Office de la Propriété Intellectuelle du Canada
Un organisme d'Industrie Canada

Canadian Intellectual Property Office
An agency of Industry Canada

CA 2510657 A1 2007/01/18

(21) 2 510 657

(12) DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION

(13) A1

(22) Date de dépôt/Filing Date: 2005/07/18

(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 2007/01/18

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/53* (2006.01),
C07H 21/00 (2006.01), *C07K 14/435* (2006.01),
C12N 1/20 (2006.01), *C12N 15/11* (2006.01),
C12N 15/31 (2006.01), *C12N 15/63* (2006.01),
C12Q 1/68 (2006.01), *C12Q 1/70* (2006.01)

(71) Demandeurs/Applicants:
INSTITUT FRANCAIS DU PETROLE, FR;
CONSEIL NATIONAL DE RECHERCHES DU CANADA, CA

(72) Inventeurs/Inventors:
LOPES FERREIRA, NICOLAS, FR;
LABBE, DIANE, CA;
MACIEL, HELENA, PT;
...

(54) Titre : POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITE DANS LA VOIE DE DEGRADATION DU MTBE ET LEURS UTILISATIONS

(54) Title: POLYPEPTIDES WITH AN ACTIVITY IN THE MTBE DEGRADATION PATHWAY AND THEIR USE

(57) Abrégé/Abstract:
L'invention concerne un polypeptide isolé ou purifié ayant une activité dans la voie de dégradation du MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le tert-butyl alcool (TBA), le 2-méthyl 1,2-propanediol (2-M1,2-PD), l'hydroxyisobutyraldéhyde, l'acide hydroxyisobutyrique (HIBA), ledit polypeptide étant sélectionné dans le groupe consistant en : a) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8 ou SEQ ID NO :10, b) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés qui présente au moins 70 % d'identité, préférentiellement 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % d'identité avec la séquence en acides aminés d'un polypeptide tel que défini en a), c) un polypeptide tel que défini en a) ou b) dont la séquence en acides aminés comprend une substitution, délétion, insertion, addition ou mutation d'un ou plusieurs acides aminés sur toute sa longueur, d) un fragment biologiquement actif d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide tel que défini en a), b) ou c).

CA 2510657 A1 2007/01/18

(21) 2 510 657

(13) A1

(72) **Inventeurs(suite)/Inventors(continued)**: FAYOLLE-GUICHARD, FRANCOISE, PT; MONOT, FREDERIC, FR; GREER, CHARLES W., CA

(74) **Agent**: ROBIC

ABRÉGÉ

L'invention concerne un polypeptide isolé ou purifié ayant une activité dans la voie de dégradation du MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le *tert*-butyl alcool (TBA), le 2-méthyl 1,2-propanediol (2-M1,2-PD), l'hydroxyisobutyraldéhyde, l'acide hydroxyisobutyrique (HIBA), ledit polypeptide étant sélectionné dans le groupe consistant en :

a) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8 ou SEQ ID NO :10,

b) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés qui présente au moins 70 % d'identité, préférentiellement 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % ou 99 % d'identité avec la séquence en acides aminés d'un polypeptide tel que défini en a),

c) un polypeptide tel que défini en a) ou b) dont la séquence en acides aminés comprend une substitution, délétion, insertion, addition ou mutation d'un ou plusieurs acides aminés sur toute sa longueur,

d) un fragment biologiquement actif d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide tel que défini en a), b) ou c).

DEMANDES OU BREVETS VOLUMINEUX

LA PRÉSENTE PARTIE DE CETTE DEMANDE OU CE BREVETS COMPREND PLUS D'UN TOME.

CECI EST LE TOME __1___ DE __2___

NOTE: Pour les tomes additionels, veillez contacter le Bureau Canadien des Brevets.

JUMBO APPLICATIONS / PATENTS

THIS SECTION OF THE APPLICATION / PATENT CONTAINS MORE THAN ONE VOLUME.

THIS IS VOLUME __1___ OF __2___

NOTE: For additional volumes please contact the Canadian Patent Office.

POLYPEPTIDES AYANT UNE ACTIVITÉ DANS LA VOIE DE DÉGRADATION DU MTBE ET LEURS UTILISATIONS

La présente demande est relative au domaine de la microbiologie, et plus particulièrement à l'utilisation de microorganismes pour traiter des effluents contaminés par des polluants chimiques, notamment le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) et/ou des intermédiaires cataboliques de ce composé.

La présente invention concerne de nouveaux polypeptides et leurs fragments, ainsi que les acides nucléiques codants lesdits polypeptides isolés de microorganismes capables de métaboliser le MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le *tert*-butyl alcool (TBA), le 2-méthyl 1,2-propanediol (2-M1,2-PD), l'hydroxyisobutyraldéhyde, l'acide hydroxyisobutyrique (HIBA). L'invention concerne également des vecteurs de clonage et/ou d'expression comprenant lesdits acides nucléiques, des cellules bactériennes transformées par lesdits acides nucléiques ou lesdits vecteurs ainsi que leurs utilisations.

L'invention concerne également un procédé d'identification de microorganismes capables de métaboliser le MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE. Plus particulièrement, la présente invention concerne une nouvelle souche bactérienne *Mycobacterium austroafricanum* enregistrées dans la collection CNCM sous le numéro I-3401.

L'invention concerne également un procédé de traitement d'effluents contaminés par le MTBE et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE.

Le composé chimique MTBE est utilisé comme additif aux essences sans plomb. Depuis que l'utilisation des alkyles de plomb est interdite en raison de leur toxicité, le MTBE est ajouté dans les essences afin d'augmenter leur indice d'octane. L'indice d'octane, mesure la "résistance au cliquetis" des carburants lorsqu'ils brûlent en mélange avec l'air dans la chambre de combustion des moteurs. Le MTBE est également utilisé en tant que composé oxygéné permettant d'augmenter la teneur en oxygène des essences et, de ce fait, d'améliorer leur efficacité de combustion. Ceci permet de réduire le rejet en hydrocarbures imbrûlés ainsi qu'en monoxyde de carbone dans l'atmosphère. Ainsi, des concentrations en MTBE de 15% (v/v) sont couramment utilisées dans les carburants oxygénés. Le MTBE a été classé comme

composé cancérigène potentiel par l'agence américaine pour la protection de l'environnement (US E.P.A., December 1997 EPA/822/F-97/008. Office of Water, Washington, DC, USA). La contamination de ce composé dans l'environnement peut être due au stockage inadéquat de l'essence dans des réservoirs non étanches ou des déversements accidentels. Ce type de

déchets peut causer de sérieux problèmes de pollution environnementale tels que la contamination des aquifères souterrains. Les consommateurs peuvent être exposés à de faibles concentrations lorsqu'ils boivent une eau non potable provenant d'une source contaminée par le MTBE. Par ailleurs, le goût et l'odeur déplaisants que le MTBE confère à l'eau, même à de faibles concentrations, rend celle-ci impropre à la consommation, faisant de ce composé xénobiotique un polluant important. La contamination du MTBE semble être largement attribuable au fait qu'il soit difficilement éliminé de l'environnement. Le MTBE s'avère persistant du fait de sa solubilité élevée dans l'eau et sa faible biodégradabilité. La demi-vie du MTBE dans les aquifères est estimée à au moins 2 ans (Wilson J. T., 2003, 19-61 : *In* E. E. Moyer and P. T. Kostecki (ed.), *MTBE Remediation Handbook*. Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA.) ; cette valeur peut être comparée à celle du benzène qui est de 2 à 3 mois dans des conditions identiques. La contamination des aquifères peut engendrer des risques sérieux pour la santé publique. Il est donc nécessaire de développer des procédés efficaces permettant de traiter les aquifères contaminés par le MTBE ou tout autre intermédiaire catabolique du MTBE.

Plusieurs études visant à déterminer la biodégradabilité du MTBE ont été entreprises depuis quelques années. Un certain nombre de microorganismes capables d'assimiler complètement ou partiellement le MTBE ont été identifiés et isolés. Par exemple, certains microorganismes sont capables de cataboliser le MTBE par cométabolisme. Deux voies de dégradation, impliquant toutes deux l'oxydation initiale du MTBE, conduisent à la production de l'alcool tert-butylique (TBA) qui, le plus généralement, s'accumule dans le milieu. La souche bactérienne Mycobacterium vaccae JOB5, lorsqu'elle est cultivée sur du propane, est capable d'oxyder le TBA bien que cela ne lui permette pas de générer des composés utiles pour sa croissance. Quelques souches de microorganismes capables d'assimiler le MTBE comme source de carbone et d'énergie ont pu être isolées (François et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 2754-2762; Hanson, J. R., et al. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999. **65**: 4788-4792; Hatzinger, P. B., et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, **67**: 5601-560). Les mécanismes enzymatiques de l'attaque initiale du MTBE chez ces bactéries n'ont pas été encore élucidés.

La souche bactérienne *Mycobacterium austroafricanum* I-2562 est une des bactéries connues pour sa capacité à croître en conditions aérobies, en présence de MTBE.

Cette souche est en effet capable de cataboliser le MTBE en source de carbone et d'énergie (François et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 2754-2762 ; US patent n° 6,849,445). Un certain nombre d'intermédiaires de dégradation ou cataboliques du MTBE ont été identifiés, tels que le TBA, le 2 M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA. La voie de dégradation du MTBE par cette souche bactérienne est décrite à la figure 1.

Les cinétiques de dégradation du MTBE et de la croissance qui l'accompagne chez *M. austroafricanum* I-2562 présentent des phases bien distinctes (Figure 2). La cinétique de dégradation du MTBE est caractérisée par une vitesse de dégradation très rapide au cours des premières 48 h, qui diminue du $2^{ème}$ au $16^{ème}$ jour. Pendant cette étape de transformation du MTBE en TBA, le TBA s'accumule et aucune croissance n'est observée. Du $16^{ème}$ au $21^{ème}$ jour, le TBA accumulé est dégradé, induisant la croissance du microorganisme.

Il est à noter que la première étape de dégradation comprend la minéralisation du formiate en CO_2 nécessitant que le microorganisme soit méthylotrophe (François et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, **68**: 2754-2762). La formiate déshydrogénase $NAD(P)^+$-dépendante (ou FDH) est une enzyme qui joue un rôle important dans la production d'énergie chez les microorganismes méthylotrophes. Cette enzyme est, d'ailleurs, fréquemment utilisée dans la régénération de cofacteur de type $NAD(P)^+$ dans des réactions de biocatalyse (Tishkov, V. I. et al. *Biochemistry (Moscow),* 2004, **69**: 1537-1554). Cette première étape du catabolisme ne génère pas d'ATP. Francois et al. ont montré que le TBF avait un effet négatif sur la vitesse de dégradation du MTBE chez *M. austroafricanum* I-2562 (François et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003, **62**: 256-262). Il a été suggéré que le déficit en équivalents réduits de coenzymes et en énergie était responsable du ralentissement des réactions enzymatiques (Salanitro, *Curr. Op. Biotechnol.*, 1995, **6:** 337-340). Ces deux raisons sont très probablement principalement responsables du ralentissement de la vitesse de dégradation du MTBE.

La seconde étape, en permettant la production nette de 2 NAD(P)H et de $2H^+$, alimente ainsi la chaîne de transport d'électrons avec l'O_2 comme accepteur final d'électrons en aérobiose. Cette étape apparaît donc essentielle dans le métabolisme du MTBE. Le résultat final de cette chaîne de transport d'électrons est de régénérer du $NAD(P)^+$ à partir du NAD(P)H, de réduire l'O_2 en H_2O, créant un gradient de transport des protons qui sont utilisés pour la formation de l'ATP par l'ATP synthase (pompe à protons). Ceci correspond au mécanisme de phosphorylation oxydative et permet la synthèse d'ATP qui est le composé

énergétique des microorganismes (30,5 kJ produit/mole d'ATP dégradé du fait d'une liaison à haut niveau énergétique).

Un objectif de l'invention est de disposer de ces polypeptides, éventuellement de les modifier et de les utiliser afin de traiter des effluents contaminés par le MTBE, et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA.

La présente invention vise tout polypeptide isolé ou purifié ayant une activité dans la voie de dégradation du MTBE et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le TBA, le 2 M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA.

En précisant que les polypeptides ou les acides nucléique codant pour au moins un polypeptides conforme à l'invention sont « isolés ou purifiés », on indique qu'ils sont placés dans un environnement différent de celui dans lequel ils se trouvent naturellement. Ils peuvent être isolés ou purifiés d'une souche bactérienne capable de croître dans un milieu comprenant du MTBE et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionnés dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA, dont notamment les souches *Mycobacterium austroafricanum* enregistrées dans la collection CNCM sous les numéros I-3401 et I-2532. On entend également les molécules qui ont été altérées par la présente invention comme étant « isolées ». On rappelle que ces qualificatifs d' « isolé ou purifié » sont également utilisés pour les cellules hôtes.

Dans le contexte de l'invention, les termes « polypeptide, enzyme » et « protéine » peuvent être utilisés de façon interchangeable et désignent des molécules caractérisées par des séquences en acides aminés de toute longueur, éventuellement modifiées par voie chimique ou biochimique. On inclut également dans le terme « polypeptide » l'ensemble des polypeptides mutés pouvant exister naturellement ou variants, en particulier chez la bactérie de la souche *M. austroafricanum*, et qui correspondent à des substitutions, délétions, insertions ou additions d'au moins un acide aminé. Dans le cas d'une substitution, un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non consécutifs, peuvent être remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression acide aminé « équivalent » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier l'activité biologique des polypeptides selon l'invention. Ces acides

aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur les résultats des essais d'activité biologique croisée auxquels les différents polypeptides sont susceptibles de donner lieu.

Selon un mode préféré de réalisation, le polypeptide selon l'invention est sélectionné dans le groupe consistant en :

a) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8 ou SEQ ID NO :10,

b) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés qui présente au moins 70 % d'identité, préférentiellement 75%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% d'identité avec la séquence en acides aminés d'un polypeptide tel que défini en a),

c) un polypeptide tel que défini en a) ou b) dont la séquence en acides aminés comprend une substitution, délétion, insertion, addition ou mutation d'un ou plusieurs acides aminés sur toute sa longueur,

d) un fragment biologiquement actif d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide tel que défini en a), b) ou c).

Différents protocoles connus de l'homme de l'art ont été décrits pour introduire des mutations dans les polypeptides. Typiquement, pour modifier la séquence en acides aminés d'un polypeptide, on agit sur la molécule d'acide nucléique qui code pour ce polypeptide. Il est possible pour modifier l'acide nucléique codant pour un polypeptide conforme à l'invention, de le soumettre à un traitement par un agent mutagène, c'est-à-dire d'un agent physique ou chimique capable de provoquer des mutations qui altèrent la signification des codons, ce qui par le jeu du code génétique modifie la séquence en acides aminés. Avantageusement, on a recours à une technique de mutagénèse dirigée pour modifier la séquence nucléotidique d'un acide nucléique codant pour au moins un polypeptide du gène ainsi que celle des polynucléotides conformes à l'invention; il s'agit alors d'introduire spécifiquement une ou plusieurs mutations dans l'acide nucléique étudié, ce qui par le jeu du code génétique entraîne la substitution d'un ou plusieurs acides aminés par un ou plusieurs autres acides aminés dans le polypeptide codé par le polynucléotide muté. L'intérêt de réaliser ces mutations est non seulement d'étudier l'activité biologique d'un des polypeptides conformes à l'invention dans la voie de dégradation du MTBE et/ou l'un au moins des

intermédiaires catalytiques, mais éventuellement d'optimiser ladite activité du polypeptide sous forme recombinante en vue de son application industrielle.

Par « fragment de polypeptide », on désigne un polypeptide comportant au minimum 15 acides aminés consécutifs, de préférence 17, 20, 23, 25, 30, 40, 50, 100, 250 ou 300 acides aminés consécutifs. Les fragments de polypeptide conforme à l'invention peuvent être obtenus par clivage dudit polypeptide par une enzyme protéolytique, par un réactif chimique, ou encore en plaçant ledit polypeptide dans un environnement très acide font également partie de l'invention.

Par « fragment biologiquement actif », on entend un fragment de séquences en acides aminés d'un polypeptide conforme à l'invention ayant au moins une des caractéristiques ou propriétés fonctionnelles dudit polypeptide, notamment en ce qu'il a une activité dans la voie de dégradation du MTBE et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA.

Selon un mode préféré de réalisation, l'expression des polypeptides conformes à l'invention est induite lorsque les bactéries susceptibles d'assimiler le MTBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, dont notamment les bactéries de la souche *M. austroafricanum*, plus préférentiellement les bactéries I-2562 ou I-3401, sont dans un milieu comprenant du MTBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA. Préférentiellement, les polypeptides dont l'expression est fortement induite sont les polypeptides SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4 et SEQ ID NO :6 tels que définis en a), b), c) ou d), comme indiqué sur la figure 3.

Avantageusement, le polypeptide SEQ ID NO :2 tel que défini en a), b), c) ou d) et dénommé MpdC a une activité d'aldéhyde déshydrogénase. Dans la voie catabolique du MTBE, le polypeptide MpdC conforme à l'invention est préférentiellement susceptible de déshydrogéner l'hydroxyisobutyraldéhyde en HIBA.

Avantageusement, le polypeptide SEQ ID NO :6 tel que défini en a), b), c) ou d) et dénommé MpdB a une activité d'alcool déshydrogénase. Dans la voie catabolique du MTBE, le polypeptide MpdB conforme à l'invention est préférentiellement susceptible de déshydrogéner le 2-M1,2-PD en hydroxyisobutyraldéhyde.

Avantageusement, le polypeptide SEQ ID NO:8 tel que défini en a), b), c) ou d) a une activité de perméase, préférentiellement de di/tripeptide perméase. Ledit polypeptide comprend préférentiellement 5 segments transmembranaires.

Avantageusement, le polypeptide SEQ ID NO:10 tel que défini en a), b), c) ou d) et dénommé MpdR a une activité de régulateur transcriptionnel.

La présente invention vise également tout acide nucléique purifié ou isolé codant pour au moins un polypeptide conforme à l'invention. Préférentiellement, la présente invention a pour objet tout acide nucléique isolé ou purifié codant pour au moins un polypeptide ayant une activité dans la voie de dégradation du MTBE, ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA.

Dans le contexte de l'invention, les termes « acide nucléique » et « ADN » sont utilisés de façon interchangeable. Par « acide nucléique », on désigne un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADN, et/ou un fragment d'ARN.

Selon un mode préféré de réalisation, l'acide nucléique selon l'invention est sélectionné dans le groupe consistant en :

e) un acide nucléique comprenant au moins l'une quelconque des séquences nucléotidiques sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:9, ou complément de celle-ci,

f) un acide nucléique comprenant au moins une séquence nucléotidique qui présente au moins 70 % d'identité, préférentiellement 75%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% d'identité avec la séquence nucléotidique d'un acide nucléique tel que défini en e),

g) un acide nucléique codant pour au moins un variant d'un polypeptide comprenant l'une quelconque des séquences en acides aminés SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:10, ledit acide nucléique s'hybridant au complément d'un acide nucléique tel que défini en e) ou f),

h) un acide nucléique tel que défini en e), f) ou g) dont la séquence comprend une substitution, délétion, insertion, addition ou mutation d'un ou plusieurs nucléotides sur toute sa longueur,

i) un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'un quelconque des acides nucléiques tels que définis en e), f), g) ou h).

Par « complément », on désigne tout acide nucléique dont les nucléotides sont complémentaires de ceux de la séquence SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:9, et dont l'orientation est inversée.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés au sens de la présente invention, on désigne un pourcentage de nucléotides ou d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer. Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acides nucléiques ou d'acides aminés est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière significative, la séquence d'acides nucléiques ou d'acides aminés à comparer pouvant comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement significatif entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou l'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions comparées et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences. Par « alignement significatif », on désigne l'alignement pour lequel le pourcentage d'identité déterminé comme ci-après est le plus élevé. Préférentiellement, on utilisera le programme BLAST pour obtenir un alignement significatif.

Selon un mode préféré de réalisation, l'acide nucléique conforme à l'invention comprend au moins deux des séquences nucléotidiques sélectionnées dans le groupe consistant en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:9 telles que définies en e), f), g) h) ou i), préférentiellement 3 desdites séquences nucléotidiques, plus préférentiellement 4 desdites séquences nucléotidiques, plus préférentiellement 5 desdites séquences nucléotidiques.

Avantageusement, l'acide nucléique conforme à l'invention, comprend les séquences nucléotidiques SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:5 telles que définies en e), f), g), h) ou i), préférentiellement SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 et SEQ ID NO:5 telles que définies en e), f), g), h) ou i).

Avantageusement, l'acide nucléique conforme à l'invention comprend la séquence nucléotidique SEQ ID NO :11.

Selon un mode préféré de réalisation, la transcription de l'acide nucléique conforme à l'invention est sous le contrôle d'un promoteur unique. Par « promoteur », on désigne une région de régulation située en amont d'un cadre de lecture ouvert (ORF), à proximité de son extrémité 5'. Dans la présente demande, on utilisera les termes « ORF » et « gène » de façon interchangeable. Un promoteur comporte certaines séquences nucléotidiques caractéristiques permettant la fixation du complexe d'initiation de la transcription ainsi que la fixation de régulateurs transcriptionnels.

Selon un autre mode préféré de réalisation, l'acide nucléique conforme à l'invention est caractérisé en ce que sa transcription est induite par la présence de MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionnés dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA. Avantageusement, l'acide nucléique conforme à l'invention est organisé en opéron.

Selon un mode préféré de réalisation, l'acide nucléique conforme à l'invention correspond à un cluster comprenant les acides nucléiques codant pour SEQ ID NO :1, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7 et SEQ ID NO :9, ledit cluster étant alors dénommé cluster *mpd*. Le cluster *mpd* est schématisé à la figure 7.

Selon un mode préféré de réalisation, l'acide nucléique conforme à l'invention est un acide nucléique recombinant. Par « acide nucléique recombinant », on désigne une molécule d'acide nucléique, simple ou double brin, qui a été modifiée par une intervention humaine de manière à contenir des fragments d'acides nucléiques combinés ou juxtaposés selon un arrangement n'existant pas à l'état naturel.

L'invention a également pour objet tout vecteur d'expression et/ou de clonage comprenant un acide nucléique conforme à l'invention. Par « vecteur », on désigne une molécule d'acide nucléique extrachromosomique, notamment un plasmide, ayant une réplication autonome et pouvant être incorporé dans une « cellule hôte ».

Typiquement, un vecteur de clonage est conçu pour permettre le transport d'un fragment d'ADN cloné et contient un ou plusieurs sites de reconnaissance pour des enzymes de restriction qui permettent l'insertion ou clonage d'un fragment d'acide nucléique ainsi qu'une ou des séquences nucléotidiques codantes pour des gènes permettant l'identification et la sélection de cellules hôtes transformées par ledit vecteur tels que des gènes de résistance à des antibiotiques.

Selon un mode préféré de réalisation, le vecteur d'expression conforme à l'invention est conçu pour permettre l'expression d'une séquence nucléotidique codante insérée en aval d'un promoteur. La séquence insérée ou insert est alors transcrite, puis traduite en polypeptide. Avantageusement, le vecteur conforme à l'invention est flanqué d'éléments assurant l'expression d'au moins un acide nucléique conforme à l'invention dans la cellule hôte. Avantageusement, certains vecteurs d'expression ont une séquence codante pour un tag en amont ou en aval du site d'insertion ou de clonage ; l'acide nucléique inséré est alors transcrit puis traduit sous la forme d'une protéine de fusion. Par « protéine de fusion », on désigne un polypeptide hybride comprenant un polypeptide codé par un acide nucléique conforme à l'invention et un polypeptide capable de se fixer à des matrices d'affinité et/ou d'être reconnu par des anticorps permettant de détecter et/ou de purifier le polypeptide auquel il est fusionné.

Selon un autre mode préféré de réalisation, le vecteur conforme à l'invention comprend au moins une séquence homologue d'une séquence d'acide nucléique présente dans le génome d'une cellule hôte et assurant son intégration dans ledit génome.

L'invention concerne en outre une cellule hôte isolée comprenant soit au moins l'un des acides nucléiques conforme à l'invention et/ou au moins l'un des vecteurs conforme à l'invention. Parmi les cellules hôtes utilisables au sens de la présente invention, on peut citer une cellule procaryote, préférentiellement une cellule bactérienne, plus préférentiellement une cellule bactérienne sélectionnée dans le groupe consistant en *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, *Escherichia Coli*, *Rhodococcus ruber* (enregistrée dans la collection CNCM sous le nom *Gordonia terrae* et le numéro CIP I-1885).

Les polypeptides conformes à l'invention peuvent être préparés et/ou obtenus par toutes techniques maîtrisées par l'homme de l'art. Ils peuvent notamment être obtenus par synthèse chimique mais également par des techniques de biologie moléculaire, utilisant notamment la PCR, des vecteurs d'expression et des cellules hôtes appropriés tels que décrits ci-dessus. Préférentiellement, les polypeptides conformes à l'invention se caractérisent en ce que leur expression dans des cellules hôtes, notamment des cellules bactériennes, permet de satisfaire à l'exigence de dégradation du MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques et permettent la croissance desdites bactéries.

La présente invention concerne également une amorce oligonucléotidique comprenant un fragment tel que défini en i), de préférence de 15, 17, 20, 23, 25, 27, 30, 35,

40, 45 ou 50 ou un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotidique SEQ ID NO :12. La séquence SEQ ID NO :12 correspond à la séquence nucléotidique de l'ADNr 16S de la souche *M. austroafricanum* I-2532.

La présente invention concerne également une sonde comprenant la séquence nucléotidique complémentaire d'un fragment tel que défini en i) ou d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotidique SEQ ID NO :12. Par « sonde » on entend un fragment d'acide nucléique marqué par l'incorporation d'atomes radioactifs ou de groupements fluorescents et dont la séquence est sensiblement complémentaire à la séquence d'un acide nucléique recherché ; ce dernier sera décelé par hybridation avec la sonde, cette hybridation se produisant lorsque les deux séquences complémentaires s'apparient. Par « séquence complémentaire » on désigne une séquence nucléotidique constituée d'une succession de bases complémentaires à celle d'une autre séquence avec laquelle elle est donc capable de s'hybrider. Préférentiellement, l'hybridation d'une sonde dont la taille est supérieure à 200 nucléotides est réalisée à une température d'environ 60°C selon l'enseignement adapté de Sambrook et al. (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001)

La présente invention vise également un procédé d'identification d'une cellule ou d'un acide nucléique d'une cellule susceptible de dégrader du MTBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA, comprenant :

- optionnellement une étape d'ensemencement de la cellule sur un milieu supplémenté en MTBE, et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA,
- une étape de criblage des acides nucléiques de ladite cellule par hybridation avec au moins une sonde conforme à l'invention, et/ou
- une étape d'amplification ou de polymérisation d'au moins un acide nucléique de ladite cellule avec au moins deux amorces oligonucléotidiques conforme à l'invention.

Selon un mode préféré de réalisation, une cellule d'une nouvelle souche capable de dégrader le MTBE, et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, sera identifiée grâce à des amorces oligonucléotidiques permettant l'amplification de l'ARNr 16S de ladite cellule.

Avantageusement, un couple d'amorces (5'-TGCACACAGGCCACAACCCA-3') et (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') a été conçu à partir de deux régions variables de la séquence nucléotidique de l'ADNr 16S de la souche *M. austroafricanum.* Ce couple d'amorces est spécifique de l'espèce *M. austroafricanum* dans la mesure où il ne permet pas d'amplifier l'ADNr 16S de microorganismes d'autres espèces, dont notamment l'espèce des *Nocardiacae*, incapables d'assimiler le MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE (Figure 12).

En mettant en oeuvre le procédé conforme à l'invention, une nouvelle souche bactérienne *M. austroafricanum* a été identifiée ; elle est enregistrée dans la collection CNCM sous le numéro I-3401. Elle a été isolée de l'eau de ruissellement prélevée au fond d'un réservoir de stockage d'une essence supplémentée en MTBE. La croissance de *M. austroafricanum* I-3401 sur MTBE suit une voie de dégradation similaire à celle de *M. austroafricanum* I-2562 (Figure 10). Préférentiellement, la nouvelle souche *M. austroafricanum* I-3401 est caractérisée par le fait qu'elle soit capable d'assimiler le MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionnés dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA. Plus préférentiellement, la nouvelle souche I-3401 est caractérisée par une séquence nucléique de l'ADNr 16S comprenant la séquence SEQ ID NO :13.

L'isolement indépendant de deux souches de *M. austroafricanum*, I-2562 et I-3401, toutes deux capables de croître sur MTBE et isolées de deux origines géographiques distinctes et éloignées (boues activées d'une station d'épuration d'une usine de traitement des eaux urbaines de la région parisienne et eau de ruissellement prélevée au fond d'un réservoir de stockage d'une essence supplémentée en MTBE localisée dans le sud-ouest de la France, respectivement) montre que de tels microorganismes, qui sont souvent isolés d'échantillons de sols et d'eaux (Jones et Jenkins, *Can. J. Microbiol.*, 1965, **11** : 127-133 ; Viallier et Viallier, *Ann. Soc. Belge Med. Trop.*, 1973, **53** : 361-371), peuvent donc jouer un rôle significatif dans la dégradation du MTBE dans les aquifères contaminés.

L'invention concerne également une trousse pour la détection et/ou la quantification de bactéries, de préférence des bactéries de la souche *M. austroafricanum* sur des sites contaminés par du MTBE, et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionnés dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA, ladite trousse comprenant au moins une sonde selon la revendication 21 et/ou au moins deux amorces selon la revendication 22, celles-ci pouvant être utilisées de façon séparée ou combinée, par exemple dans des puces à ADN ("microarrays").

La présente invention concerne également l'utilisation du polypeptide SEQ ID NO :2 tel que défini en a), b), c) ou d) en tant qu'aldéhyde déshydrogénase, préférentiellement pour la déshydrogénation de l'hydroxyisobutyraldéhyde en HIBA.

La présente invention concerne également l'utilisation du polypeptide SEQ ID NO :6 tel que défini en a), b), c) ou d) en tant qu'alcool déshydrogénase, préférentiellement pour la déshydrogénation du 2-M1,2-PD en hydroxyisobutyraldéhyde.

La présente invention concerne enfin un procédé de traitement d'effluents aqueux comprenant du MTBE, du ETBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA, afin de réduire leur concentration, comprenant l'ensemencement dudit effluent aqueux par au moins une cellule conforme à l'invention ou identifiée par le procédé d'indentification conforme à l'invention. Avantageusement, le procédé conforme à l'invention est caractérisé en ce que la cellule est fixée sur un support adapté, préférentiellement un support minéral, plus préférentiellement un support comprenant au moins 50% en masse de partite.

Le procédé selon l'invention est particulièrement adapté pour traiter un aquifère ou un sol contaminé par du MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Voie métabolique de dégradation du MTBE par *M. austroafricanum* I-2562. En gras, les intermédiaires de dégradation qui ont été identifiés au cours de nos expérimentations.

Figure 2. Croissance de *M. austroafricanum* I-2562 sur MTBE.

Pendant la croissance, la D.O. $_{600\ nm}$ (◊-◊) ainsi que les concentrations en MTBE (■-■), TBF (Δ-Δ) et TBA (-) ont été mesurées.

Figure 3. Electrophorèse sur gels de polyacrylamide à 10% (A) ou 15% (B) en présence de SDS (SDS-PAGE) des extraits cellulaires de *M. austroafricanum* I-2562 obtenus après croissance sur glucose ou sur MTBE. Les poids moléculaires (en kDa) sont indiqués sur la droite de la figure.

Figure 4. Amplification par PCR sur l'ADN génomique *M. austroafricanum* I-2562 avec les amorces dégénérées créées à partir des séquences peptidiques internes du polypeptide de 64 kDa induit sur MTBE.

Figure 5. Hybridation par Southern Blot de l'ADN génomique de *M. austroafricanum* I-2562 après digestion en utilisant la sonde de 204 pb. La taille des bandes révélées est indiquée en kb. 5 µg d'ADN génomique de *M. austroafricanum* I-2562 sont digérés par les enzymes de restriction *BamH*I, *EcoR*I, *Fsp*I, *Knp*I, *Nhe*I, *Nru*, *Pst*I, *Pvu* II ou *Sma*I (puits 2-8, respectivement) et 50 ng de sonde de 204 pb (puits12) sont analysés par Southern Blot en utilisant la sonde de 204 pb. Les positions correspondant à la migration de l'ADN du marqueur de poids moléculaire III marqué avec la digoxigénine (Roche; puits 1 et puits 9) sont indiquées sur la gauche du luminographe.

Figure 6. "Hybridation sur colonies" des clones recombinants d'*E. coli* DH10B avec une sonde de 604 pb.

A) Luminographie des membranes contenant les premiers clones provenant de la digestion par *Sma*I de *M. austroafricanum* I-2562. Les clones positifs (taches noires) sont détectés avec la sonde *mpdC* marquée à la digoxigénine.

B) Luminographie des membranes contenant les seconds clones provenant de la digestion par *Pst*I de *M. austroafricanum* I-2562. Les clones positifs (taches noires) sont détectés avec la sonde *mpdB* marquée à la digoxigénine.

Figure 7. Organisation du cluster des gènes impliqués dans la voie de dégradation du MTBE et isolé à partir de l'ADN génomique de *M. austroafricanum* I-2562 (A) et leur carte de restriction correspondante (B).

L'ORF *mpdR* code pour un régulateur transcriptionnel, les ORF *mpdC* et *mpdB* codent respectivement pour une enzyme aldéhyde déshydrogénase et une enzyme alcool déshydrogénase. Trois polypeptides de 64, 55 et 27 kDa sont tous fortement exprimés après croissance de *M. austroafricanum* I-2562 sur MTBE. Le polypeptide de 25 kDa est une perméase. Les fragments PCR issus des amplifications réalisées à l'aide des couples de primers RT-PCR-F1/-R1, RT-PCR-F2/-R2 et RT-PCR-F3/-R3 sont représentés schématiquement sur la figure 7 (fragments numérotés I, II et III).

Figure 8. RT-PCR sur *M. austroafricanum* I-2562 après croissance sur TBA en utilisant les amorces correspondant au cluster *mpd*.

Les amorces utilisées sont citées dans le Tableau ci-dessous.

Légende: Puits 1 : C^- PCR I, Puits 2 : C^+ PCR I, Puits 3 :(-) RT-PCR I, Puits 4 : (+)RT-PCR I, Puits 5 :C^+ PCR II, Puits 6 : (-) RT-PCR II, Puits 7 : (+) RT-PCR II, Puits 8 : C^+ PCR III, Puits 9 : (-) RT-PCR III, Puits 10 : (+) RT-PCR III, Puits 11 : marqueur d'ADN (100 pb).

Figure 9. Cinétique de dégradation du 2-M1,2-PD par des cellules de *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 (carrés) et de *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D (triangles).

Dégradation du 2-M-1,2-PD (symboles pleins) et production du HIBA (symboles vides). Contrôle abiotique (◊-◊). Cellules de *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 en présence de 400 $mg.L^{-1}$de chloramphénicol (x-x).

Les concentrations cellulaires de *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 et de *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D étaient 233,33 ± 14,09 et 214,63 ± 21,95 $mg.L^{-1}$, respectivement.

Figure 10. Croissance de *M. austroafricanum* I-3401 sur MTBE.

Pendant la croissance, la D. O. $_{600\ nm}$ (♦-♦), et les concentrations résiduelles en MTBE (□-□), TBF (Δ-Δ) et TBA (▲-▲) ont été mesurées.

Figure 11. Amplification par PCR du cluster *mpd* dans l'ADN génomique de *M. austroafricanum* I-3401.

Légende :

MM : marqueur d'ADN 1kb,

Puits 1 et 6 : amplification de SEQ ID NO:9 codant pour le polypeptide de 47 kDa.

Puits 2 et 7 : amplification de SEQ ID NO:1 codant pour l'aldéhyde déshydrogénase de 55 kDa.

Puits 3 et 8 : amplification de SEQ ID NO:3 codant pour la protéine de 27 kDa

Puits 4 et 9 : amplification de SEQ ID NO:5 codant pour l'alcool déshydrogénase de 64 kDa.

Puits 5 et 10 : amplification de SEQ ID NO:7 codant pour la protéine de 25 kDa, la perméase putative.

C1 et C2 : contrôles négatifs sans amorces des ADN génomiques de *M. austroafricanum* I-2562 et I-3401, respectivement.

Figure 12. Amplification de séquences spécifiques de l'ADNr 16S dans divers micro-organismes.

La taille attendue du produit de PCR est 331 pb.

Les ADN génomiques des souches de *Rhodococcus ruber* (puits1), *Rhodococcus* sp. B-1 (puits 2), *Pseudomonas resinovorans* CA10 (puits 3), *Mycobacterium smegmatis* mc2 155 (puits 4), *Escherichia coli* DH10B (puits 5), *Mycobacterium austroafricanum* I-2562 (puits 6), *Mycobacterium austroafricanum* I-3401 (puits 7) et des échantillons provenant du milieu de la cassette 1 (puits 9) et du milieu de la cassette 2 (puits 10) d'une biobarrière-pilote ensemencée avec *M. austroafricanum* I-2562 pour la dégradation du MTBE ont été utilisés pour effectuer les réactions d'amplification par PCR. GeneRuler™ 1kb DNA Ladder a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire de l'ADN (puits 8).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide des exemples qui suivent ; ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration des objets de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : IDENTIFICATION DES POLYPEPTIDES INDUITS APRES CROISSANCE DE LA SOUCHE *M. AUSTROAFRICANUM* I-2562 SUR MTBE

Dans le but d'identifier et de détecter la présence de protéines induites spécifiquement après croissance des bactéries *M. austroafricanum* sur un milieu comprenant du MTBE, des extraits de protéines cytoplasmiques ont été réalisés à partir de culture sur MTBE ou sur glucose (Figure 2).

1.1. Préparation des extraits protéiques

Des cellules de la souche *M. austroafricanum* I-2562 sont cultivées sur 300 mL de milieu minéral (MM) défini précédemment décrit (Piveteau et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001, **55**: 369-373) en présence de MTBE ou de glucose comme source de carbone. Les cultures sont incubées en aérobiose à 30°C dans des fioles coniques sous agitation. La croissance est évaluée par mesure de l'absorbance ($D.O._{600nm}$) sur un spectrophotomètre UV-1601 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Lorsque la $D.O._{600}$ est de 1, les cellules sont collectées par centrifugation à 20,000 x *g* pendant 15 min, lavées deux fois dans du tampon phosphate (20 mM, pH 7) et remises en suspension dans 5 mL de tampon Tris-HCl à 50mM (pH=8,0) contenant 0,1M de dithiothreithol (DTT). Les cellules sont cassées par trois passages à la presse de French (20,000 psi) et toujours maintenues dans la glace. Les débris cellulaires sont éliminés par deux centrifugations à 1,000 x *g* pendant 2 min. Le surnageant est alors utilisé pour l'analyse du profil protéique. La concentration en protéines totales est mesurée par le kit Bio-Rad (Dye reagent, Bio-Rad laboratories GmbH, Munich, Allemagne).

1.2. Analyse des protéines solubles

L'électrophorèse sur ces extraits est effectuée sur des gels SDS-PAGE à 10 ou 15% de polyacrylamide contenant du SDS selon la méthode mise au point par Laemmli mis à part pour les conditions de migration (V =150 Volts pendant la première heure puis A=33mA de façon constante pendant les heures suivantes de la migration). 12,5 µg de protéines totales sont déposées par puits sur le gel, pour chaque source de carbone testée (Laemmli, *Nature*, 1970, **227**: 680-685).

Les profils protéiques de haut et de bas poids moléculaires révélés sur gels SDS-PAGE à 10 ou 15% d'acrylamide, respectivement, ont permis de détecter 9 protéines de poids moléculaires différents spécialement induites par la présence du MTBE (Figure 3).

1.3. Identification de deux séquences peptidiques du polypeptide MpdC (64 kDa) induit durant la croissance sur MTBE

Protocole du séquençage interne:

Chaque bande de gel correspondant à un polypeptide induit spécifiquement sur le profil protéique après croissance sur MTBE de *M. austroafricanum* I-2562 est découpée puis soumise à une réduction au DTT "dans le gel" puis à une alkylation des ponts disulfure par l'iodoacétamide (Jenö et al. *Analytical Biochemistry*. 1995, **224**: 75-82) avant digestion à la trypsine. L'enzyme utilisée est la trypsine de qualité "sequencing grade" de Promega (Helman et al. 1995, William et al., *In: Techniques VIII, Marshak, D., ed. Academic Press, San Diego*, 1997, 79-90). Les peptides ainsi générés sont alors extraits des morceaux de gel résiduels par 3 traitements de 30 min à 60°C, chacun en présence de 100 µL de TFA à 1% et acétonitrile à 60% suivi d'un passage au sonicateur pendant 10 min. Une dernière extraction est effectuée dans 50 µL d'acétonitrile pur pendant 10 min. Les 4 extraits sont mélangés et le volume liquide est réduit dans un évaporateur rotatif (Savant AES1010) pour obtenir un volume final de 5µL.

Les peptides sont alors séparés par HPLC (Vydac) sur une colonne microbore C18 (300°A ; 1 X 50mm #218TP5105) en utilisant le système de séparation Applied Biosystems 130A. Les peptides sont élués à 100 µL/min par un mélange de solvants A et B avec un gradient de mélange des solvants programmé ainsi: 3-63 min (0-50% B), 63-72min (50-100% B) et 72-75min (100% B). Le solvant A est constitué de TFA à 0,1% dans l'eau et le solvant B est composé de TFA à 0,08 % dans 70% d' acétonitrile et eau, les peptides sont détectés par un détecteur UV à 220 nm. Les différentes fractions sont collectées manuellement dans des tubes de 1,5 mL et déposées sur des disques en fibre de verre prétraités par addition de 7 µL de biobrène (Applied Biosystems Inc.). Les disques sont soumis à la dégradation d'Edman sur un séquenceur Procise (modèle 494 cLC) selon le protocole décrit par Hewick et al. (*J. Biol. Chem.*, 1981, **256**:7990-7997).

Une quantité de peptide équivalente à environ 1 pmole est déposée sur le séquenceur et un programme standard utilisant du TFA comme phase liquide est utilisé pour

le séquençage. Les dérivés acides aminés-Phénylthiohydantoine (PTH-aa) sont déterminés par comparaison avec des standards (PTH-standards, ABI) et analysés en ligne grâce à un système de séparation capillaire (ABI 140D) dès le démarrage du séquençage.

Résultats :

Parmi les protéines identifiées, une protéine migrant à 64 kDa (dénommée MpdC) est la plus fortement induite. L'extraction à partir de la bande de gel correspondante, la digestion trypsique suivie de micro-séquençages peptidiques internes ont permis l'obtention de 2 séquences de ce polypeptide.

La comparaison à l'aide du logiciel BLAST de la première séquence interne (**KQRGWAYDPNVRGLPE**) n'a pas révélé de similitudes significatives. En revanche l'analyse BLAST de la deuxième séquence interne (**STEHGLEGTIDWPISYEELAPYYDENDAIY**) montre une forte similitude (93%) avec de nombreuses oxydases et déshydrogénases appartenant à la famille des GMC-oxydoréductases (Cavener, *J. Mol. Biol.*, 1992, **223** : 811-814).

EXEMPLE 2 : PREPARATION DES SONDES

2.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été isolé des différentes souches testées selon le protocole de Pospiech et Neumann modifié de la façon suivante : une culture effectuée sur 50 mL de milieu LB (D.O. à 600nm de 0,7) est collectée par centrifugation à 10000 g pendant 15min à 4°C (Pospiech and Neumann, *Trends In Genetics.*, 1995, **11**: 217-218). Le culot est remis en suspension dans 5 mL de tampon SET (NaCl 75mM, EDTA 25mM, Tris-HCl 20mM à pH8). Du lysozyme est ajouté à une concentration finale de 1 $mg.mL^{-1}$ ainsi que de la lysostaphine à 112 $U.\mu L^{-1}$ (Sigma). Ce mélange réactionnel est incubé pendant 1 h à 37°C. Après traitement par le mélange SDS/Protéinase K, une étape d'extraction est effectuée dans le mélange réactionnel suivant où les différents réactifs sont ajoutés séquentiellement : ¼ volume de NaCl 5M suivi de 1/7,5 volume de CTAB à 10% - NaCl 0,7M (pré-chauffé à 65°C) et le mélange est incubé pendant 1h à 65°C. Un volume de chloroforme ($CHCl_3$) est ensuite ajouté et les étapes subséquentes sont réalisées selon le protocole original.

2.2. Préparation d'une sonde de 204 pb

Les deux séquences peptidiques obtenues dans l'exemple 1 ont été utilisées pour créer plusieurs paires d'amorces dégénérées en accord avec le code génétique universel et en tenant compte des deux possibilités d'appariement des séquences au sein de la séquence polypeptidique. La connaissance de ces séquences peptidiques permet, par le jeu du code génétique, de déduire les séquences nucléotidiques correspondantes. Le code génétique équivaut à la correspondance entre les séquences nucléotidiques et les séquences peptidiques. Ainsi, chaque triplet de nucléotides de la séquence nucléotidique ou codon correspond à un acide aminé unique. On parle de dégénérescence du code génétique dans la mesure où plusieurs codons synonymes peuvent spécifier un même acide aminé. En conséquence, par le jeu du code génétique, plusieurs séquences nucléotidiques peuvent être déduites pour une séquence peptidique unique. A partir de ces informations, on conçoit et synthétise des amorces oligonucléotidiques dégénérées : elles servent d'amorces dans le cadre d'une réaction d'amplification à l'issue de laquelle on obtient une sonde ayant une grande spécificité pour le ou les acides nucléiques recherchés.

Un seul couple d'amorces (MadF1/MadR1) a permis l'obtention par PCR, à partir d'ADN génomique pure de *M. austroafricanum* I-2562, d'un fragment d'acide nucléique de 204 pb (figure 4).

La séquence nucléotidique de l'amorce MadF1 est :

5'- GGNTGGGCNTAYGAYCC-3'

La séquence nucléotidique de l'amorce MadR1 est :

5'- GCRTCRTTYTCRTCSTAST-3'

La séquence en acides aminés a été obtenue grâce au logiciel ORF finder (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html). Elle est représentée par :

K Q R G W A Y D P N V R G L P E *D Y P V T G F T T P Y L M N N V G G S T M H Y A G H W P R Y K P V D F R K* **G T E H G L E G T I D W P I S Y E E L A P Y Y D E N D.**

L'analyse BLAST de cette séquence en acides aminés confirme l'appartenance de la protéine MpdC à la famille des GMC-oxydoréductases puisque l'analyse montre 62 % de similitude (44% d'identité sur 45 acides aminés) avec une choline déshydrogénase putative de *Bradyrhizobium japonicum*, 53 % de similitude (38% d'identité

sur 76 acides aminés) avec une glucose déshydrogénase d'une souche de *Burkholderia cepacia* et 61 % de similitude (38% d'identité sur 47 acides aminés) avec une oxydoréductase, toutes appartenant à cette même famille.

2.3. Préparation d'une sonde de 604 pb

A la suite des informations obtenues à partir de cette première amplification PCR, des amorces dégénérées ont été conçues et synthétisées en tenant compte de certains motifs conservés qui sont présents dans les protéines de la famille des GMC-oxydoréductases. Un des couples d'amorces (MadF2/MadR2) a permis d'obtenir un nouvel acide nucléique de 604 pb.

La séquence nucléotidique de l'amorce MadF2 est :

5'- TTCACCTTGTTGGAACCGCTGGG-3'

La séquence nucléotidique de l'amorce MadR2 est :

5'- TCATTACCGAGCCGACCTGC-3'

Les sondes sont marquées à la dUTP-digoxigenine (DIG DNA Labelling and Detection Kit; Roche Diagnostics, Laval Canada).

EXEMPLE 3: CLONAGE D'UN ACIDE NUCLEIQUE SEQ ID NO:11

3.1. Southern blot

Les expériences de Southern Blot ont été réalisées sur de l'ADN génomique de la souche *M. austroafricanum* I-2562 tel que préparé dans l'exemple 1. 5 µg d'ADN génomique est partiellement digéré à l'aide d'enzymes de restriction choisies en fonction de leur site de restriction *BamH*I, *EcoR*I, *Fsp*I, *Knp*I, *Nhe*I, *Nru*, *Pst*I, *Pvu* II ou *Sma*I (puits 2-8, respectivement sur la figure 5). Après migration sur gel, les ADN digérés sont transférés sur une membrane de nylon. A l'aide de la sonde de 204 pb marquée à la dUTP-digoxigenine (DIG DNA Labelling and Detection Kit; Roche Diagnostics, Laval Canada), on procède au criblage par hybridation des acides nucléiques digérés. La sonde de 204 pb s'hybride spécifiquement à des fragments d'acides nucléiques compris entre 2 et 12 kb (figure 5). Les positions correspondant à la migration de l'ADN du marqueur de poids moléculaire III marqué avec la digoxigénine (Roche; puits 1 et puits 9) sont indiqués sur la gauche du luminographe.

3.2. Construction de mini-banques, criblage et clonage

Ces fragments d'acides nucléiques sont clonés dans le plasmide pBluescript II KS (pBKS) (+/-) après digestion par *Sma*I. Les plasmides recombinants sont utilisés pour transformer des bactéries compétentes DH10B d'*E. coli* préparées (Hanahan, D et al., *Methods Enzymol.* 1991, **204**:63-113). Chaque colonie bactérienne issue d'un clone bactérien renfermant un plasmide recombinant est transférée sur une membrane de nitrocellulose et criblée par hybridation sur colonie avec la sonde de 604 pb telle qu'obtenue dans l'exemple 2.3. Pour chaque clone positif, c'est-à-dire s'hybridant avec la sonde, le plasmide recombinant (pKS1) est extrait et purifié grâce au kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN, Mississauga, Canada). Pour permettre le séquençage, une concentration du plasmide a dû être réalisée à l'aide d'une digestion par *Sma*I de la préparation plasmidique suivie de l'extraction uniquement du plasmide linéaire. Après analyse du séquençage, la partie 5' en amont du gène *mpdC* étant manquante, une nouvelle mini-banque a été réalisée afin d'obtenir un fragment *Pst*I de 5,6 kb en utilisant les même techniques que précédemment, mais en utilisant la sonde de 914 pb chevauchant le premier insert et obtenue à l'aide du couple d'amorces MF3/MR3. Le plasmide pKS3 a été isolé à partir d'un clone positif révélé par « hybridation sur colonies » (Figure 6). Le fragment *Pst*I-*Pst*I détecté par la sonde a donc été cloné selon le même protocole que précédemment afin d'obtenir un plasmide recombinant pKS3.

L'intégralité de l'insert PstI présent dans ce plasmide a été séquencée selon la technique de « primer-walking » à l'aide d'une T7 ADN polymérase (T7-DNA sequencing kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) et d'un séquenceur (ABT prism 377 automated fluorescence sequencer ; Applied Biosystems, Foster City, CA). Les séquences nucléotidiques et d'acides aminées correspondantes ont été comparées avec celles contenues dans les bases de données EMBL, Swissprot et GenBank en utilisant les logiciels BLASTN et BLASTX du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

EXEMPLE 4 : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES DIFFERENTS CADRES OUVERTS DE LECTURE (ORF) COMPRIS DANS LA SEQUENCE SEQ ID NO :11 DE M. *AUSTROAFRICANUM* I-2562

L'analyse des cadres ouverts de lecture présents dans la séquence d'ADN *PstI/Sma*I, SEQ ID NO :11 obtenue à l'issue des deux clonages décrits dans l'exemple 3 a été

réalisée à l'aide du logiciel « ORF finder ». Cinq séquences codantes ont été identifiées SEQ ID NO1, SEQ ID NO :3, SEQ ID NO :5, SEQ ID NO :7 et SEQ ID NO :9 ; elles codent respectivement pour les polypeptides SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8 et SEQ ID NO :10 (cf tableau ci-dessous).

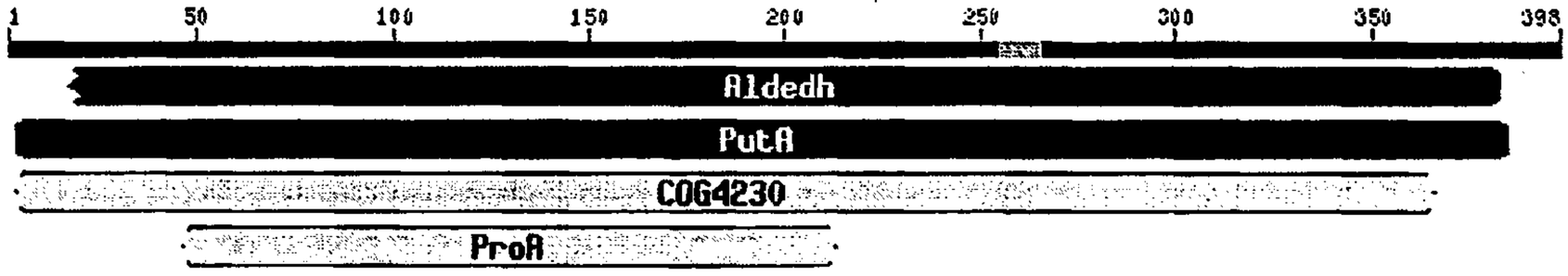
Séquence nucléotidique	ORF	Séquence en acides aminés du polypeptide	Nom du polypetide	Poids moléculaire
SEQ ID NO :1 1515 pb	*mpdC*	SEQ ID NO :2 552 acides aminés	MpdC	55 kDa
SEQ ID NO :3 648 pb	*orf1*	SEQ ID NO :4 215 acides aminés		27 kDa
SEQ ID NO :5 1659 pb	*mpdB*	SEQ ID NO :6 552 acides aminés	MpdB	64 kDa
SEQ ID NO :7 672 pb	*orf2*	SEQ ID NO :8 223 acides aminés		25 kDa
SEQ ID NO :9 1233 pb	*mpdR*	SEQ ID NO :10 410 acides aminés	MpdR	47 kDa

La séquence en acides aminés SEQ ID NO :6 du polypeptide MpdB de 64 kDa a donc pu être corrélée avec les premières séquences polypeptidiques et les amplifications PCR de 204 et 604 pb. Ce gène *mpdB* est compris dans une organisation génétique comprenant 3 autres ORFs dans la même orientation, *mpdC*, *orf1* et *orf2*, codant respectivement pour les protéines de 55, 27 et 25 kDa. En amont de ce cluster, un nouveau gène orienté dans le sens opposé au premier cluster et codant pour une protéine de 47 kDa a été identifié et nommé *mpdR*. L'organisation de ce système est schématisée dans la Figure 7.

4.1. <u>ORF *mpdC*, SEQ ID NO :1</u>

L'analyse par le logiciel BLAST schématisée ci-dessous montre de fortes similitudes avec de nombreuses déshydrogénases appartenant à la famille des aldéhydes déshydrogénases. Le polypeptide SEQ ID NO :2 codé par cet ORF correspond à un

polypeptide de 55 kDa, dont l'expression est induite sur MTBE. Ce polypeptide est capable de déshydrogéner l'hydroxybutyraldéhyde en HIBA.



Résultat obtenu par le logiciel "NCBI domain search" :

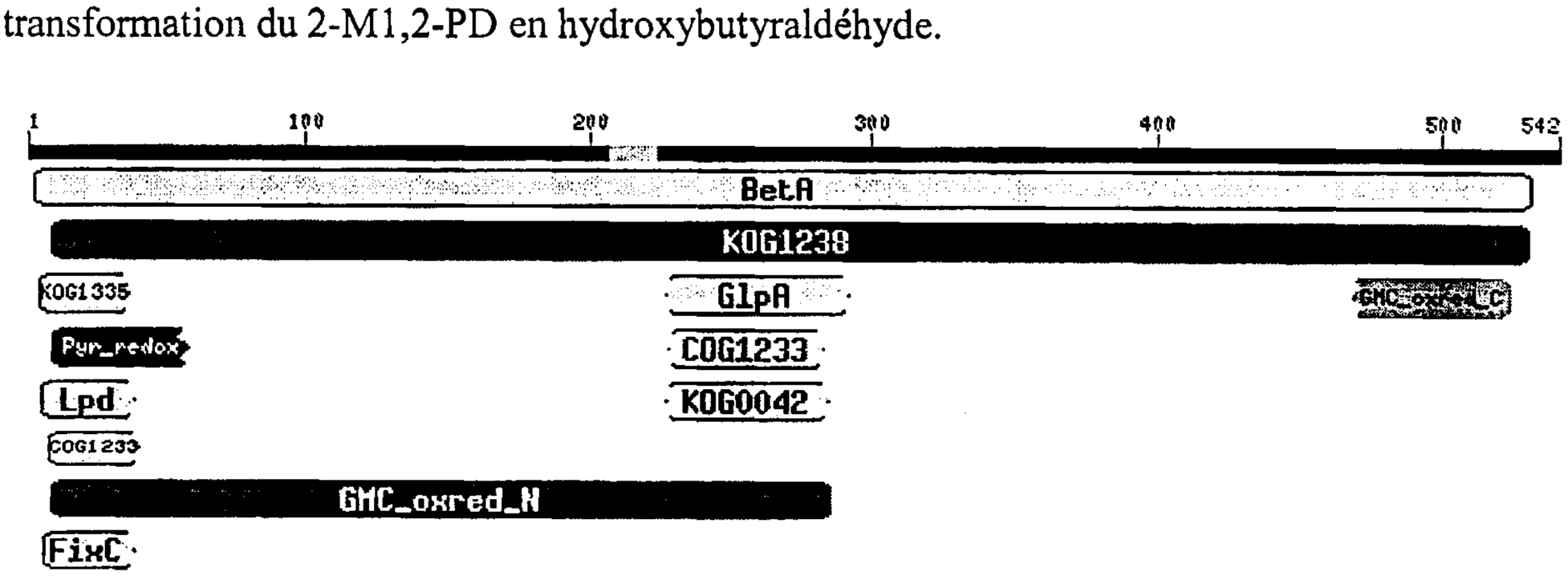
Aldedh, Aldehyde dehydrogenase family	e-value = 3e-114
PutA, NAD-dependent aldehyde dehydrogenases	e value = 5e-106
COG4230, Delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	e value = 3e-44

4.2. ORF *orf1*, SEQ ID NO :3

Le polypeptide SEQ ID NO :4 codé par cet ORF correspond à un polypeptide de 27 kDa, dont l'expression est induite sur MTBE.

4.3. ORF *mpdB*, SEQ ID NO :5

Le polypeptide SEQ ID NO :6 codé par cet ORF correspond à un polypeptide de 64 kDa, dont l'expression est induite sur MTBE. Il a de fortes similitudes avec de nombreuses oxydases et déshydrogénases appartenant à la famille des GMC (Glucose-Méthanol-Choline) oxydoréductases. L'analyse par le logiciel "NCBI Conserved Domain Search" a détecté plus précisément des similitudes avec la protéine codée par le gène *betA*, codant pour la choline déshydrogénase appartenant à cette même famille. La séquence en acides aminés déduite peut être corrélée avec la séquence N-terminale et les deux séquences internes de la protéine de 64 kDa induite spécifiquement sur MTBE et responsable de la transformation du 2-M1,2-PD en hydroxybutyraldéhyde.



NCBI conserved domain search result :

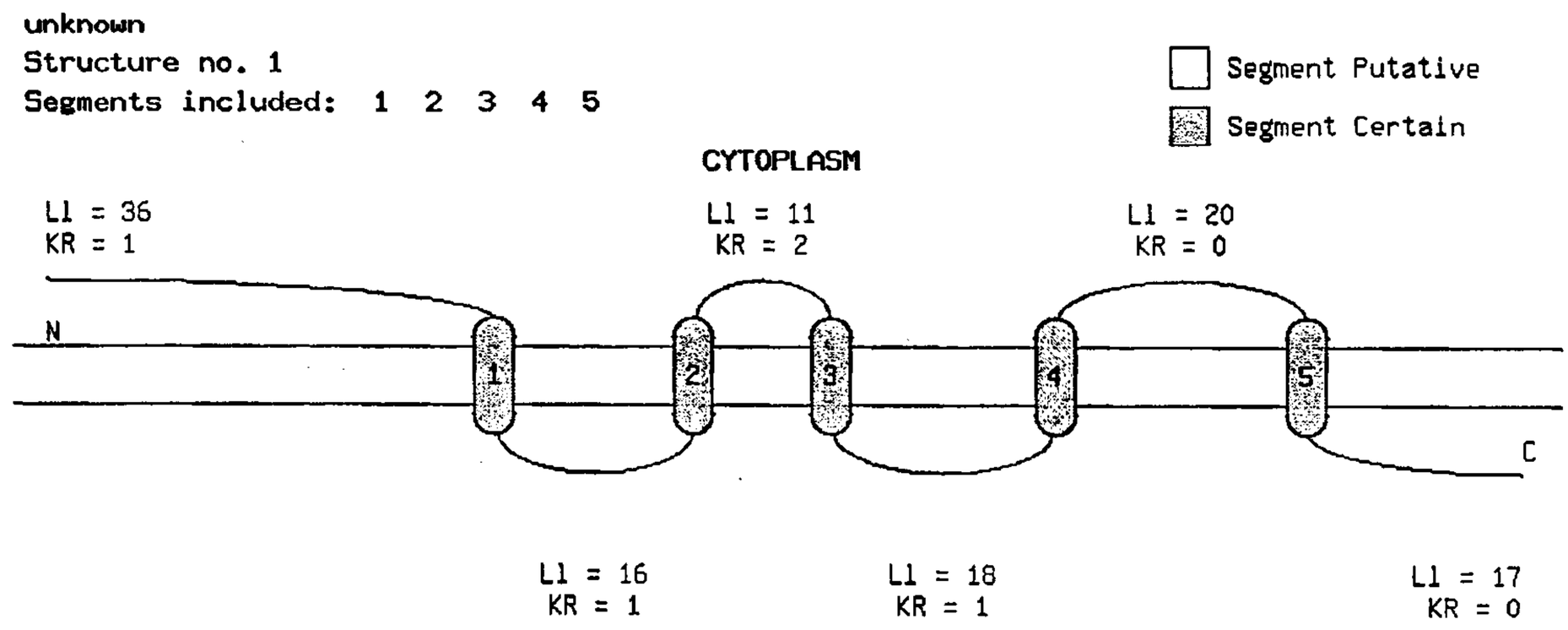
BetA, Choline dehydrogenase and related flavoproteins	e-value = 3e-48
KOG1238, Glucose dehydrogenase/choline dehydrogenase	e-value = 2e-07
KOG1335, Dihydrolipoamide dehydrogenase [Energy production]...	e-value = 6e-05
GMC_oxred_N, GMC oxidoreductase	e-value = 2e-03
GMC_oxred_C, GMC oxidoreductase	e-value = 4e-03

4.4. ORF *orf2*, SEQ ID NO :7

Le polypeptide SEQ ID NO :8 codé par cet ORF correspond à un polypeptide de 25 kDa. L'analyse BLAST a révélé une homologie avec une Di/Tripeptide perméase (COG3104: Dipeptide/tripeptide permease [*Rubrivivax gelatinosus* PM1] Length = 372, Expect = 2e-24). L'analyse de l'hydropathie de cette protéine par le logiciel "Predict Protein" a révélé la présence de 5 segments transmembranaires dont l'organisation est schématisée ci-dessous :

L'expression de ce polypeptide est probablement induite en présence de MTBE.

Cette protéine se trouve donc au sein de la membrane des bactéries de l'espèce *M. austroafricanum*.



4.5. ORF *mpdR*, SEQ ID NO :9

Le polypeptide SEQ ID NO :10 codé par cet ORF correspond à un polypeptide de 47 kDa. Cet ORF est situé en amont des quatre ORF précédentes et est orienté dans l'autre sens comme le montre la Figure 7. L'analyse BLAST révèle une similitude de la première moitié de la séquence avec de nombreux régulateurs transcriptionnels σ54, dont notamment de type AcoR :

Sigma-54 dependent transcriptional activator [*Azoarcus* sp. EbN1]	e = 6e-23
COG3284: AcoR Transcriptional activator of acetoin/glycerol metabolism	e = 1e-22

D'après ces analyses, il n'est pas possible de détecter si l'expression de ce polypeptide est induite spécifiquement ou pas sur le profil MTBE mais il est possible de détecter son expression lors d'analyse RT-PCR. Elle joue potentiellement un rôle dans la régulation de l'expression des gènes *mpd*.

EXEMPLE 5 : EXPRESSION PAR RT-PCR DU CLUSTER DES GENES *mpd*

5.1. Extraction de l'ARNm de *M.austroafricanum* I-2562

Pour les expériences d'extraction d'ARN, tous les ustensiles, toutes les solutions et la vaisselle ont été préparés de manière à éviter la contamination par des ARNases selon les procédures standards (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 2001).

L'ARN total de *M. austroafricanum* I-2562 a été extrait à partir de 20mL d'une culture à $O.D._{600nm}$ de 0,7. Après une incubation sur glace de 30 min, les cellules ont été centrifugées (8000 xg pendant 10min à 4°C) et conservées sur glace. Par la suite, 600µL de lysozyme (Roche Diagnostics, Laval, Canada) à $3mg.mL^{-1}$ et 600µL de lysostaphine (Sigma, St-Louis, Missouri) à $50µg.mL^{-1}$ ont été ajoutés au culot de cellules et le mélange est incubé à 37°C durant 10 min. 10mL de RNAwiz™ (Ambion, Austin, Texas) ont été par la suite ajoutés et le mélange est vortexé pendant 15 sec. Le mélange est ensuite fractionné dans des tubes de 2mL (1400 µL/tube) contenant 250 mg de billes de zirconium-silica (0,1 mm de diamètre) placés dans un adaptateur pour vortex (Ambion) et vortexés pendant 10 min. Après

avoir centrifugé (13000 xg à 4°C pendant 5 min), le lysat bactérien correspondant aux surnageants de chaque tube est transféré dans de nouveaux tubes de 2 mL et 0,2 volume de $CHCl_3$ est ajouté dans chaque tube. Les tubes sont ensuite vortexés pendant 30 sec, incubés à température ambiante pendant 10 min, puis centrifugés (13000 xg à 4°C pendant 5 min) afin de récupérer les surnageants dans de nouveaux tubes de 2mL. Les extraits d'ARN sont précipités en ajoutant séquentiellement 0,5 volume d'H_20 traitée avec du DEPC, 1 volume d'isopropanol et $1/50^{ème}$ de volume de glycogène Rnase-free à 5 $mg.mL^{-1}$ (Ambion), bien mélangés et incubés à température ambiante pendant 10 min. L'ARN est centrifugé (13000 xg à 4°C pendant 5min), lavé deux fois avec de l'éthanol à 70%, séché 30 sec (DNA Speed Vac, Savant) et resuspendu dans l'H_2O-DEPC (25µL/tube). La qualité de l'ARN a été déterminé par électrophorèse à l'aide d'un gel d'agarose à 1% non dénaturant dans un tampon TBE 0,5X (Trizma Base 45mM, acide borique 45mM, Na_2EDTA1mM à pH=8,3). L'ARN est précipité avec $1/10^{ème}$ volume d'acétate de sodium 3M à pH=7,0 et 2,5 volume d'éthanol à 95%, puis est conservé à -80°C.

5.2. Traitement à la DNase et Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)

Deux mg d'ARN extraits de *M. austroafricanum* I-2562 ont été traités avec le kit « DNA-Free » (Ambion, Austin, Texas) selon les recommandations du fabricant. L'élimination de l'ADN a été vérifiée à l'aide d'amplification PCR en utilisant les amorces spécifiques créées dans le cluster *mpd* et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. La concentration finale d'ARN a été quantifiée à 260 nm à l'aide d'un Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). Les expériences de Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR) ont été mises en place selon le protocole du kit « One step RT-PCR » de QIAGEN (QIAGEN, Mississauga, Canada) tel que décrit par le fabricant. On a utilisé 120 ng d'ARN à chaque tentative de RT-PCR avec, à chaque fois en parallèle, une amplification PCR contrôle positive (et négative) avec (ou sans) 100 ng d'ADNg de *M. austroafricanum* I-2562. Les conditions de RT-PCR sont décrites ci-dessous.

- étape de reverse transcription :

1) 30 min à 50°C

2) ∞ à 50°C

- étape PCR:

15 min à 95°C

30 à 40 cycles (variables en fonction de l'intensité du signal) :

1) 30 sec à 94°C

2) 1 min à 55°C

3) 1 min à 72°C

-étape d'élongation finale:

1) 10min à 72°C

2) ∞ à 4°C

5.3. Expression par RT-PCR du cluster des gènes *mpd* pendant la croissance de *M.austroafricanum* I-2562 sur TBA

L'expression des gènes *mpd* est testée après croissance des bactéries sur TBA, le principal intermédiaire de la biodégradation du MTBE (voir Figure 1). Des paires d'amorces chevauchant les différents gènes *mpd* sont créées (voir Tableau ci-dessous) afin de vérifier que l'ARNm correspondant à ce cluster était transcrit en un monocistron. L'ARN total est extrait des cultures après croissance sur TBA et les RT-PCR sont réalisées avec les différentes amorces. Le résultat de cette expérimentation qui est présentée dans la Figure 8 montre que très probablement la transcription du cluster des gènes *mpd* est monocistronique ; les gènes étant organisés en opéron. (Ma et al. *J. Bacteriol.*, 2002, **184** : 5733–5745).

Tableau : Amorces utilisées dans l'ensemble des expériences d'amplification par PCR et RT-PCR :

Amorces	Séquence	Région amplifiée
Bott1	5'-TGCACACAGGCCACAACCCA-3'	ADNr 16S
Bott2	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	ADNr 16S
244	5'-CCCACTGCTGCCTCCCGTAG-3'	ADNr 16S
Tb11	5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3'	*hsp*65
Tb12	5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3'	*hsp*65
MaFV2	5'-GTCTAATACCGAATACACCCTTCT-3'	ADNr 16S
MaRV6	5'-GTAGTTGGCCGGTCCTTCTTCTCC-3'	ADNr 16S
MF1	5'-TGAGAAGCCTCGTGTATTAC-3'	*orf1-mpdB*
MR1	5'-GAGATAAGGCGTGGTGAA-3'	*orf1-mpdB*
MF2	5'-AGTGACGGCACCCATAAGTG-3'	*mpdR* interne

MR2	5'-TCGAGGTGTTGAGGTCCGAAT-3'	*mpdR* interne
MF3	5'-ATCATCCCGTGGAACTAC-3'	*mpdC* interne
MR3	5'-TGACCTGGGCGATGTGTT-3'	*mpdC* interne
MF4	5'-ATCAGACCTGGGATGTGC-3'	*mpdB-orf2*
MR4	5'-GGCTGTGAAAGTCGGATGA-3'	*mpdB-orf2*
RT-PCR-F1	5'-AGTGACGGCACCCATAAGTG-3'	*mpdR* interne
RT-PCR-R1	5'-TCGAGGTGTTGAGGTCCGAAT-3'	*mpdR* interne
RT-PCR-F2	5'-GCAGGTCGGCTCGGTAATGA-3'	*mpdC-orf1*
RT-PCR-R2	5'-GTAATACACGAGGCTTCTCA-3'	*mpdC-orf1*
RT-PCR-F3	5'-ACGGTCTCGTCGGCAAATAC-3'	*mpdB-orf2*
RT-PCR-R3	5'-GCACATCCCAGGTCTGAT-3'	*mpdB-orf2*

EXEMPLE 6: EXPRESSION DES GENES *mpd* DANS LA BACTERIE DE LA SOUCHE *M. SMEGMATIS* MC2 155

6.1. Construction du vecteur d'expression contenant les gènes *mpd* et transformation des bactéries

Les gènes compris dans l'organisation génétique *mpd* ont été insérés au sein du vecteur pCL4D en deux étapes (Picardeau et al., *Microbiology*, 2000, **146**: 305-313). Dans un premier temps, le fragment *Not*I-*Not*I de 4401 paires de bases contenu dans le plasmide pKS1 a été digéré par *Not*I (NEB, Pickering, Canada) et cloné dans le site *Hinc*II de pCL4D. Les cellules chimiocompétentes d'*E. coli* DH10B ont été utilisées pour la transformation et la sélection des transformants sur du milieu LB contenant 20 $\mu g.mL^{-1}$ de kanamycine. La détection des clones positifs contenant le plasmide recombinant p4D1 s'est faite par amplification PCR à l'aide des amorces Forward et Reverse (Tableau dans l'Exemple 5). Lors de la seconde étape, le fragment *Pst*I de 5574 pb contenant la partie manquante du gène *mpdC*, le gène *mpdR* et l'*orf3* a été extrait par digestion du plasmide pKS3 à l'aide de l'enzyme *Pst*I. Ce fragment a été introduit au sein du plasmide p4D1 digéré au préalable par *Pst*I permettant ainsi d'enlever le fragment PstI correspondant à la sonde de 914 pb présent dans le plasmide p4D1. L'orientation du fragment PstI dans le plasmide recombinant p4D2 contenant la totalité du cluster *mpd* a été vérifiée par PCR.

Dans le but d'exprimer l'ensemble des gènes clonés, le vecteur p4D2 a été introduit dans des cellules compétentes de la souche *M. smegmatis* mc2 155 en utilisant la

technique d'électroporation. Un transformant (souche *M. smegmatis* mc2 155-clone 9) issu de cette transformation a été isolé sur boîte LB contenant de la kanamycine (20 $\mu g.mL^{-1}$). Le plasmide pCL4D ne comprenant pas d'insert a également été introduit dans des bactéries de la souche *M. smegmatis* mc2 155 (souche *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D) et sert de contrôle.

6.2. Expression fonctionnelle des gènes *mpdB* et *mpdC* chez *M. smegmatis* mc2 155

Les bactéries *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 (avec insert) et *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D (contrôle) sont conservées sur du milieu LB contenant 20 $mg.L^{-1}$ de kanamycine. Les deux souches sont cultivées sur 200 mL de milieu LB contenant 20 $mg.L^{-1}$ de kanamycine pendant 72 h à 30°C. Les cellules de *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 et *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D sont collectées par centrifugation (13,000 g pendant 15 min), lavées deux fois et mises en suspension dans 40 mL de tampon phosphate (20 mM, pH 7) contenant le substrat à tester (MTBE, TBA, 2-M-1,2-PD ou HIBA) dans des fioles scellées de 120 mL. Après ensemencement, les fioles sont incubées à 37°C sur un agitateur rotatif. Lorsque c'est nécessaire, du chloramphénicol est ajouté à partir d'une solution dans l'eau stérilisée par filtration (0,22 µm) afin d'obtenir une concentration finale de 400 $mg.L^{-1}$. Les échantillons filtrés de ces cultures sont analysés par CPG ou HPLC. La dégradation du substrat est suivie sur une période de 24 h. Les activités spécifiques (mg de substrat dégradé.g^{-1} de biomasse.h^{-1}) sont calculées à partir des vitesses maximales de dégradation.

6.3. Expression chez *M. smegmatis* mc2 155 du cluster des gènes *mpd* isolés de *M. austroafricanum* I-2562

Un fragment de 9,1 kb, SEQ ID NO :11 contenant le cluster des gènes *mpd* de *M. austroafricanum* I-2562 a été cloné dans le plasmide pCL4D (Picardeau et al. 2000). Ce plasmide, nommé p4D2, a ensuite été utilisé pour effectuer la transformation de *M. smegmatis* mc2 155. La transformation a été réalisée aussi avec le plasmide pCL4D, comme contrôle. Deux transformants ont été sélectionnés *: M. smegmatis* mc2 155-clone 9 (contenant p4D2 et portant donc les gènes *mpd*) et *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D (portant le vecteur, pCL4D). Les deux souches sont cultivées sur du milieu LB contenant de la kanamycine puis testées dans des expériences en resting cells pour la capacité à dégrader le MTBE, le TBA, le 2-M1,2-PD et le HIBA. Aucune dégradation du MTBE, du TBA ou du HIBA n'a été observée

avec les souches *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 et *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D (Tableau 2).

La dégradation du 2-M1,2-PD et la production stoechiométrique de HIBA (312,1 ± 2,3 µM dégradé et 311,6 ± 4,5 µM produit, respectivement) a été observé seulement en présence de la souche *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 (Figure 9). Aucune dégradation du 2-M1,2-PD n'a été observée en présence de la souche *M. smegmatis* mc2 155-pCL4D ou dans le contrôle abiotique. Les deux souches étant cultivées sur milieu complet LB, l'induction des gènes était nécessaire pour produire les enzymes correspondantes et c'est pourquoi la dégradation ne commence qu'après 4 h d'incubation en présence de 2-M1,2-PD Aucune dégradation du 2-M1,2-PD n'est observée quand les cellules de *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 sont incubées en présence de 2-M1,2-PD et de chloramphénicol qui est connu pour inhiber la traduction des ARNm en protéines.

La vitesse maximale de dégradation du 2-M-1,2-PD par la souche n *M. smegmatis* mc2 155-clone 9 a été calculée et est de 2,34 ± 0.41 µmol.g^{-1} (poids sec).min^{-1}.

EXEMPLE 7 : IDENTIFICATION D'UNE NOUVELLE SOUCHE *M. AUSTROAFRICANUM* I-34017, CAPABLE DE CROITRE SUR MTBE

L'eau de ruissellement collectée au fond d'un réservoir de stockage d'une essence supplémentée en MTBE a été utilisée pour ensemencer du milieu minéral MM contenant 200 mg.L^{-1} de MTBE. Le MTBE a été lentement mais totalement consommé en 140 jours. Toutes les bactéries formant des colonies après étalement sur boîtes de milieu LB plates ont été individuellement réisolées puis testées pour leur capacité à pousser sur MM contenant du MTBE comme seule source de carbone et d'énergie. Une bactérie Gram positive et aérobie stricte formant des bâtonnets, et poussant sous forme de colonies jaunes sur boîtes de milieu LB a été isolée et s'est avérée capable de croissance sur MTBE.

L'ADNr 16S de la souche I-3401 a été totalement séquencé pour les deux brins et le gène *hsp65* a été partiellement séquencé. La séquence de l'ADNr 16S montre que la nouvelle souche I-3401, SEQ ID NO :13, est très proche de *M. austroafricanum* I-2562, avec sept nucléotides différents (5 substitutions et 2 insertions chez I-3401). La séquence du gène *hsp65* diffère par huit nucléotides de celle du gène *hsp65* de la souche-type (de référence) de

M. austroafricanum. La capacité de *M. austroafricanum* I-3401 à pousser sur MTBE a été montrée (Figure 10).

EXEMPLE 8 : CREATION D'AMORCES SPECIFIQUES DE L'ADNr 16S DE M. AUSTROAFRICANUM ET CONDITIONS SPECIFIQUES DE PCR

8.1. Analyses de l'ADNr 16S et de gène *hsp65* de la souche *M. austroafricanum* I-2562

Afin d'identifier la nouvelle souche I-3401, une amplification par PCR de l'ADNr 16S a été réalisée en utilisant le couple d'amorces Bott 1 forward / Bott 2 reverse (voir tableau de l'exemple 5). Le produit d'amplification a été purifié en utilisant le kit Qiagen (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) et le séquençage nucléotidique a été réalisé en utilisant l'amorce 244 (voir tableau de l'exemple 5). L'amplification par PCR du gène *hsp65* a été réalisée en utilisant l'amorce forward Tb11 et l'amorce reverse Tb12 (voir tableau de l'exemple 5). Le produit d'amplification a été purifié avec le kit Qiagen et le séquençage a été effectué en utilisant l'amorce Tb11. La réaction de séquençage est effectuée avec le kit de séquençage BigDye cycle terminator (Version 3.1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) comme décrit par le fabricant en utilisant 25 ng d'ADN purifié et 15 µmol des amorces universelles utilisées pour le séquençage de l'ADNr 16S des Eubactéries. La réaction est programmée comme suit : 25 cycles de 10 sec à 96°C, 5 sec à 50°C, et 4 min à 60°C. Les produits de séquençage sont purifiés sur des colonnes Centri-Sep comme décrit par le fabricant (Princeton Separations, Inc., Adelphia, NJ, USA) pour éliminer l'excès de terminateurs. Les séquençages sont réalisés sur un séquenceur automatisé à fluorescence ABT Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les séquences nucléotidiques obtenues sont comparées à celles contenues dans la banque de données de gènes EMBL/GenBank et les identités sont évaluées en utilisant le système d'alignement BLAST (Altschul et al., 1997).

8.2. Création d'amorces et conditions spécifiques de PCR

Les séquences d'ADNr 16S de *M. austroafricanum* I-2562 et d'espèces proches des mycobactéries sont alignées et les séquences conservées et variables sont comparées. Sur la base des analyses de ces alignements multiples, plusieurs paires d'amorces spécifiques de l'espèce *M. austroafricanum* sont comparées aux séquences d'ADNr 16S

disponibles en utilisant le programme de recherche dans les banques de données BLAST (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25 :** 3389-3402). Ces séquences ont aussi été analysées afin de déterminer leur température de dénaturation (Tm), la possibilité de formation de dimères et leur contenu en (G+C) en utilisant le logiciel Amplify. La paire d'amorces la plus efficace était : MaFV2 forward et MaRV6 reverse (voir tableau de l'exemple 5). La taille du produit de PCR attendue est de 331 pb.

Les PCR sont réalisées de la façon suivante : chaque tube contient 5 µL d'ADN génomique provenant d'une lyse par chauffage ("boiling lysis") pendant 10 min de colonies isolées sur boîtes fraîchement étalées avec les souches de collection, les souches de *Mycobacterium austroafricanum*, ou les échantillons provenant d'une bio barrière ensemencée avec *M. austroafricanum* I-2562, 2.5 unités d'ADN polymérase *Taq* (Amersham Pharmacia Biotech), 5 µL du tampon ADN polymérase *Taq* dilué 10X (Amersham pharmacia biotech), 25 pmol de chacune des amorces, 4 µL de désoxyribonucléotides triphosphates à 2,5 mM (à 200 µM chacun: dATP, dGTP, dCTP, et dTTP), 2 µL de $MgCl_2$ à 25 mM, et de l'eau distillée stérile pour avoir un volume final de 50 µL. Le contrôle négatif contient le même mélange que décrit ci-dessus sauf que l'ADN est remplacé par de l'eau stérile. Les échantillons sont préalablement chauffés 3 min à 95°C dans un appareil Bio-Rad Thermal iCycler (Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada) puis la température est abaissée à 80°C avant leur addition au mélange enzymatique ADN polymérase *Taq* /tampon dilué 10X. Dans le but d'obtenir des conditions d'amplification spécifique, les conditions d'amplification sont les suivantes : 30 sec à 94°C, 1 min à 68°C, 1 min à 72°C répété pendant 30 cycles et l'extension finale est effectuée à 72°C pendant 7 min. Les tubes de PCR sont conservés à 4°C jusqu'au moment d'effectuer l'électrophorèse sur gel d'agarose. 10 µL de chacun des produits de PCR sont mélangés avec 2 µL de tampon de dépôt contenant du glycérol à 30% (v/v), du bleu de bromophénol à 0,15% (w/v), du xylène cyanol à 0,15% (w/v). Les différents produits de PCR ainsi préparés et le marqueur d'ADN 1kb GeneRuler™ (MBI Fermentas, Inc., Burlington, Ontario, Canada) sont déposés sur gel d'agarose à 1% (w/v) préparé dans du TAE. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium et révélé aux UVs à 254 nm sur un transilluminateur. Les gels sont photographiés en utilisant un film Polaroid de type 57.

EXEMPLE 9 : DETECTION DE LA PRESENCE DE L'ORGANISATION GENETIQUE *mpd* AU SEIN DE LA NOUVELLE SOUCHE *M. AUSTROAFRICANUM* I-3401.

La biodégradation du MTBE par la souche *M. austroafricanum* I-3401 étant similaire à celle de *M. austroafricanum* I-2562, la présence ou non du « cluster » *mpd* au sein de la nouvelle souche a été étudiée. Ainsi, des couples d'amorces, MF1/MR1, MF2/MR2, MF3/MR3 et MF4/MR4 amplifiant spécifiquement dans les différents gènes du cluster *mpd* ont été créés (Tableau de l'exemple 5). Des amplifications par PCR effectuées sur l'ADN génomique de *M. austroafricanum* I-3401 ou I-2562 (ce dernier, comme contrôle positif) ont été réalisées (Figure 11) et montrent des amplifications positives pour tous les couples d'amorces. Ceci démontre la présence d'une organisation génétique similaire à celle des gènes *mpd* de *M. austroafricanum* I-2562 au sein du génome de la nouvelle souche *M. austroafricanum* I-3401. Il est donc vraisemblable que la nouvelle souche utilise le même chemin réactionnel pour assimiler le 2-M1,2-PD au cours du catabolisme du MTBE.

EXEMPLE 10 : DETECTION SPECIFIQUE DE *M. AUSTROAFRICANUM* I-2562 ET I-3401 PAR PCR.

Les amorces MaFV2 et MaRV6 spécifiques de l'espèce *M. austroafricanum* ont été créées (voir tableau de l'exemple 5). La spécificité de ces amorces se fixant dans deux des régions variables V2 et V6 de l'ADNr 16S de *M. austroafricanum* I-2562 a été évaluée en utilisant de l'ADN génomique de souches plus ou moins proches. Les résultats présentés sur la Figure 12 montrent que seuls les ADN génomique des deux souches de *M. austroafricanum*, I-2562 et I-3401, métabolisant le MTBE permet d'obtenir une amplification PCR positive. Ces amorces permettent donc de détecter spécifiquement les microorganismes de cette espèce. D'autres microorganismes du genre *Nocardiaceae* ne présentent pas d'amplification par PCR.

Les réalisations de l'invention au sujet desquelles un droit exclusif de propriété ou de privilège est revendiqué, sont définies comme il suit :

1. Polypeptide isolé ou purifié ayant une activité dans la voie de dégradation du MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le *tert*-butyl alcool (TBA), le 2-méthyl 1,2-propanediol (2-M1,2-PD), l'hydroxyisobutyraldéhyde, l'acide hydroxyisobutyrique (HIBA), ledit polypeptide étant sélectionné dans le groupe consistant en :

a) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO :2, SEQ ID NO :4, SEQ ID NO :6, SEQ ID NO :8 ou SEQ ID NO :10,

b) un polypeptide comprenant une séquence en acides aminés qui présente au moins 70 % d'identité, préférentiellement 75%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% d'identité avec la séquence en acides aminés d'un polypeptide tel que défini en a),

c) un polypeptide tel que défini en a) ou b) dont la séquence en acides aminés comprend une substitution, délétion, insertion, addition ou mutation d'un ou plusieurs acides aminés sur toute sa longueur,

d) un fragment biologiquement actif d'au moins 15 acides aminés consécutifs d'un polypeptide tel que défini en a), b) ou c).

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que son activité dans la voie de dégradation du MTBE est une activité d'aldéhyde déshydrogénase, préférentiellement une activité de déshydrogénation de l'hydroxyisobutyraldéhyde en HIBA, et en ce que la séquence en acides aminés définie en a) est SEQ ID NO :2.

3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que son activité dans la voie de dégradation du MTBE, est une activité d'alcool déshydrogénase, préférentiellement une activité de déshydrogénation du 2-M1,2-PD en hydroxyisobutyraldéhyde, et en ce que la séquence en acides aminés définie en a) est SEQ ID NO :6.

4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que son activité dans la voie de dégradation du MTBE est une activité de perméase, préférentiellement de

di/tripeptide perméase, et en ce que la séquence en acides aminés définie en a) est SEQ ID NO:8.

5. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce que son activité dans la voie de dégradation du MTBE est une activité de régulateur transcriptionnel, et en ce que la séquence en acides aminés définie en a) est SEQ ID NO:10.

6. Acide nucléique purifié ou isolé, caractérisé en ce qu'il code pour au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5.

7. Acide nucléique isolé ou purifié codant pour au moins un polypeptide ayant une activité dans la voie de dégradation du MTBE, ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement le TBA, le 2 M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA, sélectionné dans le groupe consistant en :

e) un acide nucléique comprenant au moins l'une quelconque des séquences nucléotidiques sélectionnée dans le groupe consistant en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:9, ou complément de celle-ci,

f) un acide nucléique comprenant au moins une séquence nucléotidique qui présente au moins 70 % d'identité, préférentiellement 75%, 80%, 90%, 95%, 98% ou 99% d'identité avec la séquence nucléotidique d'un acide nucléique tel que défini en e),

g) un acide nucléique codant pour au moins un variant d'un polypeptide comprenant l'une quelconque des séquences en acides aminés SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8 ou SEQ ID NO:10, ledit acide nucléique s'hybridant au complément d'un acide nucléique tel que défini en e) ou f),

h) un acide nucléique tel que défini en e), f) ou g) dont la séquence comprend une substitution, délétion, insertion, addition ou mutation d'un ou plusieurs nucléotides sur toute sa longueur,

i) un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de l'un quelconque des acides nucléiques tels que définis en e), f), g) ou h).

8. Acide nucléique selon la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux des séquences nucléotidiques sélectionnées parmi les séquences

nucléotidiques SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:9 telles que définies en e), f), g), h) ou i), préférentiellement 3 desdites séquences nucléotidiques, plus préférentiellement 4 desdites séquences nucléotidiques, plus préférentiellement 5 desdites séquences nucléotidiques.

9. Acide nucléique, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléotidique SEQ ID NO :11.

10. Acide nucléique selon la revendication 8, caractérisé en ce les séquences nucléotidiques sont SEQ ID NO:1 et SEQ ID NO:5 telles que définies en e), f), g), h) ou i), préférentiellement SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 et SEQ ID NO:5, telles que définies en e), f), g), h) ou i).

11. Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 6 à 10, caractérisé en ce que sa transcription est sous le contrôle d'un promoteur unique.

12. Acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 6 à 11, caractérisé en ce que sa transcription est induite par la présence de MTBE, et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA.

13. Acide nucléique selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il est organisé en opéron.

14. Polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 ou acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 6 à 13, caractérisé en ce qu'il est isolé et/ou purifié d'une souche bactérienne capable de croître dans un milieu comprenant du MTBE et/ou l'un au moins des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA, dont notamment les souches *Mycobacterium austroafricanum* enregistrées dans la collection CNCM sous les numéros I-3401 et I-2532.

15. Acide nucléique recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 6 à 14.

16. Vecteur caractérisé en ce qu'il comprend un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 6 à 15.

17. Vecteur selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une séquence homologue d'une séquence nucléique présente dans le génome d'une cellule hôte et assurant son intégration dans ledit génome.

18. Vecteur caractérisé en ce que l'acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 6 à 15 est flanqué d'éléments assurant son expression dans la cellule hôte.

19. Cellule hôte isolée comprenant soit au moins l'un des acides nucléiques selon l'une quelconque des revendications 6 à 15, soit au moins l'un des vecteurs selon l'une quelconque des revendications 16 à 18.

20. Cellule hôte isolée selon la revendication 19, caractérisée en ce qu'elle est une cellule procaryote, préférentiellement une cellule bactérienne, plus préférentiellement une cellule bactérienne sélectionnée dans le groupe consistant en *Mycobacterium smegmatis* mc2 155, *Escherichia Coli*, *Rhodococcus ruber*.

21. Sonde caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence nucléotidique complémentaire d'un fragment tel que défini en i) de la revendication 7, d'un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotidique SEQ ID NO :12.

22. Amorce oligonucléotidique, caractérisée en ce qu'elle comprend un fragment tel que défini en i) de la revendication 7, ou un fragment d'au moins 15 nucléotides consécutifs de la séquence nucléotidique SEQ ID NO :12, de préférence de 15, 17, 20, 23, 25, 27, 30, 35, 40, 45 ou 50 nucléotides.

23. Procédé d'identification d'une cellule ou d'un acide nucléique d'une cellule susceptible de dégrader du MTBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques

du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA, comprenant :

- optionnellement une étape d'ensemencement de la cellule sur un milieu supplémenté en MTBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA,

- une étape de criblage des acides nucléiques de ladite cellule par hybridation avec au moins une sonde selon la revendication 21, et/ou

- une étape d'amplification ou de polymérisation d'au moins un acide nucléique de ladite cellule avec au moins deux amorces oligonucléotidiques selon la revendication 22.

24. Souche bactérienne *Mycobacterium austroafricanum* enregistrées dans la collection CNCM sous le numéro I-3401.

25. Utilisation du polypeptide SEQ ID NO :2 selon la revendication 2 en tant qu'aldéhyde déshydrogénase, préférentiellement pour la déshydrogénation de l'hydroxyisobutyraldéhyde en HIBA.

26. Utilisation du polypeptide SEQ ID NO :6 selon la revendication 3 en tant qu'alcool déshydrogénase, préférentiellement pour la déshydrogénation du 2-M1,2-PD en hydroxyisobutyraldéhyde.

27. Procédé de traitement d'effluents aqueux comprenant du MTBE, du ETBE et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionné dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde, le HIBA, afin de réduire leur concentration, caractérisé en ce qu'il comprend l'ensemencement dudit effluent aqueux par au moins une cellule selon l'une quelconque des revendications 19, 20, 24 ou identifiée par le procédé selon la revendication 23.

28. Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que la cellule est fixée sur un support adapté, préférentiellement un support minéral, plus préférentiellement un support comprenant au moins 50% en masse de partite.

29. Procédé selon l'une quelconque des revendications 27 ou 28, caractérisé en ce qu'il permet de traiter un aquifère ou un sol.

30. Trousse pour la détection et/ou la quantification de bactéries sur des sites contaminés par du MTBE, et/ou au moins l'un des intermédiaires cataboliques du MTBE, préférentiellement sélectionnés dans le groupe consistant en le TBA, le 2-M1,2-PD, l'hydroxyisobutyraldéhyde et le HIBA, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une sonde selon la revendication 21 et/ou au moins deux amorces selon la revendication 22, ladite sonde et/ou lesdites amorces pouvant être utilisées de façon séparée ou combinée.

31. Trousse selon la revendication 30 caractérisé en ce qu'elle permet la détection et/ou la quantification de bactéries de la souche *M. austroafricanum*.

Application number/numéro de demande: 2510657

Figures: ~~3A-B, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12~~

Pages:

DRW-IP

Unscannable items
received with this application
(Request original documents in File Prep. Section on the 10th Floor)

Documents reçus avec cette demande ne pouvant être balayés
(Commander les documents originaux dans la section de préparation des dossiers au 10ième étage)

Figure 1

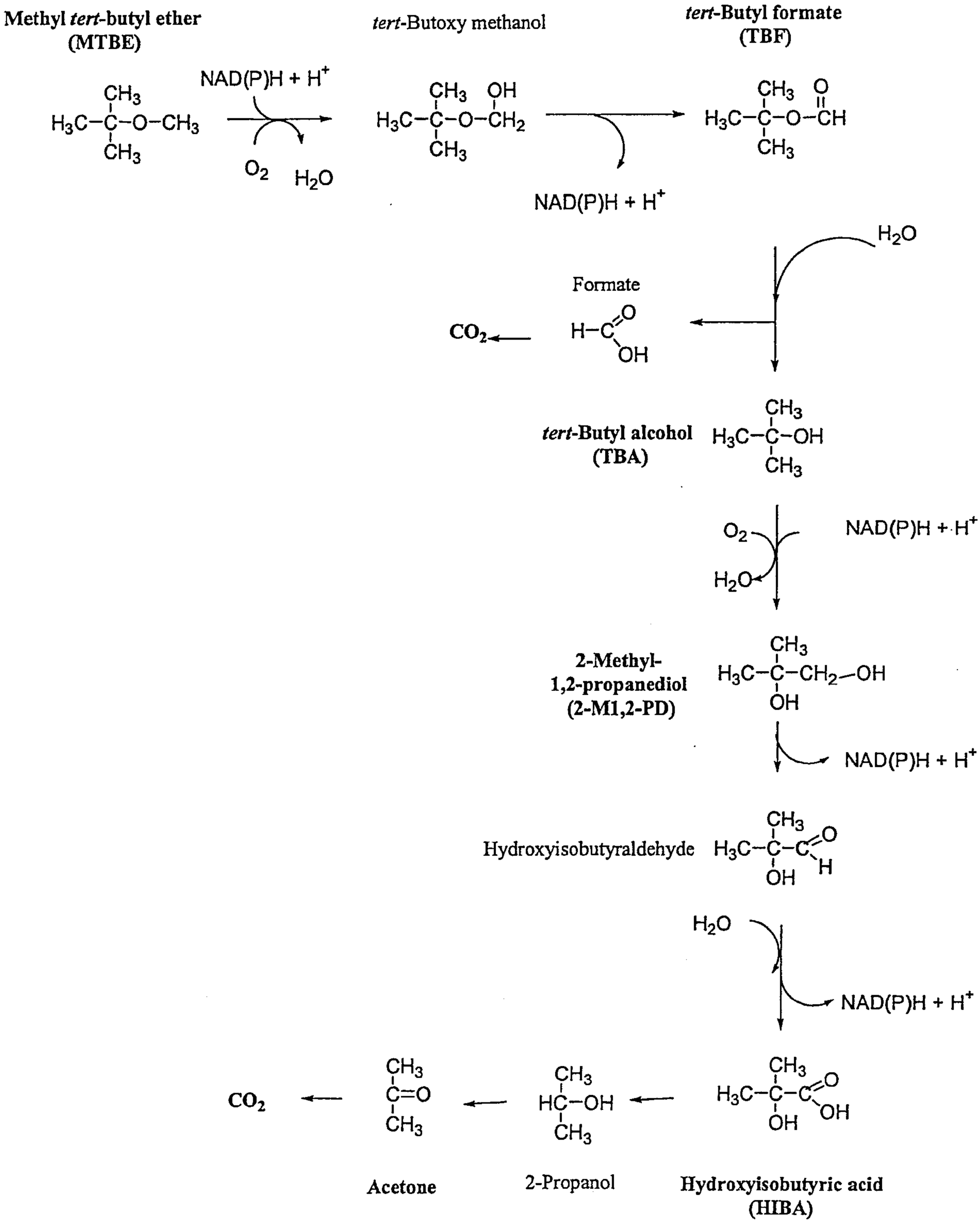

Methyl tert-butyl ether (MTBE)
NAD(P)H + H+
O2
H2O
tert-Butoxy methanol
tert-Butyl formate (TBF)
NAD(P)H + H+
H2O
Formate
CO2
tert-Butyl alcohol (TBA)
O2
H2O
NAD(P)H + H+
2-Methyl-1,2-propanediol (2-M1,2-PD)
NAD(P)H + H+
Hydroxyisobutyraldehyde
H2O
NAD(P)H + H+
CO2
Acetone
2-Propanol
Hydroxyisobutyric acid (HIBA)

Figure 2

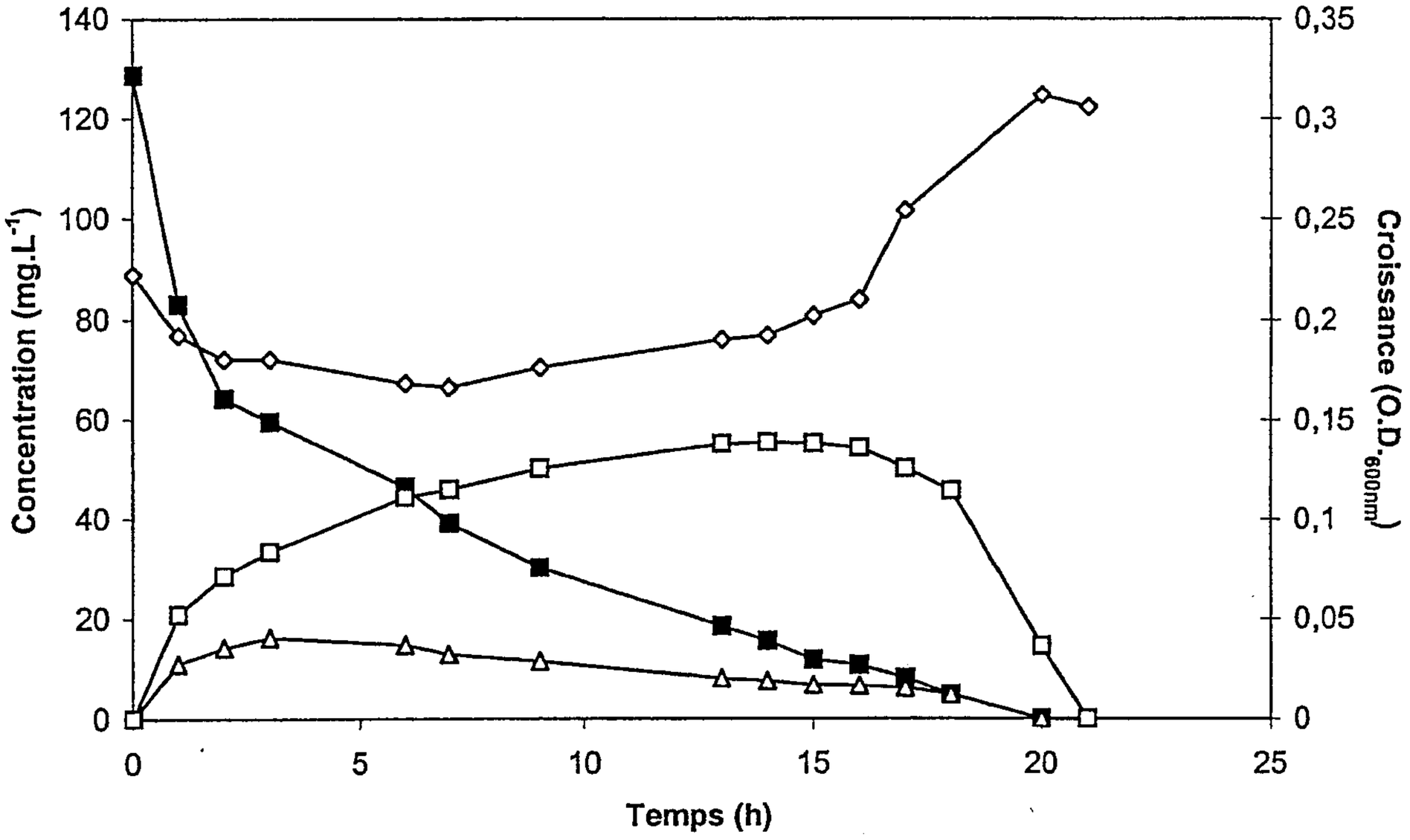
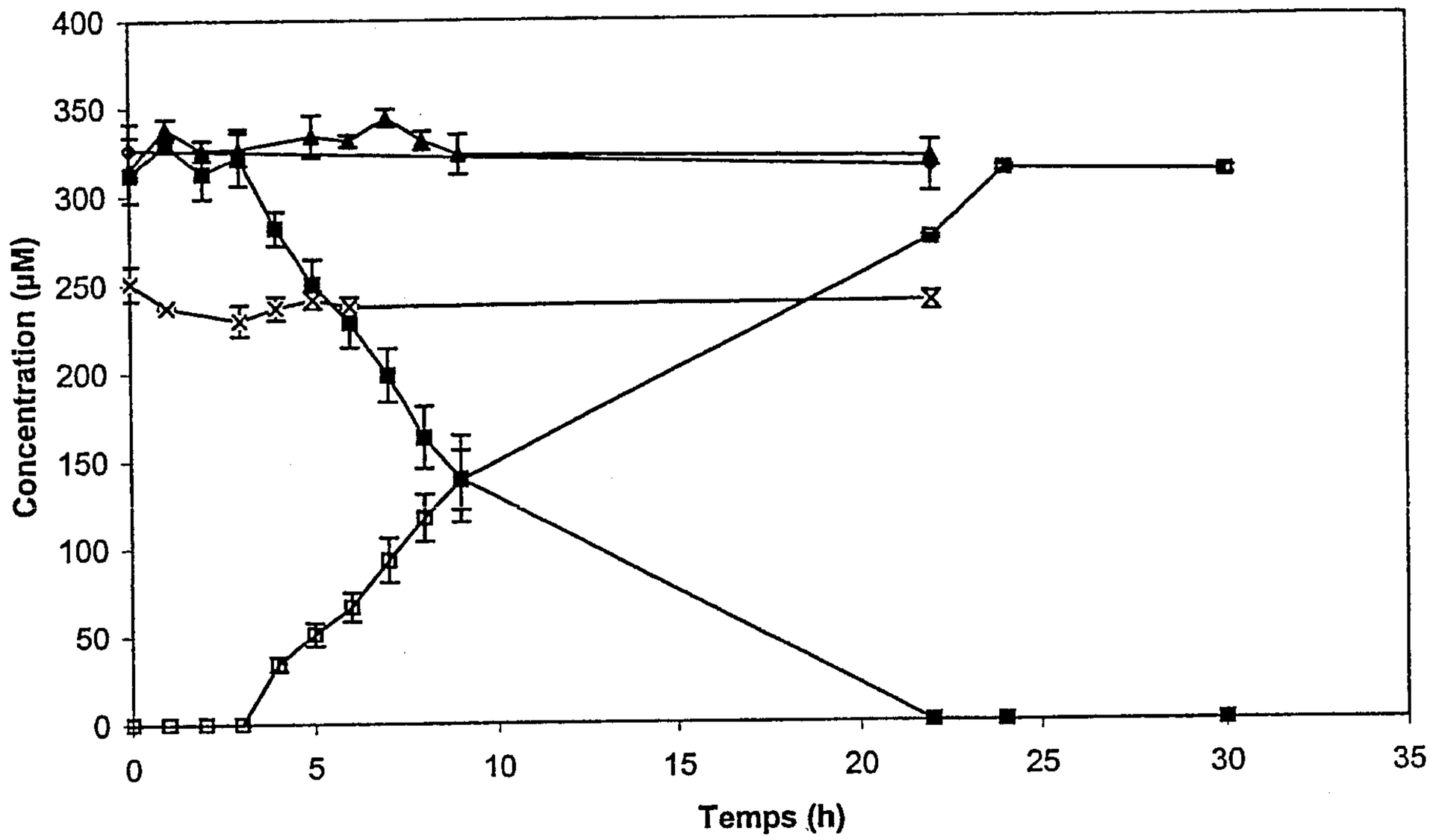

Concentration (mg.L-1)
Croissance (O.D.600nm)
Temps (h)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
0,05
0,1
0,15
0,2
0,25
0,3
0,35
0
5
10
15
20
25

Figure 9

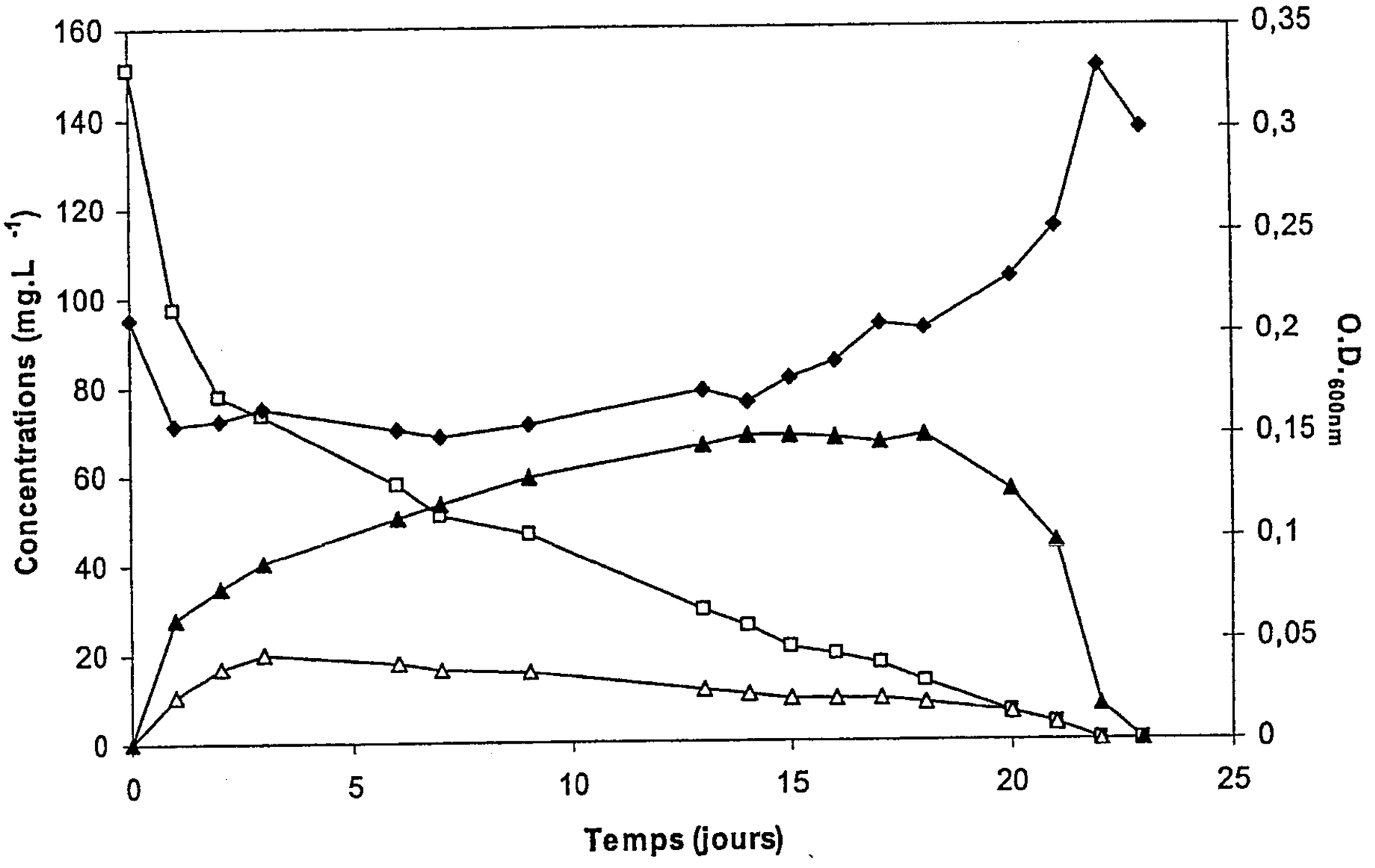


5

10

15

Figure 10


Concentrations (mg.L -1)
O.D.600nm
Temps (jours)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0,35
0,3
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
0
5
10
15
20
25