstream metabolites for the same monooxygenase.

MATERIALS AND METHODS.

Degradation assay using resting cells. *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 (François et al. 2002) was cultivated in MM (Piveteau et al. 2001) containing 1g/L TBA (unless otherwise stated). Cultures were grown aerobically in conical flasks and incubated at 30°C under constant agitation. The volume of the flask headspace was sufficient to prevent any limitation in O₂ during growth. Growth was followed by measuring the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) with a UV-1601 spectrophotometer (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Unless otherwise stated, tightly-closed flasks were inoculated to obtain an initial OD₆₀₀ of 0.1. The relationship between OD₆₀₀ and cell dry weight was previously determined (François et al. 2002).

After growth, the cells were harvested by centrifugation at 23,000 x g for 15 min and washed twice in phosphate buffer (20 mM, pH 7.0). The cells were resuspended in 40 ml phosphate buffer in 250-ml sealed flasks to obtain an initial OD₆₀₀ of 0.4 buffer. After inoculation, the reaction was started by the addition of the substrate and the flasks were incubated at 30°C on an orbital shaker. Samples were filtered through 0.22 µm filters (Prolabo, Fontenay sous Bois, France) before analysis. Substrate degradation was followed over a 48-h period by gas chromatography analysis.

For assays under anaerobic conditions, cells obtained from aerobic cultures were transferred to an anaerobic chamber under strict anaerobic conditions and resuspended in the phosphate buffer that had been boiled while being flushed with N₂ for one hour.

Analytical assays. MTBE, TBA, *tert*-butyl formate (TBF), acetone, propylene oxide were quantified by gas chromatography as previously described (François et al. 2002). Samples were filtered through 0.22 µm filters and injected without further treatment into the chromatograph.

Formate was quantified enzymatically using the formate dehydrogenase of *Candida boidinii*. One mL of a 9 mM NAD⁺ lithium salt was added to 0.1 mL of sample and 1.9 mL of water. A blank was prepared in which the sample was replaced by 0.1 mL of water. After 5 minutes at room temperature, the initial optical densities of the sample and of the blank were measured at 340 nm (OD₃₄₀). A 0.05 mL aliquot of a solution of formate dehydrogenase (67 U/mL) was then added to each tube to start the reaction. After 20 minutes at room temperature, OD₃₄₀ were measured and the initial values of OD₃₄₀ were subtracted. The concentration of formate was then calculated taking a NAD⁺ molar extinction coefficient at 340 nm of 6.3 L.mmol⁻¹.cm⁻¹.

Chemicals. MTBE, TBA, HIBA, TBF, propylene oxide were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Ethanol, 2-propanol, formate, and acetone were supplied by Prolabo (Fontenay-sous-Bois, France). Propylene and acetylene were obtained from Air Liquide (Paris-La Défense, France). All chemicals were of the highest purity available.

RESULTS

Regulation of the early steps of MTBE degradation in *M. austroafricanum* IFP 2012.

The degradation of MTBE by TBA-grown resting cells of *M. austroafricanum* IFP 12012 was studied at two initial concentrations of MTBE. At a MTBE concentration of 240 μM (Figure 1a), the degradation of MTBE occurred immediately confirming the inducibility of MTBE degradation by TBA. The initial MTBE degradation rate measured over a 30 minute-period was high ($24.4 \pm 1.8 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{biomass}$). As was previously demonstrated (François et al. 2002), both TBF and TBA were produced during MTBE degradation and were partially accumulated: when 214 μM of MTBE was degraded, 137 μM of TBA and 6 μM of TBF were measured. The major part of TBF and TBA degradations took place when the residual MTBE concentration was low (about 20 μM).

By doubling the initial MTBE concentration (480 μM) a different profile was obtained (Figure 1b). When TBF and TBA concentrations reached 81 μM and 274 μM , respectively, MTBE degradation rate slowed down and then stopped. In this case, TBF and TBA produced were not further degraded and the accumulation of TBF was much more important than with a low initial MTBE concentration.

These results suggested that the degradation of MTBE might be subject to feedback regulation by its metabolites and the effect of an initial addition of TBF or TBA on MTBE degradation rate was then investigated.

Figure 1 : MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 resting-cells (179 mg.L⁻¹) at a low (A) and a high (B) initial MTBE concentrations. During degradations experiments (triplicates), concentrations of MTBE (□), TBF (■) and TBA (▲) were monitored by GC analysis.

When TBA was added at a concentration equal to that of MTBE, it led to an 18% decrease in the initial MTBE degradation rate (Table 1). The addition of higher concentrations of TBA, even at a TBA/MTBE molar ratio as high as 7, did not result in a more important impact on the initial MTBE degradation rate.

TABLE 1. Effect of TBA concentration on MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells.

MTBE (μM)	TBA (μM)	MTBE degradation rate * ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ of biomass)
236 \pm 7	0	24.4 \pm 1.8
190 \pm 5	255 \pm 5	20.1 \pm 1.2
189 \pm 5	637 \pm 3	19.6 \pm 1.0
204 \pm 3	1472 \pm 4	19.4 \pm 0.9

MTBE degradation rates were calculated during the first 30 minutes of each experiment. Cell dry weight was 179 \pm 2 mg.L⁻¹ in every case.

* Mean values (\pm standard deviation) of triplicates

On the contrary, in the presence of a low TBF concentration (58 μM), MTBE degradation rate and TBA production rate were around 70% of the activities measured in the absence of TBF (Table 2). This effect was more important in the presence of higher concentrations of TBF, especially on TBA production rate. It can also be noticed that the MTBE degradation rate was 3 times as high as the TBA production rate suggesting the involvement of a rate-limiting step (different from the initial MTBE oxidation) during the conversion of MTBE to TBA.

These results highlighted the important regulatory role played by TBF on MTBE degradation. As a matter of fact, the fate of TBF in MTBE-growing bacteria had not been documented before, and these latter results induced us to investigate that point.

TABLE 2. Effect of TBF concentration on MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells.

MTBE (μM)	TBF (μM)	MTBE Degradation rate* ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{biomass}$)	TBA production rate* ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{biomass}$)
244 \pm 5	0	27.6 \pm 0.1	8.4 \pm 0.6
192 \pm 3	58	19.2 \pm 2.7	5.7 \pm 1.6
221 \pm 10	168	15.9 \pm 2.3	3.5 \pm 0.3

Biomass concentrations during experiments with 244, 192 and 221 μM of MTBE were 134, 139 and 150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively.

*MTBE degradation and TBA production rates were calculated during the first 30 minutes of each experiment and are the mean values (\pm standard deviation) of triplicates

Degradation of TBF by *M. austroafricanum* IFP 2012

The conversion of TBF to TBA and formate has been shown to be a hydrolysis reaction at acidic pH (O'Reilly et al. 2001) or in the presence of acid catalysts (Lien and Zhang 2001). The fate of TBF at neutral pH has not been reported in MTBE-growing strains. The occurrence of spontaneous hydrolysis of TBF to TBA and formate under abiotic conditions was first investigated (Table 3). It was found that the percentage of hydrolysed TBF increased with the incubation time and led to an equimolar production of TBA and formate: after 48 h of incubation, 22% of the initial 260 μM TBF was transformed. Formate was detected only after 48 h because of the detection limit of the method being used (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, *i.e.* 49 μM). Similar percentages of hydrolysis were obtained at lower TBF concentrations (results not

shown). The hydrolytic spontaneous degradation of TBF at neutral pH was therefore apparently a low-rate reaction.

TABLE 3. Abiotic degradation TBF at neutral pH.

Incubation time (h)	Residual TBF concentration* (μM)	TBA formed* (μM)	Formate formed* (μM)
8	247.9 ± 9.8	14.5 ± 0.7	ND
24	232.9 ± 5.0	31.2 ± 0.2	ND
48	204.8 ± 11.4	53.7 ± 1.4	49.3 ± 0.5

ND : Not detected

The experiments were carried out under constant agitation at 30°C. The initial concentration of TBF was $261.7 \pm 2.9 \mu\text{M}$.

*Mean values (\pm standard deviation) of triplicates.

TBF degradation in the presence of TBA-grown resting cells of *M. austroafricanum* IFP 2012 was followed at low and high initial TBF concentrations (Figures 2a and 2b).

With an initial concentration of 40 μM (Figure 2a), TBF was totally degraded in 8 h by *M. austroafricanum* IFP 2012 at an initial rate of $2.35 \pm 0.48 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ cell dry weight, which was much lower than the MTBE and TBA degradation rates. TBA partially accumulated (the maximum TBA concentration was 28 μM when 37 μM of TBF had been degraded) and then consumed. Its degradation took place only when the TBF residual concentration was low, about 5 μM .

No active TBF degradation occurred using heat-killed cells of *M. austroafricanum* IFP 2012. So, an esterase-type enzyme responsible for TBF degradation was probably involved in the MTBE degradation pathway of *M. austroafricanum* IFP 2012.

Figure 2 : Time course of TBF (■) and TBA (▲) concentrations during TBF degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells. These experiments (triplicates) were carried out with low (A) and high (B) initial TBF concentrations. The biomass concentration was $136 \pm 3 \text{ mg.L}^{-1}$ and $132 \pm 7 \text{ mg.L}^{-1}$ in experiments A and B, respectively.

Increasing the initial TBF concentration to $230 \mu\text{M}$ (Figure 2b) resulted in a different profile: even though the initial degradation rate was in the same range of order ($6.09 \pm 2.15 \mu\text{mol.min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ biomass), the concentration of TBA accumulated ($187 \mu\text{M}$) was stoichiometric with the

amount of TBF degraded (180 μM). According to these results, it can be noticed that at a similar initial TBF concentration, the enzymatic TBF degradation rate was 25 times as high as the abiotic one : 50 $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$ and 2 $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$, respectively.

The effect of TBA addition on the initial TBF degradation rate was also tested and a decrease of 35% of the TBF degradation rate using *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells at initial concentrations of TBA and TBF of 608 and 69 μM , respectively was observed (data not shown).

Involvement of an acetone monooxygenase in the MTBE degradation pathway of *M. austroafricanum* IFP 2012.

Acetone has been proposed as a putative intermediate of MTBE catabolism (Salanitro 1995; Steffan et al. 1997). Acetone degradation can possibly occur as a result of an oxidation catalysed by an oxygenase (Taylor et al. 1980). Therefore, in addition to TBA, acetone might also be a competitive substrate for the same MTBE/TBA monooxygenase of *M. austroafricanum* IFP 2012.

The degradation of TBA (400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was investigated using resting cells at a low biomass concentration (49 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) to decrease the reaction rate and allow the possible accumulation of intermediates. A new peak with a retention time corresponding to that of an acetone standard was detected by gas chromatography. The nature of the product was confirmed by coelution in the presence of added acetone (result not shown).

The ability of *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells to degrade acetone was studied and it was shown that its degradation was dependent on the preculture conditions (Table 4). The acetone degradation rate was very low using LB-grown resting cells (0.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomass). The rates were one order of magnitude higher when ethanol-, TBA-, HIBA- and acetone-grown cells were used, which suggested that this activity was inducible. The best

inducer was 2-propanol since the acetone degradation rate of 2-propanol-grown cells was 6 times higher than that of acetone-grown cells. No acetone degradation was observed using heat-killed cells of *M. austroafricanum* IFP 2012.

TABLE 4. Acetone degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells with a cell dry weight of $103 \pm 17 \text{ mg.L}^{-1}$.

Substrate for resting-cells production	Acetone* (μM)	Acetone degradation rate* (μmol.min⁻¹.g⁻¹ of biomass)
LB	88 ± 2	0.2 ± 0.1
Ethanol (alcohol)	240 ± 2	2.5 ± 0.2
TBA	229 ± 2	2.9 ± 0.1
HIBA	243 ± 2	2.6 ± 0.1
2-propanol	257 ± 2	19.6 ± 0.8
Acetone	222 ± 2	3.5 ± 0.2

Acetone degradation rates were measured in a 2 h period except for the assay with 2-propanol which was measured in a one-hour period.

*Mean values (± standard deviation) of triplicates.

The acetone degradation activity using TBA-grown resting cells under anaerobic conditions was $0.48 \mu\text{mol.min}^{-1}.\text{g}^{-1}$ biomass, which was 6 times lower than that obtained in the presence of oxygen (data not shown). This showed that oxygen was required for an efficient acetone degradation. Moreover, the production of propylene oxide from propylene occurred when acetone-grown resting cells were used ($69.1 \pm 4.3 \text{ nmol of propylene oxide.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ biomass) (data not shown). This propylene oxide production rate was lower than those obtained using MTBE- or TBA-grown cells (François et al. 2002). No propylene oxide was produced using heat-killed acetone-grown cells.

Besides, the effects of an inhibitor and an inactivator of monooxygenases on the growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on acetone were studied. No growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on acetone was observed in the presence of 10 mM methimazole, a specific inhibitor of flavin-containing monooxygenase (Tomasi et al. 1995). A similar effect of methimazole was observed during growth on TBA (François et al. 2002). The growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on acetone was, however, not affected by the presence of acetylene whereas we previously showed that this compound was a strong inactivator of the MTBE/TBA monooxygenase (François et al. 2002).

DISCUSSION

The microbial metabolism of MTBE is still unclear even though pure bacterial strains able to use it as a sole carbon and energy source have been recently isolated. Indeed, such strains could provide new information to help understand the main limitations to MTBE biodegradation, especially those related to metabolic regulation.

The fact that MTBE/TBA monooxygenase is unstable in *M. austroafricanum* IFP 2012 crude extracts prevents any investigation at the enzymatic level (François et al. 2002). The results of this study show that metabolic regulation involved in MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 is probably one of the reasons for its low growth on MTBE. The initial step of MTBE degradation consists of the oxidation of MTBE by a monooxygenase to a hemiacetal rapidly converted to TBF. This latter compound is then hydrolysed to TBA and formate. TBA degradation was dependent on the consumption of the upstream products since TBA was not consumed before the disappearance of MTBE. The same phenomenon occurred using *H. flava* ENV 735 (Steffan et al. 2000) where TBA was stoichiometrically accumulated during MTBE degradation and was then slowly degraded only after the MTBE was consumed.

The present results were consistent with the hypothesis that a same monooxygenase could be involved in the degradation of both MTBE and TBA. Moreover, the slight decrease of MTBE degradation rate by addition of high amounts of TBA, confirmed that this oxidation system could have a higher affinity for MTBE than for TBA. A K_S for TBA of 1.1 mM was previously determined (François et al. 2002). So different affinities would explain the sequential degradation of MTBE and then TBA during growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on MTBE.

Our study showed that the hydrolysis of TBF in the MTBE-growing *M. austroafricanum* IFP 2012 is the combined result of an esterase-type biotic reaction and, to a lesser extent, a

spontaneous hydrolysis. The propane-grown *M. vaccae* JOB5 was shown by Martinez-Prado et al. (Abstr. Proceedings of the third international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds, Monterey, Ca, USA, May 20-23, 2002) and by Hyman (Abstr. Proceedings of IFP International Workshop, "Microbiology of hydrocarbons : state of the art and perspectives". Rueil-Malmaison, France, June 06-07, 2002) to be capable of degrading enzymatically TBF. In the case of the MTBE-growing *M. austroafricanum* IFP 2012, during TBF degradation, formate is immediately consumed since no formate was detected and since the strain is methylotrophic (François et al. 2002). On the contrary, TBA is accumulated. Investigations on the effects of the addition of various concentrations of TBF on MTBE degradation rate or of TBA on MTBE degradation rate showed that TBF is a key compound in the regulation of MTBE metabolism. Contrary to TBA, it exerted a strong negative effect on the monooxygenase responsible for both MTBE and TBA oxidation. Interestingly, Hatzinger et al. (2001) suggested that the poor growth of microorganisms on MTBE may at least partially be related to toxic effects of intermediates produced during MTBE metabolism. Our results also showed that TBF hydrolysis itself can be limited by TBA (Figure 2b); moreover, a decrease of 35% in the TBF degradation rate was measured when *M. austroafricanum* IFP 2012 resting cells were incubated with TBA/TBF molar ratio equal to 10.

The regulation of MTBE metabolism in *M. austroafricanum* IFP 2012 is probably different from that of *H. flava* ENV 735 and *R. gelatinosus* PM1. In the case of *M. austroafricanum* IFP 2012, both MTBE and TBA oxidations are catalysed by the same monooxygenase, with a higher apparent affinity for MTBE than for TBA. The difference observed between the MTBE and the TBF degradation rates would result in an accumulation of high concentrations of TBF. This accumulation might be prevented by the regulatory effect of TBF on the MTBE/TBA monooxygenase. The inhibitory action of the TBF formed results in a decrease

activity of the system towards MTBE allowing hydrolysis of TBF into TBA to occur. These complex interactions explain why a long lag phase corresponding to the complete conversion of MTBE to TBA via TBF took place before any growth was noticeable (François et al. 2002). The interactions taking place during the early steps of MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 are summarized on Figure 3.

The TBA degradation pathway is still putative. Before this study, the sole intermediate identified by analysis was HIBA (François et al. 2002). As suggested by Salanitro (1995), acetone, which was supposed to be produced from HIBA via 2-propanol (Steffan et al. 1997), could be a competitive substrate for the MTBE/TBA monooxygenase. However, it had never been detected before as an intermediate in the MTBE degradation pathway. This study is the first evidence showing that acetone is produced from TBA. Acetone degradation was inducible in *M. austroafricanum* IFP 2012 since LB-grown resting cells had a specific acetone degradation activity 15 times lower than alcohols- and HIBA-grown resting cells. 2-Propanol was a good inducer of this activity.

Acetone could be metabolised according to two different pathways. For most aerobic bacteria, the initial step of acetone degradation is catalysed by a monooxygenase leading to hydroxyacetone, although no acetone monooxygenase activity has been found in vitro (Taylor et al. 1980). In facultative or strict anaerobic bacteria, the initial step in acetone metabolism is a CO₂-dependent carboxylation to form acetoacetate or an acetoacetyl derivative. This type of reaction was also demonstrated in the strictly aerobic *Xanthobacter* strain Py2 and *Rhodococcus rhodochrous* B276 (Sluis et al. 1996; Clark and Ensign 1999).

Figure 3 : Putative regulatory effects occurring during the early steps of MTBE metabolism in *M. austroafricanum* IFP 2012

An acetone monooxygenase activity was suggested in *M. austroafricanum* IFP 2012 since : (i) there was an important decrease of activity under anaerobic conditions, (ii) propylene oxide was produced from propylene, (iii) the acetone degradation activity was inhibited in the presence of methimazole. In contrast to the MTBE/TBA monooxygenase, the acetone monooxygenase was not inactivated by acetylene. Therefore, our results indicate that monooxygenases involved in MTBE/TBA oxidation, on the one hand, and in acetone oxidation, on the other hand, were different. The absence of cytochrome P-450 in MTBE- or TBA-grown cells (François et al. 2002) and the propylene oxide production from propylene using acetone-grown cells of *M. austroafricanum* IFP 2012 let us assume that this acetone monooxygenase was non-hemic.

According to these results, one of the main limitations of MTBE degradation by *M. austroafricanum* IFP 2012 is probably caused by the regulation of the MTBE/TBA monooxygenase and of the esterase expression by TBF and TBA, respectively and to a lesser extent, to the competition between MTBE and TBA for the monooxygenase.

Savolainen et al. (1985) showed that in rat liver, MTBE and TBA may be oxidised by the same monooxygenase which was suggested to be a cytochrome P-450 elsewhere (Turini et al. 1998). In the case of *M. austroafricanum* IFP 2012, the lower steps of the MTBE degradation pathway, including acetone oxidation, do not seem to exert any limitation on MTBE degradation.

The present results obtained on the basis of physiological studies clearly indicated the importance of regulatory effects to explain the poor biodegradability of MTBE. It is, nevertheless, at this stage unclear whether the intermediates act at the transcriptional level via a mechanism of repression or at the enzymatic one.

Acknowledgements

We thank Darwin Lyew for linguistic advice.

REFERENCES

- Achten C, Puttmann W (2000) Determination of methyl *tert*-butyl ether in surface water by use of solid phase microextraction. *Environ Sci Technol* 34:1359-1364
- Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE (2001a) Methyl *t*-butyl ether mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions. *Appl Environ Microbiol* 67:1975-1978
- Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH (2001b) Widespread potential for microbial MTBE degradation in surface-water sediments. *Environ Sci Technol* 35:658-662
- Clark DD, Ensign SA (1999) Evidence for an inducible nucleotide-dependent acetone carboxylase in *Rhodococcus rhodocrous* B276. *J. Bacteriol.* 181:2752-2758
- Deeb RA, Hu HY, Hanson JR, Scow KM, Alvarez-Cohen L (2001) Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ Sci Technol* 35:312-317
- François A, Piveteau P, Fayolle F, Marchal M, Béguin P, Monot F (2001) Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization. In: Magar VS, Gibbs JT, O'Reilly KT, Hyman MR, Leeson A (ed) *Bioremediation of MTBE, alcohols, and ethers*. Battelle, Columbus, Ohio, pp 153-160
- François A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F (2002) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl Environ Microbiol* 68:2754-2762
- Garnier PM, Auria R, Augur C, Revah S (1999) Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Appl Microbiol Biotechnol* 51:498-503
- Hanson JR, Ackerman CE, Scow KM (1999) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl Environ Microbiol* 65:4788-4792
- Hatzinger PB, McClay K, Vainberg S, Tugusheva M, Condee CW, Steffan RJ (2001) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture. *Appl Environ Microbiol* 67:5601-5607
- Hyman M, O'Reilly K (1999) Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria. In: Leeson A (ed) *In situ bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds*. Battelle, Columbus, Ohio, pp 7-12
- Hyman M, Taylor C, O'Reilly K (2000) Cometabolic degradation of MTBE by iso-alkane-utilizing bacteria from gasoline impacted soils. In: Magar VS (ed) *Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle, Columbus, Ohio, pp 149-155
- Jensen H, Arvin E (1990) Solubility and degradability of the gasoline additive MTBE, methyl *tert*-butyl ether and gasoline compounds. In: Van Den Brink W (ed) *Contaminated Soil'90*, Kluwer, Dordrecht, pp 445-448
- Johnson R, Pankow J, Bender D, Price C, Zogorsky J (2000) MTBE. To what extent will past release contaminate community water supply wells? *Environ Sci Technol* 34:210A-217A
- Kane SR, Beller HR, Legler TC, Koester CJ, Pinkart HC, Halden RU, Happel AM (2001) Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. *Appl Environ Microbiol* 67:5824-5829
- Lien H, Zhang W (2001) Catalytic oxidation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether by bifunctional aluminium in the presence of dioxygen. In: Suidan MT (ed) *Remediation of water and soil contaminated with gasoline oxygenates : in situ and ex situ treatment technologies*. ACS Symposium, series vol.41, Columbus, OH, pp 463-468
- Mo K, Lora CO, Wanken AE, Javanmardian M, Yang X, Kulpa CF (1997) Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:69-72
- O'Reilly KT, Moir ME, Taylor CD, Smith CA, Hyman MR (2001) Hydrolysis of *tert*-butyl methyl ether (MTBE) in dilute aqueous acid. *Environ Sci Technol* 35:3954-3961
- Piveteau P, Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F (2001) Biodegradation of *tert*-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:369-373
- Salanitro J (1995) Understanding the limitations of microbial metabolism of ethers used as fuel octane enhancers. *Current Opinion in Biotechnology* 6:337-340
- Salanitro J, Diaz L, Williams M, Wisniewski H (1994) Isolation of a bacterial culture that degrades methyl *tert*-butyl ether. *Appl Environ Microbiol* 60:2593-2596
- Savolainen H, Pfaffli P, Elovaara E (1985) Biochemical effects of methyl tertiary-butyl ether in extended vapour exposure of rats. *Arch Toxicol* 57:285-288
- Sluis MK, Small FJ, Allen JR, Ensign SA (1996) Involvement of an ATP-dependent carboxylase in a CO₂-dependent pathway of acetone metabolism by *Xanthobacter* Strain Py2. *J Bacteriol* 178:4020-4026
- Squillace P, Zogorski J, Wilber W, Price C (1996) Preliminary assessment of the occurrence and possible sources of MTBE in groundwater in the United States, 1993-1994. *Environ Sci Technol* 30:1721-1730

- Steffan RJ, McClay K, Vainberg S, Condee CW, Zhang D (1997) Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:4216-4222
- Steffan RJ, Vainberg S, Condee CW, McClay K, Hatzinger PB (2000) Biotreatment of MTBE with a new bacterial isolate. In: Magar VS (ed) *Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle, Columbus, Ohio, pp 165-173
- Swain EJ (1999) U.S. MTBE production at a record high in 1998. *Oil Gas J.* 14:99-101
- Taylor DG, Trudgill PW, Cripps RE, Harris PR (1980) The microbial metabolism of acetone. *J Gen Microbiol* 118:159-170
- Tomasi I, Artaud I, Bertheau Y, Mansuy D (1995) Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100 : determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole. *J Bacteriol* 177:307-311
- Turini A, Amato G, Longo V, Gervasi PG (1998) Oxidation of methyl- and ethyl- tertiary-butyl ethers in rat liver microsomes: role of the cytochrome P450 isoforms. *Arch Toxicol* 72:207-214

La dégradation du MTBE par *M. austroafricanum* IFP 2012 est lente. Dans l'article 3, nous avons montré le rôle que jouent les intermédiaires métaboliques lors de cette dégradation. L'ensemble de ces résultats ont révélé les régulations négatives du TBF et du TBA sur la MTBE/TBA mono-oxygénase et la TBF estérase, respectivement. Cependant, White et al. (1996) considèrent que la détermination de la configuration structurale des substrats la plus adaptée pour permettre le clivage des liaisons C-O-C est importante (point 4). Aux vues des résultats obtenus au cours de la minéralisation des différents éthers (article 2), le métabolisme de dégradation du MTBE a été comparé à celui du TAME puisque ces deux composés présentent la même liaison méthoxy.

La voie de dégradation du TAME a été partiellement élucidée et certains résultats présentés dans l'article 3 confirmés. Ces nouveaux résultats sont présentés dans l'article 4.

ARTICLE 4: Comparison of MTBE and TAME degradation pathways in *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Alan François, Lauriane Garnier, Hugues Mathis, Françoise Fayolle et Frédéric Monot. 2002. Soumis pour publication.

**Comparison of MTBE and TAME degradation pathways in *Mycobacterium*
austroafricanum IFP 2012.**

Alan François, Lauriane Garnier, Hugues Mathis, Françoise Fayolle and Frédéric Monot*.

Institut Français du Pétrole, Département de Microbiologie, 1 & 4, avenue de Bois-Préau,
92852 Rueil-Malmaison Cedex, France.

*corresponding author:

Frédéric Monot

Mailing address: Institut Français du Pétrole, Département de Microbiologie, 1 & 4 avenue de
Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France

Phone: (33) 1-47-52-73-53

Fax : (33) 1-47-52-70-01

e-mail: frederic.monot@ifp.fr

ABSTRACT

The MTBE-growing strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, is able to grow rapidly on *tert*-amyl methyl ether (TAME). *Tert*-amyl formate, *tert*-amyl alcohol and 2-hydroxy-2-methylbutyric acid were identified as intermediates of its degradation. The same monooxygenase is involved in the initial oxidation of both MTBE/TBA and TAME/TAA.

Only few studies deal with biodegradation of *tert*-amyl methyl ether (TAME), an octane enhancer used in reformulated gasoline (worldwide production of 1.5 Mt in 1999). It can be degraded under aerobic conditions by cometabolism with ethanol (4) and propane (1, 9) or by a mixed culture (6). *Tert*-amyl alcohol (TAA) was the only metabolite identified during TAME catabolism (4, 9).

Using a MTBE-growing strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, TAME was shown to be mineralized more rapidly than MTBE and ETBE when used as a sole carbon and energy source (2). A better understanding of the TAME degradation pathway could provide new information, especially about the initial attack on the ether bond which was supposed to be very recalcitrant to enzymatic attack and responsible for the low biodegradability of ethers. Degradation of TAME by *M. austroafricanum* IFP 2012 was studied to elucidate its degradation pathway and to compare it to that of MTBE.

Growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on TAME.

MM' medium was used for growth and corresponded to the MM medium (7) supplemented with 100 mg/liter of yeast extract, nitrogen source being (NH₄)₂SO₄ at 1.2 g/liter. The carbon source was added in tightly closed flasks. *M. austroafricanum* IFP 2012 was inoculated at an initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.1 and growth was monitored by measuring the OD₆₀₀. One OD₆₀₀ unit corresponded to a cell dry weight of 0.49 ± 0.04 g/liter (n= 5).

Whereas *M. austroafricanum* IFP 2012 completely degraded 876 µM of TAME within 4 days of growth (Figure 1), the growth on 811 µM MTBE required 15 days (2). On TAME, growth was regular and could not be divided into two phases as observed on MTBE (2). During growth on TAME, three intermediates were detected by GC or HPLC and identified as *tert*-amyl alcohol (TAA), *tert*-amyl formate (TAF) and hydroxymethylbutyric acid (HMBA)

FIGURE 1 : Growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on TAME. During growth, OD₆₀₀ (▲) and the concentrations of TAME (■), TAF (ω), TAA (o) and HMBA (×) were monitored.

by coelution with pure products (SIGMA) except *tert*-amyl formate (TAF) which was synthesized according to Stevens and Van Es (1964). After 24 h, from 750 μM of TAME, 572 and 123 μM of TAA and TAF, were respectively produced. Both compounds were then consumed leading to a transient accumulation of HMBA which was degraded after exhaustion of TAME, TAA and TAF.

The requirement of Co²⁺ for growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on 2-hydroxyisobutyric acid (HIBA) (2) was also observed for HMBA. Using 275 μM of HMBA, the mean growth rates were 4 and 14.6 mg of biomass/h/liter without and with CoCl₂ (1 mg/liter), respectively.

A TAME degradation pathway, including the detected intermediates, could be proposed (Figure 2). It was similar to that of MTBE (2) suggesting that the same enzymatic activities were probably involved in both TAME and MTBE metabolic pathways.

FIGURE 2 : Pathway for TAME degradation in *M. austroafricanum* IFP 2012.

Involvement of the MTBE/TBA monooxygenase during TAME degradation.

Since no MTBE-monooxygenase activity could be detected in crude extracts (François et al., 2002), resting cells were used as previously described (2) to identify the system involved in the initial attack of TAME. Resting cells produced on TBA, a good inducer of the MTBE/TBA monooxygenase, were able to degrade 94 ± 4 μ moles of TAME and 199 ± 1 μ moles of TAA without any lag phase. The specific activities were 327 ± 20 μ moles TAME/h/g of cell dry weight and 239 ± 6 μ moles TAA/h/g of cell dry weight.

Furthermore, TAME-grown resting cells produced propylene oxide from propylene at a rate of 897 ± 39 μ mole/h/g of cell dry weight. Acetylene was previously shown to prevent growth of *M. austroafricanum* IFP 2012 on MTBE and TBA (2). Similarly, no growth was observed on TAME and TAA in the presence of 0.4% (vol/vol) acetylene.

Induction of TAME and TAA degradation activity by TBA, propylene oxidation by TAME-grown resting cells and negative effect of acetylene on the growth on TAME and TAA are in favor of the involvement of the MTBE/TBA monooxygenase in TAME and TAA oxidations.

Protein patterns on SDS-PAGE of *M. austroafricanum* IFP 2012 crude obtained after growth on some fuel oxygenates and their metabolites, were compared (Figure 3). The patterns obtained for ethers and their related alcohols were similar. Particularly, a polypeptide of 66 kDa corresponding to the band previously named 66^b which was supposed to be involved in the oxidations of MTBE and TBA (2), was also present in crude extracts from

cells grown on TAME and TAA. The polypeptide corresponding to the band 66^a, probably responsible for HIBA decarboxylation (2), was also detected in crude extracts obtained after growth on TAA and HMBA. Another polypeptide corresponding to a new band also around 66 kDa (66^d) was strongly induced on both compounds. This new protein could be related to

M T Tb Ta Hi Hm G

Figure 3 : SDS-7.5% PAGE of *M. austroafricanum* IFP 2012 grown on various substrates. Portions (70µg) of the total proteins of crude extracts of cells grown on MTBE (lane M), TAME (lane T), TBA (lane Tb), TAA (lane Ta) , HIBA (lane Hi), HMBA (lane Hm) and glucose (G) were analyzed by SDS-7.5% PAGE.

an additional enzymatic activity required for the degradation of HMBA which, with respect to HIBA, contains an extra methyl group.

The present study is the first one proposing a TAME degradation pathway. It also pointed out that, although the same enzymatic systems seem to be involved in MTBE and

TAME degradation pathways of *M. austroafricanum* IFP 2012, growths on TAME and MTBE were different, especially considering the rates of degradation (the time required to consume the same ether concentration was four times lower in the case of TAME). This result suggests that the cleavage of the methoxy bond was not responsible for the slow conversion of MTBE to TBA. Therefore, changing a methyl group to an ethyl one on the *tert*-butyl structure (MTBE vs. TAME) improved growth. This difference could be due to substrate selectivity of the monooxygenase, but also to differences in metabolic regulation during the first steps of ether degradation as suggested elsewhere (3, 5, 8). We previously showed that MTBE/TBA monooxygenase activity of *M. austroafricanum* IFP 2012 was regulated by TBF (François et al. submitted for publication). Since TAME was rapidly metabolized, TAF probably does not play the same regulatory role on TAME degradation.

Acknowledgements

We thank P. Béguin for helpful discussions.

1. **Chang, S. W., S. S. Baek, and S. J. Lee.** 2001. Biodegradation of MTBE and other gasoline oxygenates by butane-utilizing microorganisms. *In* V. S. Magar, J. T. Gibbs, K. T. O'Reilly, M. R. Hyman, and A. Leeson (ed.), *Bioremediation of MTBE, alcohols and ethers*. Battelle. Columbus, Ohio.
2. **François, A., H. Mathis, D. Godefroy, P. Piveteau, F. Fayolle, and F. Monot.** 2002. Biodegradation of Methyl *tert*-Butyl Ether and Other Fuel Oxygenates by a New Strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2754-62.
3. **Hatzinger, P. B., K. McClay, S. Vainberg, M. Tugusheva, C. W. Condee, and R. J. Steffan.** 2001. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:5601-7.
4. **Hernandez-Perez, G., F. Fayolle, and J. P. Vandecasteele.** 2001. Biodegradation of ethyl *t*-butyl ether (ETBE), methyl *t*-butyl ether (MTBE) and *t*-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:117-21.
5. **Hyman, M., P. Kwon, K. Williamson, and K. O'Reilly.** 1998. Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms., p. 321-326. *In* G. B. Wickramanayake and R. E. Hincsee (ed.), *Natural attenuation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle. Columbus, Ohio.
6. **Park, K., and R. Cowan.** 1997. Effects of oxygen and temperature on the biodegradation of MTBE., p. 421-424, Preprints of extended abstracts, ACS National Meeting, Am Chem Soc, Div Environ Chem, vol. 37.
7. **Piveteau, P., F. Fayolle, J. P. Vandecasteele, and F. Monot.** 2001. Biodegradation of *tert*-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**:369-73.
8. **Salanitro, J.** 1995. Understanding the limitations of microbial metabolism of ethers used as fuel octane enhancers. *Current Opinion in Biotechnology* **6**:337-340.
9. **Steffan, R. J., K. McClay, S. Vainberg, C. W. Condee, and D. Zhang.** 1997. Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4216-22.

IV. Mise en évidence d'une activité alcool déshydrogénase dans le métabolisme du TBA par *M. austroafricanum* IFP 2012.

Lors de la détermination des intermédiaires de dégradation du MTBE, nous avons montré que l'acétone était un des métabolites du TBA. Par ailleurs, *M. austroafricanum* IFP 2012 est capable de croissance sur 2-propanol qui est métabolisé via l'acétone comme nous avons pu le montrer (Figure 16A, page 92). Salanitro et al. (1994) et Steffan et al. (1997) ont d'ailleurs proposé le 2-propanol puis l'acétone comme des intermédiaires de la dégradation de l'HIBA. La conversion du 2-propanol en acétone requiert l'intervention d'une déshydrogénase. Cependant, aucune activité alcool déshydrogénase NAD(P) dépendante n'a pu être mise en évidence dans les extraits bruts de *M. austroafricanum* IFP 2012 après croissance sur TBA.

IV.1. Identification d'une protéine induite lors de la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur TBA.

La comparaison de profils protéiques réalisés avec des extraits cellulaires préparés après croissance de la souche sur TBA ou glucose permet, notamment, de mettre en évidence l'apparition d'une bande d'environ 60 kDa (Figure 17) spécifiquement induite sur TBA. Après migration d'un extrait protéique sur gel SDS-PAGE et coloration à l'AmidoBlack, la bande d'intérêt est découpée et le contenu protéique séquencé après digestion à la trypsine. Une séquence peptidique de 25 acides aminés d'un fragment de cette protéine est obtenue :

KSFHPFPRAMMGPGAHEMVGPEALK

L'étude des similarités de cette séquence peptidique avec les séquences de protéines disponibles dans les banques de données (BLAST 2) ont révélé une forte similarité (86% d'identités et 99% de similarité) de cette séquence avec une méthanol : N,N'-diméthyl nitrosoaniline (NDMA) oxydoréductase d'*Amycolatopsis methanolica* (Bystrykh et al. 1993). Cette enzyme, définie comme spécifique des bactéries à Gram positif, a également été détectée chez *Rhodococcus erythropolis* (Nagy et al. 1995) et *Mycobacterium gastri* (Bystrykh et al. 1993).

Par la suite, cette bande protéique de 60 kDa a également été obtenue dans des extraits cellulaires de cellules cultivées sur HIBA, éthanol, acétone et 2-propanol (résultats non montrés).

M G T

Figure 17 : Gel SDS-7,5%PAGE d'extraits bruts (50 µg de protéines totales) de cellules cultivées sur glucose (G) ou TBA (T).
Le marqueur de poids moléculaire (M) est 7702S BioLabs.

IV.2. Mise en évidence d'une activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase chez *M. austroafricanum* IFP 2012.

La similarité de la séquence peptidique de la protéine induite sur TBA chez *M. austroafricanum* IFP 2012 avec celle de la méthanol : NDMA oxydoréductase de *Amycolatopsis methanolica* nous a conduit à essayer la NDMA comme accepteur artificiel d'électrons dans les extraits bruts à la place du NAD(P). Ainsi, une réduction de la NDMA peut être mise en évidence en présence de 2-propanol, d'éthanol ou de méthanol (Figures 18 et 19) dans des extraits cellulaires de *M. austroafricanum* IFP 2012 préparés sur TBA. Le fait que des extraits bruts de cellules cultivées sur glucose ne présentent ni l'activité alcool : NDMA oxydoréductase ni la bande de 60 kDa confirme la relation entre ces deux caractéristiques et leur inductibilité.

Figure 18 : Réduction du NDMA dans des extraits bruts de cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012.

L'activité a été testée en présence d'éthanol (■, 20 mM), de méthanol (◆, 25 mM) ou sans alcool (◇). L'activité dans un extrait brut de cellules cultivées sur glucose a été testée en présence d'éthanol (x). La quantité d'extrait cellulaire utilisée correspond à 200 µg de protéines totales.

On constate une importante activité endogène de réduction de la NDMA importante (témoin sans ajout d'alcool). Cette dégradation endogène doit être due à la persistance du substrat de l'enzyme dans les extraits bruts. Cette activité endogène n'a pas diminué après dialyse des extraits bruts pendant une nuit à 4°C.

L'activité éthanol : NDMA oxydoréductase est supérieure à l'activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase dans des extraits bruts de cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012 cultivées sur TBA.

Il est intéressant de constater qu'une activité méthanol : NDMA oxydoréductase est détectable dans les extraits bruts de cellules cultivées sur TBA (Figure 18). Bien que plus

faible que l'activité vis-à-vis de l'éthanol, cette activité est peut-être à relier à la capacité de croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur méthanol (cf. article 2). Compte tenu de la faible production de biomasse sur ce substrat, des extraits bruts sur méthanol n'ont pu être réalisés afin de vérifier l'induction de l'activité méthanol : NDMA oxydoréductase par le méthanol. Cependant, l'identification de cette activité méthanol : NDMA oxydoréductase est intéressante car elle est spécifique de bactéries méthylophiles à Gram positif puisqu'elle a été détectée chez *Amycolatopsis methanolica* et *Mycobacterium gastri* (Bystrykh et al., 1993a) et *M. austroafricanum* IFP 2012 (ce travail). De plus, d'après Schenkels et Duine (2000), ce type d'activité alcool : NDMA oxydoréductase pourrait jouer un rôle de conversion des alcools et des aldéhydes lors de limitations en cofacteurs. Cette indication est importante pour notre étude puisque la limitation en cofacteurs (NAD(P)) est une hypothèse possible à la faible biodégradabilité du MTBE. L'induction d'une activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase permettrait alors à *M. austroafricanum* IFP 2012 de poursuivre le catabolisme sans puiser dans le pool de NAD(P) de la cellule.

Figure 19: Réduction de NDMA par des extraits cellulaires de *M. austroafricanum* IFP 2012.

Les essais sont réalisés en présence de 2-propanol (▲, 33 mM) ou d'éthanol (■, 25mM) dans des extraits bruts de cellules cultivées sur TBA. Deux témoins sont réalisés : cellules cultivées sur TBA mais aucun alcool n'est ajouté pour l'essai (◇) et des cellules cultivées sur glucose avec de l'éthanol (25 mM) pendant l'essai (x). La quantité d'extrait cellulaire utilisée correspond à 200 µg de protéines totales.

IV.3. Détermination des constantes cinétiques de l'activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase.

L'activité 2-propanol : NDMA oxydoréductase variant en fonction de la concentration initiale en 2-propanol (figure 20), les constantes V_m et K_m de l'enzyme vis-à-vis du 2-propanol ont été déterminés dans les extraits bruts par une représentation de Lineweaver-Burk (Figure 20). Ces valeurs de V_m et de K_m sont égales à $182 \mu\text{moles NDMA réduit.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de protéines totales et $0,11 \text{ mM}$, respectivement ont été déterminées.

Figure 20 : Réduction du NDMA par des extraits cellulaires ($200 \mu\text{g}$ de protéines totales) de *M. austroafricanum* IFP 2012 cultivé sur TBA testée en présence de 0 (\diamond), $0,066$ (\blacksquare), $0,33$ (\blacktriangle), $0,66$ (\times), $6,6 \text{ mM}$ (\bullet) de 2-propanol.
En vignette : représentation de Lineweaver-Burk.

V. Transformations plasmidiques des Mycobactéries.

V.1. Intérêt de la transformation génétique par les gènes *eth*.

Une des solutions proposées par White et al. (1996) pour mieux comprendre les réactions de clivage des liaisons éthers consiste à avoir recours au génie génétique afin d'améliorer les capacités de dégradation de ces composés par les micro-organismes. Par ailleurs, les études précédentes ont mis en évidence le spectre de dégradation très particulier de *M. austroafricanum* IFP 2012 vis-à-vis des éthers carburants : l'ETBE étant le plus récalcitrant à la biodégradation par ce micro-organisme.

Un cytochrome P450 est induit lors de la dégradation de cet éther par *R. ruber* IFP 2001. Les gènes *eth*, *ethRABCD*, responsables de cette dégradation ont été préalablement identifiés et isolés sur le plasmide pGT222 par Chauvaux et al. (2001). Les différents gènes du cluster codent pour un activateur de transcription (*ethR*), une ferrédoxine réductase (*ethA*), un cytochrome P450 (*ethB*), une ferrédoxine (*ethC*) et une protéine de fonction inconnue (*ethD*).

L'introduction de ces gènes chez *M. austroafricanum* IFP 2012 a été envisagée. En cas d'expression des gènes *eth* chez *M. austroafricanum* IFP 2012, une telle transformation pourrait favoriser la dégradation de l'ETBE par la souche transformée. De plus, chez *R. ruber* IFP 2001, l'expression des gènes de dégradation de l'ETBE permet également la conversion du MTBE en TBA par cométabolisme (Urios et al., 2002).

Comme le système *eth*, à cytochrome P450, est différent de la MTBE/TBA mono-oxygénase non-hémique de *M. austroafricanum* IFP 2012 (article 2), son introduction dans cette souche pourrait alors conduire à une amélioration de la capacité de dégradation du MTBE chez *M. austroafricanum* IFP 2012.

En résumé, l'introduction des gènes *eth* de *R. ruber* IFP 2001 chez *M. austroafricanum* IFP 2012 a été tentée afin de i) élargir le spectre des capacités de dégradation des éthers carburants de la souche et ii) améliorer la croissance de cette souche sur MTBE par une assimilation différente.

V.2. Transformations des Mycobactéries par pCL4D.

Avant de construire le plasmide pMS100, des tests de transformations ont été réalisés avec le plasmide pCL4D afin de définir les conditions expérimentales.

Ces expériences ont été réalisées avec *M. austroafricanum* IFP 2012 et la souche hypercompétente de Mycobactérie, *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. Cette dernière est utilisée comme témoin lors des expériences d'électroporation et d'extraction des plasmides.

Après transformation par le plasmide pCL4D et expression, les transformants sont sélectionnés pour leur capacité à pousser sur milieu sélectif (LB gélosé contenant 20 µg/mL de kanamycine) à 30°C. Les transformants ayant intégré et exprimé le plasmide pCL4D sont capables de croître sur le milieu sélectif et leur phénotype est alors noté Kana^R.

La fréquence de transformation obtenue pour *M. austroafricanum* IFP 2012 n'est que de six transformants.µg⁻¹ d'ADN alors que ce nombre est supérieur à 3.10³ dans le cas de *M. smegmatis* mc² 155.

Afin de vérifier le contenu plasmidique des 6 transformants Kana^R de *M. austroafricanum* IFP 2012 obtenus, ceux-ci sont repris et mis en culture sur milieu sélectif. A l'issue de la croissance, des minipréparations d'ADN plasmidique sont réalisées mais aucune observation directe sur gel d'agarose n'a pu être obtenue du fait des mauvais rendements d'extraction. De ce fait, l'ADN plasmidique a été utilisé directement pour transformer des cellules compétentes d'*E. coli* TG1. Après expression et sélection sur LB supplémenté en kanamycine, des minipréparations d'ADN plasmidique des transformants Kana^R d'*E. coli* TG1 sont réalisées. Enfin, le profil de restriction du plasmide extrait est déterminé (Figure 21).

Les profils de restriction par l'enzyme KpnI de trois transformants d'*E. coli* TG1 transformées par les minipréparations de cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012 montrent la présence des deux fragments de 2,8 et 4,9 kb correspondants au dérivé du plasmide pUC19 et au fragment 4D, respectivement. Ainsi, la transformation de cellules compétentes d'*E. coli* TG1 par les minipréparations de transformants Kana^R de *M. austroafricanum* IFP 2012 a permis de mettre en évidence que la transformation de *M. austroafricanum* IFP 2012 par pCL4D a fonctionné.

M T A B C

Figure 21 : Profils de restriction des transformants Kana^R de *M. austroafricanum* IFP 2012. Les profils de restriction sont obtenus après digestion par l'enzyme KpnI du vecteur pCL4D (T) et de minipréparations de transformants Kana^R d'*E. coli* TG1 électroporés avec trois minipréparations de *M. austroafricanum* IFP 2012 Kana^R (A, B et C). Un marqueur de poids moléculaire (1kb Ladder) est également déposé (M).

V.3. Transformation des Mycobactéries par pMS100.

Compte tenu du faible taux de transformation de *M. austroafricanum* IFP 2012 par pCL4D et de la difficulté de mise en évidence du contenu plasmidique des transformants, la transformation par pMS100 a également été réalisée avec *M. smegmatis* mc² 155 afin de valider les techniques employées.

M. smegmatis mc² 155 est facilement transformée par pMS100 puisque l'efficacité observée est autour de $1,6 \cdot 10^3$ transformants. μg^{-1} ADN. Par contre aucun transformant de *M. austroafricanum* IFP 2012 n'a pu être obtenu.

Comme les minipreps d'ADN avaient un très faible rendement chez les Mycobactéries, la présence du plasmide pMS100 dans les transformants Kana^R a été mise en évidence par hybridation avec une sonde radioactive correspondant aux gènes *eth* (Figure 22).

Il est important de constater que seules les bactéries transformées par pMS100 hybrident avec la sonde radioactive. Cette hybridation spécifique permet de conclure à l'incorporation du plasmide dans les bactéries transformées. L'absence d'hybridation avec les gènes *eth* permet de conclure que ni la souche *M. smegmatis* mc² 155, ni le plasmide pCL4D n'ont de région similaire aux gènes *eth* dans leurs séquences d'ADN.

Lors de ces hybridations, des essais ont également été réalisés avec des cellules de *M. austroafricanum* IFP 2012 transformées ou non par le plasmide pCL4D. Aucune

hybridation n'ayant été obtenue, cela confirme l'absence d'analogies entre le génome de la souche et les gènes *eth*. En particulier, ce résultat démontre la différence génétique entre la MTBE/TBA mono-oxygénase de *M. austroafricanum* IFP 2012 et le système à cytochrome P450 de *R. ruber* IFP 2001.



Figure 22 : Hybridation de l'ADN de *M. smegmatis* mc2 155 transformée par pMS100 (a, b, c, d, e, f) ou pCL4D (g, h) avec une sonde radioactive de 3,5 kb correspondant aux gènes *eth*.

V.4. Croissance de *M. smegmatis* mc2 155 (pMS100) sur ETBE.

Afin de vérifier l'expression des gènes *eth* chez *M. smegmatis* mc2 155 (pMS100), des tests de croissance sur MM supplémenté en ETBE ont été réalisés.

La transformation de *M. smegmatis* mc² 155 par pMS100 confère à cette souche la capacité de pousser sur ETBE (Figure 23). Cependant, les transformants *M. smegmatis* mc² 155 (pMS100) ont une croissance lente sur ETBE. Le dosage du surnageant de culture en fin de croissance a permis de mettre en évidence du TBA dans le milieu. Ceci indique que les gènes *eth* introduits sont nécessaires et suffisants à l'oxydation de l'ETBE en TBA et que *M. smegmatis* mc² 155 n'a pas la capacité endogène de dégradation du TBA.

Afin de caractériser la capacité de dégradation de l'ETBE par *M. smegmatis* mc² 155 (pMS100), des tests en cellules quiescentes ont été réalisés (Figure 24). La dégradation de l'ETBE a été suivie par la production de TBA et cette expérience a permis de mettre en évidence que la production de TBA ($9,2 \mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de biomasse) est spécifique de *M. smegmatis* mc² 155 (pMS100) et que le TBA s'accumule stœchiométriquement sans être

reconsommé ultérieurement. Ce dernier résultat confirme l'absence de capacité de dégradation du TBA de *M. smegmatis* mc² 155.

Bien que l'introduction des gènes *eth* chez *M. smegmatis* mc² 155 permette à la souche transformée de dégrader l'ETBE, cette dégradation n'est pas aussi efficace que chez *R. ruber* IFP 2007, puisque la vitesse de production du TBA dans cette souche (180 $\mu\text{M}\cdot\text{h}^{-1}$; Hernandez et al., 2001) est vingt fois plus élevée pour des concentrations cellulaires équivalentes (0,11 et 0,16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ pour *R. ruber* IFP 2007 et *M. smegmatis* mc² 155, respectivement).

L'ensemble de ces résultats met en évidence que l'introduction des gènes *eth* dans une souche autre que *R. ruber* IFP 2007 ne permet pas de restituer une capacité de dégradation de l'ETBE aussi importante qu'avec la souche d'origine.

Figure 23 : Croissance sur ETBE de *M. smegmatis* mc² 155 transformée (■) ou non (o) par pMS100. 740 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'ETBE était régulièrement ajouté (flèche).

Figure 24 : Production de TBA lors de la dégradation de 100 μM d'ETBE par des cellules quiescentes de *M. smegmatis* mc² 155 transformée (■) ou non (o) par pMS100. $\text{OD}_{600} = 0.291$.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

L'élucidation des raisons de la mauvaise biodégradabilité du MTBE est importante pour éclairer la controverse concernant son utilisation. Jusqu'à la découverte d'un micro-organisme capable de croissance sur MTBE, *R. gelatinosus* PM1 (Hanson *et al.*, 1999), les résultats obtenus pouvaient laisser supposer que seul le processus de cométabolisme pouvait permettre la biodégradation du MTBE. Néanmoins, le rendement en biomasse de cette souche sur MTBE est très faible (0,18 g masse sèche.g⁻¹MTBE), ce qui rend vraisemblablement son étude difficile. Par la suite, une nouvelle souche *H. flava* ENV735 a été isolée (Steffan *et al.*, 2000 ; Hatzinger *et al.*, 2001) pour sa capacité à utiliser le MTBE comme substrat de croissance. En présence d'extrait de levure, cette souche a un bon rendement en biomasse (0,4 g masse sèche.g⁻¹MTBE). Dans ces deux cas, les auteurs n'ont pas déterminé la voie métabolique, ni mis en évidence les principales activités enzymatiques impliquées ainsi que les éléments de régulation intervenant. Les seuls éléments connus pouvant se résumer au schéma 2 :

Schéma 2 : Dégradation du MTBE par *H. flava* ENV 735 et *R. gelatinosus* PM1.

①, ② : activités mono-oxygénases.

L'étude que nous avons réalisée avec la souche *M. austroafricanum* IFP 2012 a apporté d'importants éléments de compréhension du mécanisme de dégradation du MTBE. Jusqu'à présent, il n'avait été étudié que dans des cas de cométabolisme mettant en œuvre des souches dégradant des alcanes. Nous allons reprendre les différents points et les perspectives nouvelles qu'a permis de dégager ce travail.

1-Intermédiaires de dégradation.

Bien qu'isolée pour sa capacité à utiliser le TBA comme substrat de croissance, *M. austroafricanum* IFP 2012 s'est révélée également capable d'utiliser le MTBE ou le TAME comme seule source de carbone et d'énergie, l'ETBE étant mal biodégradé par ce micro-organisme. Les voies métaboliques du MTBE et du TAME ont pu être partiellement élucidées chez *M. austroafricanum* IFP 2012. En effet, pour la première fois, lors de la dégradation du MTBE comme seule source de carbone et d'énergie, le TBF, le TBA, l'HIBA

et l'acétone ont pu être mis en évidence comme intermédiaires de sa dégradation. De même, lors de la dégradation du TAME, le TAF, le TAA et l'HMBA ont été détectés. Les similitudes entre les métabolites intermédiaires accumulés suggèrent que les mêmes systèmes enzymatiques sont impliqués lors de la dégradation du TAME et du MTBE chez *M. austroafricanum* IFP 2012.

2-Oxydation du MTBE.

Concernant la première étape de dégradation du MTBE par *M. austroafricanum* IFP 2012, nous avons pu montrer qu'elle mettait en œuvre une mono-oxygénase non-hémique et inductible. Nos résultats semblent indiquer que la même enzyme est responsable de l'oxydation du TAME et des alcools tertiaires dérivés, le TBA et le TAA. Seule une caractérisation biochimique et/ou génétique apporterait des arguments définitifs pour l'implication de la même enzyme. Le système impliqué dans l'attaque initiale du MTBE et du TAME aboutit au TBF et au TAF, respectivement, via la formation d'un intermédiaire de type hémiacétal (Figure 6). Un tel hémiacétal est généralement considéré comme instable bien que certains auteurs considèrent que sa dégradation pourrait faire intervenir une déshydrogénase (Hardison et al., 1997 ; Hyman, communication au congrès international de l'IFP, « Microbiology of hydrocarbons : state of the art and perspectives ». Rueil-Malmaison, France, 6-7 juin 2002). Cependant, une telle activité enzymatique sera difficile à mettre en évidence en raison de l'instabilité des substrats, qui ne sont pas disponibles commercialement, et de l'existence de nombreuses déshydrogénases dans les micro-organismes.

3-Hydrolyse du TBF.

Le devenir du TBF est un point qui restait obscur. Nous avons pu, dans le cas de *M. austroafricanum* IFP 2012, montrer l'intervention d'une estérase lors de son hydrolyse. Cette hydrolyse enzymatique se fait à une vitesse dix fois supérieure à l'hydrolyse abiotique du TBF qui était pourtant estimée comme le processus prédominant, sinon unique, de conversion du TBF en TBA. Par conséquent, l'absence d'une activité estérase peut constituer une éventuelle limitation à la croissance de micro-organismes sur MTBE même s'ils possèdent une mono-oxygénase efficace pour l'attaque de la liaison alkyl. L'hydrolyse du TBF par l'estérase conduit également à la formation de formiate. Cette apparition n'a pu être mise en évidence lors de la dégradation du MTBE par *M. austroafricanum* IFP 2012 mais nous avons montré que cette souche avait une activité méthylotrophe (puisque'elle était capable de croître sur méthanol) probablement responsable de la minéralisation rapide du

formiate au fur et à mesure de sa formation. Ceci est d'ailleurs confirmé par la valeur du taux de recouvrement en carbone sur MTBE qui est de $99,7 \pm 3,9\%$ ce qui montre bien qu'aucun intermédiaire n'est accumulé. Ainsi, grâce à l'étude de ces premières étapes, nous avons pu éliminer la possibilité de formation de formaldéhyde chez *M. austroafricanum* IFP 2012 alors que cela avait été montré chez *Graphium* sp. (Hardison et al., 1997) et envisagé par Steffan et al. (1997 ; Figure 5) et par Hatzinger *et al.* (2001). Ces derniers ont étudié la toxicité du formaldéhyde sur les systèmes enzymatiques et/ou sur les micro-organismes au cours de la dégradation du MTBE par *H. flava* ENV735. La production de formaldéhyde et sa toxicité bien connue pour les micro-organismes ont été une des raisons invoquées pour expliquer la lente biodégradation du MTBE.

4-Oxydation du TBA.

De nombreux éléments convergent indiquant que l'oxydation ultérieure du TBA fait intervenir la même mono-oxygénase que l'oxydation du MTBE chez *M. austroafricanum* IFP 2012 (mêmes profils protéiques, mêmes inhibiteurs, induction des deux activités par le TBA) contrairement à ce qui a été observé pour *R. gelatinosus* PM1 (Deeb et al., 2000) et *H. flava* ENV735 (Hatzinger et al., 2001). Nous n'avons pu détecter le produit direct de cette oxydation mais nous avons mis en évidence la présence dans le milieu de culture de l'acide α -hydroxyisobutyrique (HIBA).

5-Dégradation de l'HIBA via le 2-propanol et l'acétone.

L'HIBA est ensuite vraisemblablement décarboxylé en 2-propanol puis oxydé en acétone ; ce dernier a été mis en évidence chez *M. austroafricanum* IFP 2012. La décarboxylation fait intervenir une enzyme particulière dont l'activité requiert la présence dans le milieu de culture d'ions Co^{2+} qui ne sont pas inclus dans une structure de type corrinnoïde. En l'absence d'ions cobalt, la croissance est mauvaise sur HIBA spécifiquement (et sur TBA et MTBE par voie de conséquence). Par contre, l'absence de cobalt n'a pas d'influence lors de la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur les produits de dégradation de l'HIBA (2-propanol et l'acétone). De plus, il faut noter que cette activité décarboxylase et son exigence en ions cobalt ne semblent pas être spécifiques de la souche à Gram-positif *M. austroafricanum* IFP 2012. En effet, la souche à Gram-négatif *Burkholderia cepacia* IFP 2003, capable de croissance sur TBA, requiert aussi cet ion pour assimiler le TBA (Piveteau et al., 2001) et plus particulièrement l'HIBA (résultats non montrés).

L'acétone a été détecté comme intermédiaire de dégradation du TBA. Il est supposé être produit par déshydrogénation du 2-propanol généré par la décarboxylation de l'HIBA (Figure 6). L'implication du 2-propanol comme intermédiaire de dégradation du HIBA est envisageable chez *M. austroafricanum* IFP 2012 puisque : (i) *M. austroafricanum* IFP 2012 est capable de croissance sur 2-propanol, (ii) au cours de la croissance sur 2-propanol, celui-ci est d'abord converti en acétone qui est ensuite utilisé pour la croissance (Figure 16), et (iii) une activité alcool : NDMA oxydoréductase a été mise en évidence en présence de 2-propanol dans les extraits cellulaires de *M. austroafricanum* IFP 2012 obtenus après croissance sur TBA. Cette dernière activité enzymatique est également très intéressante puisqu'elle est rare et que l'accepteur d'électrons naturel n'a pas été déterminé dans le cas de la dégradation du 2-propanol chez *M. austroafricanum* IFP 2012. Sa mise en œuvre dans la voie de dégradation du MTBE permet peut-être à *M. austroafricanum* IFP 2012 de s'affranchir de la disponibilité en coenzyme. Cet élément ayant également été évoqué comme une des limitations possibles à la mauvaise biodégradabilité du MTBE.

Enfin, nous avons déterminé qu'une mono-oxygénase intervenait dans l'oxydation de l'acétone. De plus, celle-ci est différente de la MTBE/TBA monooxygénase puisque, contrairement à cette dernière, l'addition d'acétylène n'a pas d'effet inactivateur sur son activité.

6-Régulation du métabolisme.

Nous avons également mis en évidence le rôle central du TBF dans les processus de régulation métabolique de la dégradation du MTBE chez *M. austroafricanum* IFP 2012. En effet, l'addition de TBF au cours d'expériences de dégradation du MTBE en resting cells (dans un ratio molaire TBF/MTBE de 1/3 seulement) se traduit par une baisse de près de 30% aussi bien des vitesses de dégradation du MTBE et du TBA (produit à partir du MTBE) que de la vitesse de production du TBA. De plus, le TBA produit à partir de TBF est dégradé uniquement quand la concentration résiduelle en TBF est faible. Il semble donc que la mono-oxygénase responsable de l'oxydation du MTBE et du TBA subit une régulation négative par le TBF. Celle-ci évite une accumulation trop forte de TBF dans les cellules qui serait sinon inévitable étant donné la différence de vitesse de dégradation entre le MTBE ($24,4 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasse) et le TBF ($6,1 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasse). Ce rôle régulateur du TBF avait également été envisagé par Salanitro (1995) et Hyman et al. (1998). La présence de TBF a, bien sûr, également une influence sur la dégradation du TBA puisque la même mono-oxygénase est impliquée. A cet égard, la coexistence de deux substrats

(MTBE et TBA) pour la même enzyme peut être à l'origine d'autres processus de régulation car cette mono-oxygénase semble avoir une affinité beaucoup plus forte pour le MTBE que pour le TBA.

Il faut par ailleurs noter que la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur TAME est beaucoup plus rapide que celle sur MTBE. En effet, alors que 876 μM de TAME sont dégradés en 3 jours et qu'au bout de quatre jours plus aucun intermédiaire métabolique n'est détectable (article 4, Figure 1), 14 jours sont nécessaires à la dégradation de 740 μM de MTBE par cette même souche (article 2, Figure 1). Par ailleurs, les activités spécifiques de dégradation du TAME et du MTBE de cellules quiescentes sont du même ordre (327 et 597 $\mu\text{moles.h}^{-1}.\text{min}^{-1}$ pour le TAME et MTBE, respectivement). Ces résultats montrent que ce n'est pas directement l'attaque initiale de la liaison éther qui est à l'origine de la récalcitrance à la biodégradation de ces composés, comportant la même liaison méthoxy mais probablement des processus de régulations différents.

7-Perspectives.

L'ensemble de nos résultats a permis de faire évoluer les connaissances du métabolisme du MTBE de façon conséquente (schéma 3) mais de nombreuses questions restent à résoudre. Chez *M. austroafricanum* IFP 2012, la dégradation des éthers carburants est influencée par leur structure et des exigences nutritionnelles spécifiques. Avec *M. austroafricanum* IFP 2012, nous disposons d'un outil de choix et probablement original. Les bons rendement et vitesse de croissance ainsi que l'inductibilité de la MTBE/TBA mono-oxygénase par le TBA facilitent la production de cellules actives sur MTBE, à la différence des souches *H. flava* ENV 735 et *R. gelatinosus* PM1 ayant deux systèmes distincts de dégradation du MTBE et du TBA.

La différence de réactivité entre le TAME, le MTBE et l'ETBE peut être mise à profit pour mieux cerner les processus de régulation : affinité vis-à-vis de ces substrats et de leurs intermédiaires (TAF et *tert*-butyl acétate, par exemple). L'étude de ces enzymes pourrait être d'un apport fondamental pour comprendre certains mécanismes de régulation. Il faudrait également purifier, afin de mieux les caractériser, les différentes activités enzymatiques mises en évidence qui sont toutes assez rares et nouvelles et leur étude présente donc un intérêt d'un point de vue de l'acquisition de connaissances (MTBE/TBA mono-oxygénase, TBF estérase, HIBA décarboxylase à cobalt, 2-propanol : NDMA oxydoréductase et acétone mono-oxygénase).

Schéma 3 : Voie de dégradation du MTBE chez *M. austroafricanum* IFP 2012.

- ① : MTBE/TBA mono-oxygénase ; ② : activité TBF estérase ; ③ : décarboxylase à Co^{2+} ;
④ : 2-propanol : NDMA oxydoréductase. * : compétition entre le MTBE et le TBA.
Ⓜ : régulation négative

Par ailleurs, il serait crucial de caractériser les gènes impliqués dans l'oxydation initiale du MTBE. Ce travail de génétique permettrait, entre autres, de parvenir à une compréhension fine des mécanismes de régulation.

Il serait également nécessaire de comparer les différents systèmes dont les micro-organismes semblent disposer pour la dégradation des éthers-carburants. A l'heure actuelle, seuls les gènes *eth* de *R. ruber* IFP 2001, responsables de la dégradation du MTBE et de l'ETBE, sont connus (Chauvaux et al., 2001). Compte tenu des physiologies très différentes des souches pures dégradant ces éthers, il est probable que des systèmes différents soient impliqués. Une telle diversité est étonnante mais rassurante sur les moyens déployés par le monde vivant. La connaissance de ces gènes permettrait de disposer d'outils indispensables pour étudier cette diversité, pour cerner les systèmes les plus fréquemment mis en œuvre dans le cas de pollutions et pour évaluer les capacités d'atténuation naturelle du MTBE et des autres éthers-carburants dans l'environnement.

Ce dernier point, ainsi que la connaissance des raisons à la limitation de la biodégradabilité des éthers-carburants, sont des données qui sont fondamentales pour avoir un avis objectif sur l'impact qu'ont eu –et auront- ces produits utilisés de façon massive sur les eaux et les sols.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achten C, Kolb A, Puttmann W (2002a) Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in river and wastewater in Germany. *Environ Sci Technol* 36:3652-3661
- Achten C, Kolb A, Puttmann W (2002b) Occurrence of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in riverbank filtered water and drinking water produced by riverbank filtration. *Environ Sci Technol* 36:3662-3670
- Achten C, Puttmann W (2000) Detremination of methyl *tert*-butyl ether in surface water by use of solid-phase microextraction. *Environ. Sci. Technol.* 34 : 1359-1364
- Ahmed FE (2001) Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. *Toxicol Lett* 123:89-113
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman, DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein databasesearch programs. *Nucleic Acids Res.* 25 : 3389-3402
- Ashraf W, Mihdhir A, Murrell JC (1994) Bacterial oxidation of propane FEMS *Microbiol Lett* 122 :1-6
- Ator MA, Ortiz de montellano PR (1990) Mechanism-based (suicide) enzyme inactivation. In : *The enzymes*, vol XIX. Academic Press, New-York, pp 213-281
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1990) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, N.Y
- Babel W (1984) Utilization of C₁ compounds by acidophiles. *In* : RL Crawford and RS Hanson (eds), *Microbial growth on C₁ compounds*. American Society for Microbiology, Washington DC, pp. 141-146
- Beatrix B, Bendrat K, Rospert S, Buckel W (1990) The biotin-dependent sodium ion pump glutaconyl-CoA decarboxylase from *Fusobacterium nucleatum* (subsp. *nucleatum*). Comparison with the glutaconyl-CoA decarboxylases from gram-positive bacteria. *Arch Microbiol* 154:362-369
- Bédard C, Knowles R (1989) Physiology, biochemistry, and specific inhibitors of CH₄, NH₄⁺, and CO oxidation by methanotrophs and nitrifiers. *Microbiol Rev* 53:68-84
- Belpoggi F, Soffritti M, Filippini F, Maltoni C (1997) Results of long term experimental studies on the carconogenicity of methyl *tert*-butyl ether (MTBE). *Ann New York Acad Sci* 837:77-95

- Bernauer U, Amberg A, Scheutzow D, Dekant W (1998) Biotransformation of ^{12}C - and 2- ^{13}C -labeled methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-butyl alcohol in rats: identification of metabolites in urine by ^{13}C nuclear magnetic resonance and gas chromatography/mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 11:651-658
- Bird MG, Burleigh-Flayer HD, Chun JS, Douglas JF, Kneiss JJ, Andrews LS (1997) Oncogenicity study of inhaled methyl *tertiary*-butyl ether (MTBE) in CD-1 mice and F-344 rats. *J Appl Toxicol* 17:S45-S55
- Blackman RL, Spence JM, Field LM, Devonshire AL (1995) Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Mycus persicae* (Homoptera :Aphidae). *Heredity* 75 :297-302
- Bleicher K, Winter J (1991) Purification and properties of F_{420} - and NADP-dependent alcohol dehydrogenases of *Methanogenium liminatans* and *Methanobacterium palustre*, specific for secondary alcohols. *Eur J Biochem* 200 :43-51
- Borden RC, Daniel RA, LeBrun LE (1997) Intrinsic biodegradation of MTBE and BTEX in a gasoline-contaminated aquifer. *Water Resour Res* 33 :1105-1115
- Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE (2001a) Methyl *t*-butyl ether mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions. *Appl Environ Microbiol* 67:1975-1978
- Bradley PM, Chapelle FH, Landmeyer JE (2001b) Effect of redox conditions on MTBE biodegradation in surface water sediments. *Environ Sci Technol* 35 :4643-4647
- Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH (1999) Aerobic mineralization of MTBE and *tert*-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms. *Environ Sci Technol* 33:1877-1879
- Bradley PM, Landmeyer JE, Chapelle FH (2001c) Widespread potential for microbial MTBE degradation in surface-water sediments. *Environ Sci Technol* 35:658-662
- Bränden C-I, Jörnvall H, Eklund H, Furugren B (1975) Alcohol dehydrogenases. In : PD Boyer (ed), *The enzymes*, vol XI. Academic Press, New-York, pp 103-190
- Brune, A, Schink, B. 1992. Phloroglucinol pathway in the strictly anaerobic *Pelobacter acidigallici* : fermentation of trihydroxybenzenes to acetate via triacetic acid. *Arch. Microbiol.* 157 : 417-424.
- Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R (2001) Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J. Clin. Microbiol.* 39 : 2799-2806

- Bystrykh L, Gorovukhina NI, van Ophem PW, Hektor HJ, Dijkhuizen, Duine JA (1993) Formaldehyde dismutase activities in Gram-positive bacteria oxidizing methanol. *J Gen Microbiol* 139 :1979-1985
- Bystrykh L, Vonck J, van Bruggen EF, van Beeumen J, Samyn B, Govorukhina NI, Arfman N, Duine JA, Dijkhuizen L (1993) Electron microscopic analysis and structural characterization of novel NADP(H)-containing methanol :N,N'-dimethyl-4-nitrosoaniline oxidoreductases from the gram-positive methylotrophic bacteria *Amycolatopsis methanolica* and *Mycobacterium gastri* MB19. *J Bacteriol* 175 :1814-1822
- Cederbaum A, Cohen G (1980) Oxidative demethylation of *t*-butyl alcohol by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 97:730-736
- Chang SW, Baek SS, Lee SJ (2001) Biodegradation of MTBE and other gasoline oxygenates by butane-utilizing microorganisms. *In* : VS Magar, JT Gibbs, KT O'Reilly, MR Hyman and A Leeson (eds), *Bioremediation of MTBE, alcohols and ethers*. Battelle Press. Columbus Ohio, pp.
- Chauvaux S, Chevalier F, Le Dantec C, Fayolle F, Miras I, Kunst F, Beguin P (2001) Cloning of a genetically unstable cytochrome P-450 gene cluster involved in degradation of the pollutant ethyl *tert*-butyl ether by *Rhodococcus ruber*. *J Bacteriol* 183:6551-6557
- Chen CI, Hohnbaum H, Smith A, Scow K, Chang D, Jackson K (2000) Scale-up of PM1 MTEB degrading culture production for field application. *In* : DL Drogos and AL Diaz (eds). *Exploring the environmental issues of mobile, recalcitrant compounds in gasoline*. ACS, San Fransisco, Calif. pp. 282-283
- Cirvello JD, Radovsky A, Heat JE, Fornell DR, Lindamood C III (1995) Toxicity and carcinogenicity of *t*-butyl alcohol in rats and mice following chronic exposure in drinking water. *Toxicol Ind Health* 11:151-165
- Clark DD, Ensign SA (1999) Evidence for an inducible nucleotide-dependent acetone carboxylase in *Rhodococcus rhodocrous* B276. *J. Bacteriol.* 181 : 2752-2758
- Corcho D, Watkinson RJ, Lerner DN (2000) Cometabolic degradation of MTBE by a cyclohexane-oxidising bacteria. *In*: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Alleman BC, Magar VS (eds) *Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle, Columbus, Ohio, pp 183-189
- Dalrymple BP, Swadling Y, Cybinski DH, Xue GP (1996) Cloning of a gene encoding cinnamoyl ester hydrolase from the ruminal bacterium *Butyrvibrio fibrisolvens* E14 by a novel method. *FEMS Lett* 143 :115-120

- Dalziel K (1975) Kinetics and mechanism of nicotinamide-nucleotide-linked dehydrogenases. In : PD Boyer (ed), The enzymes, vol XI. Academic Press, New-York, pp 1-60
- Deeb RA, Hu HY, Hanson JR, Scow KM, Alvarez-Cohen L (2001) Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. Environ Sci Technol 35:312-317
- Deeb RA, Nishino S, Spain J, Hu H-Y, Scow K, Alvarez-Cohen L (2000) MTBE and benzene biodegradation by a bacterial isolate via two independent monooxygenase-initiated pathway. Preprints of extended abstracts, ACS Natl. Meet., Am. Chem. Soc., Div. Environ. Chem. 40(1), pp. 280-282.
- Deeb RA, Scow KM, Alvarez-Cohen L (2000) Aerobic MTBE biodegradation: an examination of past studies, current challenges and future research directions. Biodegradation 11:171-186
- Dernbach LS (2000) The complicated challenge of MTBE cleanups. Environ Sci Technol 34:516A-521A
- Dimroth P (1987) Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling bacteria. Microbiol Rev 51 :320-340
- Dourson ML, Felter SP (1997) Route-to-route extrapolation of the toxic potency of MTBE. Risk Anal 17 :717-725
- Duine JA, Frank J, Berkhout MPJ (1984) NAD-dependent, PQQ-containing methanol dehydrogenase : a bacterial dehydrogenase in a multienzyme complex. FEBS Lett 168 :217-221
- Dunn M, Bernhard SA (1971) Rapid kinetic evidence for adduct formation between the substrate analog *p*-nitroso-N,N-dimethylamine and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide during enzymic reduction. Biochemistry 10 :4569-4575
- Eggink G, Engel H, Meijer W, Otton J, Kingma J, Witholt B (1988) Alkane utilization in *Pseudomonas oleovorans*. J Biol Chem 263:13400-13406
- Fayolle F, Hernandez-Perez G, Le Roux F, Vandecasteele JP (1998) Isolation of two aerobic bacterial strains that degrade efficiently ethyl *t*-butyl ether (ETBE). Biotechnol Lett 20 :283-286
- Fayolle F, Le Roux F, Hernandez G, Vandecasteele JP (1999). Mineralization of ethyl *t*-butyl ether by defined mixed bacterial cultures. In : B.C. Aleman and A. Leeson (Eds), In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds. Batelle Press, Columbus, OH, pp. 25-30

- Fayolle F, Vandecasteele J-P, Monot F (2001) Microbial degradation and fate in the environment of methyl *tert*-butyl ether and related fuel oxygenates Appl Microbiol Biotechnol 56 :339-349
- Ferreira LMA, Wood TM, Williamson G, Faulds C, Hazlewood GP, Black GW, Gilbert HJ (1993) A modular esterase from *Pseudomonas fluorescens* subsp. *cellulosa* contains a non-catalytic cellulose-binding domain. Biochem J 294 :349-355
- Fortin N, Morales M, Nakagawa Y, Focht DD, Deshusses MA (2001) Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. Environ Microbiol 3 :407-416
- François A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F (2002) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Appl Environ Microbiol 68:2754-2762
- François A, Garnier L, Mathis H, Fayolle F, Monot F Roles of *tert*-butyl formate, *tert*-butyl alcohol and acetone in the regulation of methyl *tert*-butyl ether degradation by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. Soumis pour publication
- François A, Piveteau P, Fayolle F, Marchal R, Béguin P, Monot F (2001) Selection of a defined mixed culture for MTBE mineralization. In : VS Magar, JT Gibbs, KT O'Reilly, MR Hyman and A Leeson (eds). Bioremediation of MTBE, alcohols and ethers. Battelle Press, Columbus, Ohio. pp. 153-160
- Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, Chakrabarty S, Schopfer LM, Massey V (1990) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. J Biol Chem 265 :3793-3803
- Garnier PM, Auria R, Augur C, Revah S (1999) Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. Appl Microbiol Biotechnol 51:498-503
- Geissdörfer W, Kok RG, Ratajczak A, Helligwerf KJ, Hillen W (1999) The genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*. J Bacteriol 181 :4292-4298
- Gibson TJ (1984) Studies on the Epstein-Barr virus genome. Ph D thesis. Cambridge University, Cambridge, United Kingdom
- Guibet J (1997) Carburants et moteurs : Technologie-Energie-Environnement. Vol 1 et 2. Institut Français du Pétrole, Paris
- Hamamura N, Storfa RT, Semprini L, Arp DJ (1999) Diversity in butane monooxygenases among butane-grown bacteria. Appl Environ Microbiol 65:4586-4593

- Hamamura N, Yeager CM, Arp DJ (2001) Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardiodes* sp. strain CF8. *Appl Environ Microbiol* 67:4992-4998
- Hanson JR, Ackerman CE, Scow KM (1999) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl Environ Microbiol* 65:4788-92
- Hanson RS, Hanson TE (1996) Methanotrophic bacteria. *Microbiol Rev* 60:439-471
- Hardison LK, Curry SS, Ciuffetti LM, Hyman MR (1997) Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *tert*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Appl Environ Microbiol* 63:3059-3067
- Harmon FR, Goss NH, Wood HG (1982) Stabilization of the quaternary structure of transcarboxylase by cobalt (II) ions. *Biochemistry* 21:2847-2852
- Harms N, de Vries GE, Maurer K, Hoogendijk J, Stouthamer AH (1987) Isolation and nucleotide sequence of the methanol dehydrogenase structural gene from *Paracoccus denitrificans*. *J Bacteriol* 169:3969-3975
- Hartley WR, Englande AJ, Harrington DJ (1999) Health risk assessment of groundwater contaminated with methyl *tertiary* butyl ether (MTBE) *Water Sci Technol* 39 :315-320
- Hatzinger PB, Mc Clay K, Vainberg S, Tugusheva M, Condee CW, Steffan RJ (2001) Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by a pure bacterial culture. *Appl Environ Microbiol* 67:5601-5607
- He Z, Wiegel J (1996) Purification and characterization of an oxygen-sensitive, reversible 3,4-dihydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *J Bacteriol* 178 :3539-3543
- Hernandez-Perez G, Fayolle F, Vandecasteele JP (2001) Biodegradation of ethyl *t*-butyl ether (ETBE), methyl *t*-butyl ether (MTBE) and *t*-amyl methyl ether (TAME) by *Gordonia terrae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:117-21
- Hong JY, Wang YY, Bondoc FY, Yang CS, Lee M, Huang WQ (1997a) Rat olfactory mucosa displays a high activity in metabolizing methyl *tert*-butyl ether and other gasoline ethers. *Fundam Appl Toxicol* 40:205-210
- Hong JY, Yang CS, Lee M, Wang YY, Huang WQ, Tan Y, Patten CJ, Bondoc FY (1997b) Role of cytochromes P450 in the metabolism of methyl *tert*-butyl ether in human livers. *Arch Toxicol* 71:266-269
- Hou CT, Ratel R, Laskin AI, Barnabe N, Barist I (1983) Production of methyl ketones from secondary alcohols by cell suspensions of C2 to C4 *n*-alkane-grown bacteria. *Appl Environ Microbiol* 46:178-184

- Huang J, He Z, Wiegel J (1999) Cloning, characterization, and expression of a novel gene encoding a reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. J Bacteriol 181 :6856
- Hur H-G, Newman LM, Wackett LP, Sadowsky MJ (1997) Toluene 2 monooxygenase-dependant growth of *Burkholderia cepacia* G4/PR1 on diethylether. Appl Environ Microbiol 63:1606-1609
- Hutcheon DE, Arnold JD, ten Hove W, Boyle J, 3rd (1996) Disposition, metabolism, and toxicity of methyl *tertiary* butyl ether, an oxygenate for reformulated gasoline. J Toxicol Environ Health 47:453-464
- Hyman MR, Arp DJ (1992) $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ - and $^{14}\text{CO}_2$ -labelling studies of the *de novo* synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. J Biol Chem 267:1534-1545
- Hyman M, Kwon P, Williamson K, O'Reilly K (1998) Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganisms. In: Wickramanayake GB, Hinchee RE (eds) Natural attenuation of chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle, Columbus, Ohio, pp 321-326
- Hyman M, O'Reilly K (1999) Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria. In: Alleman BC, Leeson A (eds) In situ bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds. Batelle, Columbus, Ohio, pp 7-12
- Hyman M, Taylor C, O'Reilly K (2000) Cometabolic degradation of MTBE by *iso*-alkane-utilizing bacteria from gasoline impacted soils. In: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Alleman BC, Magar VS (eds) Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle, Columbus, Ohio, pp 149-155
- Hyman MR, Wood PM (1985) Suicidal inactivation and labeling of ammonia monooxygenase by acetylene. Biochem J 227:719-725
- Inoue T, Sunagawa M, Mori A, Imai C, Fukuda M, Takagi M, Yano K (1989) Cloning and sequencing the gene encoding the 72-kilodalton dehydrogenase from *Acetobacter aceti*. J Bacteriol 171 :3115-3122
- Jensen HM, Arvin E (1990) Solubility and degradability of the gasoline additive MTBE, methyl *tert*-butyl ether and gasoline compounds. In: Arendt F, Hinsenveld M, Van Den Brink W (eds) Contaminated soil'90, Kluwer, Dordrecht, pp 445-448
- Johnson R, Pankow J, Bender D, Price C, Zogorsky J (2000) MTBE. To what extent will past release contaminate community water supply wells? Environ Sci Technol 34:210A-217A

- Jörnvall H, Höög J-O, Bahr-Lindström H, Vallee BL (1987a) Mammalian alcohol dehydrogenases of three separate classes : intermediates between different enzymes and interclass isoenzymes. Proc Natl Acad Sci USA 84 :2580-2584
- Jörnvall H, Persson B, Jeffery J (1987b) Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. Eur J Biochem 167 :195-201
- Kane SR, Beller HR, Legler TC, Koester CJ, Pinkart HC, Halden RU, Happel AM (2001) Aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by aquifer bacteria from leaking underground storage tank sites. Appl Environ Microbiol 67:5824-5829
- Kato N, Yamagami T, Simao M, Sakazawa C (1986) Formaldehyde dismutase, a novel NAD-binding oxidoreductase from *Pseudomonas putida* F61. Eur J Biochem 156 :59-64
- Kay-Shoemaker JL, Watwood ME (1996) Limitations of the lignin peroxidase system of the white-rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*. Appl Microbiol Biotechnol 46:438-442
- Khalameyzer V, Fischer I, Bornscheuer UT, Altenbuchner J (1999) Screening, nucleotide sequence, and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. Appl Environ Microbiol 65 :477-482
- Kharoune M, Kharoune L, Lebeault JM, Pauss A (2001) Isolation and characterization of two aerobic bacterial strains that completely degrade ethyl *tert*-butyl ether (ETBE). Appl Microbiol Biotechnol 55:348-353
- Kintoshita S, Kakizono T, Kodota K, Das K, Taguchi H (1985) Purification of two alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* and their properties. Appl Microbiol Biotechnol 22 :249-254
- Klingenberg, M. 1958. Arch. Biochem. Biophys. 75 : 376
- Kobayashi M, Shimizu S (1999) Cobalt proteins. Eur J Biochem 261:1-9
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685
- Landmeyer JE, Chapelle FH, Herlong HH, Bradley PM (2001) Methyl *tert*-butyl ether biodegradation by indigenous aquifer microorganisms under natural and artificial oxic conditions. Environ Sci Technol 35:1118-1126
- Lien H, Zhang W (2001) Catalytic oxidation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether by bifunctional aluminium in the presence of dioxygen. In : In situ and ex situ treatment technologies. ACS, Chicago, IL. Vol 41, pp. 463-468

- Liu CY, Speitel GE Jr., Georgiou G (2001) Kinetics of methyl *t*-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol* 67:2197-2201
- MacKenzie KF, Eddy CK, Ingram LO (1989) Modulation of alcohol dehydrogenase isoenzyme levels in *Zymomonas mobilis* by iron and zinc. *J Bacteriol* 171 :1063-1067
- Mac Kintosh RW, Fewson CA (1987) Microbial aromatic alcohol and aldehyde dehydrogenases. In : *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*, Weiner H, Flynn TG (eds), Ala R. Liss, New-York, pp 259-273
- Machlin SM, Hanson RS (1988) Nucleotide sequence and transcriptional start site of the *Methylobacterium organophilum* XX methanol dehydrogenase structural gene. *J Bacteriol* 170 :141-148
- Mancini ER, Steen A, Rausina GA, Wong DC, Arnold WR, Gostomski FE, Davies T, Hockett JR, Stubblefield WA, Drottar KR, Springer TA, Errico P (2002) MTBE ambient water quality criteria development: a public/private partnership. *Environ Sci Technol* 36:125-129
- Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Eleventh edition. Budavari, S, O'Neil, MJ, Smith, A, Heckelman, PE (eds). Merck & Co., Inc. Rahway, NJ, USA.
- Miller MJ, Ferdinandi ES, Klan M, Andrews LS, Douglas JF, Kneiss JJ (1997) Pharmacokinetics and disposition of methyl *t*-butyl ether in Fischer-344 rats. *J Appl Toxicol* 17 Suppl 1:S3-12
- Mo K, Lora CO, Wanken AE, Javanmardian M, Yang X, Kulpa CF (1997) Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:69-72
- Mormile MR, Liu S, Suflita JM (1994) Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Environ Sci Technol* 28:1727-1732
- Nagy I, Schoofs G, Compennolle F, Proost P, Vanderleyden J, de Mot R (1995) Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothiate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J Bacteriol* 177:676-687
- Nakazawa T, Hayashi E (1978) Phtalate and 4-hydroxyphtalate metabolism in *Pseudomonas testosteroni*: purification and properties of 4,5-dihydroxyphtalate decarboxylase. *Appl Environ Microbiol* 36 :264-269

- Narhi LO, Fulco AJ (1986) Characterization of a catalytically self-sufficient 119 000-Dalton cytochrome P-450 monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 261:7160-7169
- Narhi LO, Fulco AJ (1987) Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* 262:6683-6690
- Nihlen A, Lof A, Johanson G (1998) Experimental exposure to methyl *tertiary*-butyl ether. I. Toxicokinetics in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 148:274-280
- Odenrantz JE (1998) Implications of MTBE for intrinsic remediation of underground fuel tank sites. *Remediation Summer*:7-16
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken S, Harel M, Remington SJ, Silman I (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Eng* 5 :197-211
- Omura T, Sato R (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem* 239:2370-2378
- Ortiz de Montellano PR, Kunze KL (1980) Inactivation of hepatic cytochrome P-450 by allenic substrates. *Biochem Biophys Res Commun* 94 :443-449
- Ortiz de Montellano PR, Mico BA (1980) Destruction of cytochrome P-450 by ethylene and other olefins. *Mol Pharmacol* 18:128-135
- O'Reilly KT, Moir ME, Taylor CD, Smith CA, Hyman MR (2001) Hydrolysis of tert-butyl methyl ether (MTBE) in dilute aqueous acid. *Environ. Sci. Technol.* 35 : 3954-3961
- Park K, Cowan RM (1997) Effects of oxygen and temperature on the biodegradation of MTBE. In: Preprints of extended abstracts, ACS National Meeting, Am Chem Soc, Div Environ Chem. Vol 37, pp 421-424
- Payne WJ, Wiebe WJ (1978) Growth yield and efficiency in chemosynthetic microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 32 :155-183
- Pearson WR (1996) Effective protein sequence comparison. *Methods Enzymol.* 266 : 227-258
- Peterson J, Lorence M, Amernech B (1990) Putidaredoxin reductase and putidaredoxin. Cloning, sequence determination, and heterologous expression of the protein. *J Biol Chem* 265:6066-6073
- Peterson J, Lu J, Geisselsoder J, Graham-Lorence S, Carmona C, Witney F, Lorence M (1992) Cytochrome P-450-terp: Isolation and purification of the protein and cloning and sequencing of this operon. *J Biol Chem* 267:14193-14203
- Petrovitch RM, Ruzicka FJ, Reed GH, Frey PA (1991) Metal cofactors of lysine 2,3 aminomutase. *J. Biol. Chem.* 266 : 7656-7660

- Picardeau, M, Le Dantec, C, Vincent, V (2000) Analysis of the internal replication region of a mycobacterial linear plasmid. *Microbiology* 146 : 305-313
- Piersma S, Visser AJWG, de Vries S, Duine JA (1998) Optical spectroscopy of nicotinoprotein alcohol deshydrogenase from *Amycolatopsis methanolica* : a comparison with horse liver alcohol dehydrogenase and UTP-galactose epimerase. *Biochemistry* 37 :3068-3077
- Piveteau P, Fayolle F, Le Penru Y, Monot F (2000) Biodegradation of MTBE by cometabolism in laboratory-scale fermentations. In: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Alleman BC, Magar VS (eds) *Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle, Columbus, Ohio, pp 141-148
- Piveteau P, Fayolle F, Vandecasteele JP, Monot F (2001) Biodegradation of *tert*-butyl alcohol and related xenobiotics by a methylotrophic bacterial isolate. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:369-373
- Plapp BV, Sogin D, Dworshack RT, Bohlken DP, Woenckhaus C, Reinhard J (1986) Kinetics of native and modified liver alcohol dehydrogenase with coenzyme analogues : isomerization of the enzyme-NAD complex. *Biochemistry* 25 :5396-5402
- Poet TS, Valentine J, Borghoff S (1997) Pharmacokinetics of *tertiary*-butyl alcohol in male and female Fischer 344 rats. *Toxicol. Lett.* 92:179-186
- Poupin P (1999) Etude génétique et physiologique de la dégradation de la morpholine, la pipéridine et la pyrrolidine par des Mycobactéries. Thèse de Doctorat, Université de Compiègne, France
- Prior SD, Dalton H (1985) Acetylene as a suicide substrate and active site probe for methane monooxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath). *FEMS Microbiol Lett* 29:105-109
- Puig-Grajales L, Tan NG, van der Zee F, Razo-Flores E, Field JA (2000) Anaerobic biodegradability of alkylphenols and fuel oxygenates in the presence of alternative electron acceptors. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:692-697
- Reed GH, Ballinger MD (1995) Characterization of a radical intermediate in the lysine 1,3 aminomutase reaction. *Methods Enzymol.* 258 : 362-379
- Reid MF, Fewson CA (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Critic Rev Microbiol* 20 :13-56
- Reuter JE, Allen BC, Richards RC, Pankow JF, Goldman CR, Scholl RL, Seyfried JS (1998) Concentrations, sources, and fate of the gasoline oxygenate methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in a multiple-use lake. *Environ Sci Technol* 32:3666-3672

- Robbins GA, Gilbert EJ (2000) MTBE : a conservative tracer for estimating biodegradation and hydrodynamic dispersion at underground tank sites. In : Tracers and modeling in hydrogeology. Proceedings TraM'2000 Conference, Liège, Belgium, May 2000. IAHS publ.n° 262,2000, pp 235-240
- Sakai Y, Tani Y (1992) Directed mutagenesis in an asporogenous methylotrophic yeast : cloning, sequencing, and one-step gene disruption of the 3-isopropylmalate dehydrogenase gene (LEU2) of *Candida boidinii* to derive doubly auxotrophic marker strains. J Bacteriol 174 :5988-5993
- Salanitro JP (1995) Understanding the limitations of microbial metabolism of ethers used as fuel octane enhancers. Current Opinion in Biotechnology 6:337-340
- Salanitro JP, Diaz LA, Williams MP, Wisniewski HL (1994) Isolation of a bacterial culture that degrades methyl *tert*-butyl ether. Appl Environ Microbiol 60:2593-2596
- Salanitro JP, Spinnler GE, Maner PM, Tharpe DL, Pickle DW, Wisniewski HL, Johnson PC, Bruce C (2001) *In situ* bioremediation of MTBE biobarriers of single or mixed cultures. In: Leeson A, Alleman BC, Alvarez PJ, Magar VS (eds) Bioaugmentation, Biobarriers, and Biogeochemistry., Battelle, Columbus, Ohio, pp 61-71
- Salanitro JP, Wisniewski HL (1996) Observations on the biodegradation and bioremediation potential of methyl *t*-butyl ether. Paper presented at the Southwestern Regional Conference of the National Ground Water Association
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T (1989) Molecular cloning – A laboratory manual/Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York, USA
- Savolainen H, Pfaffli P, Elovaara E (1985) Biochemical effects of methyl *tertiary*-butyl ether in extended vapour exposure of rats. Arch Toxicol 57:285-288
- Schenkels P, Duine JA (2000) Nicotinoprotein (NADH-containing) alcohol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis* DSM 1609 : an efficient catalyst for coenzyme independent oxidation of a broad spectrum of alcohols and the interconversion of alcohols and aldehydes. Microbiology 146 :775-785
- Schirmer M, Barker JF, Butler J, Church CD, Schirmer K (1998) Natural attenuation of MTBE at the Borden field site. In: Wickramanayake GB, Hinchee RE (eds) Natural attenuation. Chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle, Columbus, Ohio, pp 327-331
- Schoene B, Fleischmann RA, Remmer H, Von Oldershausen. HF (1972) Determination of drug metabolizing enzymes in needle biopsies of human liver. Eur J Clin Pharmacol 4:65-73

- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791
- Sluis MK, Small FJ, Allen JR, Ensign SA (1996) Involvement of an ATP-dependent carboxylase in a CO₂-dependent pathway of acetone metabolism by *Xanthobacter* strain Py2. *J. Bacteriol.* 178 : 4020-4026
- Smith DF, Kleindienst TE, Hudgens EE, Mc Iver CD, Bulalini J (1991) The photooxidation of methyl *tertiary* butyl ether. *Int J Chem Kinet* 23 :907-924
- Solano-Serena F, Marchal R, Casag rola S, Vasnier C, Lebeault JM, Vandecasteele JP (2000) A new *Mycobacterium* strain with extended degradation capacities for gasoline hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 : 2392-2399
- Somsamak P, Cowan RM, H ggbloom M (2001) Anaerobic biotransformation of fuel oxygenates under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 37:259-264
- Squillace PJ, Zogorski S, Wilber WG, Price CV (1996) Preliminary assessment of the occurrence and possible sources of MTBE in groundwater in the United States, 1993-1994. *Environ Sci Technol* 30:1721-1730
- Snapper, SB, Melton, RE, Mustafa, S, Kieser, T, Jacobs, WR (1999) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* 4 : 1911-1919
- Steffan RJ, McClay K, Vainberg S, Condee CW, Zhang D (1997) Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *tert*-butyl ether, ethyl *tert*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:4216-4222
- Steffan RJ, Vainberg S, Condee CW, McClay K, Hatzinger PB (2000) Biotreatment of MTBE with a new bacterial isolate. In: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Alleman BC, Magar VS (eds) *Bioremediation and phytoremediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle., Columbus, Ohio., pp 165-173
- Stirling D, Dalton H (1980) Oxidation of dimethyl ether, methyl formate and bromoethane by *Methylococcus capsulatus* (Bath). *J Gen Microbiol* 116:277-283
- Stocking AJ, Deeb RA, Flores AE, Stringfellow W, Talley J, Brownell R, Kavanaugh MC (2000) Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. *Biodegradation* 11:187-201
- Suflita JM, Mormile MR (1993) Anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in the terrestrial subsurface. *Environ Sci Technol* 27 :976-978

- Sun H-W, Plapp BV (1992) Progressive sequence alignment and molecular evolution of the Zn-containing alcohol dehydrogenase family. *J Mol Evol* 34 :522-535
- Swain EJ (1999) US MTBE production at a record high in 1998. *Oil Gas J.* 14 : 99-101
- Taylor DG, Trudgill PW, Cripps RE, Harris PR (1980) The microbial metabolism of acetone. *J. Gen. Microbiol.* 118: 159-170
- Takahashi J (1980) Production of intracellular protein from *n*-butane by *Pseudomonas butanovora* sp. nov. *Adv Appl Microbiol* 26:117-121
- Takemura H, Kondo K, Horinouchi S, Beppu T (1993) Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. *J Bacteriol* 175 :6857-6866
- Tamaki T, Fukaya M, Takemura H, Tayama K, Okumura H, Kawamura Y, Nishiyama M, Horinouchi S, Beppu T (1991) Cloning and sequencing of the gene cluster encoding two subunits of membrane-bound alcohol dehydrogenase from *Acetobacter polyoxogenes*. *Biochem Biophys Acta* 1088 :292-300
- Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T (1993) Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 31:175-178
- Testa B, Jenner P (1981) Inhibitors of cytochrome P-450 and their mechanism of action. *Drug Metab Rev* 12:1-117
- Thomas PE, Ryan D, Levin W (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 75 : 168-176
- Tomasi I, Artaud I, Bertheau Y, Mansuy D (1995) Metabolism of polychlorinated phenols by *Pseudomonas cepacia* AC1100: determination of the first two steps and specific inhibitory effect of methimazole. *J Bacteriol* 177:307-311
- Torck B (1999) Oxygenated fuels. In: Pétrole IFd (ed), Rueil-Malmaison
- Turini A, Amato G, Longo V, Gervasi PG (1998) Oxidation of methyl- and ethyl- tertiary-butyl ethers in rat liver microsomes: role of the cytochrome P450 isoforms. *Arch Toxicol* 72:207-214
- Urios A, Fayolle F, Monot F, Chauvaux S, Béguin P (2002) Physiological comparison of an ETBE (MTBE)-degrading strain and some derived mutants. Paper 2B-02. In : Gavoskar, AR, Chen ASC (eds). Remediation of chlorinated and recalcitrant compounds-2002. Proceedings of the third international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds (Monterey CA, May 2002). ISCN 1-57477-132-9. Battelle Press, Columbus, Ohio.

- USEPA (1999) Achieving clean air and clean water : the report of the blue ribbon panel on oxygenates in gasoline. US Government Printing Office, Washington DC, pp EPA420-R-99-021
- Van Dijken, JP, Harder W (1975) Growth yields of microorganisms on methanol and methane. Theoretical study. *Biotechnol Bioeng* 17:15
- Veenhuis M, Douma A, Hatder W, Osumi M (1983) Degradation and turnover in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes
- Veenhuis M, van den Klei IJ, Totorenko V, Harder W (1992) *Hansenula polymorpha*: an attractive model organism for molecular studies of peroxisome biogenesis and function. *FEMS Microbiol Lett* 100:393-404
- Verhagen FJM, Swarts HJ, Wijnberg JBPA, Field JA (1998) Biotransformation of the major fungal metabolite 3,5-dichloro-*p*-anisyl alcohol under anaerobic conditions and its role in formation of bis(3,5-dichloro-4-hydroxyphenyl)methane. *Appl Environ Microbiol* 64:3225-3231
- Werringloer J (1978) Assay of formaldehyde generated during microsomal oxidation reactions. *Methods Enzymol.* 52 : 297-302
- White GF, Russell N, Tidswell E (1996) Bacterial scission of ether bonds. *Microbiol Rev* 60:216-232
- Wilkes H, Rabus R, Fischer T, Armstroff A, Behrends A, Widdel F (2002) Anaerobic degradation of *n*-hexane in a denitrifying bacterium : further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl)succinate via C-skeleton rearrangement. *Arch Microbiol* 177 :235-243
- Williams TM, Borghoff SJ (2000) Induction of testosterone biotransformation enzymes following oral administration of methyl *tert*-butyl ether to male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 57:147-155
- Wilson JT, Cho JS (2000) Rate of biotransformation of MTBE in methanogenic ground water. In: Wickramanayake GB, Gavaskar AR, Gibbs JT, Means J (eds) Case studies in the remediation of chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle, Columbus, Ohio, pp 1-8
- Yeh CK, Novak JT (1991) Anaerobic biodegradation of oxygenates in the subsurface. Proceedings of the petroleum hydrocarbons and organic chemicals in ground water: prevention, detection, and restoration. Houston, Texas
- Yokoyama S, Yokoyama R, Kinlaw CS, Harry DE (1990) Molecular evolution of the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase genes. *Mol Biol Evol* 7 :143-154

Yule W (1983) Blood lead concentrations in school age children, intelligence, attainment and behaviour. In: Society ACotBP (ed), York, Angleterre

Zeida M, Wieser M, Yosida T, Sugio T, Nagasawa T (1998) Purification and characterization of gallic acid decarboxylase from *Pantoea agglomerans* T71. Appl Environ Microbiol 64 :4743-4747

Résumé

Afin d'obtenir le niveau requis d'indice d'octane et de limiter les rejets en monoxyde de carbone, le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE), le *tert*-amyl méthyl éther (TAME) ou l'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) sont incorporés dans les essences (jusqu'à 15%, vol/vol). Cependant, à la suite de fuites accidentelles de stockages d'essence, le MTBE est apparu comme un polluant majeur des nappes aquifères en raison de sa très faible biodégradabilité. L'objectif de ce travail a été d'étudier la biodégradation du MTBE par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 (souche isolée sur TBA afin de permettre la minéralisation du MTBE dans le cadre d'une culture mixte avec *Rhodococcus ruber* IFP 2007 et qui s'est révélée, en fait, capable de croissance sur MTBE), afin d'élucider les raisons de sa mauvaise biodégradabilité. La voie métabolique du MTBE a été partiellement élucidée par l'identification de plusieurs intermédiaires : le *tert*-butyl formiate (TBF), le *tert*-butyl alcool (TBA), l'acide α -hydroxyisobutyrique (HIBA) et l'acétone. Plusieurs activités enzymatiques impliquées dans cette voie métabolique ont été mises en évidence : une MTBE/TBA mono-oxygénase non-hémique et inductible, une TBF estérase, une 2-propanol : NDMA oxydoréductase et autre mono-oxygénase impliquée dans la dégradation de l'acétone. L'intervention du TBF dans la régulation métabolique de la dégradation du MTBE a été proposée. En effet, en sa présence (dans un rapport molaire MTBE/TBF de 3), l'activité de dégradation du MTBE par *M. austroafricanum* IFP 2012 ($24 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasse) diminue de 30%. Compte-tenu de la faible vitesse d'hydrolyse du TBF ($6 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasse), cette inhibition pourrait éviter l'accumulation intracellulaire de TBF. Un autre élément important pour expliquer la faible atténuation naturelle du MTBE est le besoin en nutriments spécifiques, comme les ions cobalt nécessaires à une bonne assimilation de l'HIBA et, par conséquence, du MTBE. Par ailleurs, la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2012 sur TAME est cinq fois plus rapide que sur MTBE. Ces deux composés possédant le même groupement méthoxy, la rupture de la liaison éther ne semble pas être un facteur limitant à la biodégradation du MTBE.

Mots clés : biodégradation, éthers-carburants, méthyl *tert*-butyl éther (MTBE), mono-oxygénase, cobalt, *tert*-butyl formiate (TBF), *Mycobacterium austroafricanum*.

Abstract

Methyl *tert*-butyl ether (MTBE), *tert*-amyl methyl ether (TAME) or ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) are introduced up to 15% (vol/vol) in gasoline in order to obtain a good octane number and to prevent carbon monoxide emissions. However, as a consequence of storage tanks leakage, MTBE became one of the major pollutants of aquifers because of its very low biodegradability. The present study aimed at investigating the biodegradation of MTBE by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 (a strain first isolated on TBA to allow the mineralisation of MTBE, in a mixed culture with *Rhodococcus ruber* IFP 2007, but which is, in fact, able to grow on MTBE), to understand the origin of its recalcitrance. The MTBE metabolic pathway was partially elucidated owing to the identification of some intermediates : *tert*-butyl formate (TBF), *tert*-butyl alcohol (TBA), α -hydroxyisobutyric acid (HIBA) and acetone. Several enzymatic activities were detected : a MTBE/TBA monooxygenase (non hemic and inducible), a TBF esterase, a 2-propanol : NDMA oxydoréductase and another monooxygenase involved in acetone degradation. The involvement of TBF in metabolic regulation of MTBE degradation was suggested since, in the presence of TBF (at a MTBE/TBF molar ratio of 3), the MTBE degradation activity of *M. austroafricanum* IFP 2012 ($24 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasse) decreased by 30%. TBF hydrolysis activity being low ($6 \mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ biomasse), this inhibition could prevent an intracellular accumulation of this compound. The requirement of specific nutrients could be another explanation for the low natural attenuation of MTBE. Cobalt ions are required for a good assimilation of HIBA, and thus, of MTBE. *M. austroafricanum* IFP 2012 grew five times as quick on TAME as on MTBE. Both compounds having the same methoxy group, the cleavage of the ether bound is not a limiting step of MTBE biodegradation.

Key words : biodegradation, fuel oxygenates, methyl *tert*-butyl ether (MTBE), monooxygenase, cobalt, *tert*-butyl formate (TBF), *Mycobacterium austroafricanum*.