



HAL
open science

Biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173

Elodie Nicolau

► **To cite this version:**

Elodie Nicolau. Biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. domain_other. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00334974

HAL Id: tel-00334974

<https://theses.hal.science/tel-00334974>

Submitted on 28 Oct 2008

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

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

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER GRENOBLE I
ÉCOLE DOCTORALE DE CHIMIE ET SCIENCE DU VIVANT

THÈSE

Pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER - GRENOBLE I

Discipline : Chimie Biologie

Présenté par

ELODIE NICOLAU

**Biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate
par *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173 :**

De l'élucidation de la voie de dégradation aux enzymes impliquées

Soutenue le 7 octobre 2008 devant le jury composé de :

M. Dominique SCHNEIDER	<i>Président du Jury</i>
M. Timothy M. VOGEL	<i>Rapporteur</i>
M. Patrick HÖHENER	<i>Rapporteur</i>
M. Pascal POUPIN	<i>Examineur</i>
M. Rémy MARCHAL	<i>Examineur</i>
M. Yves JOUANNEAU	<i>Directeur de thèse</i>

Thèse préparée au sein du laboratoire de biotechnologie et chimie de la biomasse de l'Institut Français du Pétrole (IFP) de Rueil Malmaison et du laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, UMR 5029, du CEA de Grenoble

RESUME

Le 2-éthylhexyl nitrate (2-EHN) est incorporé en quantité significative au gazole afin d'augmenter son indice de cétane. Ce composé est produit à raison de 100 000 tonnes par an, principalement en France. Les risques liés à son utilisation sont cependant mal connus car en cas de contamination de l'environnement, on ne sait pas s'il est biodégradable. Cette étude avait pour but (i) d'évaluer la capacité de biodégradation du 2-EHN par des bactéries sélectionnées, (ii) d'élucider la voie de dégradation, et (iii) d'identifier les enzymes impliquées. Les tests de biodégradation prenant en compte le caractère toxique et hydrophobe du substrat ont été mis au point dans un premier temps. A l'aide de ces tests qui reposent sur la mise en œuvre de cultures biphasiques, nous avons montré que plusieurs souches de *Mycobacterium austroafricanum* étaient capables de dégrader le 2-EHN. La souche la plus performante (IFP 2173), résistant à des concentrations de 2-EHN de 6 g.L⁻¹, a été choisie pour étudier la voie de dégradation. Sur la base de bilans carbone et d'analyse du milieu de culture par chromatographie gazeuse (CG), j'ai découvert que la dégradation du 2-EHN était incomplète et donnait lieu à l'accumulation d'un métabolite. Ce métabolite a été identifié comme étant la β -méthyl- γ -butyrolactone par des analyses de CG-MS et LC-MS/MS. La structure de cette lactone indiquait que le 2-EHN était dégradé selon une voie enzymatique impliquant l'hydroxylation du groupement méthyle de la chaîne carbonée principale, son oxydation en aldéhyde et acide, et enfin un cycle de β -oxydation.

Dans un deuxième temps, les enzymes impliquées dans la voie de dégradation du 2-EHN ont été recherchées par une approche protéomique. Des analyses par électrophorèse bidimensionnelle ont mis en évidence qu'en présence de 2-EHN, la souche IFP 2173 déclenche la synthèse d'une panoplie d'enzymes spécialisées dans le métabolisme des acides gras, comme les enzymes de la β -oxydation, des alcool et aldéhyde déshydrogénases. Une analyse exhaustive du protéome de la souche IFP 2173 a permis d'identifier par LC-MS/MS plus de 200 protéines induites sur 2-EHN, notamment un cytochrome P450 de type alcane monooxygénase (CYP153). En outre, j'ai également identifié et cloné les gènes codant deux alcanes hydroxylases transmembranaires de types AlkB, qui n'ont pas été détectées par l'approche protéomique. Ainsi, la souche IFP 2173 possède trois alcane hydroxylases susceptibles de catalyser l'attaque initiale du 2-EHN. Pour déterminer laquelle de ces trois monooxygénases était responsable de cette réaction, leur gène respectif a été cloné dans des plasmides conçus pour l'expression soit chez *E. coli*, soit chez *M. smegmatis* mc². Nos résultats préliminaires montrent que dans certains cas les protéines recombinantes sont bien synthétisées. Ces constructions seront employées pour étudier l'activité des trois hydroxylases de IFP 2173 vis-à-vis des alcanes et du 2-EHN en particulier.

Mots clés : 2-éthylhexyl nitrate, alcane, *Mycobacterium austroafricanum*, biodégradation, 4-ethylidihydrofuran-2-(3H)one, alcane hydroxylase, gènes *cyp153* et *alkB*.

ABSTRACT

Compounds such as 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN) are added to diesel fuel to improve ignition and boost cetane number. The production of 2-EHN reaches around 100 000 tons per year in France, principally. Risks associated to its utilization are however poorly known because, in case of accidental release in the environment, nothing is known about its biodegradability.

In this study, we aimed to (i) identify bacterial strains able to degrade 2-EHN and compare their capabilities, (ii) elucidate the degradation pathway, and (iii) identify the enzymes involved. Biodegradation of 2-EHN was first tested in biphasic cultures under conditions that reduce the toxicity and increase the availability of the hydrophobic substrate. Using optimized culture conditions, we showed that several strains of *Mycobacterium austroafricanum* were able to degrade 2-EHN. One of the most efficient strain (IFP 2173) which could grow at 2-EHN concentrations up to 6 g.L⁻¹, was chosen to investigate the degradation pathway. On the basis of carbon balance determination and gas chromatographic (GC) analysis on the culture medium, I found that the degradation of 2-EHN was incomplete and gave rise to the accumulation of a metabolite. This metabolite was identified as β -methyl- γ -butyrolactone by GC-MS and LC-MS/MS analysis. The structure of the lactone indicated that 2-EHN was degraded through a pathway involving hydroxylation the methyl group of the main carbon chain, its oxidation into aldehyde an acid and a subsequent cycle of β -oxidation.

Enzymes involved in the 2-EHN biodegradation pathway were looked for by a proteomic approach. Analyses by two-dimensional gel electrophoresis showed that, when exposed to 2-EHN, strain IFP 2173 triggered the synthesis of a bunch of enzymes specialized in fatty acid metabolism such as β -oxidation enzymes, as well as alcohol and aldehyde dehydrogenases. An exhaustive analysis of the IFP 2173 proteome resulted in the identification of more than 200 proteins induced on 2-EHN, including a cytochrome P450 predicted to function as an alkane monooxygenase (CYP153). Moreover, I also cloned genes encoding two trans-membrane alkane hydroxylases, which passed undetected in the proteomic analysis. Hence, strain IFP 2173 synthesizes three alkane hydroxylases potentially able to catalyze the initial attack on 2-EHN. In order to determine which of the three monooxygenases was responsible for this reaction, their structural gene was cloned in plasmids designed for the expression in either *E. coli* or *M. smegmatis* mc². Preliminary results indicated that the recombinant proteins were produced in some cases. These constructions will be used to separately study the activity of each enzyme with respect to alkane and 2-EHN hydroxylation.

Keywords: 2-ethylhexyl nitrate, *Mycobacterium austroafricanum*, biodegradation, 4-ethylidihydrofuran-2-(3H)one, alkane hydroxylase, branched alkane, *cyp153* and *alkB* genes.

LISTE DES PUBLICATIONS

Marchal R., Nicolau E., Ballaguet J.P. and Bertoncini F. (2008) Biodegradability of polyéthylène glycol 400 by complex microfloras. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1-7 (In press).

Solano-Serena F., Nicolau E., Favreau G., Jouanneau Y. and Marchal R. (2008) Biodegradability of 2-Ethylhexyl nitrate (2-EHN), a cetane improver of diesel oil. *Biodegradation*.

Nicolau, E., Kerhoas, L., Lettere, M., Jouanneau, Y. & Marchal, R. (2008). Biodegradation of 2-ethylhexyl nitrate by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6187-6193.

Nicolau E., Kuhn L., Marchal R. and Jouanneau Y. (2008) Proteomic identification of enzymes involved in 2-EHN biodegradation in *Mycobacterium austroafricanum* IFP2173.

LISTE DES POSTERS

Nicolau E., Baraige F., Anglade P., Zagorec M. and M. C. Champomier-Vergès. *Lactobacillus sakei* adaptation to disulfide stress. 14ème club des bactéries lactiques Paris 18-20 mai 2006.

Nicolau E., Marchal R., Jouanneau Y. et F. Monot. Evaluation de la biodégradabilité du 2-éthylhexyl nitrate par des Actinomycètes. Biodépollution et environnement Paris 12-13 septembre 2006.

Nicolau E., Marchal R., Jouanneau Y. Mise en évidence de la biodégradabilité du 2-EHN par *Mycobacterium austroafricanum*. VIIème congrès de la société française de microbiologie 30,31 mai et 1^{er} juin 2007, cité des Congrès, Nantes.

Nicolau E., Kuhn L., Marchal R. Jouanneau Y. Alkane monooxygenases involved in 2-EHN biodegradation. Third International Meeting of the Institute of Metals in Biology of Grenoble Metals in health and environment. Autrans (France) 21th to 24th of September 2008.

BREVET

Nicolau E., Marchal R. et Jouanneau Y. 2007. Procédé de traitement bactérien d'effluents contenant du 2-éthylhexyl nitrate. Brevet Français N° FR 0703808 en date du 25/05/2007

LISTE DES ABREVIATIONS

2-EHN : 2-éthylhexyl nitrate	NAD⁺ : Nicotinamide adénine Dinucléotide oxidé
ADH : alcool déshydrogénase	NADH : Nicotinamide adénine Dinucléotide réduit
ADNg : Acide Désoxyribo Nucléique génomique	NAPL : non-aqueous phase liquid
ADNr : Acide Désoxyribo Nucléique ribosomal	NOAEL : no observed adverse effect level
ALDH Aldéhyde déshydrogénase	OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
ARN : Acide Ribo Nucléique	PAI : Protein Abundance Index
BSA : Sérum Albumin Bovin	PCR : Polymerase Chain Reaction
CID : Ions activés par collision	PQQ : Pyrrolo Quinoline Quinone
CMN : <i>Corynebacterium Mycobacterium</i> <i>Nocardia</i>	REACH : Chemical Consulting Global Laboratory Network
COD : Carbone Organique Dissous	RFLP : Restriction Fragment Lengh Polymorphism
COT : Carbone Organique Total	Rf : Radiofréquence
CPG-FID : Chromatographie en Phase Gazeuse à Détecteur à Ionisation de Flamme	RT-PCR : Réaction de polymerisation en chaîne par transcritpion réverse
1DE : Electrophorèse mono- dimensionnelle	STEP : Station d'épuration
2DE : Electrophorèse bi-dimensionnelle	SDS-PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulphate
DEHP : di-(2-ethylhexyl) phtalate	TBE : Tris-borate-EDTA
DThO : Demande théorique en di-oxygène	TE : Tris EDTA
D.O. : Densité Optique	TMCS : Trimethylchlorosilane
4-EDF : 4-éthylidihydrofuran-2(3H)-one	TC : Total Carbon
EDTA : acide éthylène-diamine-tétra acétique.	WWTP : wastewater treatment plant
ES + : Electrospray positif	
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide	
GC-MS : Gaz Chromatography-Mass Spectrometry	
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique	
HMDS : Hexamethyldisilazane	
HMN : 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane	
HPLC : High Performance liquid Chromatography	
IC : Inorganic Carbon	
IEF : Iso-électrofocalisation	
ITS : Internal Transcript Region	
LC50 : 50 % Lethal Concentration	
MMSYE : Milieu Minimum Salin Yeast Extract	
MS : Mass Spectrometry	
MTBE : Methyl <i>Tert</i> -Butyl Ether	

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
1 Le 2-éthylhexyl nitrate	3
1.1 Propriétés physico-chimiques	3
1.2 Données toxicologiques et écotoxicologiques	4
1.2.1 Impact sur l'environnement	4
1.2.2 Ecotoxicité.....	5
1.2.3 Toxicité	5
2 Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes.....	5
2.1 L'assimilation des hydrocarbures solubles	6
2.2 L'accession interfaciale	6
2.3 L'accession interfaciale facilitée (émulsification)	6
2.4 Le transfert micellaire	7
3 Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques	7
3.1 Les alcanes linéaires.....	8
3.2 Les alcanes ramifiés	9
3.2.1 Substrats utilisés par la β -oxydation.....	9
3.2.2 Cas du pristane et phytane : Alcanes polyméthylés.....	10
3.2.3 Voie du citronellol et alcanes β -substitués	11
3.2.4 Alcanes polyméthylés récalcitrants à la biodégradation.....	13
3.2.5 Dégradation du di-2-éthylhexyl phtalate	13
4 Systèmes enzymatiques de dégradation d'alcane ramifiés	14
4.1 Les alcane-1 monooxygénases (E.C. 1.14.15.3).	15
4.1.1 Les méthane monooxygénases solubles sMMO.....	16
4.1.2 Les hydroxylases de type AlkB (E.C 1.14.15.3)	18
4.1.2.1 Propriétés générales	18
4.1.2.2 Diversité des gènes <i>alkB</i> d'origine bactérienne	18
4.1.2.3 Organisation génétique des gènes <i>alkB</i>	19
4.1.2.4 Spécificité	21
4.1.3 Les monooxygénases de type cytochromes P450.....	23
4.1.3.1 Classification des cytochromes P450 :	23
4.1.3.2 Réactions catalysées	24
4.1.3.3 Les cytochromes P450 de la famille des CYP153	27
4.1.3.3.1 Fonction des CYP153.....	27
4.1.3.3.2 Présence et redondance dans les génomes bactériens.....	28
4.1.3.3.3 Structure	28
4.1.4 CYP153 ou AlkB ? : L'exemple de <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	30
4.2 Les oxidoréductases (E.C. 1).	33
4.2.1 Les alcool déshydrogénases (E.C. 1.1.).....	33
4.2.1.1 Les ADH utilisant le NAD(P) ⁺ comme accepteur d'électrons (E.C. 1.1.1.).....	34
4.2.1.2 Les alcool déshydrogénases NAD(P)-indépendantes (E.C. 1.1.[2-3-4-5-99]).....	34
4.2.1.3 Une famille particulière, les flavoprotéines	35
4.2.2 Les aldéhyde déshydrogénases (E.C. 1.2).	36
4.2.2.1 Fonction	36
4.2.2.2 Classification	37
4.3 Les estérases (E.C.3.1.1.x).....	38
4.3.1 Mécanisme d'hydrolyse de l'ester	38
4.3.2 Classification des estérases	39

4.4	Les enzymes de la β -oxydation	41
5	Dégradation de xénobiotiques récalcitrants par <i>Mycobacterium</i>.....	43
5.1	Taxonomie et description du genre <i>Mycobacterium</i>	43
5.1.1	Taxonomie et phylogénie	43
5.1.2	Description de l'enveloppe des mycobactéries	46
5.2	Mycobactéries dégradant des polluants.....	47
5.2.1	Dégradation des <i>n</i> -alcane par <i>Mycobacterium</i>	47
5.2.2	Dégradation d'un alcane branché par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173	48
	PRESENTATION DU TRAVAIL	51
1	Sélection de microflores et souches bactériennes compétentes	51
2	Elucidation globale des voies de dégradation du 2-EHN.....	52
3	Identification des enzymes induites lors de la croissance sur 2-EHN	53
4	Recherche et expression des gènes d'intérêts	53
	MATERIELS ET METHODES	55
1	Méthodes microbiologiques	55
1.1	Milieu de culture	55
1.1.1	Milieu minimum salin extrait de levure (MMSYE)	55
1.1.2	Milieu complet	55
1.1.3	Milieu Middlebrook 7H9 et 7H10, pour la culture des <i>mycobactéries</i>	56
1.1.4	Milieu PTYG : Peptone-Tryptone-Yeast extract-Glucose medium	56
1.2	Souches et plasmides	57
1.2.1	Microorganismes	57
1.2.2	Plasmides utilisés	58
1.3	Tests de biodégradation aérobie.....	59
1.3.1	Mise en œuvre du test.....	59
1.3.2	Expression des résultats	60
1.3.2.1	Taux de recouvrement abiotique.....	60
1.3.2.2	Taux de dégradation	60
1.3.2.3	Rendement de minéralisation.....	60
1.3.3	Suivi cinétique de la consommation d'oxygène par respirométrie	60
2	Méthodes d'analyses physicochimiques	61
2.1	Méthodes chromatographiques	61
2.1.1	CO ₂	61
2.1.2	2-EHN	62
2.1.3	GC-MS	63
2.1.4	HPLC couplée à un détecteur MS/MS	64
2.2	Dosage du carbone organique dissous	64
2.3	Méthodes de dérivation	65
2.3.1	Préparation de l'échantillon	65
2.3.2	Estérification	65
2.3.2.1	En milieu acide	65
2.3.2.2	En milieu alcalin	65
2.3.3	Silylation	65
3	Méthodes de biologie moléculaire	66
3.1	Extraction d'ADN génomique de <i>Mycobacterium</i>	66
3.2	Dosage des acides nucléiques	66
3.3	Réactions d'amplification par PCR	66
3.4	Clonage de fragments d'ADN.....	68
3.4.1	Purification de fragments d'ADN	68

3.4.2	Préparation du vecteur de clonage.....	68
3.4.3	Utilisation du kit de clonage pDrive.....	69
3.4.4	Ligation et clonage	69
3.4.4.1	Ligation.....	69
3.4.4.2	Préparation des cellules compétentes.....	69
3.4.4.3	Transformation des cellules compétentes	69
3.4.4.4	Sélection des clones positifs par PCR sur colonie	70
3.4.4.5	Extraction de plasmides	70
3.4.4.6	Vérification de la présence de l'insert dans les plasmides par digestion	70
3.5	Transformation de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	70
3.5.1	Préparation de cellules compétentes.....	70
3.5.2	Transformation par électroporation et sélection des transformants.....	71
3.6	PCR couplée à la transcription inversée.....	71
3.6.1	Méthode d'extraction des ARN totaux de souches de <i>Mycobacterium</i>	71
3.6.2	PCR couplée à la transcription inversée (RT-PCR)	72
4	Méthodes biochimiques.....	72
4.1	Préparation des extraits protéiques.....	72
4.1.1	Extraits bruts	72
4.1.2	Fractions soluble et membranaire.....	73
4.1.3	Dosage des protéines	73
4.1.4	Isolement rapide de protéines par chromatographie d'affinité de type IMAC	73
4.2	Analyse des protéines par électrophorèse	74
4.2.1	Gels SDS PAGE.....	74
4.2.1.1	Gels Glycine-SDS-PAGE.....	74
4.2.1.2	Gel Tricine-SDS-PAGE.....	74
4.2.2	Electrophorèse bidimensionnelle.....	74
4.2.2.1	Préparation des échantillons pour la première dimension.....	74
4.2.2.1.1	Dialyse des extraits solubles de protéines	74
4.2.2.1.2	Hydratation des bandelettes avec l'extrait protéique.....	74
4.2.2.2	Isoelectrofocalisation (IEF)	75
4.2.2.3	Equilibration des bandelettes pour la deuxième dimension	75
4.2.2.4	Deuxième dimension	75
4.2.3	Coloration au bleu colloïdal	76
4.2.4	Découpage des gels d'électrophorèse.....	76
4.3	Analyse LC-MS-MS des spots.....	76
4.4	Activité sur gel d'électrophorèse	76
4.4.1	Activité estérase	76
4.4.2	Activité peroxydase.....	77
4.5	Western Blot	77
5	Outils bioinformatiques	77
RESULTATS		79
1	Sélection de souches dégradant le 2-EHN.....	79
2	Dégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173	93
2.1	Cinétique de la dégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173	93
2.1.1	Influence du substrat de préculture.....	93
2.1.2	Influence du mode d'apport du 2-EHN.....	95
2.1.3	Influence de la température	96
2.2	Étude préliminaire de la voie de dégradation.....	97
2.2.1	Étude du système d'attaque du substrat	97
2.2.2	Utilisation du 2-EHN comme source d'azote	97
2.2.3	Dégradation du 2-éthylhexanol et de l'acide 2-éthylhexanoïque	98
2.2.4	Essais de dérivatisation de l'intermédiaire accumulé	99
2.3	Voie catabolique du 2-EHN	101

3	Analyse protéomique des enzymes impliquées dans la voie de dégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173.....	109
3.1	Stratégie d'analyse protéomique	109
3.1.1	Analyse des protéines induites sur 2-EHN	109
3.1.1.1	Choix de la méthode d'analyse : électrophorèse 1D ou 2D ?	109
3.1.1.2	Choix du substrat témoin	112
3.1.1.3	Marquage métabolique au ³⁵ S	113
3.1.2	Identification des protéines en LC-MS/MS	113
3.1.3	Une analyse quantitative des protéines membranaires	115
3.1.3.1	Protein Abundance Index	116
3.1.3.2	Spectral count	117
3.2	Article 3	118
3.2.1	Complément d'analyse de la fraction de protéines membranaires	140
3.2.2	Limites de la méthode	141
3.3	La découverte de P450 alcane monooxygénase de type CYP153 chez la souche IFP 2173	141
4	Étape initiale de dégradation du 2-EHN.....	143
4.1	Les alcane hydroxylases de type alkB.....	143
4.1.1	Le gène <i>alkB1</i>	143
4.1.2	Le gène <i>alkB2</i>	144
4.1.3	Clonage et expression chez <i>Escherichia coli</i>	145
4.1.3.1	Stratégie de clonage	145
4.1.3.2	Surproduction de AlkB1 dans <i>E. coli</i>	146
4.1.4	Clonage et expression chez <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155.....	147
4.1.4.1	Stratégie de clonage	148
4.1.4.2	Tests d'induction de AlkB chez <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	150
4.1.4.3	Test de dégradation du 2-EHN	151
4.2	Le cytochrome P450 de type CYP153	152
4.2.1	Mise en évidence	152
4.2.2	Clonage et expression du <i>cyp153-1</i> chez <i>E. coli</i>	152
4.2.3	Test d'expression chez <i>M. smegmatis</i> mc ² 4517	155
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	157
1	Biodégradabilité du 2-EHN	158
2	Voie de dégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173	158
3	Recherche des enzymes impliquées dans la voie de dégradation du 2-EHN	159
4	Existence de multiples alcane hydroxylases dans la souche IFP 2173.....	160
5	AlkB ou CYP153 ?.....	161
6	Expression et Clonage des alcanes hydroxylases	162
7	Perspectives	163
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	167
	ANNEXES	184

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Figure 1.1 : Structure du 2-éthylhexyl nitrate	3
Figure 1.2 : Les mécanismes d'accès des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005).....	6
Figure 1.3 : Voies de dégradation des alcanes aliphatiques (van Beilen et al., 2003).....	8
Figure 1.4 : Dégradation et assimilation de nombreux hydrocarbures chez les Actinomycètes (Alvarez, 2003) .	10
Figure 1.5 : Voie métaboliques de dégradation du pristane (Vandecasteele, 2005).....	11
Figure 1.6: Voies métaboliques de dégradation du citronellol par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>P. citronellolis</i> . (Adapté de Forster-Fromme et al., 2008)	12
Figure 1.7 : Structure du bis-(2-ethylhexyl) phtalate	13
Figure 1.8 : Étapes impliquées dans la réaction d'oxydation par la méthane monooxygénase soluble (d'après Ayala & Torres, 2004).	16
Figure 1.9 : Cycle catalytique de la méthane monooxygénase (Kopp & Lippard, 2002).....	17
Figure 1.10 : Chaîne de transfert d'électrons des systèmes d'hydroxylases à fer non hémique.....	18
Figure 1.11 : Arbre phylogénétique des séquences partielles d'alcane hydroxylases (AlkB) connues et obtenues à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures. Adapté de Heiss et al. (2005).	19
Figure 1.12 : Exemples d'organisation de gène alk chez des bactéries dégradant les alcanes. Adapté de (Whyte et al., 2002).	20
Figure 1.13 : Voie de dégradation des alcanes chez <i>P. putida</i> Gpo1 : rôle et localisation cellulaire des protéines impliquées. Adapté de van Beilen et al. (2001).	21
Figure 1.14 : Modèle montrant le substrat dans le site catalytique de l'alcane hydroxylase de <i>P. putida</i> Gpo1 w.t. (W55-AlkB) ou du mutant W55S (S55-AlkB). Selon (Rojo, 2005) et adapté de (van Beilen & Funhoff, 2005)..	22
Figure 1.15 : Les monooxygénases à cytochrome P450 : les chaînes de transfert d'électron. Classification selon Munro & Lindsay (1996).	24
Figure 1.16 : Le cycle catalytique par le système cytochrome P450. D'après Munro et Lindsay (1996).....	25
Figure 1.17 : Réactions catalysées par les cytochromes P450 de <i>Rhodococcus</i> facilitant sa croissance et la dégradation d'un large spectre de polluants. (Larkin et al., 2005).	26
Figure 1.18 : Réactions catalysées par des CYP153 d'après (van Beilen & Funhoff, 2007)	28
Figure 1.19 : Arbre phylogénétique des P450 de type CYP153 basé sur l'alignement de séquences partielles (région de fixation de l'hème). (van Beilen et al., 2006)	29
Figure 1.20 : Modèle de la structure du CYP153A6 selon Funhoff et al. 2006.	30
Figure 1.21 : Déterminants génétiques impliqués dans la dégradation des alcanes chez <i>A. borkumensis</i> SK2 (Schneiker et al., 2006)	31

Figure 1.22 : Reconstitution des voies de dégradation putatives des alcanes chez <i>A. borkumensis</i> SK2. (Schneiker et al., 2006)	32
Figure 1.23 : Représentation schématique du repliement α/β de l'hydrolase.	39
Figure 1.24 : Enzymes de la bêta-oxydation, chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , impliquées dans la dégradation du citronellol (Adapté de Seubert et Fass 1964 et de Förster-Fromme et al. 2008).	42
Figure 1.25 : Arbre phylogénétique des espèces du genre <i>Mycobacterium</i> à croissance rapide et dégradant les HAP d'après les séquences des différents hsp65 (d'après Wang et al., 2006).	45
Figure 1.26 : Représentation schématique de la paroi des mycobactéries selon (Karakousis et al., 2004).	46
Figure 1.27: Biodégradation de l'isooctane par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173 (Solano-Serena et al. 2004).....	50
PRESENTATION DU TRAVAIL.....	51
Figure 2.1 : Stratégie suivie pour caractériser la voie de dégradation du 2-EHN	51
MATERIELS ET METHODES	55
Figure 3.1 : Détail des connexions de l'appareil Sapromat.....	61
Figure 3.2 : Principe de la méthode de dosage du 2-EHN	62
Figure 3.3 : Programme PCR d'amplification de l'ADNg	68
RESULTATS	79
Figure 4.1: Cinétique dégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173 en présence de HMN : Influence du substrat de préculture	94
Figure 4.2: Influence de la nature de la phase solvant sur la dégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173.	95
Figure 4.3: Cinétiques de consommation d'O ₂ par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173 : Influence de la température..	96
Figures 4.4: Chromatogrammes obtenus après la dégradation par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173 de: A: L'acide 2-éthylhexanoïque, B: Le 2-éthylhexanol	99
Figure 4.5 : Comparaison de gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines solubles et membranaires de la souche IFP 2173 incubée sur 2-EHN	111
Figure 4.6 : Comparaison de la migration de protéines de la souche IFP 2173 sur gel Tris-glycine et sur gel Tris-tricine.	111
Figure 4.8 : Méthode d'analyse protéomique par LC-MS/MS.....	113
Figure 4.9 : Principe d'identification des protéines par MASCOT.....	114
Figure 4.10 : Répartition des protéines contenant ou non des domaines transmembranaires	140
Figure 4.11 : Carte du locus contenant le gène <i>alkB1</i>	144
Figure 4.12 : Représentation du locus contenant le gène <i>alkB2</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173.....	145
Figure 4.13 : Expression de la protéine <i>AlkB1</i> à l'aide du plasmide pEN07 dans <i>E. coli</i> Rosetta TM	147

Figure 4.14 : Carte du plasmide pHLD69.	149
Figure 4.15 : Plasmides dérivés de pHLD69 construits pour exprimer les gènes alkB de IFP2173 dans Mycobacterium.	150
Figure 4.16 : Expression des AlkB dans pHLD69.	151
Figure 4.17 : Carte du plasmide pUYB1062.	154
Figure 4.18 : Contrôle de l'expression du CYP153-1 chez E.coli par SDS-PAGE.	154
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	157
Figure 5.1 : Voie de dégradation du 2-EHN et enzymes impliquées chez M. austroafricanum IFP2173	160
Figure 5.2 : Organisation génétique des alcane hydroxylases retrouvées chez M. austroafricanum IFP 2173 ...	161
Figure 5.3 : Photo de M. austroafricanum IFP 2173 en milieu aqueux et en présence de 2-EHN	165
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	167
ANNEXES	184

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION	1
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
Tableau 1.1 : Principales propriétés physico-chimiques du 2-EHN.....	4
Tableau 1.2 : Enzymes capables d'oxyder les alcanes (d'après Van Beilen & Funhoff, 2005).....	15
Tableau 1.3 : Comparaison de diverses carboxyl estérases bactériennes (Bornscheuer, 2002).	41
Tableau 1.4 : Spectre de dégradation des alcanes par des souches de <i>Mycobacterium</i> (Adapté de Lopes Ferreira et al 2007)	48
PRESENTATION DU TRAVAIL.....	51
MATERIELS ET METHODES	55
Tableau 3.1: Souches utilisées lors des tests de biodégradation du 2-EHN	57
Tableau 3.2: Souches utilisées pour le clonage et l'expression de gènes.....	57
Tableau 3.3 a : Plasmides utilisés.....	58
Tableau 3.3 b : Plasmides utilisés issus de cette étude.....	58
Tableau 3.4: Conditions chromatographiques pour l'analyse du 2-EHN résiduel par CPG/FID.....	63
Tableau 3.5: Amorces utilisées pour la recherche et le clonage de gènes d'intérêt	67
RESULTATS	79
Tableau 4.1: Influence du substrat de préculture sur les performances finales de biodégradation du 2-EHN par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173.....	94
Tableau 4.2 : Variations des conditions de culture sur 2-EHN de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173.....	96
Tableau 4.3: Action des inhibiteurs de mono-oxygénases sur la dégradation du 2-EHN	97
Tableau 4.4: Utilisation du 2-EHN comme source d'azote	97
Tableau 4.5: Dégradation du 2-éthylhexanol et de l'acide 2 éthylhexanoïque par <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173 .	98
Tableau 4.6: Essais de synthèses de dérivés sur l'intermédiaire de dégradation.	100
Tableau 4.7 : Nombre de protéines de la souche IFP 2173 identifiées par LC-MS/MS.....	140
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	157
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	167
ANNEXES	184

INTRODUCTION

Les pays industrialisés comptent de nombreuses zones contaminées. Dans l'Union européenne, les sites pollués étaient estimés à 1 800 000 environ, en 2006 (European Environment Agency 2007). La pollution des sols est généralement le fait de l'activité minière, pétrolière ou d'autres activités industrielles encore, comme la sidérurgie, la cokerie, la chimie ou la fabrication de peinture par exemple. Le recensement des sites et sols pollués et la caractérisation des polluants révèlent que les cas de contamination concernent les métaux (cuivre, zinc, plomb, cobalt, nickel, arsenic, cadmium), les hydrocarbures légers (fioul, essence, gazole) et lourds (lubrifiants, huiles lourdes, pétrole brut), les solvants halogénés, et des molécules organiques complexes (hydrocarbures aromatiques polycycliques, HAP, etc.). Les composés organiques sont impliqués dans près de 75 % des sites pollués.

La gestion des sites contaminés est une préoccupation primordiale. Du point de vue de la santé publique, les molécules dangereuses sont susceptibles de se propager dans le milieu et dans les nappes phréatiques. Leur transfert dans la chaîne alimentaire peut avoir un impact direct sur la santé des populations. Par ailleurs, d'un point de vue économique, les projets de réhabilitation peuvent conduire à des coûts exorbitants car ils exigent parfois l'excavation des sols et le transport des terres vers les installations de dépollution.

Indépendamment des techniques d'excavation, les techniques de réhabilitation mises en oeuvre sur le terrain sont le plus souvent des traitements thermiques et physico-chimiques, tandis que les procédés de traitement biologiques sont souvent réservés à une catégorie restreinte de composés comme les hydrocarbures pétroliers légers ou adaptés à des conditions particulières. Les techniques biologiques qui utilisent le pouvoir dépolluant de microorganismes sont connues et utilisées depuis longtemps. L'intérêt de ces techniques réside essentiellement dans le fait qu'elles ne nécessitent ni excavation, ni transport, ce qui rend leur mise en oeuvre bien moins coûteuse. De plus en plus, la lutte contre la pollution s'oriente vers la prévention comme en témoigne le "Grenelle de l'Environnement" qui s'est déroulé en France en septembre 2007. Au niveau européen, et afin d'anticiper l'impact des déversements accidentels, la directive REACH (**R**egistration, **E**valuation, **A**uthorisation and **R**estriction of **C**hemical substances) a pour objectif de caractériser les propriétés intrinsèques des substances chimiques qui sont produites à raison de plus d'une tonne par an et qui présentent, ou non, un danger pour l'environnement et la santé.

Le 2-éthylhexyl nitrate (2-EHN) est un additif du gazole qui entre directement dans le cadre de la directive européenne REACH. Il s'agit d'un composé produit à raison de 100 000

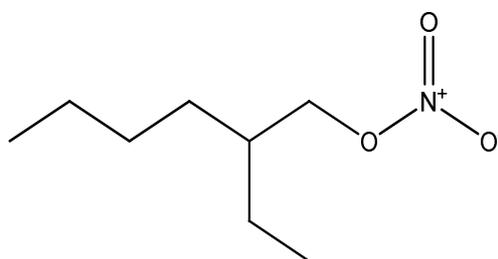
tonnes par an dans le monde, dont 60 000 tonnes en France. Certains critères de toxicité de la molécule sont connus. Toutefois, le devenir dans l'environnement de ce dernier n'a fait l'objet d'aucune étude détaillée. Ce n'est qu'en 2005, que le groupe SNPE a demandé un rapport d'analyse complet sur ce produit. D'après les résultats diffusés en novembre 2006, il s'avère que le 2-EHN n'est pas aisément biodégradable selon un test normalisé de dégradation. A terme, ces résultats pourraient remettre en cause, l'utilisation de cet additif procétane qui est pourtant doté d'une très grande efficacité.

L'étude que nous avons menée présente un double enjeu. Elle vise tout d'abord à évaluer si le 2-EHN est biodégradable ou pas et quels sont les critères qui peuvent favoriser sa biodégradabilité. D'un point de vue plus fondamental, l'étude ambitionne d'élucider les mécanismes physiologiques et biochimiques de dégradation d'une molécule branchée qui possède des propriétés physico-chimiques particulières. La stratégie développée au cours de ce travail est présentée dans le paragraphe qui suit l'étude bibliographique

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Le 2-éthylhexyl nitrate

Le 2-éthylhexyl nitrate 2-EHN, (**figure 1.1**) est un additif qui permet d'augmenter l'indice de cétane du gazole. L'indice de cétane conditionne l'aptitude au démarrage des moteurs diesels. Le 2-EHN est l'additif procétane le plus utilisé. Liquide à température ambiante, c'est un composé qui se décompose au dessus de 100°C. Il libère alors des radicaux libres qui contribuent à réduire le délai d'auto-inflammation du moteur. Le 2-EHN est incorporé aux carburants à raison de 0,3 à 1 g.L⁻¹ ce qui explique que 10⁵ tonnes sont produites annuellement dans le monde, dont 60 % par une usine du groupe EURENCO (EUROpean ENergetics COrporation) (www.eurengo.com/en/2ehn/index.html) basée à Bergerac en France. Le 2-EHN est formé par le mélange stœchiométrique d'acide nitrique et de 2-éthylhexanol dans l'acide sulfurique. La formation de 2-EHN est presque instantanée. La réaction est la suivante : $C_8H_{17}OH + HNO_3 \rightarrow C_8H_{17}NO_3 + H_2O$



2-ethylhexyl nitrate

Figure 1.1 : Structure du 2-éthylhexyl nitrate

1.1 Propriétés physico-chimiques

Le 2-EHN est un ester nitraté, il peut aussi être nommé ester nitrique de 2-éthylhexanol. Le **tableau 1.1** résume ses caractéristiques physico-chimiques.

Le 2-EHN est un liquide presque translucide à température ambiante et il se décompose suite à une exposition à 100°C. Cette réaction exothermique peut être extrêmement violente et provoquer une explosion. C'est pourquoi il est impossible de déterminer son point d'ébullition.

Tableau 1.1 : Principales propriétés physico-chimiques du 2-EHN

Caractéristique	Valeur
N° CAS	27247-96-7
Formule chimique	C ₈ H ₁₇ NO ₃
Point de fusion	> 70°C
Point de congélation	< - 45°C
Masse molaire	175,2 g.mol ⁻¹
Masse volumique à 20°C	0,96 kg.L ⁻¹
	27 Pa à 20°C
Pression de vapeur	40-53 Pa à 40°C
	1.33 kPa à 82°C
Solubilité	12,6 mg.L ⁻¹
Log Ko/w	5,24
Température de décomposition	> 100°C

(Source : www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/nitracd2/c14932rt.pdf)

1.2 Données toxicologiques et écotoxicologiques

1.2.1 Impact sur l'environnement

Suite à une demande des producteurs de 2-EHN et aux contraintes imposées par la directive européenne REACH, les propriétés de biodégradabilité du 2-EHN ont été étudiées selon un protocole standard par mesure du CO₂ dans l'espace de tête de la fiole de test. C'est en octobre 2006 qu'un rapport demandé par les entreprises adhérant à l'HERTIG (The Health, Environmental, and Regulatory Task Group) a rendu compte des critères de dégradation du 2-EHN. Il s'avère que ce dernier n'est pas biodégradable selon les tests normalisés (The American Chemistry Council Petroleum additives panel, 2006). En cas d'accident ou de déversement accidentel, il existe donc un risque de pollution rémanente de l'environnement par le 2-EHN. C'est un composé de faible solubilité dans l'eau qui forme une émulsion en solution aqueuse. Il peut aussi former un film sur l'eau et ainsi faire barrière au transfert d'oxygène et limiter la vie d'organismes aérobie. Le coefficient de répartition octanol/eau (K_{O/W}) est élevé, on peut ainsi en déduire que le 2-EHN a une mobilité réduite en milieu aqueux et qu'il s'adsorbe modérément aux particules de terre et de sédiments. De plus, il est très volatil à température ambiante et de ce fait peu accessible aux microorganismes. Ces dernières remarques se basent sur des hypothèses formulées par l'ATC. Ces hypothèses reposent sur les propriétés de biodégradabilité d'hydrocarbures dont les propriétés physico-chimiques sont voisines de celles du 2-EHN.

1.2.2 Ecotoxicité

Les propriétés d'écotoxicité du 2-EHN sont connues. Le 2-EHN est faiblement toxique puisque les LC50 (dose létale pour 50 % de la population) vis-à-vis du poisson Zebra (*Danio rerio*), de la daphnie (*Daphnia magna*) et des algues (*Selenastrum capricornutum*) sont supérieures à sa solubilité dans l'eau à 20°C (soit 12,6 mg.L⁻¹).

(www.epa.gov/HPV/pubs/summaries/nitracd2/c14932tp.pdf).

1.2.3 Toxicité

La toxicité orale a été testée par une injection (10 mL/kg) de 2-EHN dans le système gastrique de rats. Après 14 jours, sur cinq animaux testés, deux sont morts, les autres ont présenté des nécroses et ont été euthanasiés (ATC 2004). Une autre étude sur les effets neurochimiques du 2-EHN chez le rat, menée par Someroja et Savolainen (Someroja & Savolainen, 1983) a montré que le 2-EHN a les mêmes effets, d'un point de vue pharmacologique, que la nitroglycérine *i.e.* la vasodilatation des vaisseaux sanguins.

La toxicité dermatologique du 2-EHN a été testée sur des lapins (Albinos) à la dose de 5 mL.kg⁻¹. La fourrure et l'abdomen des animaux ont été sévèrement irrités. Aucun signe de toxicité n'a cependant été observé après 14 jours (ATC, 2004).

Le 2-EHN a les mêmes effets que la nitroglycérine sur l'homme, à savoir la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Une simple exposition au 2-EHN peut causer des céphalées graves, des faiblesses, des étourdissements, des rougeurs de la peau, de l'hypotension et des palpitations.

Le 2-EHN est un contaminant pour l'environnement, de plus il est à l'origine de trouble pour la santé. L'étude de sa biodégradabilité est ainsi justifiée. Pour ce faire, il est important de comprendre comment les micro-organismes peuvent accéder à ce substrat hydrophobe et volatil.

2 Accession des microorganismes aux composés organiques hydrophobes

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est faible (< 0,1 g.L⁻¹), les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Quatre modes

d'accession, illustrés dans la **figure 1.2** ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999; Hommel, 1994).

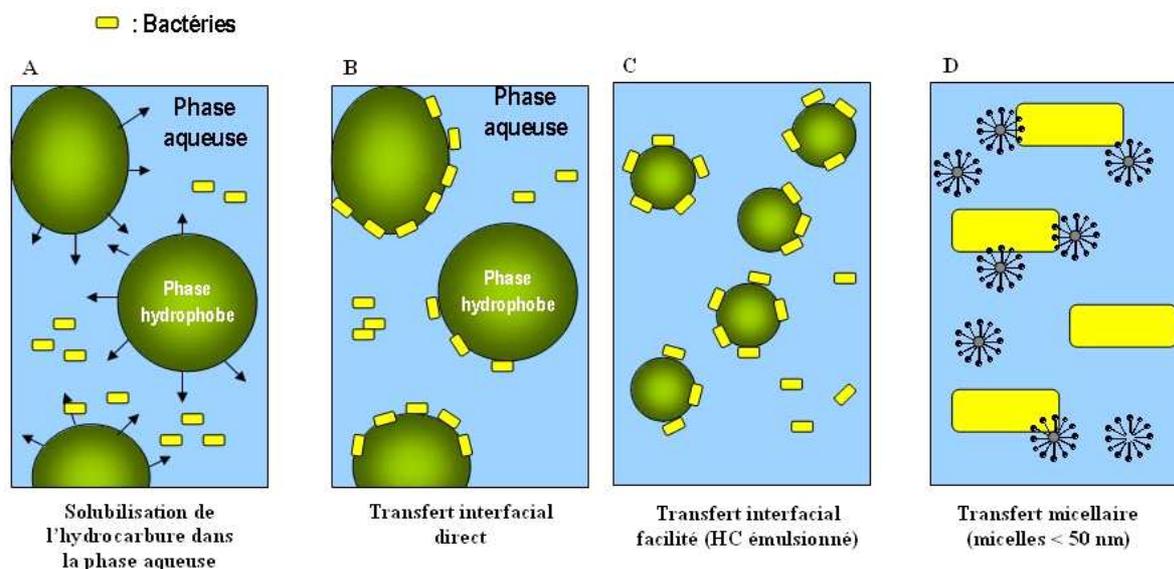


Figure 1.2 : Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)

2.1 L'assimilation des hydrocarbures solubles

L'assimilation en phase aqueuse a surtout été rapportée pour les hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles et les alcanes légers (Bouchez *et al.*, 1995a; Goswami & Singh, 1991). C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule.

2.2 L'accession interfaciale

Les micro-organismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe (Miura, 1978; Rosenberg, 1986). L'hydrophobicité élevée de cette enveloppe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse. L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation.

2.3 L'accession interfaciale facilitée (émulsification)

Dans ce cas, l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent

complexe. Ils participent à la pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance (Singer & Finnerty, 1984).

2.4 Le transfert micellaire

Différents auteurs ont montré que la solubilité apparente des *n*-alcanes était très largement supérieure à celle mesurée dans l'eau dans les cultures de levures sur *n*-alcanes (Roy *et al.*, 1978) ou sur HAP (Kim *et al.*, 2001). Cette augmentation de la solubilité apparente est liée à la formation d'une microémulsion résultant de la pseudo solubilisation des hydrocarbures par des biosurfactants produits par le microorganisme. Les micelles ainsi formées, de taille très inférieure aux bactéries, entrent en contact avec la cellule. Le mécanisme de transfert à travers l'enveloppe cellulaire n'est en réalité pas connu. Une protéine de transport membranaire AlkL a été cependant mise en évidence (van Beilen *et al.*, 1992b). Hommel et Ratledge (Hommel, 1994) ont formulé une hypothèse sur l'existence des pores hydrophobes au niveau de l'enveloppe bactérienne. Il faut noter que la surface externe d'une micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire apparaît privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe micellaire est faible (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999). Les interactions hydrophobes entre substrat et cellule microbienne sont d'ailleurs complexes car les biosurfactants produits sont susceptibles d'affecter l'hydrophobicité cellulaire. En effet, le rôle physiologique des biosurfactants est multiple. Ils interviennent dans la formation de microcolonies, ils facilitent l'association en surface des bactéries et de part ce fait la formation d'agrégats, ils assurent la formation d'une structure de type filamenteuse et jouent un rôle dans la dispersion des biofilms (Pamp & Tolker-Nielsen, 2007).

3 Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures regroupent des composés pétroliers, parmi lesquels, des alcanes linéaires, ramifiés, cycliques et des composés mono- et poly- aromatiques. Le 2-EHN est un ester branché à 8 atomes de carbone. J'aborderai ici seulement ce qui concerne la biodégradation des hydrocarbures linéaires et branchés. Concernant l'étude exhaustive de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers, vous pouvez vous référer à l'ouvrage « Microbiologie Pétrolière » de J.P. Vandecasteele (2005).

3.1 Les alcanes linéaires

Les *n*-alcanes de longueur de chaîne supérieure à neuf atomes de carbone sont les composés les plus facilement biodégradables lors d'une éventuelle pollution (Britton, 1984). Ils contribuent à la formation de films d'hydrocarbures (Leahy & Colwell, 1990). En revanche les alcanes de plus courte chaîne sont toxiques et plus difficilement biodégradables, ils agissent comme des solvants vis-à-vis des membranes (Watkinson & Morgan, 1990). La première étape d'oxydation est catalysée par une oxygénase. La présence d'oxygène est donc une condition nécessaire à la dégradation de ces molécules. Trois voies de dégradation ont été clairement élucidées qui mettent en œuvre une alcane hydroxylase qui catalyse une réaction d'oxydation terminale ou subterminale. Le schéma présenté par la **figure 1.3** illustre les voies de dégradation des alcanes connues chez les micro-organismes.

En général, l'alcane est tout d'abord oxydé en alcool primaire par une alcane-1-monoxygénase, puis en aldéhyde par une alcool déshydrogénase et enfin en acide carboxylique par une aldéhyde déshydrogénase. Lors de l'oxydation subterminale, l'alcane est oxydé en alcool secondaire puis en méthyl-cétone, elle-même dégradée en ester par une réaction de type « Baeyer-Villiger », impliquant une monoxygénase. L'ester s'hydrolyse ensuite en alcool, puis s'oxyde en aldéhyde, puis acide. L'acide carboxylique ainsi formé est soit métabolisé par l'intermédiaire de la voie de la β -oxydation, soit incorporé dans la voie de synthèse des lipides cellulaires.

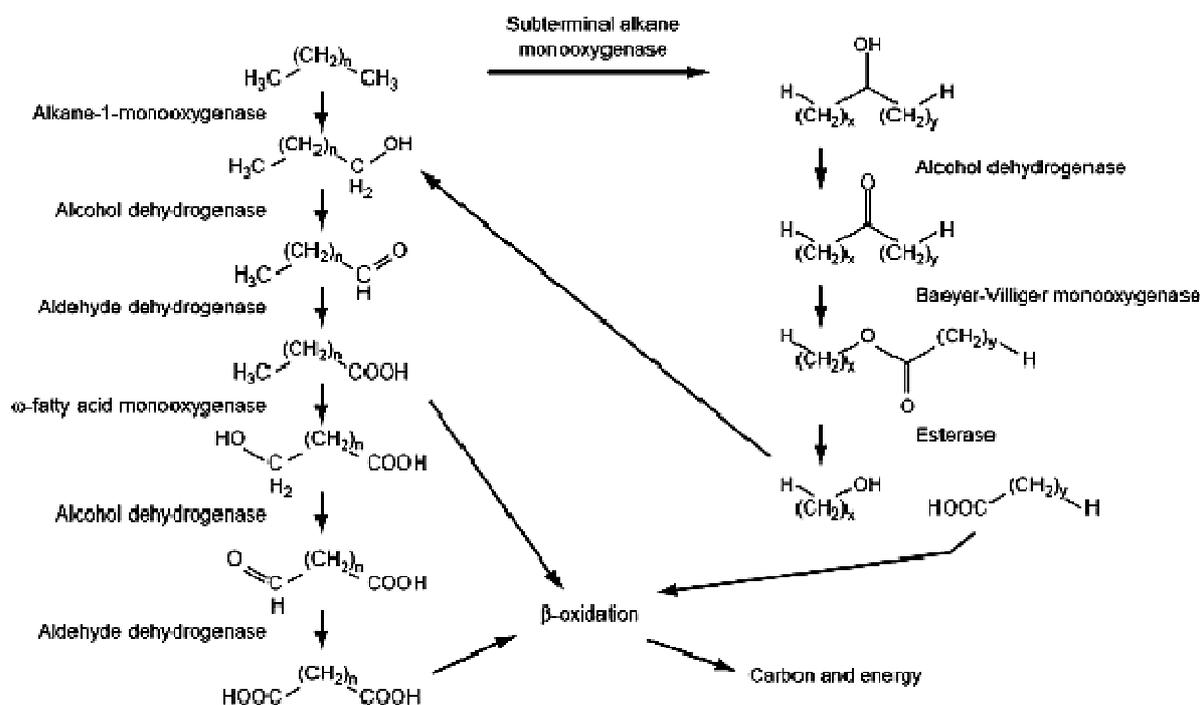


Figure 1.3 : Voies de dégradation des alcanes aliphatiques (van Beilen et al., 2003).

3.2 Les alcanes ramifiés

Les composés branchés sont en général plus résistants à la dégradation que leurs homologues linéaires. Les alcanes branchés contenant un ou deux groupements méthyles sur leur chaîne principale sont complètement métabolisés en CO₂. Les voies de dégradation mises en jeu sont similaires à celles intervenant lors de la dégradation des alcanes linéaires (Thijsse & Van der Linden, 1961). En général, plus les groupements méthyles sont éloignés de l'extrémité de la chaîne, plus la biodégradation est facile (Pirnack, 1977). Les molécules présentant des carbones tertiaires sont dégradées plus lentement. Les composés les plus récalcitrants sont ceux qui comportent un carbone quaternaire. La molécule est d'autant plus difficilement biodégradable que la chaîne carbonée est grande, le carbone substitué est près du centre de la chaîne principale, le degré de substitution est élevé (Mc Kenna, 1972). La résistance des alcanes branchés peut avoir d'autres explications parmi lesquelles : i) les cellules sont incapables de transférer les molécules branchées au travers des membranes, ii) le système enzymatique n'est pas capable d'oxyder ce type de molécule, iii) les alcanes branchés ne parviennent pas à induire le système enzymatique d'oxydation ou iv) le substrat est toxique pour les cellules (Schaeffer *et al.*, 1979).

3.2.1 Substrats utilisés par la β -oxydation

La β -oxydation correspond à quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée d'un acide gras couplé au coenzyme A est réduite de deux atomes de carbone. L'acyl gras-CoA dont la chaîne carbonée est réduite de deux unités, retourne alors dans un cycle de β -oxydation et est de nouveau réduit de deux atomes de carbone. L'acide gras-CoA subit ainsi plusieurs cycles de β -oxydation jusqu'à sa dégradation complète en acétyl-CoA. Ce mécanisme peut être stoppé en fonction de plusieurs facteurs mêlant les propriétés physico-chimiques de l'acyl-CoA, la longueur de la chaîne carbonée, la présence d'un alcane β -substitué ou ayant un carbone quaternaire, la concentration du substrat, la présence de CoA, d'acétyl-CoA ou le ratio NAD⁺/NADH. Alvarez (2003) suggère que la β -oxydation joue un rôle central chez les Actinomycètes (**figure 1.4**). Une partie des *n*-alcanes est incorporée aux lipides cellulaires après une oxydation de l'une de ses extrémités sans qu'il y ait dégradation complète de l'acyl-CoA. Dans ce cas, la biosynthèse des acides gras *de novo* est probablement inhibée. Les acides gras produisent ainsi des intermédiaires clés chez les Actinomycètes pour la biosynthèse de plusieurs espèces lipidiques leur permettant des interactions environnementales avec des hydrocarbures. Ainsi, la β -oxydation ne sert pas

seulement à la voie catabolique des Actinomycètes mais aussi à la production de lipides de fonction et de structure diverses (Alvarez, 2003).

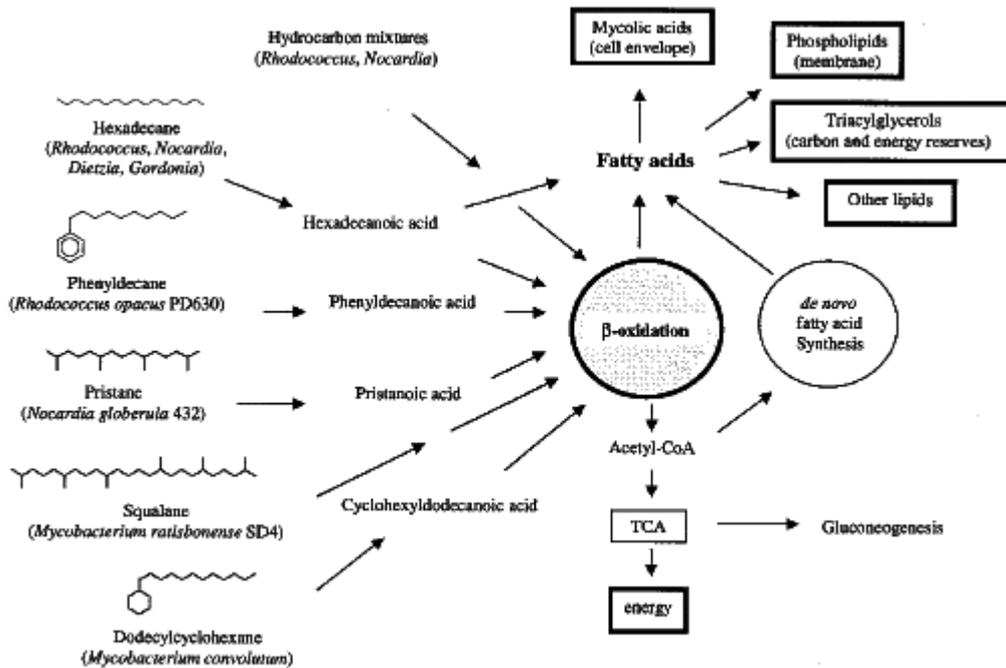


Figure 1.4 : Dégradation et assimilation de nombreux hydrocarbures chez les Actinomycètes (Alvarez, 2003).

Le fonctionnement de la β -oxydation décrit pour les chaînes d'alcane linéaires tolère des alcanes qui possèdent des branchements méthyles. Les études portant sur la dégradation du 2-méthylhexane par *P. aeruginosa* sont les premiers travaux réalisés sur la dégradation des alcanes branchés (Thijsse & Van der Linden, 1961). La mise en évidence d'acide 2-méthylhexanoïque et 5-méthylhexanoïque confirme l'existence de voies de dégradation similaires à celles intervenant dans la dégradation des *n*-alcane. Pour cette raison, seule la dégradation d'alcane ramifiés particuliers (alcane polyméthylés, β -substitués ou ayant un carbone quaternaire) est détaillé ci-dessous.

3.2.2 Cas du pristane et phytane : Alcane polyméthylés

Le pristane (2,6,10,14-tétraméthylpentadécane) et son homologue le phytane (2,6,10,14-tétraméthylhexadécane) sont présents dans les pétroles et dans les sédiments anciens. Les produits isolés de l'oxydation monoterminal (Nakamiya *et al.*, 1985), diterminale (McKenna & Kallio, 1971; Pirnik *et al.*, 1974) et subterminale (Rontani *et al.*, 1986) conduisent au schéma présenté dans la **figure 1.5**. L'acide ou le diacide, après activation en acyl-CoA, peut être dégradé par β -oxydation. Le point important est que la position 2 de chaque branchement méthyle par rapport aux positions successives du

groupement carboxyl-CoA terminal ne bloque pas la progression de la β -oxydation qui libère tour à tour du propionyl-CoA et de l'acétyl-CoA.

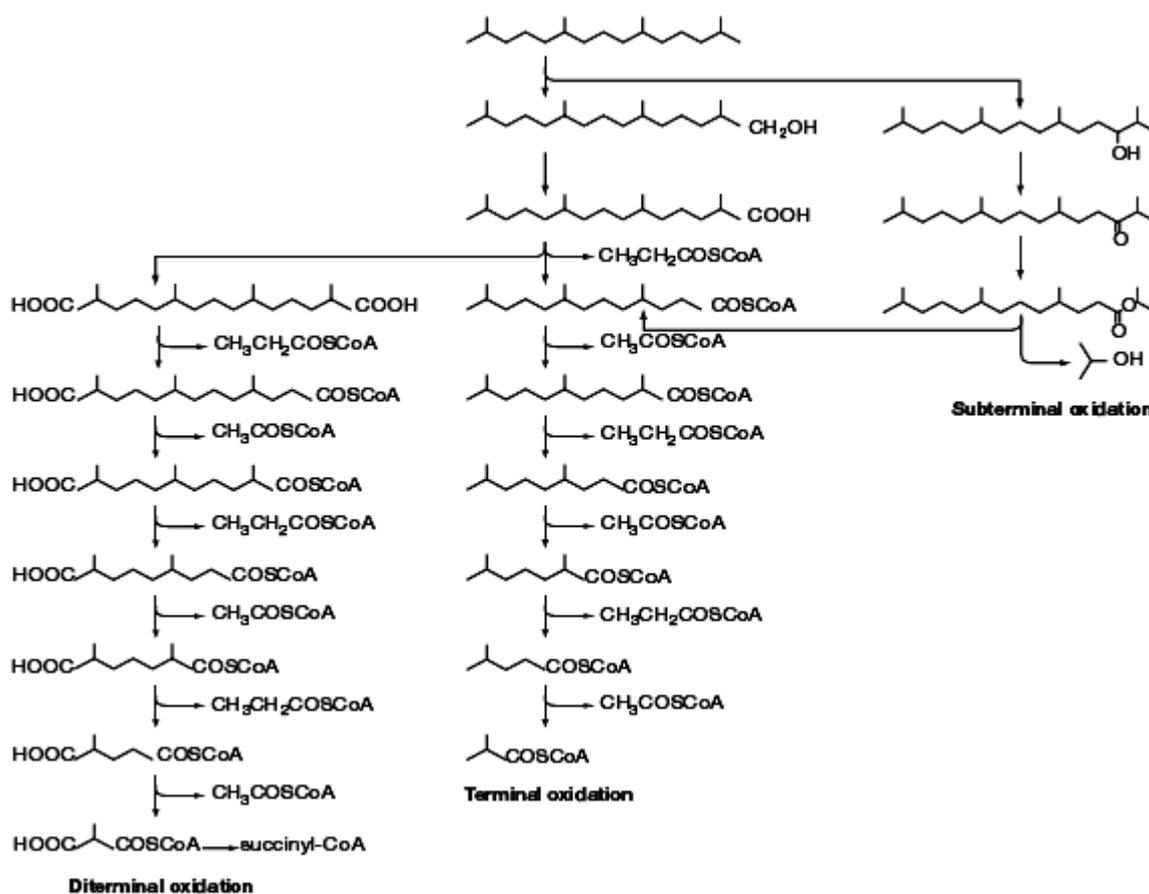


Figure 1.5 : Voie métaboliques de dégradation du pristane (Vandecasteele, 2005)

3.2.3 Voie du citronellol et alcanes β -substitués

Les antéiso-alcanes (β -substitués) sont rarement oxydés en raison de la présence d'un carbone quaternaire bloquant la voie classique de la β -oxydation (croix bleue sur la **figure 1.6**). En effet pour les 3-alkylacyl-CoA, la β -oxydation est bloquée après l'étape d'hydratation. Ce problème se pose aussi pour les terpénoïdes comme le citronellol, le géranol et le nérol. Il est ici résolu chez certains micro-organismes par carboxylation du groupement méthyle concerné et élimination du groupement carboxyméthyle formé.

Cette voie a été initialement découverte par Seubert et ses collègues chez *Pseudomonas citronellolis* capable de dégrader le citronellol (Seubert & Fass, 1964) et a été ensuite rapporté chez d'autres *Pseudomonas* (Forster-Fromme *et al.*, 2008). Selon Fall *et al.* (1979), les voies de dégradation du citronellol et des 3-méthylalcanes se rejoignent. Ils proposent ainsi que la dégradation d'un 3-méthylalcane se fasse initialement par la voie de dégradation des alcanes

(formation d'un acide carboxylique) puis ensuite par la voie de dégradation du citronellol et se termine par β -oxydation classique.

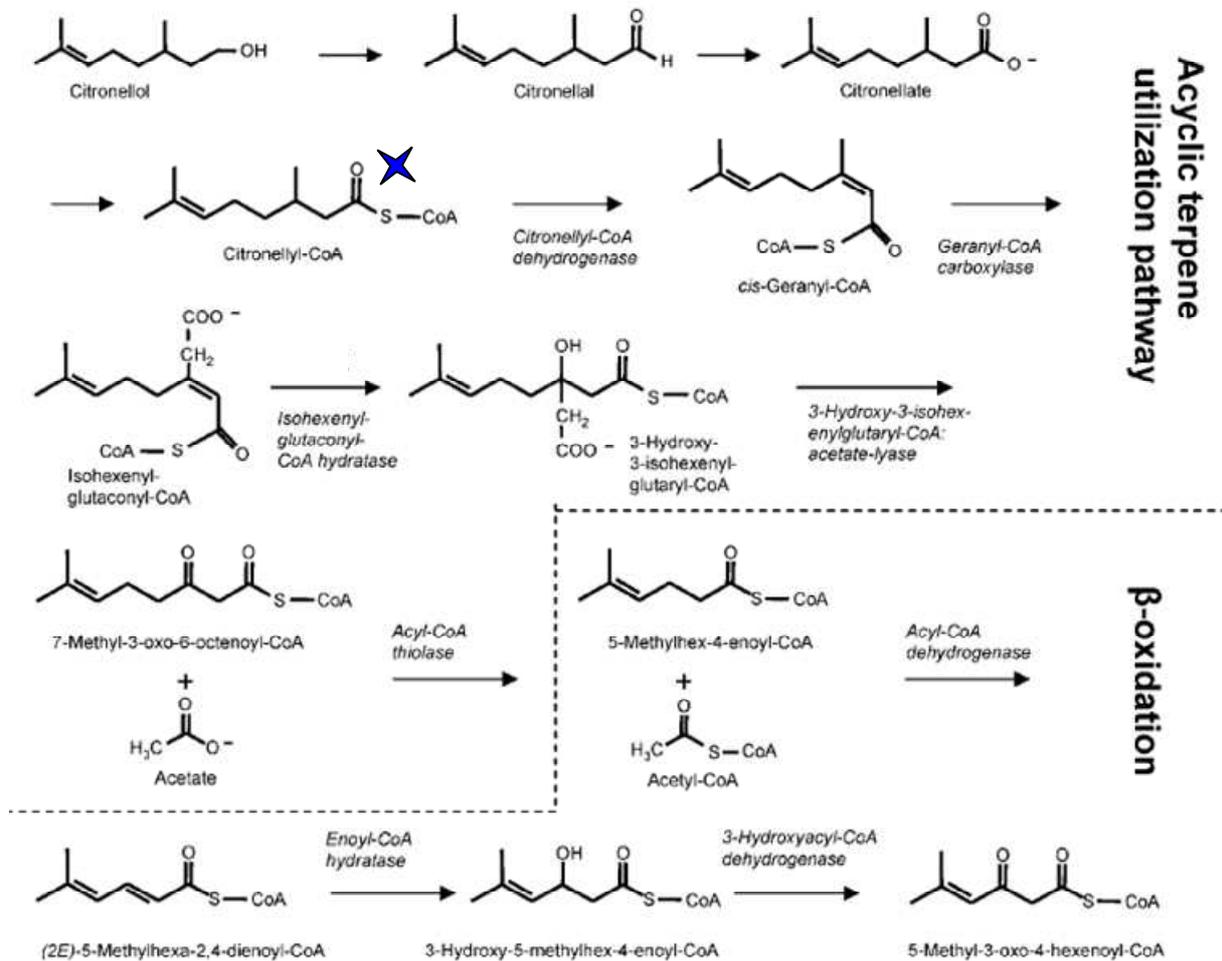


Figure 1.6: Voies métaboliques de dégradation du citronellol par *Pseudomonas aeruginosa* et *P. citronnellolis*. (Adapté de Forster-Fromme et al., 2008)

Pseudomonas citronnellolis et plus récemment *P. aeruginosa* ont été étudiés pour leur capacité à dégrader les terpènes, en particulier le citronellol (Seubert & Fass, 1964 ; Forster-Fromme et al., 2008). Ces bactéries possèdent une enzyme capable de débloquent le cycle de la β -oxydation lors de la présence d'un méthyle en position β . C'est une géranyl CoA décarboxylase qui permet la formation d'une fonction acétate au niveau du groupement méthyle qui bloque normalement la β -oxydation. Cette réaction permet au substrat d'être utilisé par d'autres enzymes spécifiques de la dégradation des terpènes comme l'isohexenyl-glutaconyl CoA hydratase puis la 3-hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA acetate lyase. Après

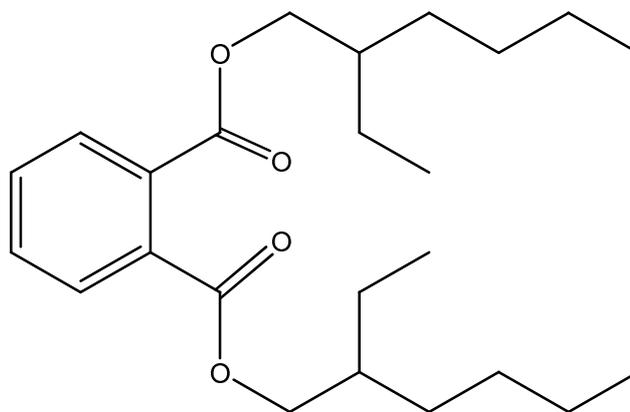
la formation de l'intermédiaire enoyl CoA (7-méthyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA sur la **figure 1.6**), le cycle de β -oxydation se poursuit sans encombre.

3.2.4 Alcanes polyméthylés récalcitrants à la biodégradation

Du fait du mécanisme particulier de dégradation des alcanes β -substitués, la dégradation des alcanes polyméthylés dépend de la capacité à attaquer des branchements méthyles en position 2. Ainsi, (Schaeffer *et al.*, 1979) rapportent que la présence de structures *anteiso* aux deux extrémités de l'hydrocarbure rend la molécule totalement récalcitrante alors que les structures *iso* ralentissent l'oxydation par rapport à la molécule linéaire correspondante. Ces observations basées sur des tests de croissance sur des isomères d'octane disubstitués (diméthyl-octanes) et avec des micro-organismes sélectionnés sur octane, ne sont cependant pas généralisables aux micro-organismes dotés de la voie du citronellol. Par exemple, des micro-organismes capables de dégrader des isoalcanes peuvent parfois s'attaquer à des alcanes substitués. C'est le cas de *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173, isolée pour sa capacité à dégrader l'iso-octane (Solano-Serena *et al.*, 2000b) et qui dégrade totalement de façon similaire les 2,5- et 3,4-triméthylpentane (voir § 5.2.2). Cependant, les isoalcanes possédant des atomes de carbone substitués consécutifs, comme le 2,3,4-triméthylpentane, sont résistants à la biodégradation (Solano-Serena *et al.*, 1999).

3.2.5 Dégradation du di-2-éthylhexyl phtalate

La dégradation du di-(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) aussi nommé *bis* (2-éthylhexyl) phtalate a fait l'objet d'études récentes. Le *bis* (2-éthylhexyl) phtalate a une structure qui, une fois libérée du groupement phtalate, libère du 2-éthylhexanol dont la structure est proche du 2-EHN (**figure 1.7**).



bis(2-éthylhexyl) phtalate

Figure 1.7 : Structure du *bis*-(2-éthylhexyl) phtalate

Les diesters de phtalate comme le DEHP sont largement utilisés pour les productions industrielles de plastiques et bien connus pour causer des perturbations endocriniennes (Nalli *et al.*, 2006). Ce sont des composés récalcitrants qui s'accumulent dans l'environnement, en l'occurrence dans les eaux usées. Il a été montré que la dégradation des diesters de phtalate se déroule dans l'eau des rivières et dans les boues activées de station d'épuration. Les micro-organismes capables d'une telle dégradation appartiennent au genre des *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Micrococcus sp.* et *Gordonia*. Une estérase catalyse l'hydrolyse des diesters de phtalate en monoesters correspondant. Aucune enzyme d'organisme supérieur hydrolysant le monoester n'a été identifiée. En général, la dégradation d'esters du *n*-butyl phtalate a lieu en deux étapes : une estérase forme des mono-esters et une hydrolase forme l'acide phtalique et du 2-éthylhexanol (Nishioka *et al.*, 2006). Récemment, une souche de *Mycobacterium sp.* capable de dégrader les DEHP en acide 1,2-benzenedicarboxylique ou acide phtalique et en 2-éthylhexanol a été isolée (Nakamiya *et al.*, 2005). Ces études mettent en évidence la facilité de l'hydrolyse du DEHP et de dégradation de l'acide phtalique et la récalcitrance du 2-éthylhexanol, qui s'accumule dans le milieu, dont la structure est très proche du 2-EHN. Il en est de même pour la dégradation du bis (2-éthylhexyl) adipate (BEHA), un autre additif des plastiques, qui au cours de sa dégradation par *Rhodococcus rhodochrous* accumule du 2-éthylhexanol et de l'acide 2-éthylhexanoïque. Nalli *et al.* ont noté que l'acide 2-éthylhexanoïque accroît la toxicité du milieu et que ce dernier n'est pas dégradé (Nalli *et al.*, 2002). Cet exemple illustre le caractère récalcitrant de l'entité « 2-éthylhexyl » lors de la dégradation de ce type d'ester.

4 Systèmes enzymatiques de dégradation d'alcane ramifiés

Les enzymes mises en œuvre pour la dégradation de composés polluants ont été largement étudiées et recherchées dans les microorganismes issus de sols et de sites pollués (Kloos *et al.*, 2006; Penet *et al.*, 2006). Les études portent surtout sur des oxygénases, catalysant l'étape initiale de dégradation. Les enzymes de la β -oxydation sont très redondantes chez les bactéries des sols et prennent en charge la dégradation des acides carboxyliques. Dans le cas du 2-EHN, les enzymes potentiellement impliquées dans la voie de dégradation seraient des alcane hydroxylases, des estérases, des aldéhyde et alcool déshydrogénases et les enzymes de la β -oxydation. Seules ces catégories d'enzymes seront considérées ci-dessous.

4.1 Les alcane-1 monooxygénases (E.C. 1.14.15.3).

Les alcane monooxygénases sont responsables de l'attaque initiale de l'alcane qui est converti en son alcool correspondant par le biais d'une oxydation du carbone à l'extrémité terminale ou subterminale. Le système enzymatique hydroxylase catalysant cette réaction est généralement couplé à un système transporteur d'électrons. En fonction de la longueur de chaîne des alcanes, différents systèmes d'enzymes sont impliqués (**tableau 1.2**).

Les enzymes de type méthane monooxygénase oxydent les alcanes composés de 1 à 10 carbones. Deux formes de cette enzyme ont été décrites : la méthane monooxygénase particulaire (pMMO) et la méthane monooxygénase soluble (sMMO). La pMMO est une enzyme membranaire synthétisée chez la plupart des bactéries méthanotrophes qui fonctionne avec un centre fer-cuivre où elle oxyde les alcanes de C₁ à C₅. Alors que la sMMO est une enzyme soluble oxydant les alcanes de C₁ à C₁₀. (Ayala & Torres, 2004; Deeth & Dalton, 1998).

Tableau 1.2 : Enzymes capables d'oxyder les alcanes (d'après Van Beilen & Funhoff, 2005)

Enzyme	Composition and cofactors	Examples of host organisms	Substrate range
Class I P450 (CYP153)	P450 oxygenase: P450 heme Ferredoxin: [2Fe-2S] Ferredoxin reductase: FAD, NADH	<i>Sphingomonas</i> sp. HXN-200, <i>Mycobacterium</i> sp. HXN-1500, <i>Acinetobacter</i> sp. EB104	C ₄ -C ₁₆
Class II P450 (CYP52)	Microsomal oxygenase: P450 heme Reductase: FAD, FMN, NADPH	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	C ₁₀ -C ₁₆
Class II P450 (CYP2E, CYP4B)	Microsomal oxygenase: P450 heme Reductase: FAD, FMN, NADPH	Humans and rabbits	C ₆ -C ₁₀
Integral membrane alkane hydroxylase	Membrane hydroxylase: dinuclear iron Rubredoxin: iron Rubredoxin reductase: FAD, NADH	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i>	C ₅ -C ₁₆
Soluble methane monooxygenase	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure Hydroxylase: dinuclear iron Reductase: [2Fe-2S], FAD, NADH Regulatory subunit	<i>Methylinus trichosporium</i> OB3b, <i>Methylococcus capsulatus</i> (Bath)	C ₁ -C ₁₀
Particulate methane monooxygenase	Putative $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure	All known methanotrophs	C ₁ -C ₅
Propane monooxygenase	Putative $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure Reductase: NADH Regulatory subunit	<i>Gordonia</i> sp. TY-5	C ₃ and C ₁₃ -C ₂₂
Butane monooxygenase	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ structure Hydroxylase: dinuclear iron Reductase: [2Fe-2S], FAD, NADH Regulatory subunit	<i>Pseudomonas butanovora</i> ATCC 43655	C ₂ -C ₈
Engineered P450cam	P450 oxygenase: P450 heme Putidaredoxin: [2Fe-2S] Putidaredoxin reductase: FAD, NADH	<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 29607	C ₃ -C ₁₀
Engineered P450BM-3	Single polypeptide: FAD, FMN, NADPH	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14581	C ₃ -C ₈

Les alcanes contenant entre 4 et 16 atomes de carbone sont oxydés soit par une alcane hydroxylase trans-membranaire à fer non hémique de type AlkB (Shanklin *et al.*, 1997), soit par un cytochrome P450 soluble de type CYP153 (Funhoff *et al.*, 2006).

Les alcanes de longueur de chaîne supérieure à C₁₇ sont aussi oxydés par des mono-oxygénases nommées LadA (Feng *et al.*, 2007).

Les alcane hydroxylases catalysent l'hydroxylation des alcanes linéaires et/ou branchés, des cyclo-alcanes simples ou *n*-alkylés. Dans le cadre de la dégradation du 2-EHN, nous ne nous intéresserons qu'aux alcane hydroxylases dégradant les alcanes linéaires et/ou branchés de longueurs de chaîne comprises entre C₅ et C₁₆ chez les bactéries. Il s'agit des méthane mono-oxygénases solubles (sMMO), des hydroxylases membranaires de type AlkB et de cytochromes P450 de la famille des CYP153.

4.1.1 Les méthane monoxygénases solubles sMMO

Les MMO catalysent la conversion du méthane en méthanol, ce qui permet aux bactéries méthanotrophes d'utiliser le méthane comme unique source de carbone et d'énergie. Les enzymes impliquées dans l'oxygénation du méthane sont représentées par la **figure 1.8**. Cette réaction est aussi catalysée par des cytochromes P450.

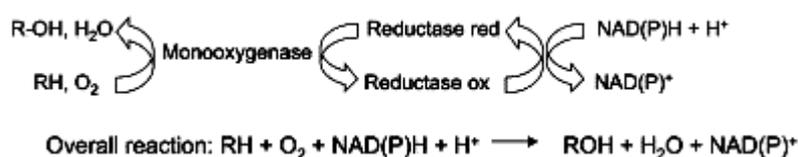


Figure 1.8 : Étapes impliquées dans la réaction d'oxydation par la méthane monoxygénase soluble (d'après Ayala & Torres, 2004).

A la différence des pMMO, la sMMO est une enzyme soluble, induite lors de carences en cuivre et qui n'est pas présente chez tous les méthanotrophes. Les méthane monoxygénases solubles les plus étudiées sont celles de *Methylosinus trichosporium* OB3b et *Methylococcus capsulatus*. Ce sont des méthane monoxygénases à trois composantes comprenant une hydroxylase à fer binucléaire (MMOH) de 245 kDa, une NADH oxidoreductase à FAD contenant un cluster fer-soufre (MMOR) de 40 kDa et une petite sous unité de régulation, indispensable au fonctionnement de l'enzyme (MMOB) de 16 kDa représentée en vert sur la **figure 1.9** illustrant le cycle catalytique des sMMO (Kopp & Lippard, 2002) (Hamamura *et al.*, 1999).

L'oxygénation du méthane n'a lieu qu'en présence de la protéine de régulation MMOB. Le cycle catalytique commence par la fixation et l'activation de l'O₂ par l'enzyme réduite MMOH_{red}. De ce fait, des intermédiaires très réactifs sont formés (MMOH_{superoxo} et

MMOH_{peroxo}), qui conduisent à l'hydroxylation du méthane en laissant les atomes de fer de l'enzyme sous forme ferrique. La réductase MMOR utilise alors deux électrons provenant de l'oxydation du NADH pour réduire la MMOH oxydée et boucler le cycle catalytique (Kopp & Lippard, 2002).

La croissance sur les alcanes gazeux de C₂ à C₄ est aussi attribuée à des bactéries appartenant aux genres *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium-Rhodococcus* (Ashraf *et al.*, 1994). Hamamura *et al.* ont montré que malgré les points communs existant entre la butane monooxygénase de *Mycobacterium vaccae* JOB5 et celle de *Pseudomonas butanovora*, les enzymes ne sont pas sensibles aux mêmes inhibiteurs et ne fonctionnent pas de la même manière. Par exemple, *P. butanovora* peut oxyder l'éthène uniquement en présence de peroxyde d'hydrogène, mais son rendement est trois fois moindre que celui d'une sMMO de *Methylosinus trichosporium* OB3b (Dubbels *et al.*, 2007). D'autre part, certaines bactéries sont équipées de plusieurs alcanes monooxygénases. C'est le cas de *Nocaroides* sp. CF8 pouvant produire deux enzymes durant l'oxydation des alcanes : une méthane monooxygénase à cuivre (pMMO) et une alcanes hydroxylase membranaire à fer binucléaire de type AlkB. (Hamamura *et al.*, 2001).

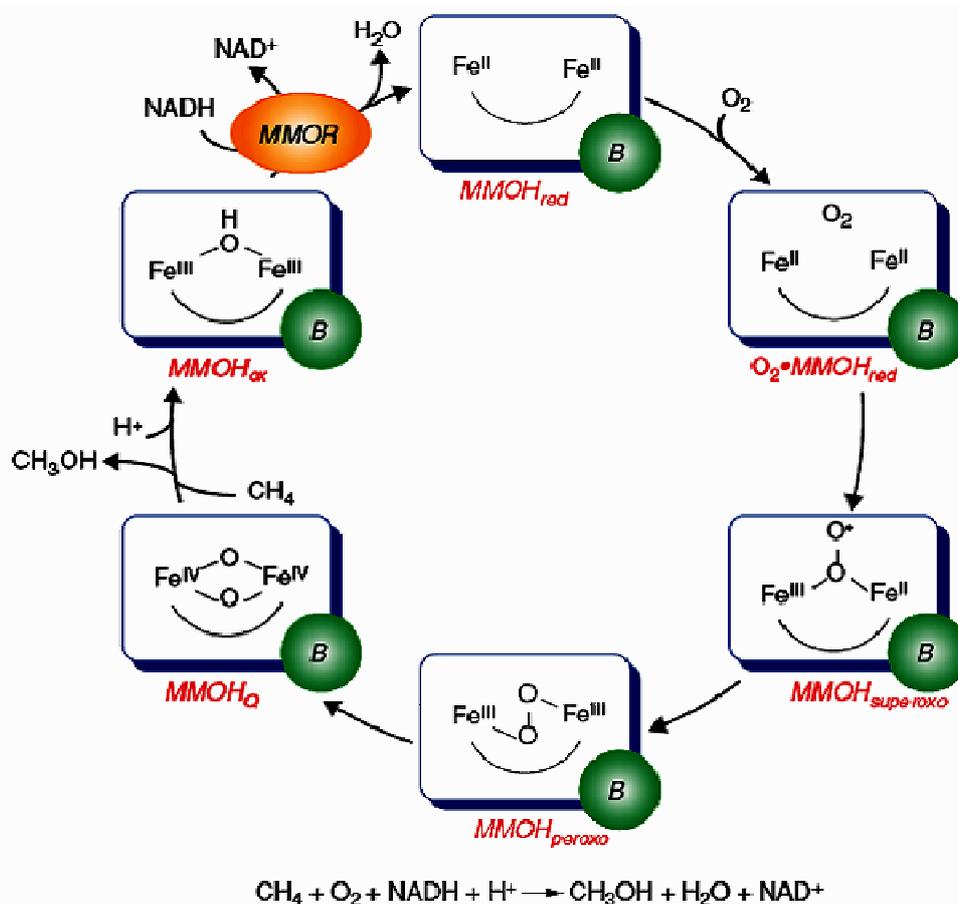


Figure 1.9 : Cycle catalytique de la méthane monooxygénase (Kopp & Lippard, 2002).

4.1.2 Les hydroxylases de type AlkB (E.C 1.14.15.3)

4.1.2.1 Propriétés générales

L'équipe de Coon (Peterson *et al.*, 1967) a caractérisé le système alcane hydroxylase de *P. oleovorans*, renommé par la suite de *P. putida* (van Beilen *et al.*, 1992a; van Beilen *et al.*, 1994; van Beilen *et al.*, 2001). Il est constitué de trois protéines : une hydroxylase à fer non hémique nommée AlkB, une rubrédoxine contenant un atome de fer et une rubrédoxine réductase. Ces deux dernières protéines agissent en tant que transporteurs d'électrons entre le NADH et l'hydroxylase comme indiqué sur la **figure 1.10**. L'hydroxylase est une protéine de masse moléculaire comprise entre 44 et 50 kDa. Elle est présente dans la membrane cytoplasmique, et son activité nécessite la présence de phospholipides et de fer. La rubrédoxine est une protéine qui contient un centre actif constitué d'un atome de fer lié aux atomes de soufre de quatre résidus cystéine et formant ainsi une structure tétraédrique. La rubrédoxine réductase est classée dans les flavoprotéines utilisant le Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) comme co-facteur (van Beilen *et al.*, 1994).

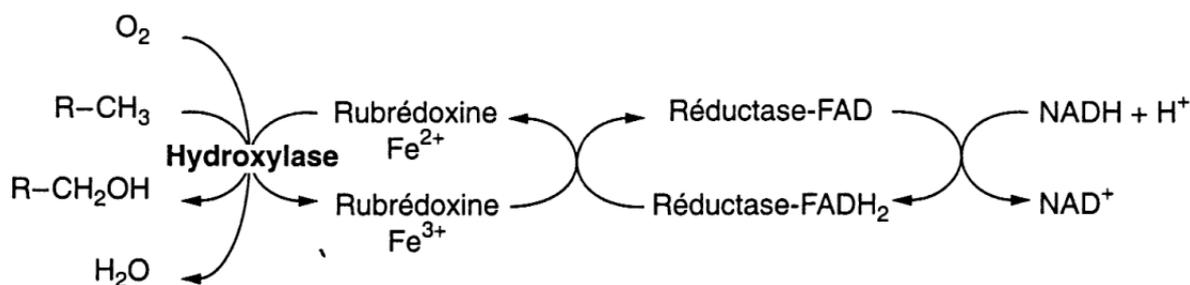


Figure 1.10 : Chaîne de transfert d'électrons des systèmes d'hydroxylases à fer non hémique.

4.1.2.2 Diversité des gènes *alkB* d'origine bactérienne

Plus d'une centaine de gènes *alkB* de type alcane-1 monooxygénase sont répertoriés dans les bases de données. Les séquences des gènes *alkB* homologues peuvent présenter des divergences importantes, avec des taux d'identité ne dépassant pas parfois 40 % (Heiss-Blanquet *et al.*, 2005). Certaines variations reflètent des différences de spécificité vis-à-vis du substrat, en fonction de la longueur de chaîne des alcanes. La présence de trois à cinq homologues divergents de *alkB* dans plusieurs souches de *Rhodococcus* accroît la gamme d'alcanes (C₆-C₁₆) dégradés par ces souches (van Beilen *et al.*, 2002b).

Les gènes d'alcane hydroxylases de micro-organismes présents sur un site pollué par des hydrocarbures ont été recherchés et partiellement séquencés. Un arbre phylogénétique a pu être ainsi réalisé sur la base des séquences partielles des gènes *alkB* codant pour l'alcane hydroxylase (**figure 1.11**). Cet arbre montre que la divergence des séquences des gènes *alkB*

n'est pas corrélée à celle qui a été établie par les espèces bactériennes en se basant sur les séquences des ARNr 16S. van Beilen *et al.* (2003) ont souligné que cette observation résulte probablement de transferts horizontaux des gènes *alkB* parmi les souches bactériennes appartenant au même genre bactérien.

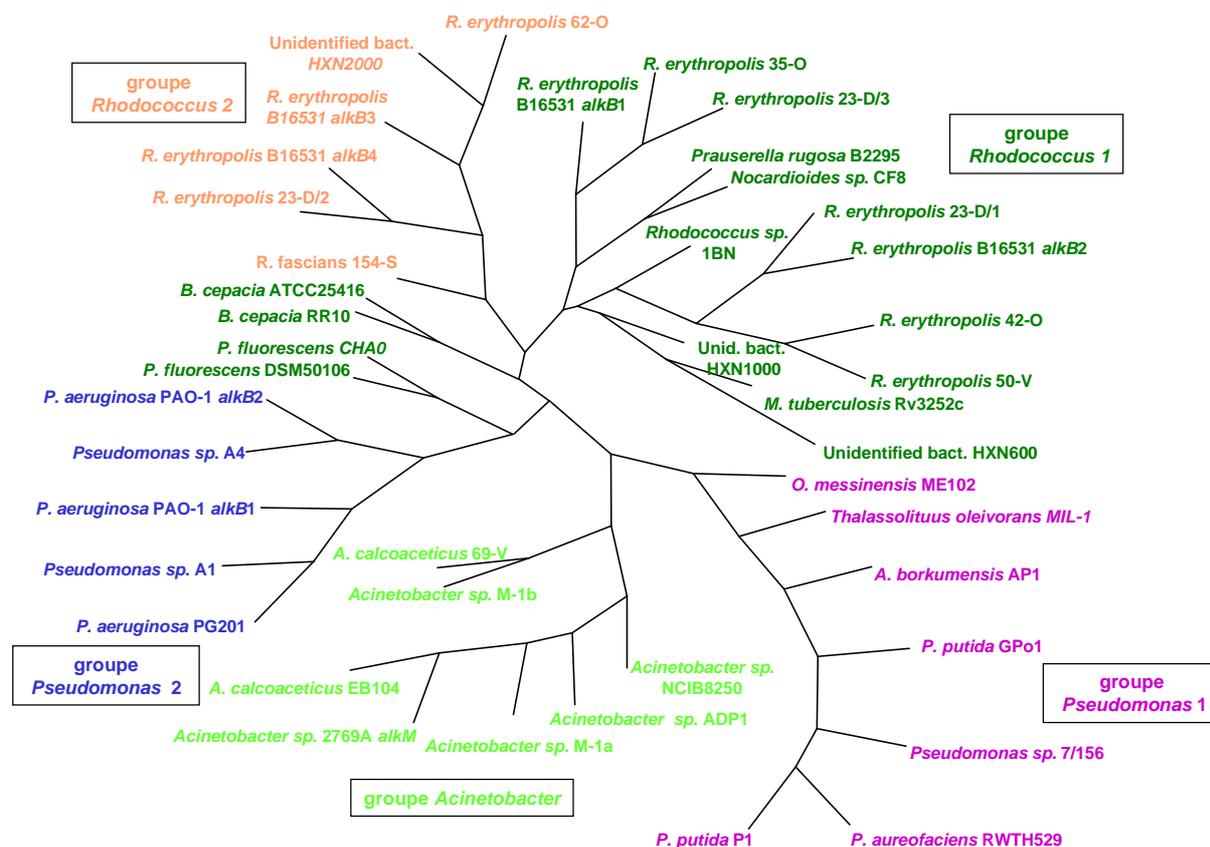


Figure 1.11 : Arbre phylogénétique des séquences partielles d'alcane hydroxylases (*AlkB*) connues et obtenues à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures. Adapté de Heiss *et al.* (2005).

4.1.2.3 Organisation génétique des gènes *alkB*

Dans la plupart des bactéries étudiées, les gènes de dégradation des alcanes sont dispersés dans l'ensemble du génome. Les alcane hydroxylases de type *AlkB* sont présentes aussi bien chez des bactéries à Gram négatif du genre *Pseudomonas* ou *Acinetobacter* que chez les bactéries à gram positif du genre *Rhodococcus* ou *Mycobacterium*. Il en existe parfois plusieurs copies comme le montre la **figure 1.12**.

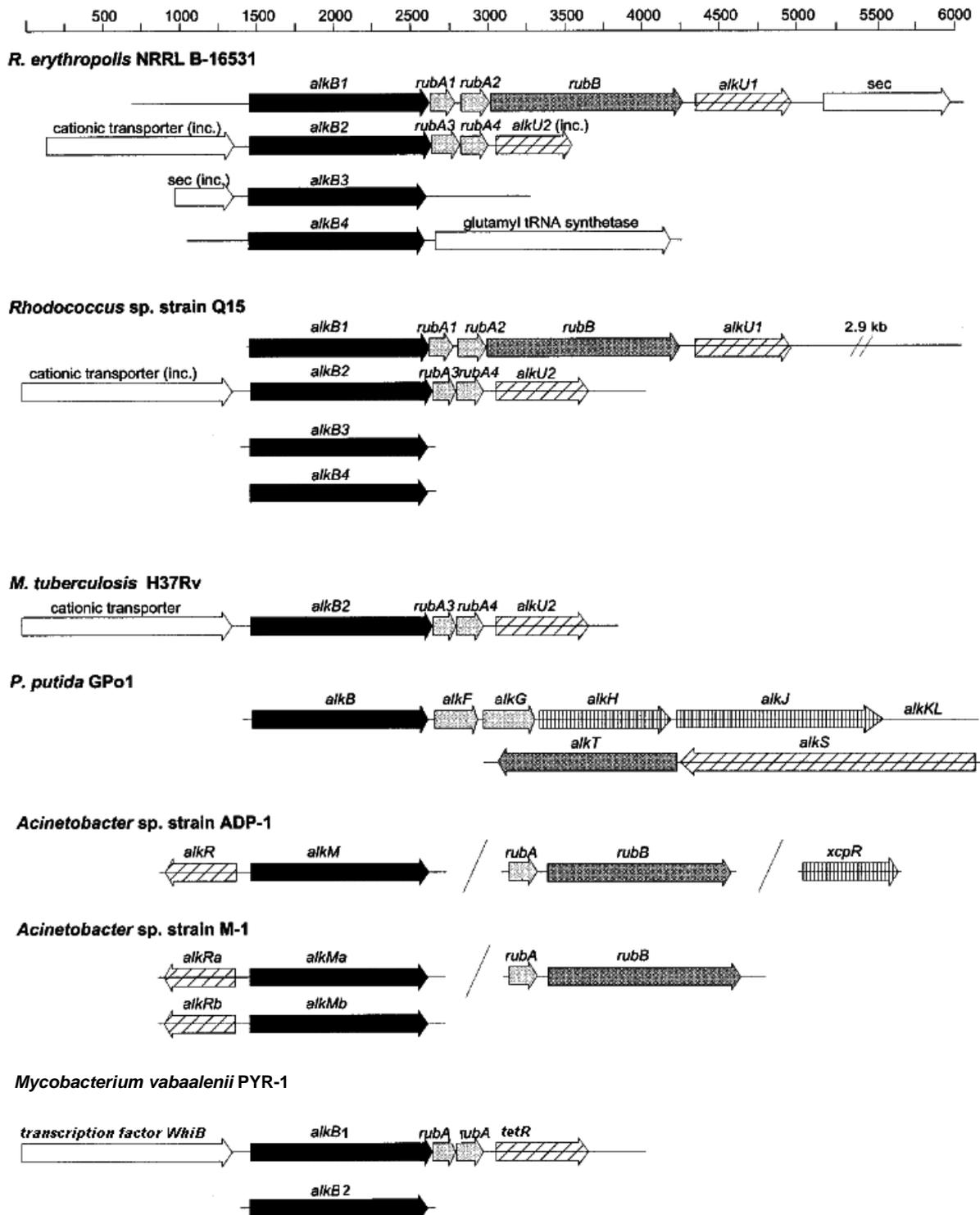


Figure 1.12 : Exemples d'organisation de gène *alk* chez des bactéries dégradant les alcanes. Adapté de (Whyte et al., 2002).

En noir sont représentés les gènes *alkB*, en gris clair les rubrédoxines, en gris foncé les rubrédoxine réductases, en rayures horizontales les deshydrogénases et en rayé les gènes de régulation.

Dans un certain nombre de cas, les gènes de la rubrédoxine et de l'hydroxylase sont séparés, sauf pour le système d'oxydation des alcanes de *P. putida* GPo1 découvert par van Beilen *et*

al. (2001). Dans cette configuration, toutes les protéines nécessaires à l'oxydation de l'alcane jusqu'aux dérivés acyl-CoA correspondant sont codées par l'opéron *alkBFGHJKL* (**figure 1.13**).

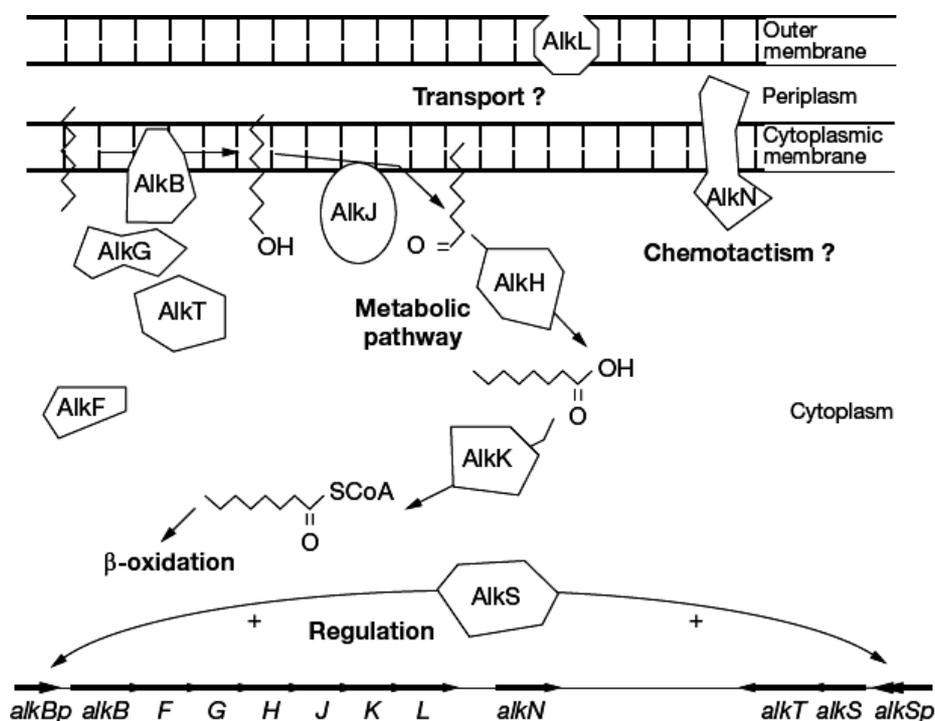


Figure 1.13 : Voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* Gpo1 : rôle et localisation cellulaire des protéines impliquées. Adapté de van Beilen *et al.* (2001).

L'opéron contient outre le gène codant pour une alcane hydroxylase membranaire (AlkB), deux gènes codant pour des rubrédoxines (AlkF et AlkG) (Peterson *et al.*, 1967; Peterson & Coon, 1968; van Beilen *et al.*, 2002a), une aldéhyde déshydrogénase (AlkH) et une protéine impliquée dans le transport des substrats (AlkL). Les gènes *alkS* et *alkT*, situés sur un locus séparé sur le plasmide OCT de cette souche codent respectivement une protéine de régulation nécessaire à l'activation de l'expression de l'opéron *alk* (van Beilen *et al.*, 1994) et une rubrédoxine réductase (Eggink *et al.*, 1990; Ueda & Coon, 1972). L'ensemble des gènes *alk* est flanqué de deux séquences d'insertion caractéristique d'un transposon de classe 1 (van Beilen *et al.*, 1994; van Beilen *et al.*, 2001).

4.1.2.4 Spécificité

Bien que la structure tridimensionnelle de la protéine ne soit pas connue, il est probable que l'alcane hydroxylase de type AlkB ait six hélices transmembranaires. Celles-ci sont arrangées par paires reliées entre elles avec de très courtes boucles du côté périplasmique (**figure 1.14**). L'enzyme possède une poche hydrophobe dans laquelle le substrat accède au

site catalytique. Ce dernier a deux atomes de fer liés à des résidus histidine localisés dans quatre séquences très conservées. Les motifs histidine se situent au sein des domaines hydrophiles cytoplasmiques de l'enzyme (van Beilen *et al.*, 2005b). Les séquences sont les suivantes : **A** : H₁₃₈EXXHK₁₄₃; **B** : E₁₆₇HXXGHH₁₇₃; **C** : N₂₆₉YXEHYG₂₇₅ et **D** : L₃₀₉QRHXDHHA₃₁₇. Elles sont visibles sur la **figure 1.14**. Les motifs A, B et C ont été trouvés dans les séquences partielles des alcane hydroxylases de *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012, IFP 2015 et IFP 2173, de *Mycobacterium* sp. IFP 2009 et de *M. vaccae* JOB5 (Lopes Ferreira *et al.*, 2007), de *Acinetobacter* sp. ADP-1 et M-1, de *M. tuberculosis* H37Rv, de *Rhodococcus* sp. Q15 et *R. erythropolis* NRRL B-16531 (Whyte *et al.*, 2002) et de *Pseudomonas putida* Gpo1 (van Beilen & Funhoff, 2005).

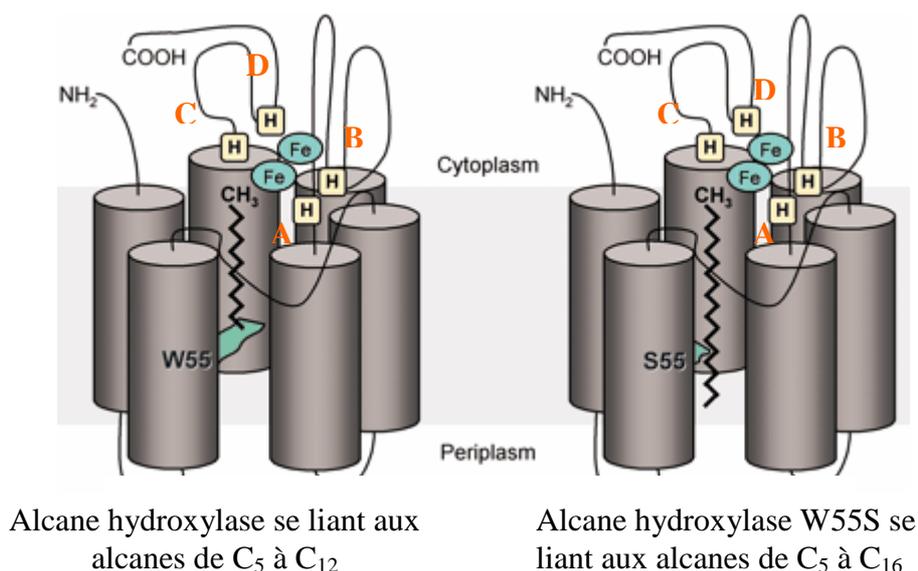


Figure 1.14 : Modèle montrant le substrat dans le site catalytique de l'alcane hydroxylase de *P. putida* Gpo1 w.t. (W55-AlkB) ou du mutant W55S (S55-AlkB). Selon (Rojo, 2005) et adapté de (van Beilen & Funhoff, 2005).

Les hélices transmembranaires de l'alcane hydroxylase sont représentées par des cylindres, les histidines (H) se lient aux atomes de fer (Fe). Les lettres A, B, C et D représentent les motifs histidine conservés.

Les tentatives pour déterminer la structure spatiale de l'alcane hydroxylase membranaire étant pour l'instant encore infructueuses, la spécificité des alcane hydroxylases pour des alcanes de différentes longueurs (van Beilen *et al.*, 2005b) a été étudiée en parallèle chez des variants de *P. putida* Gpo1 et de *A. borkumensis* AP1 obtenus par mutagenèse dirigée. L'étude a montré que le changement d'un seul acide aminé dans la séquence peptidique de l'alcane hydroxylase, W55 ou W58, respectivement, par un acide aminé d'encombrement moindre, la sérine ou la cystéine, rendrait l'enzyme capable d'oxyder des alcanes plus longs non oxydés par les

enzymes sauvages. Sur cette base, ces auteurs proposent un modèle moléculaire d'insertion de l'alcane dans le site actif de l'alcane hydroxylase de *P. putida* Gp01 (**figure 1.14**).

Si les données expérimentales sur l'alcane hydroxylase de type AlkB à fer non hémique sont très nombreuses, ce n'est pas le cas de l'alcane-1 monooxygénase à fer hémique de type CYP153 dont la fonction n'a été décrite qu'à partir de 2005.

4.1.3 Les monooxygénases de type cytochromes P450

Les monooxygénases à P450 sont des enzymes très étudiées du fait de leur présence ubiquitaire dans les organismes et de leur fréquente implication dans la dégradation des composés xénobiotiques. La nature hémique des cytochromes P450 a été établie en 1964 par Omura et Sato. La fonction enzymatique du cytochrome P450 et son rôle dans le métabolisme des composés xénobiotiques et dans l'hydroxylation des stéroïdes a ensuite été montré (Denison & Whitlock, 1995).

4.1.3.1 Classification des cytochromes P450 :

Les cytochromes P450 sont présents chez les eucaryotes supérieurs mais aussi chez les levures et les bactéries. Une nomenclature des P450 a été établie (Nelson, 2003). Il existe plusieurs familles de P450, nommées CYP ou Cyp chez la souris uniquement. En fonction du règne animal, les numérotations des familles de P450 changent. Chez les bactéries, la nomenclature a nommé les cytochromes P450 de CYP101 à CYP281 (Nelson, 2003). Pour classer des P450 dans une même famille protéique, il faut que les protéines aient au minimum 40 % d'identité de séquence (Nebert & Nelson, 1991).

Ces enzymes sont divisées en trois classes selon leur mode d'action catalytique :

a) Les cytochromes P450 de classe I correspondent aux enzymes mitochondriales et bactériennes, qui sont solubles. Ce sont des complexes composés de trois protéines : une ferrédoxine réductase contenant un coenzyme flavinique (FAD), une petite protéine contenant un centre fer-soufre (la ferrédoxine) et le cytochrome P450. La chaîne de transfert des électrons du NAD(P)H au P450 est décrite dans la **figure 1.15**. Dans de nombreux systèmes bactériens, les gènes codant pour le cytochrome P450, la ferrédoxine et la protéine réductase sont regroupés en opéron, généralement inductible (Peterson *et al.*, 1990; Peterson *et al.*, 1992); (Chauvaux *et al.*, 2001; Nagy *et al.*, 1995). Ce type de cytochrome est peu spécifique et peut catalyser l'oxydation de nombreux composés.

b) Les cytochromes de classe II, qui incluent les enzymes microsomiales et membranaires. Ils comprennent seulement deux protéines, une réductase contenant deux coenzymes (FAD et FMN) et le cytochrome P450. Le transfert des électrons est décrit par la **figure 1.15**.

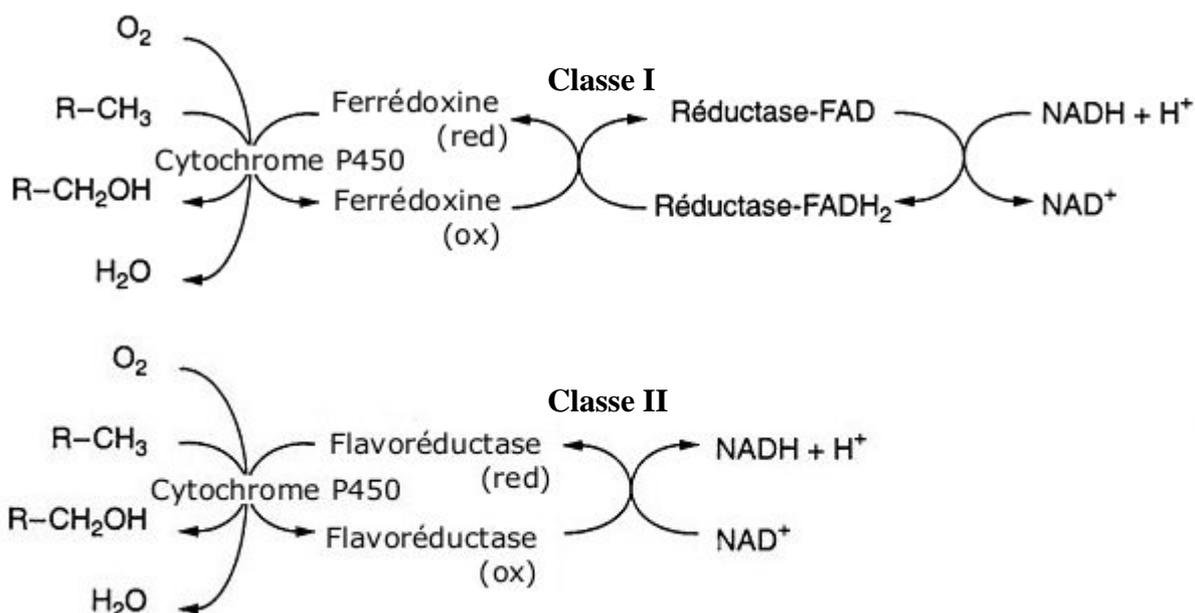


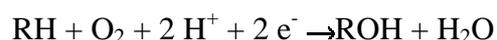
Figure 1.15 : Les monoxygénases à cytochrome P450 : les chaînes de transfert d'électron. Classification selon Munro & Lindsay (1996).

c) Un cytochrome P450 de classe III, CYP102, a été isolé chez *Bacillus megaterium* (P450 BM-3). Cette enzyme soluble de 119 kDa intervient dans le métabolisme des acides gras à longue chaîne et est intermédiaire entre les classes I et II. Ce cytochrome ne nécessite que la présence de NADPH pour oxyder les acides gras (Narhi & Fulco, 1987). Il est composé de deux domaines : un polypeptide de 66 kDa contenant les deux coenzymes flaviniques (FAD et FMN) et un polypeptide de 55 kDa correspondant au cytochrome P450 (Narhi & Fulco, 1987). Ces deux domaines présentent plus de similitudes avec la réductase et le cytochrome P450 à deux composants (type II) qu'avec les systèmes bactériens (type I).

4.1.3.2 Réactions catalysées

Les cytochromes P450 sont des protéines possédant un centre « hème-thiolate ». C'est une classe de protéine à fer hémique dont le cinquième ligand est un groupement thiol (généralement celui d'un résidu cystéine).

La réaction catalysée par les P450 mono-oxygénase est l'insertion d'un atome d'oxygène dans le substrat alors que l'autre atome d'oxygène est réduit en eau.



La plupart des réactions catalysées suivent le cycle catalytique présenté par la **figure 1.16**.

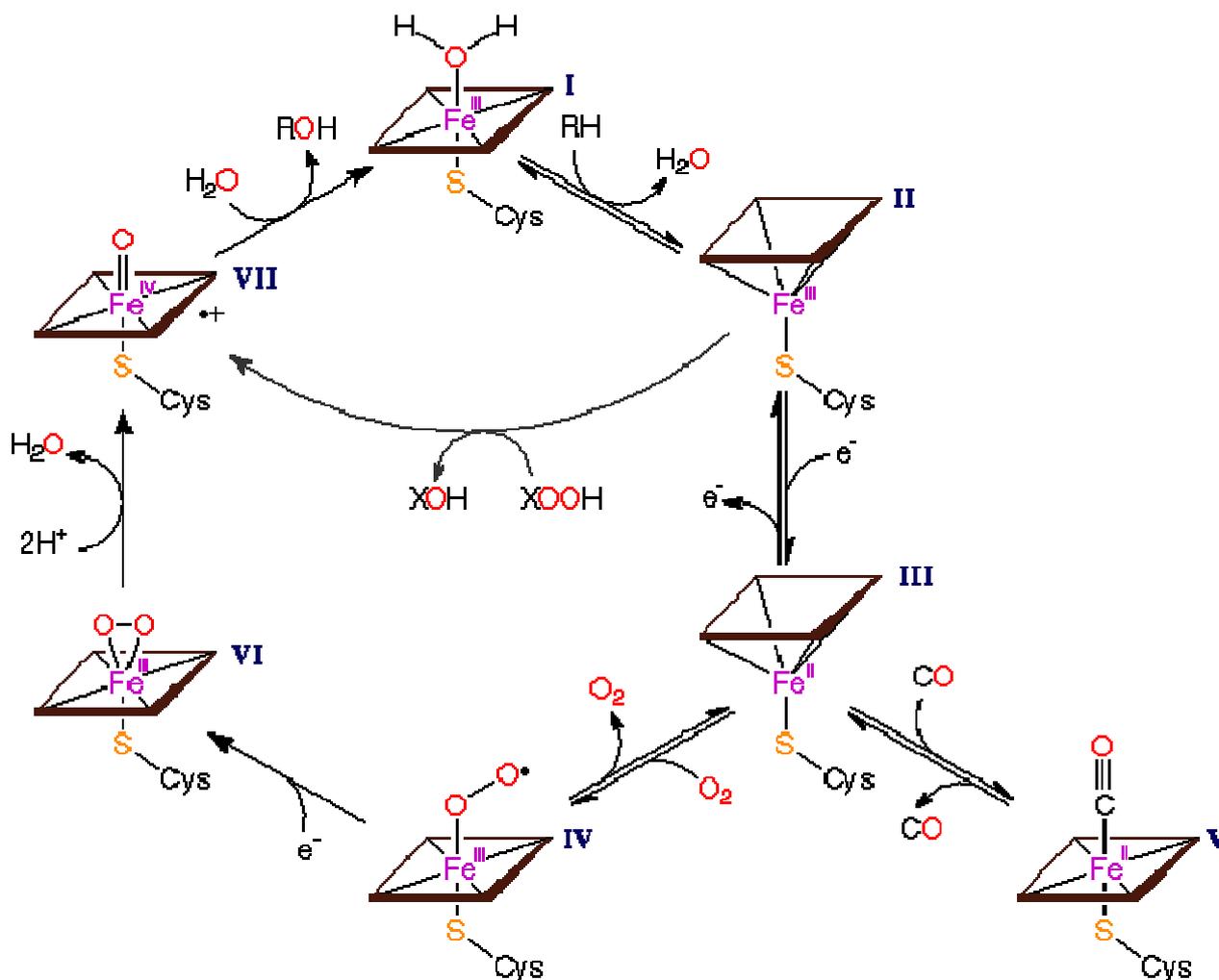


Figure 1.16 : Le cycle catalytique par le système cytochrome P450. D'après Munro et Lindsay (1996).

Un mécanisme général de l'activité catalytique des cytochromes P450 a été proposé par (Guengerich & MacDonald, 1990). Le cytochrome P450cam de *Pseudomonas putida* a largement servi de modèle pour ces études. Au cours de ce mécanisme catalytique, l'oxygène moléculaire est clivé et le substrat est oxydé (**figure1.16**). La première étape de ce mécanisme réactionnel est la fixation du substrat. Lors de cette étape, qui est supposée rapide, le spin de l'atome de fer est souvent modifié. L'atome de fer initialement sous la forme ferrique (**I**) dans un état bas spin hexacoordonné est converti en état haut spin pentacoordonné représenté par le complexe (**II**). Lors de la fixation du substrat le changement d'état de spin s'accompagne d'une modification du spectre d'absorption. Dans une seconde étape, le fer est réduit par l'arrivée d'un électron de la protéine réductase ou de la ferrédoxine. Le fer ferreux passe à l'état haut spin, représenté par le complexe (**III**). Au cours de la troisième étape, un complexe (**IV**), instable $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2]$, est formé par la fixation de l'oxygène moléculaire sur l'ion ferreux.

Lors des dernières étapes, un second électron est transféré au complexe cytochrome P450- $[\text{Fe}^{\text{II}}\text{O}_2]$ ce qui régénère les intermédiaires (VI) peroxy $[\text{FeO}_2]^+$ et (VII) oxyferrique $[\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}]$. La liaison de l'oxygène moléculaire est ensuite rompue libérant une molécule d'eau et un intermédiaire réactif. Le substrat est alors oxygéné et libéré. Le cytochrome P450 est disponible pour un nouveau cycle.

Les cytochromes P450 sont capables de catalyser différentes réactions d'oxydation sur un grand nombre de substrats qu'il serait trop long de détailler dans cette étude. Pour illustrer certaines de ces réactions un exemple des différentes réactions catalysées chez *Rhodococcus*, une bactérie capable de dégrader un grand nombre de composés organiques, est présenté ci dessous (**figure 1.17**) :

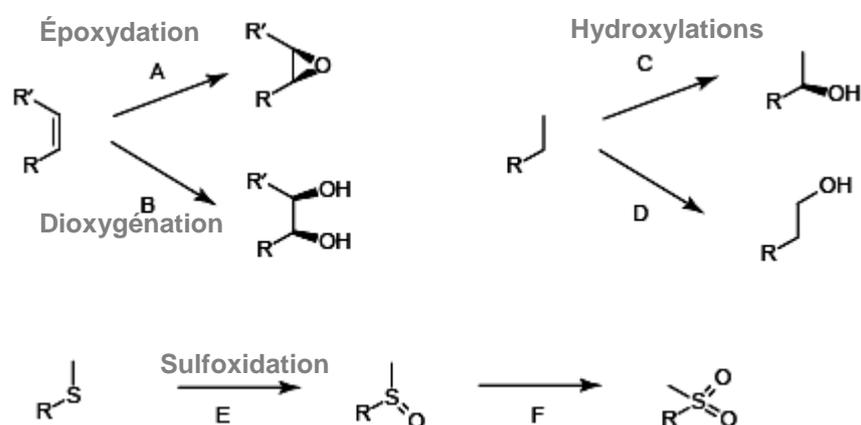


Figure 1.17 : Réactions catalysées par les cytochromes P450 de *Rhodococcus* facilitant sa croissance et la dégradation d'un large spectre de polluants. (Larkin *et al.*, 2005).

A : Réaction d'époxydation d'oléfines et de cycles aromatiques. Les époxydes des composés aromatiques peuvent subir un réarrangement pour former un phénol ou un trans-diol.

B : Réaction de *cis*-dihydroxylation. Au cours de cette réaction, 2 atomes d'oxygène sont incorporés au substrat. La réduction de l'oxygène moléculaire nécessite 4 électrons dont deux sont fournis par le substrat et les deux autres par le NADH. C'est une réaction qui est aussi catalysée par les dioxygénases, comme la naphthalène dioxygénase. Cette dernière est une enzyme à 3 composantes comprenant une NADH oxydoreductase à cofacteur flavinique, une ferrédoxine à cluster $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ et une composante oxygénase terminale avec un cluster $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ de Rieske et un centre à fer mononucléaire (Bassan *et al.*, 2004).

C : Réaction d'hydroxylation subterminale, c'est une réaction aussi catalysée par la propane monooxygénase de *Gordonia* sp. TY-5 et de *Pseudonocardia* sp. TY-7 (Kotani *et al.*, 2006).

D : Réaction hydroxylation terminale. La plupart des alcanes hydroxylases catalysent cette réaction. C'est en 2001 qu'a été mis en évidence par Maier *et al.* une nouvelle famille de

cytochrome P450 catalysant uniquement l'hydroxylation d'alcane linéaire. Il s'agit d'un cytochrome P450 de la famille des CYP153 de *Acinetobacter* sp. EB104 (Maier *et al.*, 2001).

E et F : Réaction de sulfoxydation de thiol en sulfoxides et des sulfoxides en sulfones.

Parmi ces réactions, nous nous intéresserons aux cytochromes P450 qui sont capables de dégrader des alcanes linéaires ou branchés de longueur de chaîne comprise entre C₄ et C₁₆.

4.1.3.3 Les cytochromes P450 de la famille des CYP153

Les cytochromes P450 catalysent l'oxygénation d'un grand nombre de composés aussi bien naturels que procarcinogènes, mutagènes et xénobiotiques. A la différence des P450 eucaryotes, les P450 procaryotes sont solubles. Il a été montré par Asperger *et al.* en 1981 que *Acinetobacter* était capable d'utiliser l'hexadécane comme unique source de carbone grâce à un cytochrome P450 fonctionnant comme une alcane hydroxylase (Asperger *et al.*, 1981). Chez les eucaryotes, les cytochromes P450 ayant une fonction d'alcane-1 mono-oxygénase sont appelés CYP4A. Dans les bases de données, l'équivalent procaryote est nommé AlkB, or il s'agit de l'alcane hydroxylase membranaire à fer non hémique (§ 4.1.2). Les cytochromes P450 catalysant une réaction d'hydroxylation d'alcane linéaire chez les bactéries ont été nommés CYP153 (Maier *et al.*, 2001). Il s'agit peut être d'une allusion à la nomenclature de l'enzyme : E.C.1.14.15.3.

4.1.3.3.1 Fonction des CYP153

Les cytochromes P450 de la famille des CYP153 sont des cytochromes de classe I car ils utilisent une ferrédoxine et une ferrédoxine réductase pour fonctionner (van Beilen *et al.*, 2006). De plus, ce type de cytochrome P450 est soluble. Les cytochromes P450 CYP153 hydroxylent préférentiellement les alcanes linaires de chaîne moyenne avec une forte sélectivité sur les régions *n*-terminales. Les CYP153 peuvent aussi hydroxyler des *n*-alcanes de longue chaîne et les alcanes cycliques. L'hydroxylation est uniquement terminale *in vivo*. Il a été montré que *in vitro*, le CYP153A6 peut former du 2-alcanol en faible proportion (< 5 %) (Funhoff *et al.*, 2006).

L'hydroxylation d'un alcane de chaîne moyenne semble être la fonction principale des CYP153. Funhoff *et al.* (2006) ont testé l'activité de onze CYP153. Il s'est avéré que certains cytochromes P450 (5/11) sont aussi capables de faire des réactions d'époxydation, en plus des réactions d'hydroxylation. Les réactions sont présentées par la **figure 1.18**.

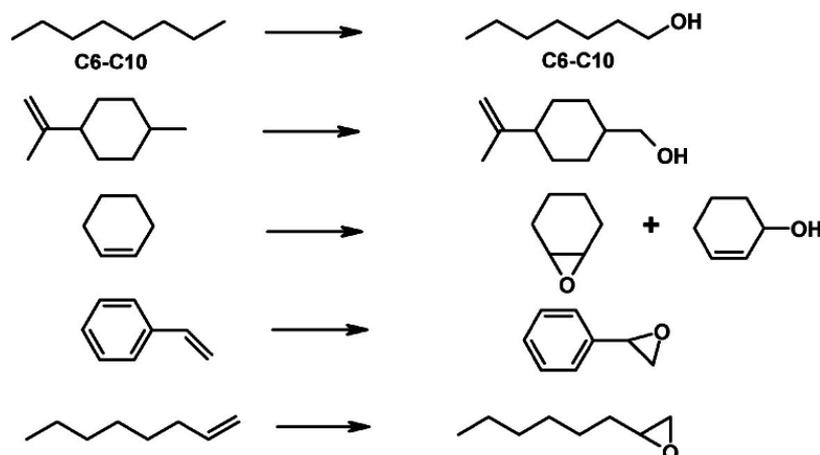


Figure 1.18 : Réactions catalysées par des CYP153 d'après (van Beilen & Funhoff, 2007)

Le CYP153A6 de *Mycobacterium* sp. XHN1500 utilise préférentiellement l'octane, alors que le CYP153A7 de *Sphingomonas* sp. préfère oxyder l'octène. Le CYP153A6 est utilisé pour convertir des alcanes en alcanols ou bien encore le limonène en alcool périllylique, un agent anticancéreux (van Beilen *et al.*, 2005a). Le CYP153A7 est utilisé pour hydroxyler des pyrrolidines, pyrrolidones, pipéridine et azétidines substituées qui sont des intermédiaires d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique.

4.1.3.3.2 Présence et redondance dans les génomes bactériens

Une analyse des homologies de séquence peptidique au niveau du site actif du CYP153 est représentée sur la **figure 1.19**. La région comparée est comprise entre le site de fixation du substrat proche de l'hélice I et la séquence terminale de fixation de l'hème par la cystéine en position axiale. (Voir § suivant pour la structure).

La plupart des séquences analysées correspondent à la sous-famille des CYP153A. Cinq autres CYP153 appartiennent aux sous-familles C, D ou E. La séquence la plus éloignée est celle de *Novosphingobium aromaticivorans* CYP153C1 qui a entre 38 et 43% d'identité avec les autres séquences de CYP153.

4.1.3.3.3 Structure

Puisque les tentatives de cristallisation du CYP153 ont été infructueuses, une modélisation de la structure a été réalisée par Funhoff *et al.* (2006) (**figure 1.20**). Le modèle obtenu révèle que le site actif du CYP153 a une nature hydrophobe, ce qui est le cas d'autres CYPs. C'est aussi ce qu'avait supposé Maier en 2001 en observant la nature hydrophobe des acides aminés composant la première hélice α du cytochrome P450 de *Acinetobacter* sp.

EB104. Dans ce cas, la réaction catalysée prend place dans une poche catalytique de nature hydrophobe. Ce qui facilite le passage du substrat.

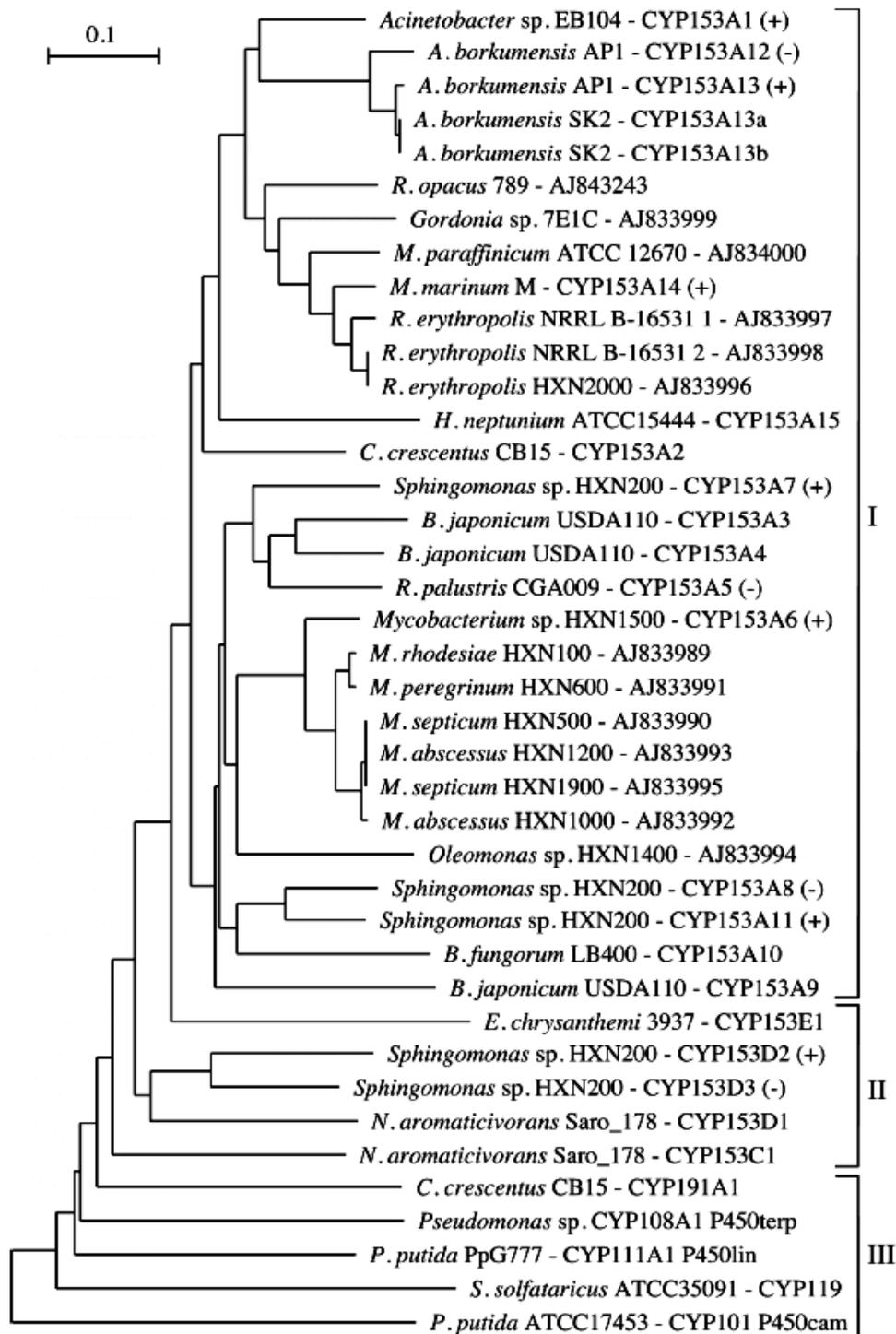


Figure 1.19 : Arbre phylogénique des P450 de type CYP153 basé sur l'alignement de séquences partielles (région de fixation de l'hème). (van Beilen et al., 2006)

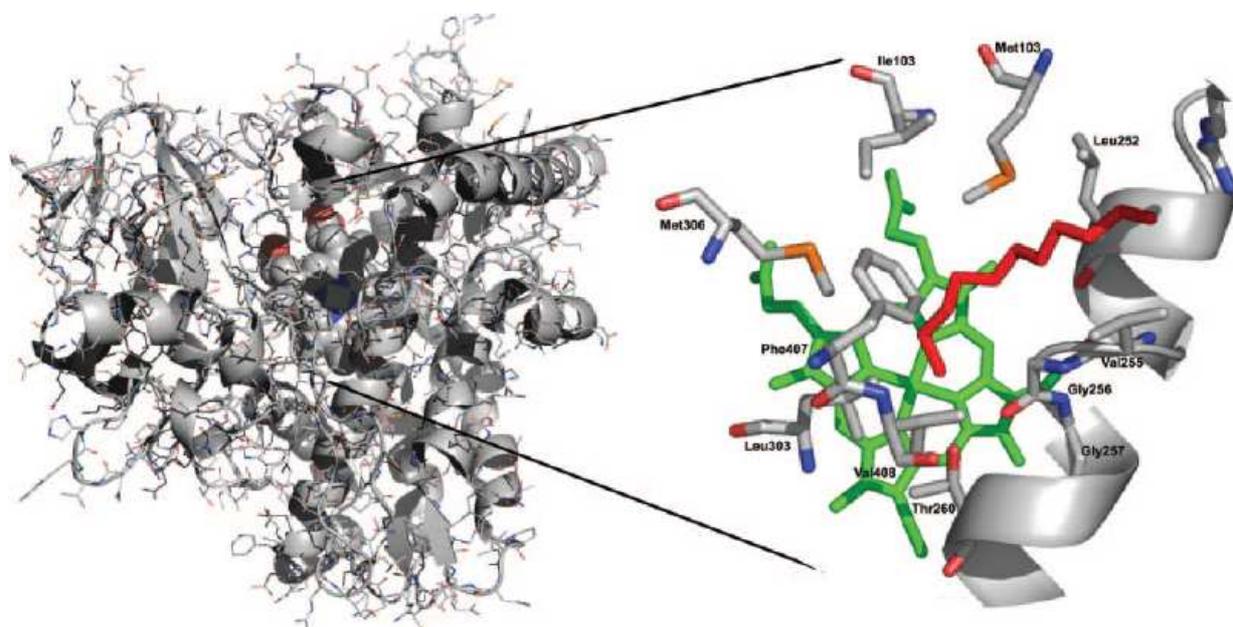


Figure 1.20 : Modèle de la structure du CYP153A6 selon Funhoff et al. 2006.

À gauche, la structure du CYP153A6 modélisée et à droite en rouge le undécane coordonné à l'hème (en vert).

Pour le CYP153A6 de la souche de *Mycobacterium* sp. XHN1500 (illustré par la **figure 1.20**) les résidus composant le site actif sont les suivants : Met101, Ile103 et Met106. Ces résidus sont localisés, en partie, à proximité d'autres acides aminés hydrophobes : Leu252, Val255, Gly256, Gly257 et Thr260 dans l'hélice centrale I et de Leu303, Phe407, Val408. Des analyses in silico d'amarrage d'alcane en C₅ à C₁₀ ont montré que dans plus de 90 % des cas, les molécules se présentaient de la même manière au site actif. Le carbone terminal est proche de l'ion ferreux de l'hème (4,5 Å) et l'alcane a une conformation coudée le long de l'hélice I, ceci, en raison de la présence de la Phe407. Si des alcanes de longueur de chaîne supérieure à 10 carbones ou inférieure à 5 carbones sont présentés au site catalytique, seule une partie (jusqu'à 50%) peut s'y fixer.

4.1.4 CYP153 ou AlkB ? : L'exemple de *Alcanivorax borkumensis* SK2

Il existe deux types d'alcane hydroxylases impliquées dans l'étape initiale de dégradation d'alcane de chaîne moyenne, l'AlkB et le CYP153. Certaines bactéries sont équipées des deux catégories d'enzymes, comme *Rhodococcus erythropolis* qui a quatre AlkB et trois CYP153 (Whyte et al., 2002) ou *Alcanivorax borkumensis* SK2 qui a deux AlkB et deux CYP153. *A. borkumensis* est une bactérie marine qui utilise exclusivement les hydrocarbures comme sources de carbone. Son génome a été séquencé récemment et il s'avère que ce dernier a plusieurs systèmes enzymatiques de dégradation des *n*-alcane (**figure 1.21**) (Schneiker et al., 2006).

L'opéron *alkSB1GHJ* de *A. borkumensis* SK2 a près de 80 % de similitude de séquences protéiques avec l'opéron *alkBFGHJKL* de *P. putida* GPo1 (Kok *et al.*, 1989a) (Vahaoja *et al.*, 2005; van Beilen *et al.*, 2001; van Beilen *et al.*, 2002b; van Beilen *et al.*, 2003) à l'exception de l'*alkS* codant pour un activateur de transcription de type LuxR et de la sous famille des MalT qui n'a que 48 % d'identité de séquence. L'AlkB1 de *A. borkumensis* SK2 oxyde les alcanes de C₅ à C₁₆. L'*alkB1* est induit en présence d'alcanes lors de la phase de croissance exponentielle de la bactérie et non lors de la phase stationnaire (Sabirova *et al.*, 2006b; van Beilen *et al.*, 2004). Les autres gènes reliés à la dégradation des alcanes comme *alkK* (une rubrédoxine), *alkL* (une protéine de transport membranaire) et *alkN* (une protéine potentiellement impliquée dans le chimiotactisme) ont moins de similitudes avec les orthologues de *P. putida* Gpo1. En outre, il n'y a pas d'équivalent pour l'*alkF* codant pour la rubrédoxine 1 de *P. putida* Gpo1. Cependant, deux gènes *rubA* et *rubB* codant pour la rubrédoxine et la rubrédoxine réductase ne sont pas dans l'opéron *alkSB1GHJ* de *A. borkumensis* SK2 mais dans une autre région du génome de la bactérie.

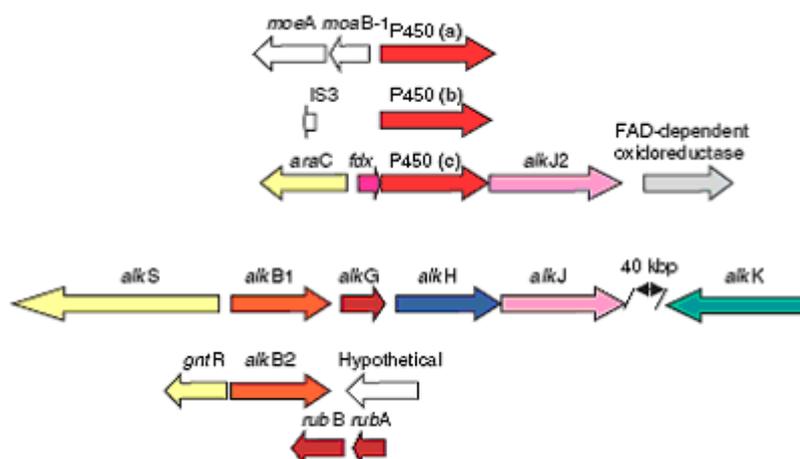


Figure 1.21 : Déterminants génétiques impliqués dans la dégradation des alcanes chez *A. borkumensis* SK2 (Schneiker *et al.*, 2006)

Un second système enzymatique fonctionnant avec une alcane hydroxylase a été découvert, il s'agit de l'*alkB2* sous le contrôle d'un répresseur de transcription GntR. L'AlkB2 oxyde des alcanes de chaîne moyenne, de C₈ à C₁₆ (Smits *et al.*, 2002; van Beilen *et al.*, 2004). L'*alkB2*, tout comme l'*alkB1*, est induit en présence d'alcanes de C₁₀ à C₁₆ (van Beilen *et al.*, 2004). Il est intéressant de noter que les systèmes de gènes des alcanes hydroxylases sont proches de l'origine de réplication du chromosome de *A. borkumensis* SK2 ce qui permet à cette dernière de croître rapidement sur alcanes.

A. borkumensis SK2 pousse aussi en présence d'isoterpénoïdes. Néanmoins le temps de génération de la bactérie est deux fois plus long sur pristane ($0.106 \pm 0.016 \text{ h}^{-1}$) que sur

hexadécane ($0.115 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) utilisé comme seule source de carbone et d'énergie (Martins dos Santos *et al.*, 2008).

Les gènes d'*alkB1* et d'*alkB2* ne sont pas exprimés en présence de terpénoïdes. C'est un autre système de dégradation des alcanes qui entre en jeu, celui des monooxygénases de type cytochromes P450. Les cytochromes P450 (b) et (c) sont des paralogues (**figure 1.21**), le cytochrome P450 (a) est en opéron avec une ferrédoxine (*fdx*), une alcool déshydrogénase (*alkJ2*), une oxydoréductase FAD dépendante et un régulateur de transcription AraC (Schneiker *et al.*, 2006). Des analyses protéomiques ont montré que toutes ces enzymes qui sont sous le contrôle de ce cluster de gènes sont surexprimées lors de la croissance de *A. borkumensis* SK2 sur octadécane (Sabirova *et al.*, 2006a). Des analyses de PCR quantitative ont montré que les P450 (b et c) sont exprimés seulement en présence d'alcanes, ce qui n'est pas le cas du P450 (a) dont l'expression est constitutive (Martins dos Santos *et al.*, 2008). Une analyse de séquence des P450 paralogues et tout deux induits en présence d'alcane a montré qu'ils sont très proches du cytochrome P450 de *Acinetobacter* sp. Eb104 qui catalyse l'oxydation terminale des alcanes (Maier *et al.*, 2001). Il s'agit donc de CYP153.

D'après ces éléments de génomes, une reconstitution schématique de dégradation des alcanes est représentée par la **figure 1.22**.

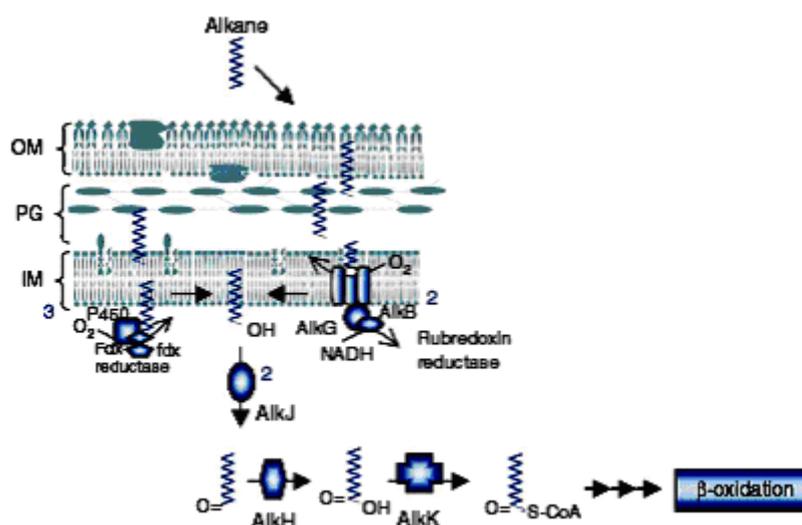


Figure 1.22 : Reconstitution des voies de dégradation putatives des alcanes chez *A. borkumensis* SK2. (Schneiker *et al.*, 2006)

Afin de dégrader les alcanes, les bactéries utilisent soit une alcane hydroxylase de type AlkB soit un cytochrome P450 de type CYP153 soit les deux. A l'exception de l'étude du génome de *A. borkumensis*, les cibles spécifiques de ces enzymes ne sont pas détaillées dans la littérature. Cette étude réalisée par l'équipe de Golyshin P.N. est la première à montrer

l'existence de deux types d'alcane mono-oxygénase, une à fer hémique et l'autre non chez une bactérie. Parmi les génomes de bactéries récemment séquencées, comme celui de *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, *M. gilvum* PYR-GCK, les deux systèmes ne sont pas présents. Ces bactéries sont en général équipées d'enzymes de type AlkB.

Ces enzymes, catalysant l'étape initiale de dégradation des alcanes, sont généralement présentes chez les bactéries capables d'utiliser ce type de substrat comme unique source de carbone et d'énergie. C'est la raison pour laquelle ces bactéries sont aussi bien équipées en oxydoréductases qui prennent ensuite le relais de dégradation des alcools pour s'en servir pour leur croissance ou pour participer à la synthèse des lipides cellulaires.

4.2 Les oxydoréductases (E.C. 1).

Les oxydoréductases, ou enzymes redox, sont une importante classe d'enzymes naturelles, représentant près du quart des enzymes connues. Elles catalysent des réductions et oxydations chimiques et interviennent dans la dégradation ou la synthèse de nombreuses substances biochimiques.

Le nom commun est « déshydrogénase ». Comme alternative, "réductase accepteur" peut être employé. Le nom "oxydase" est employé seulement si l'O₂ est l'accepteur d'électrons. La classification est difficile dans certains cas, en raison du manque de spécificité envers l'accepteur.

4.2.1 Les alcool déshydrogénases (E.C. 1.1.)

Les alcool déshydrogénases (ADHs) appartiennent à la sous-classe E.C. 1.1 des oxydoréductases oxydant des alcools primaires, secondaires et des hémi-acétals en aldéhydes ou en cétones. Les ADHs sont impliquées dans des voies métaboliques nombreuses et peuvent oxyder des alcools primaires ou secondaires, à chaîne linéaire ou branchée, aliphatiques ou aromatiques (MacKintosh & Fewson, 1987). Les microorganismes possèdent généralement plusieurs ADHs et leurs rôles physiologiques respectifs sont alors difficiles à connaître précisément.

Les ADHs utilisent différents accepteurs d'électrons comme le NAD(P)⁺, la pyrrolo quinoline quinone (PQQ), un groupement hémique en association avec la PQQ, le cofacteur F₄₂₀ ou le FAD.

Les ADHs peuvent être divisées en trois catégories majeures (Reid & Fewson, 1994) :

1. Les alcool déshydrogénases NAD- ou NADP- dépendantes
2. Les alcool déshydrogénases NAD(P)- indépendantes
3. Les oxydases

4.2.1.1 Les ADH utilisant le NAD(P)⁺ comme accepteur d'électrons (E.C. 1.1.1.).

Les alcool déshydrogénases NAD(P)-dépendantes correspondent à la classe d'ADH la plus étudiée. Ces enzymes catalysent la réaction suivante :



Trois groupes composent cette superfamille (Reid & Fewson, 1994):

Groupe I : les ADHs zinc-dépendantes à longue chaîne (environ 350 acides aminés). Il représente le groupe le plus étudié (Yokoyama *et al.*, 1990) et l'ADH de foie de cheval (HLADH) en est l'archétype. Les ADHs de ce groupe appartiennent aux eucaryotes, aux champignons, aux levures ou aux bactéries. Il y a par exemple la benzyl alcool déshydrogénase de *Pseudomonas putida* (Shaw & Harayama, 1990). C'est aussi le cas de 4 alcool déshydrogénases de *Rhodococcus* (Peng *et al.*, 2006) et d'une alcool déshydrogénase, Adh, de *Corynebacterium glutamicum* (Arndt & Eikmanns, 2007) qui présentent les résidus conservés GXGXXG correspondant au site de fixation du coenzyme et un second ligand du site catalytique à Zn²⁺ GHEXXGXXXXXXGXXV.

Groupe II : les ADHs zinc-indépendantes à courte chaîne (environ 250 acides aminés). Ce groupe n'est pas bien caractérisé. Il comprend une vingtaine d'ADHs. Ces enzymes ont un large spectre d'action et ont été isolées principalement de drosophiles et de Procaryotes. La ribitol déshydrogénase de *Klebsiella aerogenes* a été caractérisée comme appartenant à ce groupe (Loviny *et al.*, 1985).

Groupe III : les ADH à fer. Ce groupe correspond aux ADH à fer dont la taille des sous-unités est autour de 385 acides aminés. La plupart des enzymes de ce groupe ont été isolées chez des bactéries. L'alcool déshydrogénase II de *Zymomonas mobilis* et l'alcool déshydrogénase IV de *Saccharomyces cerevisiae* appartiennent à ce groupe. Cependant, certaines enzymes peuvent avoir presque 900 résidus, c'est le cas de l'alcool déshydrogénase multifonctionnelle d'*Escherichia coli* et de *Clostridium acetobutylicum*. *Z. mobilis* a deux ADH, une ADH I zinc dépendante et une ADH II à fer. Cette dernière est sensible à l'oxydation, car en présence d'oxygène l'activité de l'enzyme est perdue car il n'y a plus de métal dans son site actif (Tamarit *et al.*, 1997).

4.2.1.2 Les alcool déshydrogénases NAD(P)-indépendantes (E.C. 1.1.[2-3-4-5-99]).

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



où 2X(ox) et 2X(réd) sont, respectivement, les formes oxydée et réduite de l'accepteur d'électrons qui peut être soit un cytochrome (classe d'enzyme E.C. 1.1.2), soit une molécule

d'oxygène (E.C. 1.1.3), soit un disulfide (E.C. 1.1.4), soit un co-facteur dérivé de la quinone (E.C. 1.1.5). Parmi ces enzymes, la famille des alcool déshydrogénases pyrrolo quinoline quinone (PQQ) –dépendante a été particulièrement étudiée (Toyama *et al.*, 2004). Ces enzymes sont trouvées chez les α , β et γ -protéobactéries et sont localisées dans le cytoplasme. Cette classe d'enzymes inclue les quinoprotéines et les quinohémostéines. Elles sont divisées en 3 catégories :

- Type I : ce sont les ADH trouvées en petit nombre chez les méthanotrophes comme par exemple la méthanol déshydrogénase de *Paracoccus denitrifians* (de Vries *et al.*, 1988). Ce sont des quinoprotéines avec une PQQ comme groupement prosthétique. Elles sont différenciées en fonction de la spécificité du substrat.
- Type II et III : ce sont des quinohémostéines ou des ADH contenant une sous-unité quinohémostéine et un cytochrome c. Les enzymes de type II sont solubles alors que celles de type III sont liées à la membrane. L'éthanol déshydrogénase NAD(P) indépendante de *Acetobacter* (Takemura *et al.*, 1993) et de *Gluconobacter* spp. (Matsushita *et al.*, 1991) fonctionnent avec une sous unité comprenant un cytochrome c et sont liées à la membrane, ce sont des ADH-PQQ-dépendantes de type III.

4.2.1.3 Une famille particulière, les flavoprotéines

Une famille particulière et correspondant à des NAD(P)H : flavine oxydoréductases a été créée après la découverte de caractéristiques communes à certaines oxydoréductases issues de ces différentes sous-classes. Cette famille est divisée elle-même en deux classes, la classe I correspond aux enzymes dans lesquelles la flavine n'est pas liée dans un groupement prosthétique alors que la classe II correspond aux enzymes dans lesquelles la flavine est liée dans un groupement prosthétique. La famille des GMC oxydoréductases appartient à la classe I car la flavine, le cofacteur, n'est pas liée de façon covalente.

Cavener (1992) a proposé de définir cette famille sur la base des résultats obtenus avec un groupe de flavoenzymes qui incluaient alors, la glucose déshydrogénase (GLD ; EC 1.1.99.10) de *Drosophila melanogaster*, la méthanol oxydase (MOX ; EC 1.1.3.13) des levures *Hansenula polymorpha* et *Pichia pastoris*, la glucose oxydase (GOX ; EC 1.1.3.4) de *Aspergillus niger* et la choline déshydrogénase (CHD ; EC 1.1.99.1) de *Escherichia coli*. Ces enzymes présentaient des séquences primaires similaires, ce qui en faisaient des protéines homologues malgré l'écart phylogénétique considérable entre ces différentes espèces. Les identités de séquences entre ces différentes enzymes se situent entre 23 et 32 %. Ce sont les

enzymes comme la glucose déshydrogénase et la choline déshydrogénase qui ont le plus fort degré de similarité.

Les réactions catalysées sont les suivantes :

- Choline déshydrogénase (CHD) : Choline + accepteur à l'état oxydé → bétaine aldéhyde + accepteur réduit
- Glucose déshydrogénase (GLD) : Glucose + accepteur à l'état oxydé → δ -gluconolactone + accepteur réduit
- Glucose oxydase (GOX) : Glucose + O₂ → δ -gluconolactone + H₂O₂
- Méthanol oxydase (MOX) : Méthanol + O₂ → Formaldéhyde + H₂O₂

Les sites catalytiques de ces enzymes ne sont pas connus et dans deux cas, CHD et GLD, les accepteurs ne sont pas identifiés. Depuis cette étude, d'autres enzymes ont été rattachées à cette famille, l'aryl-alcool oxydase (AAO) de *Pleurotus eryngii* et *Pleurotus pulmonarius* (Varela *et al.*, 2000) ainsi qu'une polyéthylène glycol déshydrogénase (PEG-DH) de *Sphingomonas terrae* (Sugimoto *et al.*, 2001).

Ces enzymes ont en commun trois séquences consensus « signatures » ainsi qu'une séquence conservée impliquée dans la liaison du FAD dont le motif GxGxxG est caractéristique. Il se trouve dans la partie N-terminale de cette protéine au sein d'une zone de repliement dont la structure est de type β - α - β (Varela *et al.*, 2000).

AlkJ, impliqué dans la voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* GpoI (**Figure 1.13, 1.21**) et codée par l'opéron *alkJKL*, est une alcool déshydrogénase appartenant à la famille des flavine oxydoréductases. Un alignement a d'ailleurs été réalisé avec les 4 premières enzymes composant au départ cette famille (van Beilen *et al.*, 1992a).

4.2.2 Les aldéhyde déshydrogénases (E.C. 1.2).

4.2.2.1 Fonction

Les aldéhyde déshydrogénases (ALDHs) constituent quant à elles une vaste famille d'enzymes très diversifiées. Elles permettent de métaboliser une grande variété d'aldéhydes exogènes et endogènes (Sophos *et al.*, 2001). Cette famille est classée dans les déshydrogénases oxydant les aldéhydes où les groupes oxo des donneurs qui peuvent être oxydés aussi bien avec addition d'eau puis clivage de la liaison C-C que, dans le cas des composés cycliques, par addition de molécules d'eau puis déshydrogénation. Avec le nombre grandissant de séquences de génomes, cette famille est en constante expansion. La présence de gènes codant pour des ALDHs dans une grande majorité de génomes de Archea, d'Eubactéries et d'Eucaryotes vient renforcer l'idée que l'intervention de ces enzymes dans les

processus métaboliques a des origines très anciennes, ce qui a été montré par une analyse phylogénique (Sophos & Vasiliou, 2003).

Ces enzymes catalysent notamment la conversion d'aldéhydes en acides correspondants (activés ou non), et ce de façon irréversible. Elles existent sous plusieurs formes avec des localisations tissulaires et subcellulaires variées. Leurs substrats sont en général des aldéhydes aliphatiques et aromatiques. La littérature présente beaucoup d'études sur les aldéhyde déshydrogénases eucaryotes (Gonzalez-Duarte & Albalat, 2005; Sophos *et al.*, 2001; Sophos & Vasiliou, 2003). Associées aux alcool déshydrogénases (ADHs), ces enzymes sont des acteurs majeurs des voies de dégradation bactérienne assimilant les alcanes, les alcools et les aldéhydes, elles remplissent d'ailleurs d'importantes fonctions de détoxification cellulaire et sont aussi impliquées dans des systèmes de défense contre des xénobiotiques (Hempel *et al.*, 1993) (Jornvall, 1994; Vasiliou & Pappa, 2000). Les enzymes les plus étudiées de cette famille sont les aldéhyde déshydrogénases de classe ALDH1 (cytosolique) et ALDH2 (mitochondriale) de foie humain en raison de leur implication dans la conversion de l'acétaldéhyde dérivé de l'éthanol. Les sous-unités de ALDH comprennent environ 500 résidus d'acides aminés et sont le plus souvent tétramériques. La première structure de déshydrogénase de classe I a été établie par Hempel *et al.* (Hempel *et al.*, 1984). Ces enzymes ont une conformation générale assez similaire. On note la présence de trois domaines, un domaine impliqué dans la liaison au co-enzyme, un domaine catalytique et un domaine d'oligomérisation.

4.2.2.2 Classification

La super famille des ALDH est subdivisée en fonction de l'accepteur d'électrons qui peut être le NAD(P)⁺ (E.C. 1.2.1), un cytochrome (E.C. 1.2.2), l'oxygène (E.C. 1.2.3), un disulfide (E.C. 1.2.4.), un protéine fer-souffre (E.C. 1.2.7) ou un autre accepteur (E.C. 1.2.99). Ainsi les ALDH sont classées sur la base de leur spécificité de substrat et peuvent être regroupées en plusieurs familles (Sophos & Vasiliou, 2003):

- Semialdéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.[16-24-27-31-32-41])
- ALDHs non-spécifiques (E.C. 1.2.1.3)
- Bétaïne aldéhyde déshydrogénases (E.C.1.2.1.8)
- Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénases non-phosphorylante (E.C. 1.2.1.9)
- Phénylacetaldéhyde déshydrogénase (E.C. 1.2.1.39)
- Lactaldéhyde deshydrogénase (E.C. 1.2.1.22)

- ALDH-like protéines incluant des protéines contenant parfois des séquences partielles d'ALDHs.

L'intégralité de la nomenclature de cette catégorie d'enzyme figure sur le site www.aldh.org

Il est intéressant de noter que dans la famille des bétaine aldéhyde déshydrogénases on trouve l'enzyme AlkH, impliquée dans la voie de dégradation des alcanes chez *P. putida* GPo1 et codée par le gène *alkH* appartenant à l'opéron *alkBFGHJKL* (**figure 1.13** ; (Kok *et al.*, 1989a; Kok *et al.*, 1989b; van Beilen *et al.*, 1992a)

4.3 Les estérases (E.C.3.1.1.x)

Les estérases appartiennent au groupe des hydrolases E.C.3.1.1 qui catalysent la formation ou la coupure des liaisons esters de composés solubles dans l'eau. Ces enzymes sont largement distribuées chez les animaux, les plantes et les microorganismes. La réaction peut être réversible, cela en fonction des conditions thermodynamiques. Il faut différencier les lipases (E.C.3.1.1.1) dont les substrats sont des triglycérides et des acides gras à longue chaîne, des estérases (E.C.3.1.1.13) qui agissent sur les esters carboxyliques.

4.3.1 Mécanisme d'hydrolyse de l'ester

Beaucoup d'estérases ont une large gamme de tolérance aux substrats ce qui montre qu'elles ont évolué pour faciliter leur accès aux diverses sources de carbone lors des voies cataboliques. De plus, les estérases ont une forte régio- et stéréo- spécificité, ce qui les rend intéressantes pour la biocatalyse et la production de composés optiquement purs (Bornscheuer, 2002). L'intérêt de ces enzymes réside dans le fait qu'elles ne nécessitent pas la présence de cofacteurs et sont habituellement stables et même actives dans les solvants organiques. Deux classes majeures d'hydrolases sont à dissocier :

Les lipases (EC 3.1.1.1, triacylglycerol hydrolases)

Les vraies estérases (EC 3.1.1.3, carboxyl ester hydrolases).

La structure tridimensionnelle des deux enzymes (Ollis *et al.*, 1992) met en évidence un repliement caractéristique α/β de l'hydrolase. En effet, un ordre précis des hélices α et des feuillets β qui est aussi retrouvé dans les halopéroxydases et les époxydes hydrolases. La triade catalytique est composée de la séquence Serine - acide Aspartique - Histidine (la Glu remplace l'Asp pour quelques lipases), d'une séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly et du site actif à sérine. Petersen *et al* (2001) ont montré que les estérases ont un motif Gly-X-X-Leu tout comme les enzymes montrant de fortes homologues de séquence avec la classe C des L-lactamases (Petersen *et al.*, 2001).

Le mécanisme d'hydrolyse de l'ester est à peu près le même pour les estérases et les lipases et est composé de quatre étapes:

La première est la formation d'un intermédiaire tétrahédrique issu de liaison avec la sérine et stabilisé par les résidus hisidine et acide aspartique du site catalytique. Puis, l'alcool est formé suite à l'hydrolyse et un complexe acyl est formé au niveau de l'enzyme. Après une attaque nucléophile, par de l'eau dans le cas d'une hydrolyse, ou sur un alcool ou un ester en (trans-) estérification reforme alors un intermédiaire tétrahédrique, qui est libéré sous forme d'acide et d'ester.

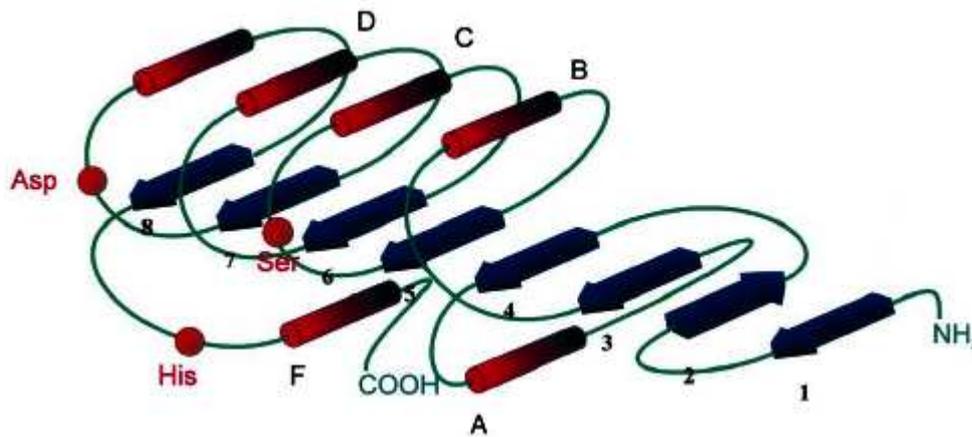


Figure 1.23 : Représentation schématique du repliement α/β de l'hydrolase.

Les feuillets β sont représentés en bleu et les hélices α en rouge. La position des acides aminés de la triade catalytique est représentée en rouge. (Bornscheuer, 2002)

Les lipases agissent lors d'un phénomène d'activation interfaciale ce qui n'est pas le cas des estérases. En effet, les lipases agissent dans des conditions particulièrement hydrophobes en raison d'un domaine hydrophobe au niveau du site actif de la molécule. Seule la présence d'une concentration minimum de substrat et la présence d'une phase non aqueuse permet au substrat d'accéder au site actif. En outre, les lipases préfèrent des substrats insolubles dans l'eau comme les triglycérides composés d'acides gras de longues chaînes alors que les estérases hydrolysent préférentiellement des esters simples comme l'acétate d'éthyle. Les deux enzymes sont stables et actives dans les solvants organiques (Fojan *et al.*, 2000).

Afin de rechercher une activité estérase, il est courant d'utiliser des substrats chromophores (*i.e.* *p*-nitrophenyl esters) (Palomo *et al.*, 2004; Soror *et al.*, 2007).

4.3.2 Classification des estérases

La classification des enzymes peut être faite soit sur la spécificité de leurs substrats, soit à partir d'alignements de séquences. La classification selon la spécificité du substrat

nécessite de comparer toutes les enzymes avec le même type de substrats et de préférence dans les mêmes conditions. Ceci obligerait donc à ce que les biochimistes qui caractérisent ces enzymes utilisent les mêmes protocoles, ce qui n'est pas une stratégie d'analyse habituelle. La seconde option de classification est plus facile d'accès grâce à l'information croissante de séquences dans les bases de données. La comparaison de séquences en acides aminés permet de donner une image claire de l'évolution et des relations entre les différentes enzymes. C'est ainsi qu' (Aurilia *et al.*, 2008) ont classé ces enzymes et ont montré que les estérases forment une superfamille comprenant 90 sous-familles. Parmi elles, 156 protéines différentes ont été cristallisées. Il a été établi que la séquence consensus des lipases et des carboxyles - estérases avait le motif Gly-X-Ser-X-Gly, avec un site actif à proximité de la sérine. Aurilia *et al.* (2008) ont analysé toutes les séquences d'estérases et ont confirmé la présence de ce motif chez la plupart des estérases classiques. Cependant, ce n'est pas parce que deux enzymes ont une similitude de séquence qu'elles ont les mêmes propriétés comme : la spécificité vis à vis des substrats, la stéréospécificité, le pH, la température optimale de fonctionnement et la stabilité dans les solvants. Par exemple, la bromoperoxydase de *Streptomyces aureofaciens* a 55% d'identité de séquences avec une estérase de *Pseudomonas fluorescens* mais ces deux enzymes n'ont pas tout à fait la même spécificité vis-à-vis de leurs substrats (Pelletier & Altenbuchner, 1995). Même si l'on considère aujourd'hui que toutes les lipases et les carboxyl-estérases ont la même séquence consensus Gly-X-Ser-X-Gly où le site actif est représenté par une sérine. En 1999, une analyse de séquence a montré que ce n'était pas le cas de toutes les enzymes (Arpigny & Jaeger, 1999). Par exemple, la séquence consensus de *Streptomyces scabies* contient une séquence Gly-Asp-Ser-Leu avec un site catalytique contenant le duo Ser-His au lieu de la triade classique Ser-Asp-His (Wei *et al.*, 1995). C'est aussi le cas pour d'autres estérases comme celle de *Pseudomonas aeruginosa* (AF005091), *Salmonella typhimurium* (AF047014) et de *Photobacterium luminescens* (X66379). D'autres informations concernant les propriétés biochimiques et les substrats préférés de certaines estérases figurent dans le **tableau 1.3**.

Tableau 1.3 : Comparaison de diverses carboxyl estérases bactériennes (Bornscheuer, 2002).

Origin ^a	Biochemical properties	Specific substrates ^b	Remarks
<i>B. gladioli</i> ATCC10248 (EstB)	392 aa, 42 kDa	pNP-esters, triglycerides (up to C ₆), deacylates, cephalosporins	S-x-x-K motif, β -lactamase-like
<i>B. gladioli</i> ATCC10248 (EstC)	298 aa, 32 kDa	pNP-esters (up to C ₅), not triglycerides	G-x-S-x-G motif, homology to plant hydroxynitrile lyases
<i>P. fluorescens</i> DSM50106	36 kDa, T _{opt.} 43°C	Lactones, ethyl caprylate, moderate enantioselectivity	G-x-S-x-G motif, homology to a haloperoxidase
<i>P. fluorescens</i> SIKW1	27 kDa, homodimer	pNP-esters, high enantioselectivity for α -phenyl ethanol, moderate <i>E</i> values for other alcohols and carboxylic acids	Low haloperoxidase activity, altered substrate specificity and improved enantioselectivity by directed evolution
<i>Pseudomonas putida</i> MR2068	29 kDa, homodimer, T _{opt.} 70°C	Alkyl-dicarboxylic acid methyl esters, high stereoselectivity (<i>E</i> > 100)	-
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	34 kDa, T _{opt.} 70°C	pNP-esters (best: hexanoate), moderate stereoselectivity (best: <i>E</i> ≈ 18)	Homology to hormone-sensitive lipase
<i>B. subtilis</i> NRRL B8079	489 aa, 54 kDa, T _{opt.} 52°C (56.5°C for best mutant)	<i>p</i> -nitrobenzyl ester of Loracarbef	Evolved by directed evolution for increased stability in DMF and thermostability
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	-	pNP-esters, moderate enantioselectivity	Thermostable mutants
<i>B. subtilis</i> (Thai-8) ^c	32 kDa, T _{opt.} 35-55°C	High enantioselectivity towards 2-arylpropionic acids	Structure known, more stable mutants by SDM ^b
<i>Thermoanaerobacterium</i> sp. JW/SL YS485	320 aa, 36 kDa	Xylose tetra acetate, cephalosporin C, MU-Ace ^b	G-x-S-x-G motif
<i>Acinetobacter</i> sp. ADP1	37 kDa	pNP-esters (best: hexanoate), benzyl esters	G-x-S-x-G motif, involved in catechol branch of β -ketoadipate pathway
<i>Clostridium thermocellum</i>	31 kDa	Feruloyl esters	Esterase activity within cellulosome
<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM3638	T _{opt.} 100°C, t _{1/2} 50 min at 126°C	MU-Ace ^b	-
<i>Lactococcus lactis</i> ^d	258 aa, 30 kDa	pNP-esters (best: hexanoate), tributyrin, C ₆ -phospholipids	G-x-S-x-G motif, function unclear
<i>Rhodococcus ruber</i> DSM 43338 ^e	Two esterases with opposite enantiopreference	Linoleol-acetate (<i>E</i> > 100)	Two esterases with opposite enantiopreference
<i>Rhodococcus</i> sp. H1	34 kDa, tetramer	Heroin	G-x-S-x-G motif, conserved His ₁₆₆
<i>Rhodococcus</i> sp. MBI	574 aa, 65 kDa, monomer	Cocaine	G-x-S-Y-x-G motif, homology to X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidases
<i>Streptomyces chrysomallus</i>	42 kDa	pNP-esters (best: butyrate)	G-x-S-x-G motif, high homology to esterase from <i>A. globiformis</i>
<i>Streptomyces diazotachromogenes</i>	326 aa, 31 kDa	pNP-esters, moderate enantioselectivity	-
<i>Orpinomyces</i> sp. PC-2	313 aa, 35 kDa, T _{opt.} 30°C	Xylose tetra acetate	High homology to other acetyl xylan esterases
<i>Aspergillus awamori</i> IFO4033 ^f	275 aa, 31 kDa	Wheat bran, α -naphthol acetate	Homology to lipases from <i>Geotrichum candidum</i> and <i>Candida cylindracea</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> IFO2347	28 kDa, homodimer, T _{opt.} 25°C	Isoamyl acetate, isobutyl acetate	=

^aOverexpressed in *E. coli*, if not stated otherwise

^bpNP, *p*-nitrophenyl; MU-Ace, 4-methylumbelliferyl-acetate; SDM, site-directed mutagenesis

^cNon-recombinant purified enzymes

^dOverexpressed in *L. lactis*

^eOverexpressed in *B. subtilis*

4.4 Les enzymes de la β -oxydation

La β -oxydation correspond à quatre réactions successives au cours desquelles la chaîne carbonée d'un acide gras lié au coenzyme A est réduite de deux atomes de carbone. Cinq enzymes sont impliquées dans ces étapes. Les enzymes de la β -oxydation ont été largement décrites chez les eucaryotes (Hiltunen & Qin, 2000). En revanche, peu d'études biochimiques concernent les enzymes d'origine procaryotique. O'Connell *et al.* ont étudié les enzymes de la β -oxydation chez *Caulobacter crescens* (O'Connell *et al.*, 1990). Les réactions catalysées par ces enzymes sont illustrées par une partie de la voie dégradation du citronellol (1.24).

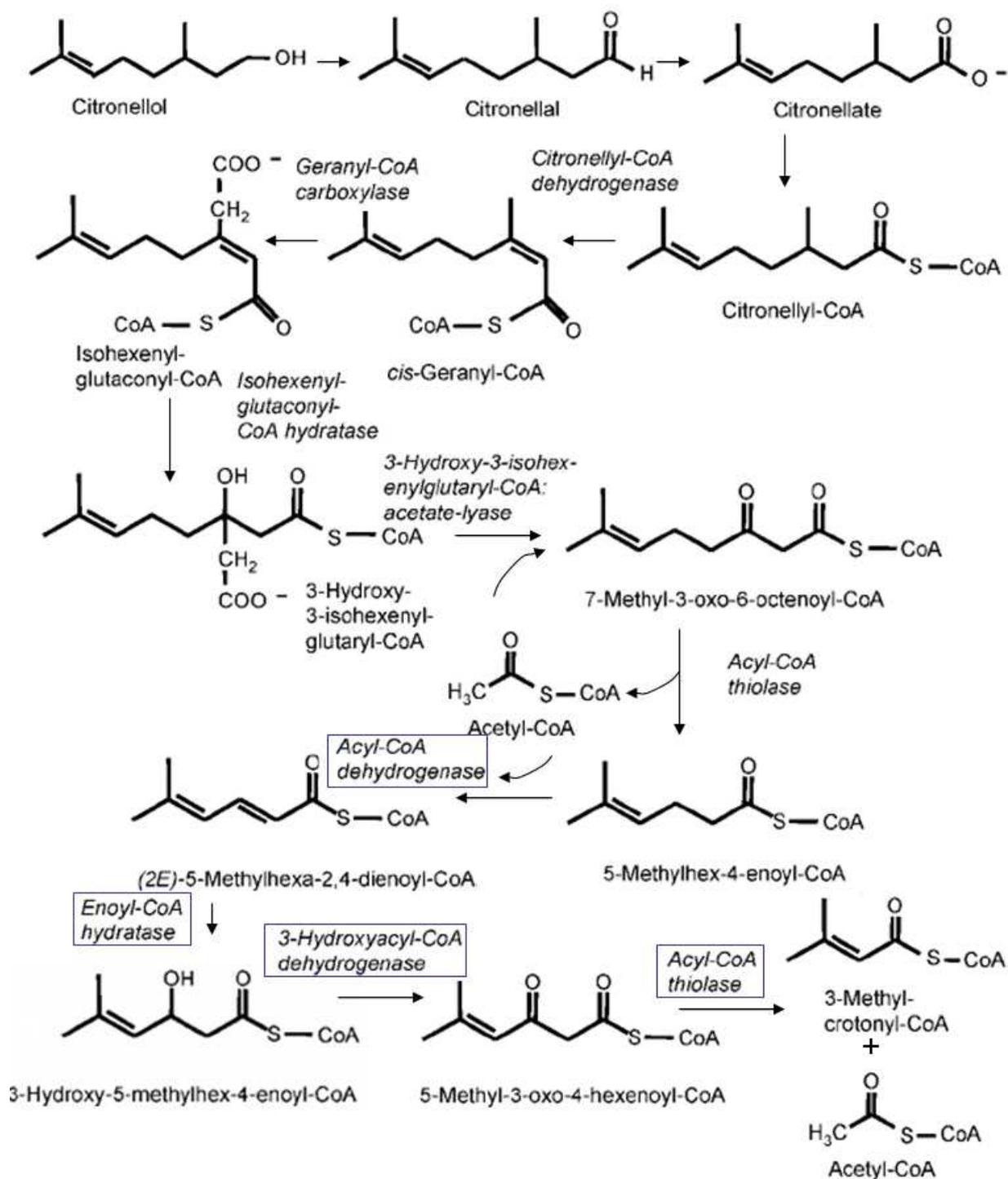


Figure 1.24 : Enzymes de la β -oxydation, chez *Pseudomonas aeruginosa*, impliquées dans la dégradation du citronellol (Adapté de Seubert et Fass 1964 et de Förster-Fromme et al. 2008).

- L'acetyl CoA acétyltransférase catalyse l'étape d'activation de l'acide gras par l'acyl CoA. Cette enzyme condense l'acide gras et l'acétyl-CoA en une molécule d'acétoacétyl-CoA.

- L'acyl CoA déshydrogénase catalyse la formation d'une double liaison entre le deuxième et le troisième carbone. Deux acyl-CoA déshydrogénases ont été trouvées chez *Pseudomonas aeruginosa*. L'une d'elles, AtuD a une spécificité vis-à-vis des terpénoïdes comme le citronellol (**figure 1.24**) l'autre, PA135, est aussi bien active vis-à-vis de l'octanoyl CoA que des dérivés enoyl CoA des terpènes (Forster-Fromme *et al.*, 2008).
- La 2-énoyl CoA hydratase catalyse l'adsorption d'une molécule d'eau à la double liaison précédemment formée. La liaison est généralement stéréospécifique pour former l'isomère L. Cette enzyme présente une très large spécificité de substrat (de longueur de chaîne de C₄ à C₂₀).
- La 3 hydroxyacyl CoA déshydrogénase convertit le groupement hydroxyle en cétone.
- Et une acyl CoA thiolase finalise le cycle de β -oxydation en clivant le 3-cétoacyl CoA par le groupement thiol d'une autre molécule de CoA entre le C₂ et le C₃.

5 Dégradation de xénobiotiques récalcitrants par *Mycobacterium*

5.1 Taxonomie et description du genre *Mycobacterium*

5.1.1 Taxonomie et phylogénie

Les mycobactéries (genre *Mycobacterium*) sont des bactéries à Gram faiblement positif (Hartman *et al.*, 2006) appartenant à l'ordre des Actinomycètes qui regroupe aussi les genres *Nocardia*, *Corynebacterium* et *Rhodococcus*. Les bactéries appartenant à ces différents genres ont en commun un certain nombre de caractéristiques : le métabolisme est de type aérobie, le pourcentage de bases G+C dans l'ADN est élevé (66 à 71 mol % pour les mycobactéries), leur paroi cellulaire contient des acides mycoliques. Ces derniers peuvent, chez les mycobactéries, comporter 60 à 90 atomes de carbone et confèrent aux cellules un caractère hydrophobe.

Les mycobactéries sont non mobiles, ne sporulent pas et se présentent, à l'observation microscopique, sous forme de bacilles droits ou incurvés plus ou moins branchés, ou de coccobacilles. Les colonies sont lisses ou rugueuses, parfois colorées en jaune ou en orange (présence de caroténoïdes).

Les mycobactéries sont largement présentes dans l'eau et les sols. C'est l'un des 14 genres bactériens les plus abondants des sols, puisqu'ils représentent 2,6 % des communautés microbiennes totales (Floyd *et al.*, 2005). Le genre *Mycobacterium* est le seul représentant de la famille des *Mycobacteriaceae*. Les espèces incluent des bactéries pathogènes ou saprophytes et sont généralement réparties en deux sous-divisions : les mycobactéries « à

croissance rapide » et les mycobactéries « à croissance lente », le temps de génération pouvant varier, selon l'espèce, de deux à plus de vingt heures. Mais, il est aussi possible de classer ces bactéries en trois groupes : celles qui sont pathogènes pour l'homme et les animaux, celles qui dégradent les hydrocarbures aromatiques polycycliques et celles qui sont associées à aucune des catégories précédemment citées (Hartman *et al.*, 2006). Les Mycobactéries suscitent un intérêt particulier pour leur aptitude à dégrader certains polluants et ainsi pour leur implication dans l'atténuation naturelle et la bioremédiation des sites pollués. L'identification des mycobactéries est réalisée sur la base de séquences des ARNr 16S pour une identification du genre. Comme les séquences des ARNr sont très proches voire identiques, on a recours aux séquences des gènes *hsp65* et *rpoB* pour une identification plus fine de l'espèce. Le gène *hsp65* (Ringuet *et al.*, 1999) code pour la protéine chaperone Hsp 65 présente chez toutes les bactéries et essentielle pour la résistance à des stress environnementaux. Le gène *hsp 65* possède deux régions hyper-variables dans lesquelles il semble moins conservé que l'ARNr 16S. Le gène *rpoB* code pour la sous unité β de l'ARN polymérase ; il est aussi moins conservé que l'ARNr 16S et les différences de séquence sont utiles pour classer les espèces (Adekambi *et al.*, 2003). La méthode la plus commune de caractérisation est l'analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) discriminant différentes souches ou clones grâce aux différentes tailles d'amplification PCR obtenues sur la région intergénique 16S-23S. Cette méthode est la plus utilisée actuellement pour l'identification des mycobactéries. Elle permet l'identification des mycobactéries « à croissance rapide » grâce à la combinaison des séquences des gènes de l'ARNr 16S et des gènes *hsp 65* et *rpoB* (Wang *et al.*, 2006).

Une étude a permis d'isoler des souches de *Mycobacterium* issues de sols contaminés par divers hydrocarbures et PCB. Pour récupérer les souches de mycobactéries, une culture des microflores en présence d'amibes a permis d'isoler les bactéries. Les amibes servent de réservoir protecteur pour protéger les souches de mycobactéries du stress environnemental et de la toxicité du milieu (Wang *et al.*, 2006). Plusieurs souches de mycobactéries ont été isolées de ces sols et elles ont été identifiées sur la base de ARNr 16S et des gènes *hsp 65* et *rpoB*. Les bactéries isolées sont proches des souches de *M. vabaalenii*, de *M. austroafricanum*, de *M. chlorephenolicum* et de *M. frederickbengense* (ceci est montré par une annotation  sur la **figure 1.25**).

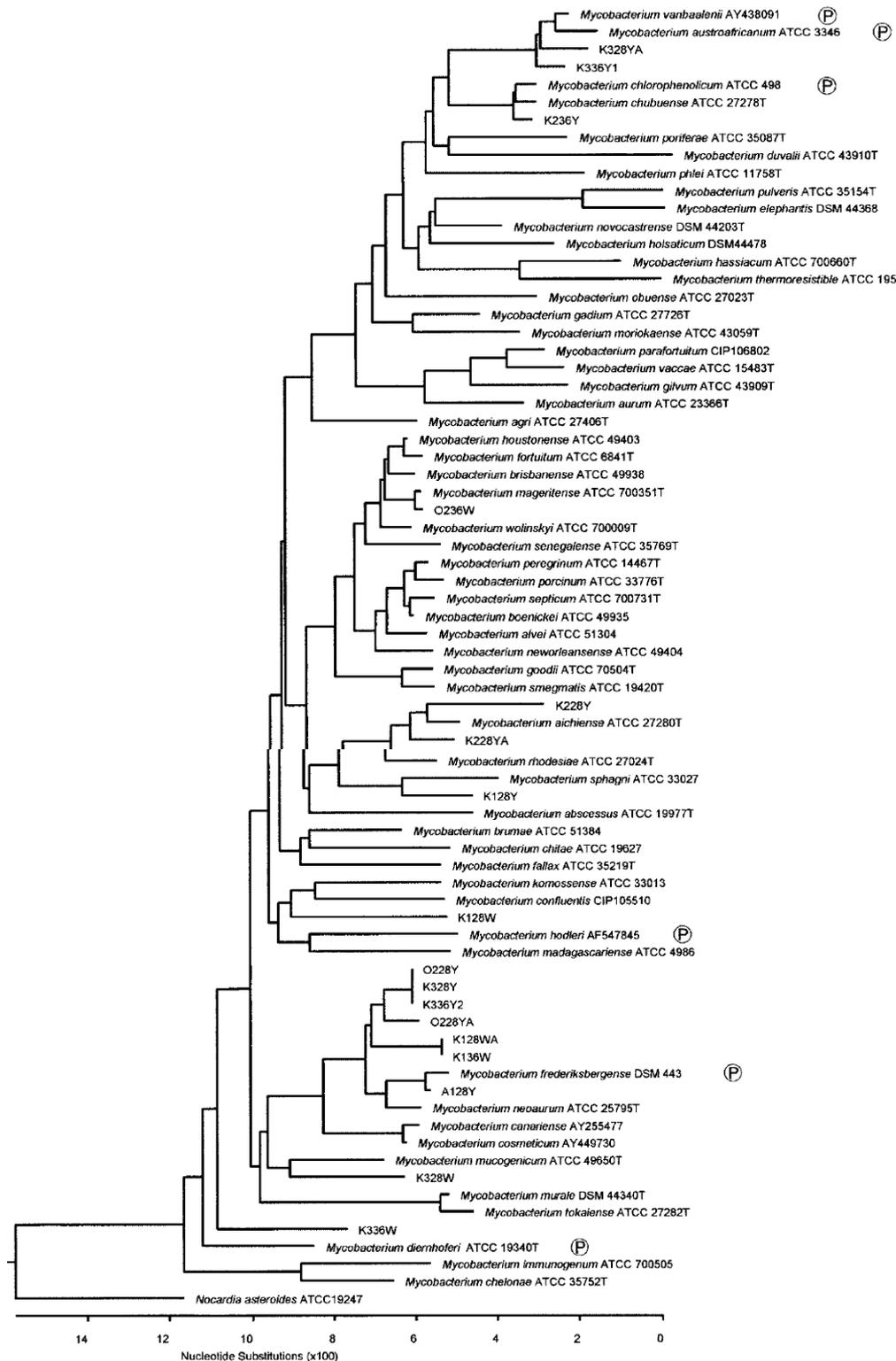


Figure 1.25 : Arbre phylogénétique des espèces du genre *Mycobacterium* à croissance rapide et dégradant les HAP d'après les séquences des différents *hsp65* (d'après Wang et al., 2006). L'arbre phylogénétique, basé sur les séquences des gènes *hsp 65*, permet d'identifier l'espèce des mycobactéries isolées. Cet arbre regroupe des bactéries à croissance rapide dégradant les hydrocarbures et les bactéries isolées sur le sol contaminé.

Grâce aux progrès de la génomique à partir des années 1990 de nombreux génomes bactériens ont été complètement séquencés et notamment ceux de certaines mycobactéries pathogènes. Les génomes des principaux pathogènes, *M. tuberculosis* H37Rv (1998), *Mycobacterium avium* k10 (2004), *M. bovis* AF2122/97 (2003), *M. tuberculosis* CDC1551 (2002) et *M. leprae* TN (2001) furent les premiers à être séquencés. Plus récemment, le génome d'un autre pathogène animal *M. marinum* M (2008) a aussi été séquencé. Les génomes de mycobactéries de l'environnement et qui sont impliquées dans la dégradation d'hydrocarbures ont été séquencés et annotés. Ce sont ceux de *M. smegmatis* mc²155 (2006), *M. gilvum* PYR-GCK (2007), *Mycobacterium* sp. JLS (2006), KMS (2007) ou bien MCS (2006), *M. vanbaalenii* PYR-1 (2006). La taille de ces génomes est comprise entre $3,3 \times 10^6$ et $6,9 \times 10^6$ pb. La fraction codante de ces génomes varie entre 90% chez *M. smegmatis* mc²155 et 99 % chez *M. vanbaalenii* PYR-1.

5.1.2 Description de l'enveloppe des mycobactéries

Le modèle actuel d'architecture de l'enveloppe des mycobactéries découle, entre autres, d'observations obtenues par microscopie électronique (Paul & Beveridge, 1992) soulignant la présence d'une épaisse barrière glycolipidique à l'extérieur de la cellule (**figure 1.26**).

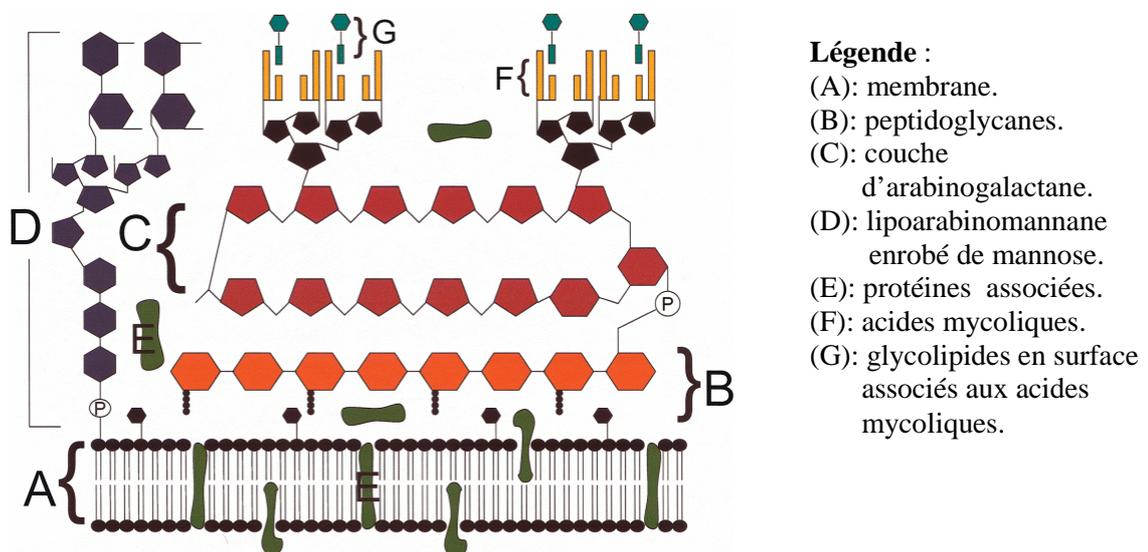


Figure 1.26 : Représentation schématique de la paroi des mycobactéries selon (Karakousis et al., 2004).

L'ultrastructure externe, également mise en évidence par des études biochimiques (Petit & Lederer, 1984) est composée de structures lipidiques ramifiées où l'on distingue la présence de gros complexes d'acides gras, les acides mycoliques, formant une structure assez dense et

la présence de lipides libres plus courts, tels que le mycocérosate, les glycolipides phénoliques et différents phospholipides. Les acides mycoliques de la paroi sont reliés de manière covalente aux peptidoglycanes par l'intermédiaire de l'arabinogalactane. La paroi présente donc une structure unique de type mycolyl-arabinogalactanepeptidoglycane (mAGP). Le lipoarabinomannane (LAM), qui peut être considéré comme le « lipopolysaccharide (LPS) mycobactérien », s'intercale de manière non covalente dans cet enchevêtrement complexe (Baulard *et al.*, 1999). La structure de la paroi des mycobactéries illustrée par la **figure 1.26** est donc l'une des plus complexes qui existent chez les bactéries. Récemment, des analyses en microscopie à cryo-électron ont permis de visualiser la structure de la membrane des mycobactéries. Les images des Zuber *et al.* et de Hoffmann *et al.* (2008) sont très similaires et tendent à dire que l'enveloppe des mycobactéries forme une bicouche lipidique semblable à celles des bactéries à Gram négatif.

5.2 *Mycobactéries dégradant des polluants*

Grâce à leur paroi complexe, à la présence d'acides mycoliques de longue chaîne et à un équipement enzymatique approprié, les mycobactéries sont bien équipées pour dégrader les polluants de type HAP, alcanes et alcanes branchés. De nombreuses souches de *Mycobacterium* ont été décrites pour leur capacité à dégrader les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques), *Mycobacterium* sp. 6PY1 (Krivobok *et al.*, 2003), *M. austroafricanum* GTI-23 (Bogan *et al.*, 2003), *M. vanbaalenii* PYR-1 (Kim *et al.*, 2006), *M. frederiksbergense* LB501T (Wick *et al.*, 2003). D'autres sont connues pour dégrader des composés oxygénés comme le MTBE (méthyl *tert*-butyl ether) : il s'agit des souches de *M. austroafricanum* IFP 2012 et IFP 2015 (Francois *et al.*, 2002; Lopes Ferreira *et al.*, 2006). Une alcane hydroxylase membranaire serait impliquée dans la dégradation de cet éther carburant, alors que chez *Rhodococcus ruber* IFP 2001, il s'agit d'un cytochrome P450 (Chauvaux *et al.*, 2001). La plupart de ces souches possèdent une, voire deux (c'est le cas chez *M. vanbaalenii* PYR-1 et *M. gilvum* PYR-GCK uniquement), alcane hydroxylases membranaires de type AlkB ce qui leur donne aussi la capacité de dégrader certains *n*-alcanes.

5.2.1 Dégradation des *n*-alcanes par *Mycobacterium*

Plusieurs souches de mycobactéries utilisent les *n*-alcanes comme sources de carbone. La gamme de substrats utilisés varie en fonction des souches (**tableau 1.4**). *M. austroafricanum* IFP 2012 et IFP 2015 et *M. vaccae* JOB5 dégradent les alcanes de C₂ à C₁₆. Les souches IFP 2173 et IFP 2009 ne dégradent pas les alcanes à courtes chaînes, C₆ à C₁₆ alors que *M. smegmatis* mc²155 ne dégrade que le dodécane. Le spectre d'action de ces

souches vis-à-vis des alcanes est probablement lié à la spécificité de l'alcanes hydroxylase membranaire. Les souches de mycobactéries ont au moins une alcanes hydroxylase, dont les séquences partielles ont été publiées récemment (Lopes Ferreira *et al.*, 2007).

Tableau 1.4 : Spectre de dégradation des alcanes par des souches de *Mycobacterium* (Adapté de Lopes Ferreira *et al* 2007)

Souches	Croissance et rendement de minéralisation (%) sur <i>n</i> -alcanes							
	Methane	Ethane	Propane	Butane	Hexane	Octane	Dodecane	Hexadecane
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2012(a)	-	++*	+*	+*	++*	++*	+	++*
(b)	0	57.8	24.9	39.8	51.2	61.0	57.1	45.9
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2015(a)	-	++*	±	+*	++*	++*	±	++
(b)	0	58.3	47.6	39.3	53.7	52.8	42.6	85.9
<i>M. vaccae</i> JOB5 (a)	-	++	+	+*	++	±	+	++
(b)	0	48.1	38.3	31.5	62.7	52.9	28.4	69.5
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2173(a)	-	-	-	-	++	++	-	+ (flocs)
(b)	0	0	43.1	44.6	56.3	58.8	36.6	76.6
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP 2009 (a)	-	-	-	-	+	++	++	± (flocs)
(b)	0	0	0	0	35.5	77.4	61.0	66.4
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155 (a)	-	-	-	-	-	-	+ (flocs)	-
(b)	0	0	0	0	0	0	33.7	43.1

Toutes les cultures ont étéensemencées initialement à D.O.600 de 0,1 et la croissance a été mesurée après 15 jours d'incubation sauf exception. Chaque substrat a été ajouté à une concentration de 200 mg.L⁻¹.

(a) La D.O.₆₀₀ a été mesurée et reportée dans le tableau selon la codification : -, pas de croissance; ± 2 fois la D.O. initiale; +, 3 fois la D.O. initiale; ++, ≤4 fois la D.O. initiale.

(b) Rendement de minéralisation = 100 x (moles de carbone de CO₂ produit / moles de carbone de substrat introduit)

* Mesure de la croissance après 3 jours d'incubation

5.2.2 Dégradation d'un alcanes branché par *M. austroafricanum* IFP 2173

M. austroafricanum IFP 2173 a été isolée à partir d'un échantillon d'eau souterraine polluée par de l'essence pour sa capacité à dégrader l'isooctane. Cette bactérie est capable de dégrader des hydrocarbures variées comme les *n*-alcanes (de C₄ à C₁₆), les *iso*-alcanes, les aromatiques et les composés oxygénés présents dans l'essence ou le gazole (Solano-Serena *et al.*, 2000a), à l'exception du MTBE (Lopes Ferreira *et al.*, 2007).

La dégradation des alcanes ramifiés portant un atome de carbone quaternaire a été peu étudiée car cette structure est habituellement résistante à la biodégradation (Mc Kenna, 1972; Solano-Serena *et al.*, 1999). L'étude de la dégradation du 2,2-diméthylheptane par *Achromobacter* sp. a mis en évidence l'accumulation d'acide 2,2-diméthylpropanoïque, une décomposition partielle et un tour de β-oxydation mais l'atome de carbone quaternaire rend la molécule

résistante à la biodégradation (Catelani *et al.*, 1977). *M. austroafricanum* IFP 2173 a été isolée pour sa capacité à utiliser le 2,2,4-triméthylpentane (isooctane) comme unique source de carbone (Solano-Serena *et al.*, 2004). La voie de dégradation de l'isooctane est représentée à la **figure 1.27**. Quatre intermédiaires de dégradation de l'isooctane ont été identifiés: l'acide 2,4,4-triméthylpentanoïque résultant de l'oxydation subterminale, l'acide pivalique issu de l'oxydation terminale de l'isooctane. Ce dernier est formé après l'acide 2,4,4-triméthylpentanoïque et est accumulé de manière transitoire dans le milieu puis son dérivé CoA est dégradé complètement après un cycle de β -oxydation. La 2,2-diméthyl-3-pentanone puis la 3,3-diméthyl-2-butanone sont formées à partir de l'acide 2,4,4-triméthylpentanoïque. Dans ce cas, c'est une voie mineure de décarboxylation du β -ketoacide car le produit de cette voie de dégradation est récalcitrant. D'autre part, cette voie fournit peu d'énergie à la bactérie pour sa croissance.

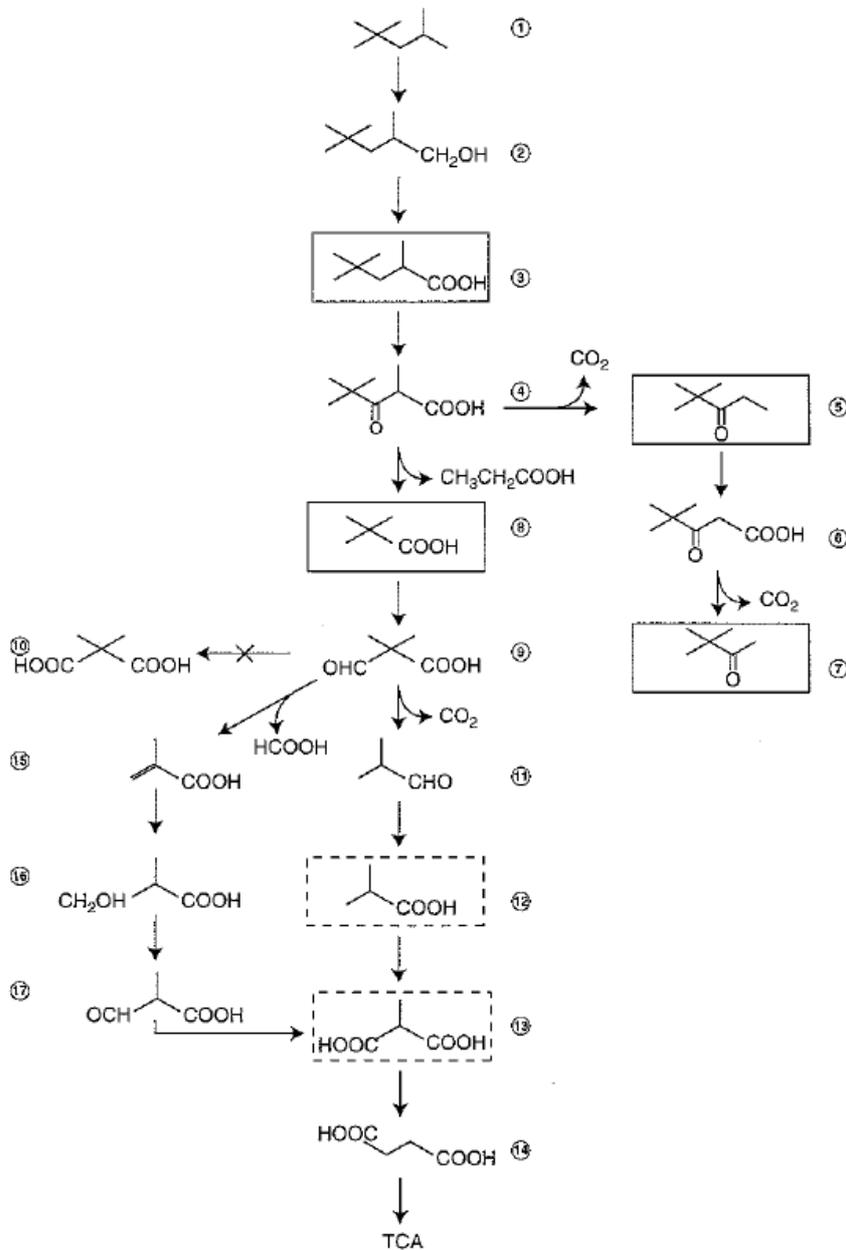


Fig. 4 Proposed pathway for the degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. The products isolated in cultures on isooctane are in solid lines boxes and proposed intermediates mineralized by isooctane-grown cells in dotted lines boxes. The free acid form is indicated for acids but is meant to include CoA derivatives. 1: isooctane (2,2,4-trimethylpentane); 2: 2,4,4-trimethyl-1-pentanol; 3: 2,4,4-trimethylpentanoic acid; 4: 2,4,4-trimethyl-3-oxopentanoic acid; 5: 2,2-dimethyl-3-pentanone (pinacolone); 6: 4,4-dimethyl-3-oxopentanoic acid; 7: 3,3-dimethyl-2-butanone; 8: pivalic acid (dimethylpropanoic acid); 9: dimethylmalonic semialdehyde (2,2-dimethyl-3-oxopropanoic acid); 10: dimethylmalonic acid (dime-thylpropanedioic acid); 11: isobutyraldehyde (methylpropionaldehyde); 12: isobutyric acid (methylpropanoic acid); 13: methylmalonic acid (methylpropanedioic acid); 14: succinic acid (butanedioic acid)

Figure 1.27: Biodégradation de l'isooctane par *M. austroafricanum* IFP 2173 (Solano-Serena et al. 2004)

La souche IFP 2173 a donc la capacité de dégrader des alcanes branchés de type antéiso qui ne sont habituellement pas utilisés par la voie classique impliquant la β -oxydation. En outre, cette souche possède une alcane hydroxylase membranaire et un cytochrome P450 induit sur isooctane (Solano-Serena et al., 2004).

PRESENTATION DU TRAVAIL

L'objectif du travail est d'étudier la biodégradabilité du 2-EHN, c'est à dire d'isoler une ou des bactéries capables de dégrader cette molécule, puis d'établir la cinétique de biodégradation et la voie catabolique de ce composé.

La **figure 2.1** représente la stratégie mise en oeuvre pour élucider la voie catabolique du 2-EHN.

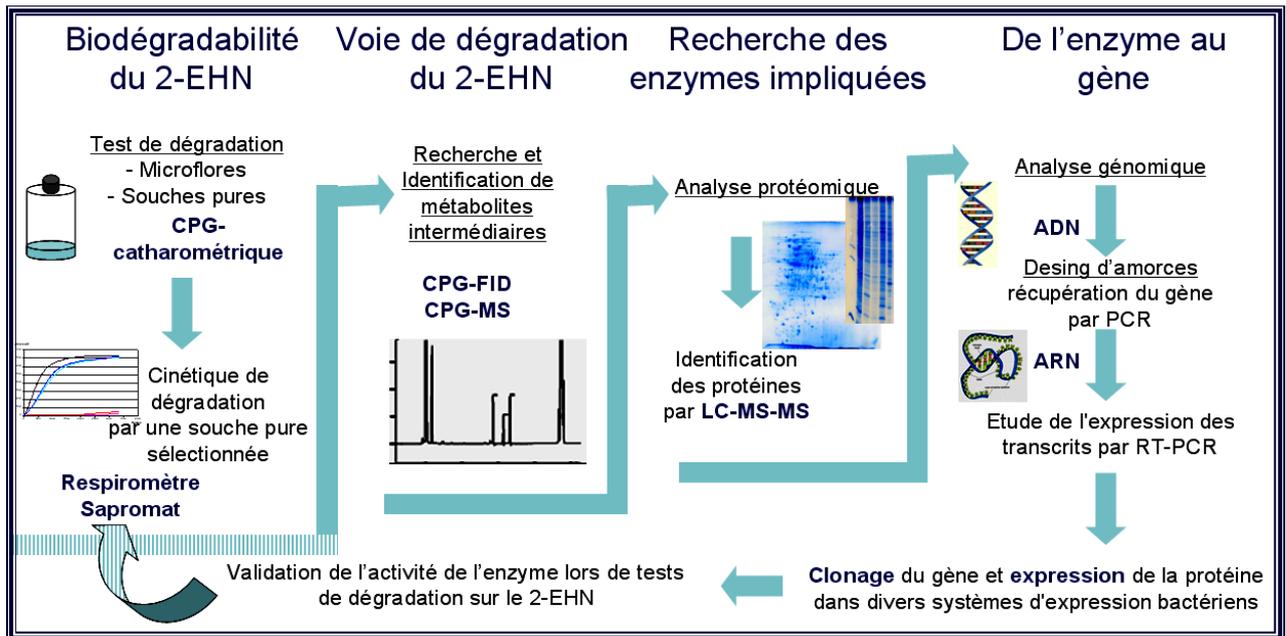


Figure 2.1 : Stratégie suivie pour caractériser la voie de dégradation du 2-EHN

L'étude comporte quatre volets principaux :

1. Sélection de microflores et de souches bactériennes compétentes ;
2. Élucidation globale des voies de dégradation du 2-EHN ;
3. Identification des enzymes induites lors de la croissance sur 2-EHN ;
4. Recherche et clonage des gènes d'intérêt.

1 Sélection de microflores et souches bactériennes compétentes

Dans un premier temps, nous avons cherché à mettre en évidence la biodégradabilité du 2-EHN à l'aide d'un test de biodégradation prenant en compte les propriétés physico-chimiques particulières de la molécule. En effet, le 2-EHN est légèrement soluble dans l'eau ($12,5 \text{ mg.L}^{-1}$ à 20 °C) ; cependant, le 2-EHN présente une hydrophobicité très marquée ($\log K_{O/W}=5,24$). Lorsqu'on introduit dans une fiole d'essai une quantité de 2-EHN dépassant celle autorisée par la pression de vapeur saturante, il se forme une phase liquide distincte. La solubilité maximale du 2-EHN dans la phase aqueuse est alors atteinte. Dans une fiole d'essai

de 120 mL contenant 10 mL de milieu à 20 °C, la pression de vapeur saturante de 2-EHN est équivalente à 0,21 mg. Elle est en équilibre avec 0,12 mg dissous dans la phase liquide. Il se forme donc une phase liquide distincte de 2-EHN pour 0,33 mg de 2-EHN introduit dans une fiole d'essai. Dans nos essais standards, la quantité de substrat mise en oeuvre dans le test de biodégradation utilisé (5 µL) est très sensiblement supérieure à la saturation de l'espace de tête. De par l'effet destructurant qu'il exerce sur les structures membranaires lipidiques, l'excès de 2-EHN est alors susceptible d'empêcher la croissance bactérienne. Pour s'affranchir de l'inhibition, nous avons ajouté au milieu de culture une phase non aqueuse liquide (non aqueous phase liquid ou NAPL selon la terminologie anglosaxonne), telle que le HMN. La phase NAPL piège la majeure partie du 2-EHN et sert de réserve de substrat. Au fur et à mesure de la consommation du substrat dissous, le 2-EHN contenu dans la phase NAPL est progressivement transféré vers la phase aqueuse.

L'utilisation du 2-EHN en tant que substrat de croissance impose aussi de disposer de micro-organismes dotés de propriétés pariétales particulières et capables de résister à la toxicité du substrat. L'aptitude à dégrader des substrats branchés est également requise pour ces micro-organismes. La sélection de micro-organismes compétents est effectuée selon deux types d'approche :

- Des microflores, issues de boues de station d'épuration urbaines et de raffineries ou de sols contaminés par les hydrocarbures, sont testées afin d'isoler des microflores compétentes. Ensuite, des isolements sont tentés à partir de ces microflores.
- Des souches de collection sont testées directement (en raison de la difficulté d'isoler des micro-organismes à partir des microflores compétentes). Ces souches appartiennent principalement au groupe des "CMN" (pour *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*) lequel est connu pour sa capacité de résistance aux hydrocarbures. De nombreuses souches de ce groupe sont par ailleurs capables de dégrader les hydrocarbures branchés.

L'ensemble de ces travaux ont été effectués en collaboration avec Floriane Solano-Serena, Maître de Conférences à l'ENSIL (École Nationale Supérieure des Ingénieurs de Limoges).

2 Elucidation globale des voies de dégradation du 2-EHN

Le 2-EHN est potentiellement récalcitrant à la biodégradation. En effet, la molécule de 2-EHN est de petite taille et possède une structure ramifiée du fait de la présence d'un substituant éthyle en position 2 de la chaîne principale.

L'étude des voies de dégradation du 2-EHN est entreprise avec la bactérie (*M. austroafricanum* IFP 2173) présentant la meilleure cinétique de biodégradation. Un bilan final en carbone est établi avec cette souche. Ce bilan met en évidence l'accumulation d'un métabolite qui est identifié par CPG-SM. Il nous permet de proposer une voie de dégradation probable pour le 2-EHN.

L'identification et la synthèse chimique de l'intermédiaire métabolique, non disponible commercialement, ont été effectués dans l'Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimique de l'INRA de Versailles par Lucien Kerhoas et Martine Lettere.

3 Identification des enzymes induites lors de la croissance sur 2-EHN

Les enzymes impliquées dans la voie de dégradation putative sont recherchées par deux approches classiques :

- L'analyse protéomique de la bactérie après croissance sur 2-EHN comme unique source de carbone est effectuée. Des gels d'électrophorèse 1D et 2D sont réalisés. Des polypeptides sélectionnés font l'objet d'analyse de séquences en LC-MS/MS, et les informations sont confrontées aux banques de données pour obtenir une identification provisoire des polypeptides induits. Ces analyses ont été effectuées au Laboratoire d'Étude Dynamique des Protéomes dirigé par Jérôme Garin au CEA de Grenoble.
- L'analyse des génomes de bactéries récemment séquencés présente une source d'information à ne pas négliger pour retrouver les gènes d'intérêts difficilement repérables par l'approche protéomique.

4 Recherche et expression des gènes d'intérêts

Des sondes nucléiques spécifiques sont élaborées pour cloner les gènes correspondant aux polypeptides. L'analyse de la séquence des gènes d'intérêt et des régions flanquantes nous renseigne sur la nature des gènes impliqués ainsi que sur la fonction des enzymes codées.

Afin de valider l'activité des enzymes trouvées par l'approche protéomique, certains gènes d'intérêt sont surexprimés dans des bactéries appropriées. La surproduction d'enzymes sous forme recombinante devrait faciliter leur isolement et l'étude de leurs propriétés catalytiques et biochimiques.

MATERIELS ET METHODES

1 Méthodes microbiologiques

1.1 Milieu de culture

1.1.1 Milieu minimum salin extrait de levure (MMSYE)

Le milieu de culture utilisé pour la croissance des souches est le milieu minéral salin additionné d'extrait de levure (MMSYE) et d'un substrat carboné qui constitue la source de carbone et d'énergie. Ce milieu a la composition décrite par (Bouchez *et al.*, 1995b) à l'exception de l'ajout de vitamines qui est remplacé par 100 mg.L⁻¹ d'extrait de levure.

Le détail de la composition est le suivant :

- Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	4,5 g.L ⁻¹
- NH ₄ NO ₃	1 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	680 mg.L ⁻¹
- MgSO ₄ , 7 H ₂ O	100 mg.L ⁻¹
- FeSO ₄	1 mg.L ⁻¹
- Extrait de levure	100 mg.L ⁻¹
- Solution d'oligo-éléments	1 ml.L ⁻¹

Composition de la solution d'oligo-éléments (conservée à 4°C):

- MnSO ₄ , H ₂ O	100 mg.L ⁻¹
- (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ , H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
- NaB ₄ O ₇ , 10 H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
- Co(NO ₃) ₂ , 6 H ₂ O	25 mg.L ⁻¹
- CuCl ₂	25 mg.L ⁻¹
- ZnCl ₂	25 mg.L ⁻¹
- NH ₄ VO ₃	25 mg.L ⁻¹

La source de carbone est introduite soit avant l'autoclavage (succinate de sodium à 4 g.L⁻¹, acétate de sodium à 4 g.L⁻¹, glycérol à 2.5 g.L⁻¹, Tween80 à 2,5 g.L⁻¹), soit au moment de l'ensemencement (2-EHN, *n*-octane, iso-octane, éthanol à 1 g.L⁻¹ ou glucose à 2 g.L⁻¹).

Pour les cultures en phase vapeur de 2-EHN sur milieu gélosé en boîtes de Petri, le MMSYE est additionné de 20 g.L⁻¹ d'agar bactériologique et de 0,5 g.L⁻¹ d'extrait de levure.

Les solutions sont stérilisées par autoclavage à 121°C pendant 20 mn.

1.1.2 Milieu complet

Il s'agit du milieu Luria-Bertani modifié qui est utilisé aussi bien pour certaines cultures en milieu liquide ou en milieu solide, sur boîtes de Petri.

Il a la composition suivante :

- Biotrycase	10 g.L ⁻¹
- Extrait de levure	5 g.L ⁻¹
- NaCl	5 g.L ⁻¹
- Glucose	1 g.L ⁻¹
- Agar-agar	20 g.L ⁻¹ (ajouté pour préparer les milieux gélosés)

1.1.3 Milieu Middlebrook 7H9 et 7H10, pour la culture des *mycobactéries*

(Middlebrook *et al.*, 1954; Middlebrook & Cohn, 1958)

	7H9	7H10 + Agar
- (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	0,5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
- KH ₂ PO ₄	1,0 g.L ⁻¹	1,5 g.L ⁻¹
- Na ₂ HPO ₄	2,5 g.L ⁻¹	1,5 g.L ⁻¹
- Citrate-Na ₃	0,1 g.L ⁻¹	0,4 g.L ⁻¹
- MgSO ₄ (7H ₂ O)	50 mg.L ⁻¹	25 mg.L ⁻¹
- CaCl ₂ (2H ₂ O)	0,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
- ZnSO ₄ (7H ₂ O)	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
- CuSO ₄ (5H ₂ O)	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
- Acide L-glutamique	0,5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
- Fe(III)(NH ₄)citrate	40 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹
- Pyridoxine	1,0 mg.L ⁻¹	1,0 mg.L ⁻¹
- Biotine	0,5 mg.L ⁻¹	0,5 mg.L ⁻¹
- Glycérol	0,2% (p/v)	0,5% (p/v)
- Malachite Green	-	0,25 mg.L ⁻¹
- Bacto Agar	-	15 g.L ⁻¹
- pH (à vérifier)	6,6 +/- 0,2	6,6 +/- 0,2

Après autoclavage, le supplément d'enrichissement ADC, stérilisé par filtration est ajouté à raison de 10% du volume total. La composition est la suivante :

- BSA, Fractio, V	50 g.L ⁻¹
- D-Glucose	20 g.L ⁻¹
- Catalase	0,03 g.L ⁻¹

0,05% de Tween 80 peut être additionné dans certains cas dans le milieu (Goldstone *et al.*, 2008)

1.1.4 Milieu PTYG : Peptone-Tryptone-Yeast extract-Glucose medium

(Shen *et al.*, 1998)

- D-Glucose	10 g.L ⁻¹
- Extrait de levure Difco®	10 g.L ⁻¹
- Bacto Peptone	5 g.L ⁻¹
- Tryptone Biokar®	5 g.L ⁻¹
- CaCl ₂ (2H ₂ O)	70 mg.L ⁻¹
- MgSO ₄ (7H ₂ O)	0,3 g.L ⁻¹

Le milieu PTYG₂ est dilué au demi avec de l'eau. Le milieu PTYG₂₀ est dilué au 1/20^{ème} avec de l'eau et 15 g.L⁻¹ d'agar y sont ajoutés.

1.2 Souches et plasmides

1.2.1 Microorganismes

Les microflores proviennent de boues de station d'épuration urbaines ou de raffinerie. Elles sont inoculées à raison de 100 mg.L⁻¹ dans le milieu de culture.

Les souches utilisées appartiennent à la famille des bactéries dites CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*). Elles ont été sélectionnées pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures, en particulier les *n*-alcane. La plupart de ces souches possèdent une mono-oxygénase. Le **tableau 3.1** présente les souches utilisées ainsi que les hydrocarbures qu'elles sont capables de dégrader. Le **tableau 3.2** représente les souches utilisés pour le clonage et l'expression de gènes.

Tableau 3.1: Souches utilisées lors des tests de biodégradation du 2-EHN

Souche	Substrats de croissance usuels	Références
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP 2009	C6, C8, C12, C14	(Béguin <i>et al.</i> , 2003)
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2012	MTBE	(Francois <i>et al.</i> , 2002)
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2015	MTBE	(Lopes-Ferreira <i>et al.</i> , 2006)
<i>M. austroafricanum</i> IFP 2173	Isooctane	(Solano-Serena <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. austroafricanum</i> ATCC 29678	Hexane, 2-Méthylpentane	(Johnson <i>et al.</i> , 2004)
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	C12, C14	(Poupin <i>et al.</i> , 1999)
<i>M. austroafricanum</i> C6	Pyrène	(Jouanneau <i>et al.</i> , 2005)
<i>M. austroafricanum</i> Spyr_Ge_1	Pyrène	(Willison J., communication personnelle)
<i>M. austroafricanum</i> BHF 004	Pyrène	(Willison J., communication personnelle)
<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	Pyrène	(Moody <i>et al.</i> , 2005)
<i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1	Pyrène	(Krivobok <i>et al.</i> , 2003)
<i>R. ruber</i> IFP 2006	Éthanol	(Chauvaux <i>et al.</i> , 2001)
<i>R. ruber</i> IFP 2007	Éthanol	(Chauvaux <i>et al.</i> , 2001)
<i>P. citronellolis</i> ATCC13674	Citronellol, terpènes	(Fall <i>et al.</i> , 1979)
<i>P. putida</i> Gpo1	C6, C8, C12, C14	(Smith & Hyman, 2004)

Les souches sont conservées à -80°C à DO₆₀₀ de 12 dans du MMSYE avec 40 % de glycérol dans des tubes cryogéniques (Nalgene). Elles ont été au préalable cultivées sur MMSYE avec 2.5 g.L⁻¹ de Tween 80. Ces tubes servent systématiquement à l'ensemencement des précultures pour effectuer des tests de biodégradation du 2-EHN.

Tableau 3.2: Souches utilisées pour le clonage et l'expression de gènes

Souche	Références
<i>Escherichia coli</i> DH5α	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
<i>Escherichia coli</i> Rosetta	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 DE3	Novagen, Invitrogen
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155	(Snapper <i>et al.</i> , 1990)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 4517	(Goldstone <i>et al.</i> , 2008)

1.2.2 Plasmides utilisés

Deux types de vecteurs ont été utilisés, des vecteurs de clonage et des vecteurs d'expression. La liste et la description de ces derniers figurent dans le **tableau 3.3**.

Tableau 3.3 a : Plasmides utilisés

Plasmide	Description	Résistance *	Promoteur / Origine de répllication (Ori)	Références
pDrive	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰ K anamycine ²⁰	T7-SP6 Ori pUC	Qiagen
TOPO	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰ K anamycine ²⁰	T7-SP6 Ori f1 et pUC	Invitrogen
pUC18	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰	Pas de promoteur Ori rep pUC	Fermentas
pUC19	Vecteur de clonage	Ampicilline ¹⁰⁰	Pas de promoteur Ori rep pUC	Fermentas
pET9a	Vecteur d'expression chez <i>E. coli</i>	Kanamycine ²⁰	T7	Novagen
pET15b	Vecteur d'expression chez <i>E. coli</i> avec un marquage His Tag en N-terminal	Ampicilline ¹⁰⁰	T7	Novagen
pHLD69	Vecteur navette <i>Mycobacterium - E. coli</i>	Kanamycine ²⁰	Pas de promoteur Ori <i>E coli</i> et <i>Mycobacterium</i> T7	(Pagnout <i>et al.</i> , 2007)
pUYB1062	Vecteur navette d'expression <i>Mycobacterium -E. coli</i>	Hygromycine ⁵⁰	Ori <i>E coli</i> et <i>Mycobacterium</i>	(Goldstone <i>et al.</i> , 2008)
pGEc47ΔB - pCom8-PFR1500	Vecteur contenant le <i>cyp153</i> isolé par Van Beilen	Tetracycline ^{12,5} Gentamycine ¹⁰⁰	pAlkB (Eggink <i>et al.</i> , 1987) OriT et MCS	(van Beilen & Funhoff, 2005)

* Les concentrations en antibiotiques sont exprimées en exposant en $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tableau 3.3 b : Plasmides utilisés issus de cette étude

Nom du plasmide	Plasmide d'origine	Gènes introduits dans le plasmide	Taille des gènes introduits	Résistance*
pEN01	pDrive	<i>alkB1</i>	1272 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN02	pDrive	<i>alkB1-rubA1</i>	1446 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN03	pDrive	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i>	1629 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN04	pET9a	<i>alkB1</i>	1272 pb	Kanamycine ²⁰
pEN05	pET15b	<i>alkB1</i>	1272 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN06	pET9a	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i>	1629 pb	Kanamycine ²⁰
pEN07	pET15b	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i>	1629 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN08	pET9a	<i>alkB1-rubA1</i>	1446 pb	Kanamycine ²⁰
pEN09	pET15b	<i>alkB1-rubA1</i>	1446 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN10	pUC18	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i> + séquence promotrice	2448 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN11	pUC18	<i>alkB1-rubA1-rubA2-tetR</i> + séquence promotrice	3063 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN12	pHLD69	<i>alkB1-rubA1-rubA2</i> + séquence promotrice	2448 pb	Kanamycine ²⁰
pEN13	pHLD69	<i>alkB1-rubA1-rubA2-tetR</i> + séquence promotrice	3063 pb	Kanamycine ²⁰
pEN14	pDrive	<i>alkB2</i>	1185 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰

Nom du plasmide	Plasmide d'origine	Gènes introduits dans le plasmide	Taille des gènes introduits	Résistance*
pEN15	pET15b	<i>alkB2</i>	1185 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN16	pET9a	<i>alkB2</i>	1185 pb	Kanamycine ²⁰
pEN17	pDrive	<i>alkB2</i> + séquence promotrice	1667 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN18	pDrive	<i>alkB2-scd</i> + séquence promotrice	2600 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN19	pHLD69	<i>alkB2</i> + séquence promotrice	1667 pb	Kanamycine ²⁰
pEN20	pHLD69	<i>alkB2-scd</i> + séquence promotrice	2600 pb	Kanamycine ²⁰
pEN21	pDrive	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Kanamycine ²⁰ ou Ampicilline ¹⁰⁰
pEN22	pET15b	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Ampicilline ¹⁰⁰
pEN23	pET9a	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Kanamycine ²⁰
pEN26	pUYB1062	<i>cyp153-1</i>	1261 pb	Hygromycine ⁵⁰

* Les concentrations en antibiotiques sont exprimées en exposant en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

1.3 Tests de biodégradation aérobie

1.3.1 Mise en œuvre du test

Les essais sont réalisés dans des fioles de pénicilline de 120 mL. Pour chaque souche, quatre essais contenant 10 mL de milieu de culture (MMSYE), 0,5 mL de HMN et 5 μL de 2-EHN (soit $487 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$) sont mis en œuvre. Deux témoins abiotiques, additionnés de chlorure mercurique à $0,2 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$ et deux témoins endogènes (absence de 2-EHN et présence de HMN dans le milieu de culture), sont réalisés. Deux fioles d'essais et de témoins endogènes sont aussi mises en œuvre dans les mêmes conditions afin de vérifier si la souche est capable de croissance en l'absence de HMN. Une foisensemencées à $\text{D.O.}_{600} = 0,2$ les fioles sont incubées à 30°C , sous agitation. Au cours de l'incubation, le CO_2 est régulièrement dosé dans le ciel gazeux de l'une des fioles d'essai ainsi que de l'une des fioles témoin sans substrat, avec ou sans HMN. A l'issue de 28 jours d'incubation (temps de dégradation préconisé dans les normes ISO 14593), les milieux de culture sont acidifiés avec 1 mL d'HCl 17,5%. Les fioles sont agitées pendant une nuit, puis le CO_2 est dosé afin d'en déterminer la quantité finale. Le 2-EHN résiduel est alors extrait pendant 30 mn sous agitation, (volume à volume) par du MTBE contenant de décahydronaphtalène 5% (v/v) utilisé comme standard interne. Les fioles sont alors refroidies au minimum 1h à 4°C puis 2 mL de la phase organique sont prélevés et dosés par CPG/FID. Pour tous les calculs relatifs aux tests de biodégradation, la respiration endogène mesurée dans les fioles sans 2-EHN est systématiquement déduite de celle mesurée dans les essais. Chaque test est réalisé en triplicata. Les résultats sont exprimés en faisant la moyenne et l'écart type des trois essais.

1.3.2 Expression des résultats

1.3.2.1 Taux de recouvrement abiotique

Le taux de recouvrement abiotique correspond à la quantité de substrat dosé par CPG-FID dans les témoins abiotiques en fin de culture par rapport à la quantité de substrat introduit déterminé par le calcul (masse volumique du substrat multipliée par le volume introduit).

Ce calcul permet de vérifier l'étanchéité des fioles utilisées ainsi que de valider les calculs du taux de dégradation et du rendement de minéralisation qui prennent en compte les valeurs des concentrations en substrat résiduel.

1.3.2.2 Taux de dégradation

Le taux de dégradation est déterminé grâce aux analyses CPG/FID par le rapport entre la quantité de substrat consommé dans les essais et celle présente dans les témoins abiotiques à la fin de la période d'incubation.

1.3.2.3 Rendement de minéralisation

Le rendement de minéralisation est le rapport entre le nombre de moles de carbone dégagées sous forme de CO₂ (dosé par CPG à détection catharométrique après acidification en tenant compte du CO₂ dissous) et le nombre de moles de carbone du substrat consommé (déterminé par la différence entre le substrat introduit initialement et le substrat résiduel présent dans les essais et dosé par CPG/FID), en tenant compte du rendement d'extraction (taux de recouvrement). Le nombre de mole de CO₂ dégagé dans les fioles témoins sans substrat (respiration endogène) est déduit de la quantité de CO₂ déterminée dans les essais.

1.3.3 Suivi cinétique de la consommation d'oxygène par respirométrie

Le Sapromat est un appareil de respirométrie qui mesure de manière indirecte la consommation d'oxygène (Sapromat D12-S, Voith, Allemagne). Il est composé de 12 postes dont le principe de fonctionnement est le suivant (**Figure 3.1**) :

Une fiole d'essai de 500 mL en communication directe avec un générateur d'oxygène, est séparée d'un compartiment de référence par un manomètre. L'ensemble, placé dans un bain marie à 30°C sous agitation magnétique, est indépendant des variations de pression atmosphérique et de température extérieure. L'activité des microorganismes crée une consommation d'oxygène et une production de CO₂. Le CO₂ est piégé par de la chaux sodée en excès. Toute activité métabolique génère donc une dépression. Cette dernière crée un contact entre les deux électrodes du manomètre, qui entraîne alors une production d'oxygène par voie électrolytique. Lorsque l'équilibre de pression est rétabli, le contact manométrique

ainsi que la production d'oxygène cessent. La mesure de consommation d'oxygène est fournie par celle de la quantité d'électricité consommée par le générateur électrolytique. L'unité de stimulation du générateur (86 mA pendant 36 s) représente 0,25 mg d'oxygène produit. Les données sont analysées par le logiciel informatique fourni par le constructeur (Sapromat).

Après croissance en MSMYE sur Tween 80 (2,5 g.L⁻¹), les cellules sont centrifugées à 10 000 g pendant 10 mn puis lavées une fois en MMSYE sans substrat carboné. Le culot cellulaire est repris dans 250 mL de milieu de culture (MMSYE) avec ou non 5% de HMN (Sigma) ou 5% d'huile de silicone (47V20, Prolabo, France) de façon à obtenir une D.O.₆₀₀ initiale proche de 0,1. Les fioles sont alors introduites dans l'appareil Sapromat.

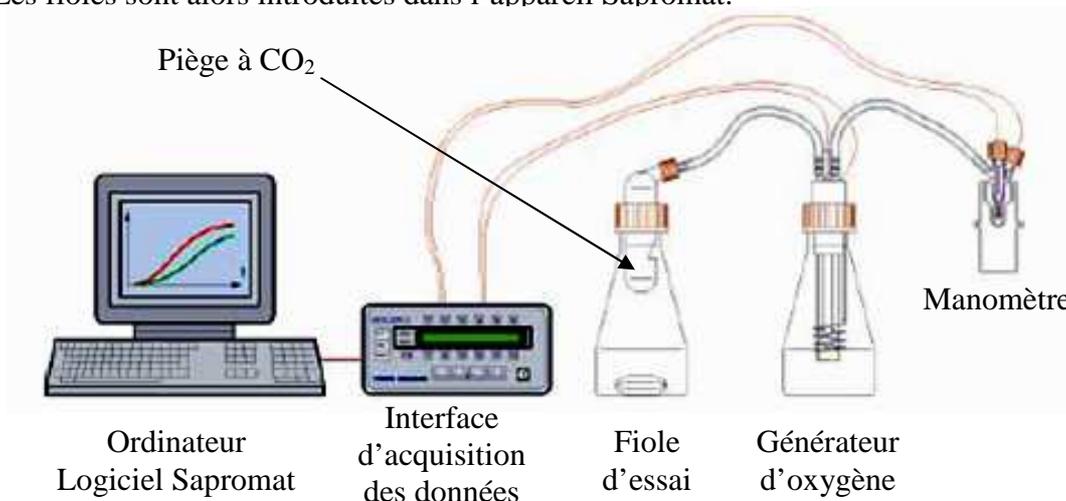


Figure 3.1 : Détail des connexions de l'appareil Sapromat

2 Méthodes d'analyses physicochimiques

2.1 Méthodes chromatographiques

2.1.1 CO₂

La teneur en CO₂ du ciel gazeux des fioles de pénicilline est mesurée par CPG à détection catharométrique (Varian 3800). L'échantillon gazeux (250 µL) est injecté à l'aide d'une seringue à gaz de 250 µL de capacité et munie d'un système de vanne ouverture/fermeture étanche (Hamilton) sur une colonne inox de 2 m de longueur et de 2 mm de diamètre interne, remplie de phase Porapak Q (80/100 mesh) (Chrompack). Le gaz vecteur est l'hélium. La pression en tête de colonne est de 24,6 psi, qui correspond à un débit de 30 mL.mn⁻¹ en sortie de colonne. La température du four est de 100°C. L'analyse s'effectue en isotherme. La température de l'injecteur est de 130°C. La température du détecteur (TCD) est de 130 °C. La température de filament du pont de Wheatstone est de 180 °C, ce qui se traduit par un courant de filament de 180 mA. La polarité est réglée en conséquence pour obtenir une

réponse sous la forme d'un signal positif. Sur le CPG, la "polarité" est positionnée sur positif pour l'analyse de CO₂. L'acquisition des données se fait par le logiciel Borwin (JMBS développement).

2.1.2 2-EHN

Le dosage du 2-EHN est réalisé par CPG avec un détecteur à ionisation de flamme (FID). Les différentes étapes de la méthode sont illustrées par la **figure 3.2** :

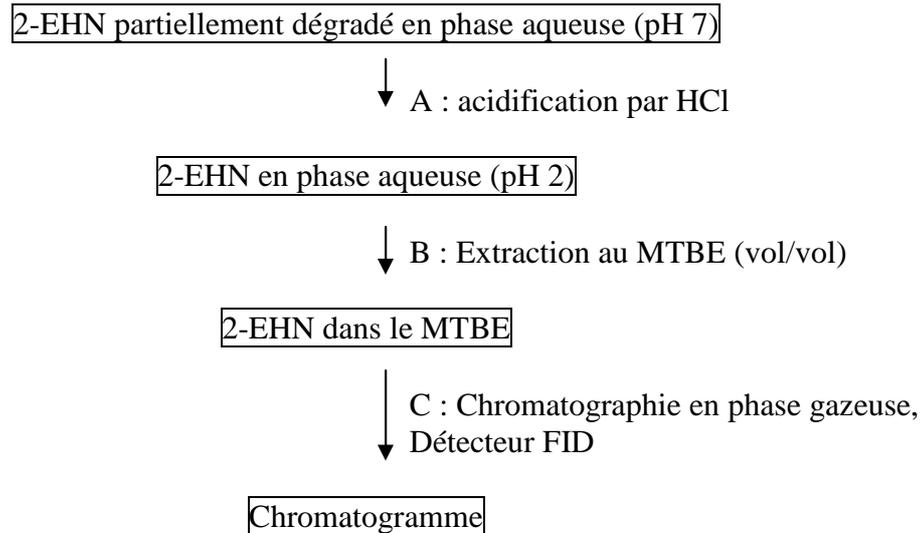


Figure 3.2 : Principe de la méthode de dosage du 2-EHN

Les conditions chromatographiques sont détaillées dans le **tableau 3.4**. L'acquisition est réalisée par le logiciel Browin et la concentration dans le MTBE est calculée en tenant compte du standard interne, la décaline sous forme *cis*- et *trans*-. Le rapport d'intégration de l'échantillon ainsi réalisé et focalisé sur 3 pics (deux pour la décaline, Tr = 14,2 et 15,7 mn et un pour le 2-EHN, Tr = 16,7 mn) est transféré dans un fichier Excel pour calculer la concentration selon la méthode du standard interne.

Tableau 3.4: Conditions chromatographiques pour l'analyse du 2-EHN résiduel par CPG/FID.

	Paramètres du chromatographe	Valeurs
	Colonne	Pona (équivalent DB1)
	Longueur	50 m
	Diamètre intérieur	0.2 mm
	Phase	Crosslinked methyl siloxane
	Épaisseur de la phase	0.5 μm
Méthode colonne :	1 ^{er} palier	
	Température initiale	100 °C
	Température finale	150 °C
	Pente	4 °C.mn ⁻¹
	2 ^{ème} palier	
	Température initiale	150 °C
	Température finale	259 °C
	Pente	20 °C.mn ⁻¹
Détecteur	Température	280 °C
Injecteur (Non programmé)	Température initiale	250 °C
	Split	30 mL.mn ⁻¹
Méthode d'injection	Volume	1 μL
	Vitesse	5 $\mu\text{L.s}^{-1}$
	Temps de séjour de l'aiguille	0 s
	Débit de fuite	0 $\mu\text{L.mn}^{-1}$
Gaz Vecteur (Hélium)	Pression d'entrée	26.5 psi
	Débit	0.8 mL.mn ⁻¹
Autres gaz	Make Up (N ₂)	23 mL.mn ⁻¹
	Air	290 mL.mn ⁻¹
	Hydrogène	35 mL.mn ⁻¹

2.1.3 GC-MS

L'identification des intermédiaires de dégradation est réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse. Les composés entrent directement dans le spectromètre de masse à leur sortie de colonne sans passer par un autre détecteur. Les conditions chromatographiques sont les mêmes que celles utilisées lors du dosage du 2-EHN (§ 2.1.2). Un autre mode d'injection a été testé, il s'agit de l'espace de tête statique à partir d'un échantillon aqueux. Les composés vaporisés et séparés à la sortie de la colonne de chromatographie entrent dans la chambre d'ionisation du spectromètre de masse, enceinte dans laquelle les molécules sont ionisées. L'ionisation de la molécule est obtenue par le bombardement de celle-ci par un faisceau d'électrons émis à partir d'un filament parcouru par un courant électrique. Les ions positifs sont accélérés par une série de champs électrostatiques, séparés et analysés en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le spectre de masse est l'enregistrement de l'ensemble des fragments (ions) caractéristiques d'une molécule. Ces fragments sont caractérisés par une valeur particulière du rapport de leur masse sur leur charge (m/z), et par leur intensité comparée à l'intensité du fragment le plus abondant de la molécule auquel on donne la valeur 100. La référence à une banque de spectres de masse permet d'identifier les composés analysés.

2.1.4 HPLC couplée à un détecteur MS/MS

Les analyses d'ionisation chimique et les spectres MS/MS ont été réalisés par Mr Lucien KERHOAS à l'INRA de Versailles. Les conditions chromatographiques en HPLC sont les suivantes :

Le couplage (Quattro LC, Waters) comprend une chaîne HPLC intégrée avec un détecteur UV-visible Waters 2487 à deux longueurs d'onde réglables et un spectromètre de masse triple quadripolaire. Les injections sont réalisées à l'aide d'un injecteur à boucle. Les colonnes utilisées ont en général un diamètre interne de 2 mm et les débits sont compris entre 100 et 250 $\mu\text{L}\cdot\text{mn}^{-1}$.

Le spectromètre de masse est un tandem MS-MS de type quadripolaire. Il est doté d'une source d'ionisation « Z-spray » fonctionnant en mode electrospray.

Les réglages standards des paramètres de la source electrospray sont les suivants :

- capillaire (Vcap) : - 3 kV (mode négatif) et + 3,25 kV (mode positif),
- cône de prélèvement : de 10 à 100 volts selon le cas et les objectifs de fragmentation visés,
- cône d'extraction : 1 à 2 volts,
- tension RF de l'hexapôle de transfert (Rf lens) : compris entre 0,1 et 0,5 V,
- gaz de désolvatation : 450 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ d'azote (valeur moyenne),
- gaz de nébulisation : fixé par le constructeur à 70-90 L/h d'azote.
- gaz de cône : 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ d'azote,
- températures : bloc source 120 °C, gaz de désolvatation 400 °C.

Les études CID (décomposition d'ions activés par collision) sont réalisées avec l'argon à la pression moyenne de $3.5 \cdot 10^{-3}$ torr. L'énergie de collision est réglable entre 0 et 200 eV (les valeurs usuelles dépassent rarement 75-100 eV).

Le pilotage de l'instrument (HPLC et MS), l'acquisition et l'analyse des données sont assurés par le logiciel MassLynx (version 4.0).

2.2 Dosage du carbone organique dissous

L'analyse globale du carbone organique total/dissous est réalisée à l'aide d'un appareil SHIMADZU TOC-5050A selon une méthode adaptée de la norme NF EN 1484.

La méthode consiste à doser le carbone organique total (COT) en soustrayant le carbone inorganique (IC) du carbone total (TC).

La teneur en carbone organique dissous (COD) est obtenue après filtration de l'échantillon aqueux sur un filtre PTFE présentant un seuil de filtration à 0.22 μm . La gamme de concentration de l'analyse du COT/COD par cette méthode varie de 0 à 3000 mg.L^{-1} . La gamme de mesure du carbone inorganique est comprise entre 3 et 50 mg.L^{-1} . La limite de quantification du COT/COD est de $3 \pm 0.6 \text{ mg.L}^{-1}$.

2.3 Méthodes de dérivation

2.3.1 Préparation de l'échantillon

L'échantillon à dériver est dans une phase aqueuse. Afin d'être dérivé, il doit être anhydre. C'est la raison pour laquelle l'échantillon est au préalable soit extrait par un solvant (cyclohexane ou MTBE) puis évaporé sous azote, soit lyophilisé. Afin d'hydrolyser un éventuel ester une saponification sans chauffage du milieu aqueux est réalisée, puis l'échantillon est lyophilisé.

2.3.2 Estérification

2.3.2.1 En milieu acide

Dans un tube à vis de 10 mL, 2 mL de méthanol contenant 1% de H_2SO_4 et 1 mL de toluène sont ajoutés à l'échantillon. Ce dernier est soit sous forme de dépôt dans le fond du tube suite à l'évaporation du solvant, soit sous forme de poudre séchée suite à la lyophilisation. Après 1h30 à 100°C dans un bain sec ou une étuve, 3 mL d' H_2O contenant 50 g.L^{-1} de NaCl sont ajoutés et l'échantillon est vigoureusement vortexé. 5 mL de cyclohexane sont alors ajoutés afin d'extraire l'échantillon estérifié et de l'analyser par CPG/FID.

2.3.2.2 En milieu alcalin

Dans un tube à vis de 20 mL, 1 mL de méthoxyde de sodium dans le méthanol est ajouté à l'échantillon à estérifier qui se trouve dans le cyclohexane. Le mélange est incubé pendant 1h à 4°C sous agitation. Afin de déshydrater l'échantillon, 5 μL d'acide acétique anhydre et 1 g de CaCl_2 sont ajoutés à l'échantillon. Après 1h à température ambiante, le tube est centrifugé 5000 g pendant 2 mn et le surnageant est alors analysé par CPG/FID.

2.3.3 Silylation

La silylation est réalisée à partir de 3 mL d'échantillon lyophilisé repris dans du cyclohexane, ou 3 mL d'échantillon extrait dans le solvant ou de l'échantillon préalablement

estérifié dans le solvant. A ces 3 mL de produit dans le solvant est ajouté 1 mL de mélange de HMDS (1,1,1,3,3,3-hexamethyldisilazane) – TMCS (trimethylchlorosilane) –pyridine (3:1:9) (Supelco). Après 30 mn d'incubation à 30°C, 1 mL de H₂O est ajouté pour éliminer l'excès de pyridine. La phase organique est alors analysée par CPG/FID.

3 Méthodes de biologie moléculaire

3.1 Extraction d'ADN génomique de *Mycobacterium*

L'ADN génomique de *Mycobacterium* a été extrait selon le protocole décrit par Heiss *et al.* (Heiss-Blanquet *et al.*, 2005).

3.2 Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques sont dosés à l'aide d'un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Thermo Fischer Scientific). 1 µL de préparation d'ADN ou d'ARN est déposé sur la lampe. Il n'est pas nécessaire de faire de dilution de l'échantillon l'absorbance lue à 260 nm peut être comprise entre 0,04 et 74. La concentration en acides nucléiques est calculée selon les formules suivantes : Concentration d'ADN = D.O.₂₆₀ x 50 ou d'ARN = D.O.₂₆₀ x 40.

3.3 Réactions d'amplification par PCR

Les réactions d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) sont réalisées par la polymérase GoTaq® (Promega) en présence d'amorces spécifiques ou universelles (**tableau 3.5**) dans le milieu réactionnel suivant:

-Tampon PCR 5x :	10 µL
-DNA Taq polymerase	0,2 µL
-MgCl ₂ (25mM)	2 µL (concentration finale 1 mM)
-Oligonucléotides (100 µM)	0.5 µL (pour chacune des amorces : 1µM final)
-dNTPs (10 mM)	1 µL (ATP, TTP, GTP et CTP: 0.2 mM final)
-ADNg	0.5 µg
-Eau déminéralisée <i>q.s.p.</i>	50 µL

La polymérase « Platinum® High fidelity » (Invitrogen) a aussi été utilisée, selon les recommandations du kit. A la différence de la GoTaq®, elle amplifie l'ADN avec une fidélité accrue et forme des produits PCR avec des bouts francs. La température d'élongation est de 68°C au lieu de 72°C pour la GoTaq. Le programme d'amplification PCR est présenté sur la **figure 3.3**.

Tableau 3.5: Amorces utilisées pour la recherche et le clonage de gènes d'intérêt

Gène cible et tailles du produit PCR	Nom de l'amorce	Séquence 5' → 3'	Tm °C	Nombre de mers
ADNr 16S amorces universelles				
≈ 1600 pb	8-F	AGAGTTTGTATYMTGGCTCAG	53	20
	1492-R	CGGTTACCTTGTTACGACCT	53	20
ADNr16S partiel de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
501 pb	P16S-F	GGTCTAATACCGAATACACCCTTCT	60	25
	P16S-R	CCAGGAATTCCAGTCTCCC	59	19
<i>alkB1</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
301 pb	AlkB1F	CGTGATCATGGGTGCCTAC	62	19
	AlkB1R	CCAGAACGTCTCACCGAAG	62	19
<i>alkB1-rubA1-rubA2-tetR</i> : clonage dans <i>pHLD69</i>				
2418 pb	*alkB1C-F	CCGAGCATTGCTGAAGGT	59	18
	*alkB1C1-R	CGCTTGTCTGGTGGAGAGG	60	18
3063 pb	*alkB1C2-R	GCGACCTTGTTAGTCCAGACC	59	20
<i>alkB1-rubA1-rubA2</i> : clonage dans <i>pET9a</i> et <i>pET15b</i>				
1272 pb	*NdeI_alkB1C-F	CGCATATGTCCTCAAGCCCGACGTCG	55	24
	*BamH_alkB1C-R	GGCCTAGGTCACGCCTTGCCCTCCTTGC	55	27
1446 pb	*BamH_rubA1C-R	GGCCTAGGTCACCTCTTAACCTCCCATCTC	52	29
1629 pb	*BamH_rubA2C-R	GGCCTAGGTCACGGCCGGGCGACTTC	57	26
<i>alkB2</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
≈ 208 pb	AlkB2-F	CCTGATGTTTCCTCGTGATCC	62	20
	AlkB2-R	CTTGTCGACGTGCGTTCATC	62	19
<i>alkB2-ssh</i> : clonage dans <i>pHLD69</i>				
1667 pb	AlkB2C-F	ATGGACGTCATCGAATCCAC	60	20
	AlkB2C-R	TGGTATCTGGAACGGCTCTC	60	20
2592 pb	AlkB2CBIS-R	CTGATTCGGACTCTGGTTCC	60	20
<i>alkB2</i> : clonage dans <i>pET19a</i> et <i>pET15b</i>				
1667 pb	NdeI_alkB2-F	CCCATATGCCGATTCAGCAGCGCTC	56	25
	BglSpe_alkB2-R	CTCTAGACTAGTCAGCCGTACCGCCGCAATA	56	31
Estérase putative de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
≈975 pb	Este-F	CATATGATGAGACTTCTTGACAGGATTCG		29
	Este-R	AGATCTTCAGAGAAGGTGCGCCTG		24
<i>cyp153</i> de <i>M. austroafricanum</i> IFP 2173				
1261 pb	CYP153vB-F	GCATATGACCGAAATGACGGTG	50	21
	CYP153vB-R1	CGGATCCTCAGGCGTTGATGCGCAC	53	25
182 pb	CYP153d-F	ATHATGGCNGTNGARACNAAYCC	55	23
	CYP153d-R	TCCATNGTNGCNARRTTYTCNGG	55	23
<i>cyp153</i> amorces universelles (Van Beilen <i>et al.</i>, 2005)				
339 pb	P450fw1	GTSGGCGGCAACGACACSAC	58	20
	P450rv3	GCASCGGTGGATGCCGAAGCCRAA	58	24

Les sites de restrictions intégrés aux oligonucléotides sont soulignés. La légende figure ci-dessous, dans le sens 5' → 3' :

NdeI : CATATG BamHI : GGATCC BglIII : AGATCT SpeI : ACTAGT

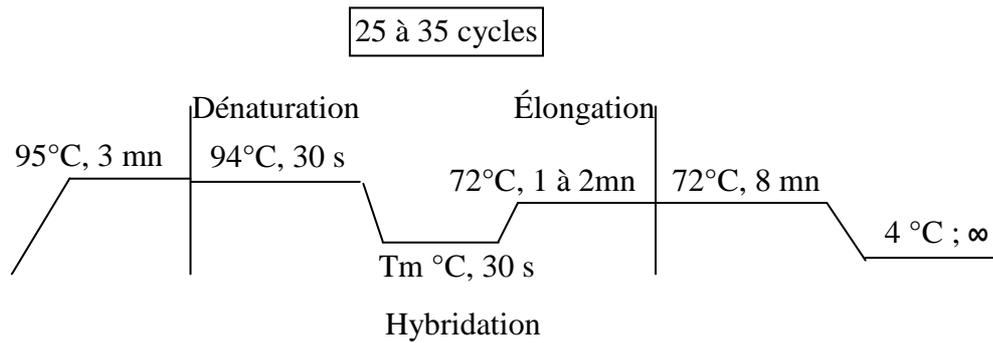


Figure 3.3 : Programme PCR d'amplification de l'ADNg

Pour analyser le produit de l'amplification, 10 μ L de chacune des réactions de PCR sont déposés sur gel d'agarose préparé dans du TBE (Tris-Borate-EDTA) 0.5X. La concentration d'agarose varie de 0,5 % pour les gros fragments (> à 3000 pb) à 2 % pour les très petits fragments (\approx 200 pb). Les marqueurs d'ADN GeneRuler™ 100 pb ou 1 kb (Fermentas) sont aussi déposés pour calibrer le gel. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium et les bandes d'ADN révélées sous lampe U.V. à 254 nm. Le gel est photographié à l'aide d'une caméra (SYNGENE) reliée à un ordinateur avec un logiciel d'acquisition Gel Snap (SynGene, Cambridge, UK).

3.4 Clonage de fragments d'ADN

3.4.1 Purification de fragments d'ADN

L'insert est issu soit d'un produit PCR (§ 3.3), soit de la digestion d'un vecteur par des enzymes de restriction (Eurogentec, Fermentas ou Promega) dans le tampon adéquat pendant 1 à 3 h à 37°C. La réaction enzymatique de digestion est interrompue par 3 μ L pour 20 μ L de volume réactionnel d'une solution « stop » composée de 40 % de sucrose, d'EDTA 50 mM et de bleu de bromophénol. Le produit PCR ou de digestion est déposé sur gel d'agarose tel que décrit dans le §3.3. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium et révélé aux U.V. à 254 nm sur un transilluminateur. L'insert est découpé à l'aide d'un scalpel et purifié avec le kit QIAEX II (Qiagen).

3.4.2 Préparation du vecteur de clonage

Pour l'utilisation du vecteur digéré, il est préférable de ne pas le déposer sur gel comme lors de la purification de fragments d'ADN (§ 3.4.1), mais de le purifier de ses sels et de ses enzymes directement avec le kit de purification QIAEX II (Qiagen).

3.4.3 Utilisation du kit de clonage pDrive

Lorsque la PCR a été réalisée avec une taq polymérase qui coupe les gènes avec des bouts francs (ce n'est pas le cas pour la GoTaq® (Promega), majoritairement utilisée), il est nécessaire de faire une addition d'adénosine aux extrémités des fragments de gène avant de l'insérer dans le plasmide pDrive. Le cas échéant, le kit Qiagen A-Addition est utilisé. La ligation est réalisée avec le kit de clonage pDrive (Qiagen) et la T4 ligase (Promega).

3.4.4 Ligation et clonage

3.4.4.1 Ligation

Les ligations vecteur-insert ont été réalisées à température ambiante à l'aide du kit « Rapid DNA ligation » (Fermentas) selon les recommandations du kit avec la T4 ligase (Promega). Un ratio molaire vecteur / insert variant de 1:1 à 1:5 a été utilisé.

3.4.4.2 Préparation des cellules compétentes

Les cellules d'*E. coli* DH5 α , BL21 DE3 ou Rosetta sont mises en culture dans un milieu Phi B, puis elles subissent un traitement avec des tampons riches en sels afin de rendre les membranes plus perméables. Le milieu de culture des cellules Phi B est composé de 20 g.L⁻¹ de Bactotryptone, 5 g.L⁻¹ de Bacto yeast extract avec un pH ajusté à 7,6. 20% de MgSO₄, 7H₂O stérile sont ajoutés juste avant l'utilisation du milieu. Après une préculture et une culture de 100 mL atteignant une D.O.₆₀₀ comprise entre 0,4 et 0,8, la culture est centrifugée à 5000 g à 4°C, et le culot repris dans du tampon RF1 composé de 30 mM d'acétate de potassium, 100 mM de KCl, 10 mM de CaCl₂, 50 mM de MnCl₂ et de 15% (v/v) de glycérol. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu est stérilisé par filtration. Après une centrifugation à 5000 g à 4°C le culot est alors mis en suspension dans du tampon RF2 composé de 10 mM MOPS, 10 mM KCl, 75 mM CaCl₂ et 15% glycérol. Le pH est ajusté à 6,8 et le milieu est stérilisé par filtration. Les cellules sont alors réparties par fractions aliquotes de 50 μ L dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL en veillant à bien laisser les tubes et les cellules dans la glace. Ces dernières sont conservées à -80°C.

3.4.4.3 Transformation des cellules compétentes

5 μ L de mélange de ligation sont ajoutés à 50 μ L de cellules chimiocompétentes d'*Escherichia coli* DH5 α ou BL21 DE3 ou Rosetta. Le mélange est incubé 30 mn sur la glace. Un choc thermique de 1 mn à 37 °C est réalisé puis 450 μ L de milieu LB sont ajoutés. Les cellules sont incubées 1 h à 37°C, puis 50 μ L de suspension sont étalés sur milieu gélosé LB contenant l'antibiotique approprié. Les boîtes de Petri sont incubées une nuit à 37°C.

3.4.4.4 Sélection des clones positifs par PCR sur colonie

Les clones sont repris dans 15 µL de H₂O dans des tubes de 0,5 mL. Puis 2 µL de suspension sont transférés dans un tube PCR auquel est ajouté 10 µL de mix PCR (comme décrit dans le § 3.3). Afin de faire éclater les cellules d'*E. coli* puis de dénaturer l'ADN, le programme PCR commence avec 5 mn d'incubation à 95°C au lieu de 3 mn classiquement. Après analyse sur d'agarose des produits PCR, un des clones ayant donné une réponse positive (fragment de PCR de la taille attendue) est mis en culture sur milieu LB, en présence de l'antibiotique de sélection la nuit à 37°C.

3.4.4.5 Extraction de plasmides

Après une culture de 30 à 200 mL sur milieu LB en présence d'antibiotique incubée à 37 °C sur la nuit, une partie des cellules contenant le plasmide et son insert sont centrifugées puis les plasmides sont extraits par le kit NucleoBond PC-100 (Macherey-Nagel).

3.4.4.6 Vérification de la présence de l'insert dans les plasmides par digestion

Une digestion (d'au minimum 100 ng de plasmide) avec les enzymes de restriction appropriées est réalisée pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide. Le produit digéré 1 h est alors déposé sur gel d'agarose (§ 3.3) avec un marqueur d'ADN GeneRuler™ 100 pb ou 1 kb (Fermentas). Après migration et coloration la taille des produits digérés est visualisée sur la photo du gel réalisée sur lampe UV. Si la taille du produit digéré est bonne, la souche ayant servi à la préparation du plasmide est stockée à – 80°C dans 40% de glycérol.

3.5 Transformation de *Mycobacterium smegmatis*

3.5.1 Préparation de cellules compétentes

Une culture de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 ou mc²4517 est préparée dans 200 mL de milieu 7H9 pendant environ 48 h à 30°C jusqu'à obtenir une DO₅₅₀ comprise entre 3 et 4. Les cellules bactériennes sont refroidies dans la glace pendant 50 mn en agitant toutes les 10 mn. La culture est répartie dans quatre tubes Falcon de 50 mL préalablement refroidis dans la glace. Les cellules sont alors centrifugées pendant 10 mn à 4°C à 5000 g. Le surnageant est éliminé et deux lavages successifs à l'eau distillée stérile sont effectués en réduisant le volume de moitié à chaque lavage. Un dernier lavage est effectué avec 5 mL de glycérol 10%. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans le volume minimum nécessaire à l'électroporation (Les cellules sont concentrées 100 à 500 fois par rapport au volume initial de la culture). Les cellules électrocompétentes peuvent être réparties en tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL à raison de 100 µL/tube, puis stockées à -80°C.

3.5.2 Transformation par électroporation et sélection des transformants

A 100 µL de suspension cellulaire, sont ajoutés 1 à 5 µL de plasmide (1 µg) dilué dans du tampon TE. Le mélange est vigoureusement vortexé puis laisse au repos 10 mn dans la glace. La solution est transférée dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie (Eurogentec® 200 µl ; Ø = 2 mm). Cette dernière est placée dans la chambre de l'électroporateur (Eppendorf™ Electroporator 2510). Un pulse de 2500 V est appliqué puis les cellules sont immédiatement placées dans un tube Falcon 50 ml contenant 5 mL de milieu PTYG₂ pour *M. smegmatis* mc²155 ou 5 mL de milieu 7H9 pour *M. smegmatis* mc²4517 et incubées pendant 4 h à 30°C sous agitation (150 rpm) afin de permettre l'expression des gènes de résistance à l'antibiotique porté par le plasmide. 100 µl de suspension cellulaire sont étalés en triplicata sur boîte de Petri PTYG₂₀ pour *M. smegmatis* mc²155 ou sur boîte de Petri 7H10 pour *M. smegmatis* mc²4517 avec l'antibiotique sélectif du plasmide. Les boîtes de Petri sont incubées à 30°C environ 1 semaine.

3.6 PCR couplée à la transcription inversée

3.6.1 Méthode d'extraction des ARN totaux de souches de *Mycobacterium*

Pour les expériences d'extraction d'ARN, le matériel, les solutions et la vaisselle ont été préparés de manière à éviter la contamination par des RNases selon les procédures standards (Sambrook *et al.*, 1989).

L'ARN total de *Mycobacterium* est extrait à partir de 50 mL d'une culture à D.O._{600nm} de 0,7. Après incubation 30 mn sur glace, les cellules sont centrifugées (8000 g pendant 10 mn à 4°C) et conservées sur glace. Par la suite, le culot est repris dans un volume total de 200 µL dans du tampon Tris-HCl 20 mM – EDTA 5 mM pH 8 avec 1.5 mg.mL⁻¹ de lysozyme et 25 µg.mL⁻¹ de lysostaphine (Sigma). Le mélange est incubé à 37°C durant 30 mn. 700 µL de RNAwiz™ (Ambion) sont ajoutés par la suite et le mélange est vortexé pendant 15 s. Le mélange est ensuite fractionné dans des tubes de 1.5 mL (450 µL/tube) contenant 250 mg de billes de zirconium-silica (0,1 mm de diamètre). Les tubes sont placés dans un adaptateur pour vortex (Ambion) et vortexés pendant 10 mn. Le protocole du kit RiboPure™-Bacteria (Ambion) est suivi pour la fin de l'extraction. La quantité d'ARN est dosée sur 1 µL au Nanodrop (Nanodrop Technologies). L'ARN est alors traité à la TurboDNase (Ambion) selon le protocole du kit. L'ARN est précipité avec 1/10^{ème} volume d'acétate de sodium 3 M à pH=5.2 et 2 volumes d'éthanol à 95% à -80°C.

3.6.2 PCR couplée à la transcription inversée (RT-PCR)

Les expériences de RT-PCR ont été mises en œuvre selon le protocole du kit « One step RT-PCR » de PROMEGA (Madison, WI, USA) tel qu'il est décrit par le fabricant. 1 ng d'ARN a été utilisé à chaque tentative de RT-PCR avec, à chaque fois en parallèle, une amplification PCR contrôle positive (et négative) avec (ou sans) 1 ng d'ADNg de *M. austroafricanum* IFP 2173.

Les conditions de RT-PCR sont les suivantes :

- 1 Étape de reverse transcription : 45 mn à 45 °C
- 2 Cycle PCR : 25 à 35 cycles (variable en fonction de l'intensité du signal) :
 - 95 °C 30 s
 - 55-62 °C 30 s à 1 mn (en fonction du Tm des amorces et de la taille de l'amplicon)
 - 72 °C 1 mn
- 3 Extension finale : 72 °C 10 mn
- 4 Conservation des échantillons : ∞ à 4 °C

4 Méthodes biochimiques

4.1 Préparation des extraits protéiques

4.1.1 Extraits bruts

Des cultures de *M. austroafricanum* IFP 2173 sont réalisées sur le milieu MMSYE supplémenté avec l'une des sources de carbone suivantes : 2-EHN (500 mg.L⁻¹), acétate (4 g.L⁻¹), glucose (2 g.L⁻¹), succinate (4 g.L⁻¹), éthanol (1 g.L⁻¹) ou tween 80 (2,5 g.L⁻¹). Après croissance jusqu'à une D.O.₆₀₀ ~0,8, les cellules sont récoltées par centrifugation à 12 000 g pendant 15 mn à 4°C. L'extraction des protéines est faite autant que possible à 0-4°C.

Les culots cellulaires sont lavés deux fois par du tampon Tris 50 mM pH 8 additionné de EDTA 5 mM. Comme les cellules de *M. austroafricanum* IFP 2173 sont très hydrophobes, afin de perdre le moins de cellules possible, les culots sont congelés à -20°C puis décollés congelés à l'aide d'une spatule pour être placés dans un tube à fond conique en verre. Du tampon Tris-HCl 50 mM pH 8 additionné de 5 mM d'EDTA est alors ajouté dans le tube à raison de deux fois le volume du culot de cellules. Les cellules sont lysées par traitement 10 mn aux ultrasons avec la microsonde conique d'un appareil Vibra Cell (Bioblock Scientific) réglé à une amplitude de 20%, avec une alternance de séquences « on/off » de 5 s. Afin d'éviter l'échauffement, le tube est placé dans de la glace pendant toute la durée de la sonication. Un extrait brut de protéines est ensuite obtenu par centrifugation (13 000 g, 10 mn à 4°C) pour éliminer les débris cellulaires.

4.1.2 Fractions soluble et membranaire

L'extrait brut est centrifugé pendant 1 h à 240 000 g à 4° C à l'aide d'une ultracentrifugeuse Optima TLX (Beckman). Le surnageant constitue alors la fraction soluble. Le culot de centrifugation est repris par du tampon HEPES 25 mM pH 7.5 contenant 10 % d'éthylène glycol, la solubilisation est effectuée par aspiration et refoulement successifs à l'aide d'une pipette.

4.1.3 Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé selon la méthode de (Bradford, 1976). Une gamme d'étalonnage de 0 à 12.5 µg de BSA (bovin serum albumin) est réalisée. Un millilitre de colorant est ajouté. Après une homogénéisation par retournement et une incubation de 5 mn, la lecture de l'absorbance est effectuée à 595 nm. Les échantillons protéiques sont dosés de la même façon sur 1 à 10 µL d'extrait protéique.

4.1.4 Isolement rapide de protéines par chromatographie d'affinité de type IMAC

Grâce à l'extrémité polyHistidine (His-Tag) introduite en N-ter par construction, les protéines recombinantes surproduites avec le vecteur pET15b peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité sur résine polymérique sur laquelle sont fixés des métaux divalents comme le cobalt, le nickel, le zinc. Le protocole de purification utilisé emploie une résine d'affinité de type TALON (BD Biosciences Clontech) sur laquelle est fixée du cobalt. La résine est conservée dans de l'EtOH 20%. La résine (30 mg essorée) est placée sur un minifiltre SpinX de 0,45 µm (Costar), adaptable sur tube de centrifugation Eppendorf. L'équilibration de la résine est effectuée avec 400 µL de tampon A (Tris-HCl 25 mM pH 7,5 + NaCl 0,5 M + glycérol 5%). La résine est essorée par une centrifugation de 0,5 s à 10 000 rpm. L'extrait protéique (≈ 50 à 200 µL), dialysé le cas échéant pour éliminer l'EDTA (chélateur des métaux incompatible avec la résine), est déposé dans le réservoir du filtre. Après 5 mn d'agitation à température ambiante, le surnageant est éliminé par centrifugation. Deux lavages sont alors effectués avec 500 µL de tampon A et un troisième avec 500 µL de tampon A contenant 10 mM d'imidazole. La faible concentration d'imidazole permet d'éliminer les protéines faiblement retenues sur la colonne. L'élution est réalisée avec 30 µL de tampon C, composé de Tris-HCl 25 mM pH 7,5, glycérol 5% et 0,15 M d'imidazole. L'éluat protéique est dénaturé avec 10 µL de SDS mix 4X et analysé par SDS-PAGE sur 10 µL.

4.2 Analyse des protéines par électrophorèse

4.2.1 Gels SDS PAGE

4.2.1.1 Gels Glycine-SDS-PAGE

Les protéines présentes dans les extraits bruts sont analysées par électrophorèse en conditions dénaturantes sur gels de polyacrylamide contenant 12.5% d'acrylamide / bisacrylamide (37,5:1) et réalisés selon (Laemmli, 1970).

Les protéines solubles sont dénaturées pendant 3 mn à 100°C en présence de 1 % de SDS, 10 % de glycérol, 2,5 % de β -mercaptoéthanol 0,001 % de bleu de Bromophénol dans du Tris-HCl 12,5 mM pH 6,8. Une fraction aliquote de protéines contenant de 5 à 50 μ g de protéines est déposée dans chaque puits ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire (Protein Ladder, 10-200 kDa, Fermentas). La séparation des différentes polypeptides est effectuée par électrophorèse à ampérage constant ($A = 30$ mA). Le tampon de migration est composé de 25 mM de Tris, 200 mM de Glycine et de 0,1 % de SDS.

4.2.1.2 Gel Tricine-SDS-PAGE

Ces gels ont servi à analyser des protéines membranaires, car ils offrent une meilleure résolution des protéines hydrophobes. Les protéines membranaires sont dénaturées pendant 15 mn à 1 h à 37°C dans un mélange de SDS (4 %), β -mercaptoéthanol (10 %) glycérol (40%) Bleu de Bromophénol (0,004%) et Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 dilué dans 3 volumes de mélange protéique. Les gels ont été réalisés selon le protocole décrit par Schagger (2006).

4.2.2 Electrophorèse bidimensionnelle

4.2.2.1 Préparation des échantillons pour la première dimension

4.2.2.1.1 Dialyse des extraits solubles de protéines

Les boudins de dialyse, contenant les fractions solubles de protéines additionnées de benzonase (Merck) (1 μ L pour 100 μ L), sont trempés 2 à 5 h dans du tampon phosphate 5 mM pH 7,5 et $MgCl_2$ 1 mM à 4 °C, puis toute la nuit dans de l'eau milliQ à 4 °C. Le boudin de dialyse a un seuil de coupure de 3500 Da (Spectra/Por®). Les extraits dialysés sont concentrés par lyophilisation si la teneur en protéines est jugée trop faible pour l'analyse sur gel.

4.2.2.1.2 Hydratation des bandelettes avec l'extrait protéique

La quantité de protéines à déposer sur la bandelette doit être de 200 à 250 μ g pour une coloration à l'argent ou de 400 μ g pour une coloration au bleu de Coomassie.

Les protéines sont mélangées dans une solution contenant de l'urée (9M), du CHAPS (2%), du DTT (0,15 %) du bleu de Bromophénol (0,02 %) et des Pharmalites (pH 3-10, Sigma) (2 %). Le volume total de mélange doit être de 450 µL. Afin de bien homogénéiser le mélange et dissoudre l'urée, les échantillons sont agités dans un bain sec à 30°C. Puis ils sont centrifugés 5 mn à 14 000 g pour éliminer la fraction insoluble. Les bandelettes ReadyStrips™ (18 cm - pH 4-7, Biorad) sont réhydratées pendant 5 à 6 h à température ambiante avec la préparation protéique, au préalable centrifugée, dans le compartiment de la cuve de réhydratation en la répartissant sur toute la longueur. La bandelette est glissée dans le compartiment côté gel en dessous en veillant à ne pas faire de bulles. De l'huile de paraffine recouvre le tout pour éviter la déshydratation au cours du gonflement de la bandelette.

4.2.2.2 Isoelectrofocalisation (IEF)

Les bandelettes sont placées dans la cuve de l'appareil d'isofocalisation (LKB Multiphore II, Pharmacia) en respectant la polarité. Des ponts de papier imbibés d'eau assurent la continuité électrique entre les bandelettes et les électrodes placées sur les ponts. L'ensemble est recouvert d'huile de paraffine et maintenu à température constante par un circuit d'eau de refroidissement. L'électrophorèse se fait dans les conditions suivantes :

150 V	3 h	0.2 mA	10W
300 V	2 h	0.2 mA	10W
700 V	1 h	0.2 mA	10W
1500 V	1 h	0.2 mA	10W
3500 V	20 h	0.2 mA	10W

L'isofocalisation complète des protéines requiert un total de 70 000 V.h. A la fin de l'IEF, les bandelettes sont stockées à -20°C dans des tubes en verre bouchés.

4.2.2.3 Equilibration des bandelettes pour la deuxième dimension

La solution d'équilibration est composée d'urée (6 M) de Tris (50 mM), de glycérol (30 %), de SDS (1 %) et de bleu de bromophénol (0,01 %). Le pH est ajusté à 8,8.

2,5 g.L⁻¹ de DTT sont ajoutés extemporanément à la solution d'équilibration. Les bandelettes sont incubées avec 5 mL de solution d'équilibration 30 mn à température ambiante avec agitation.

4.2.2.4 Deuxième dimension

De grands gels (200 x 200 x 1 mm) contenant 12,5 % d'acrylamide sont réalisés en tampon Tris-glycine-SDS. Le mélange d'acrylamide est soumis à un dégazage sous vide pendant 10 mn pour favoriser la polymérisation avant l'ajout de persulfate. Il n'y a pas de gel de concentration, la bandelette est directement placée sur le gel de résolution et recouverte

d'agarose à 1 % (dans le tampon de migration). L'ampérage est réglé à 15 mA en début d'électrophorèse pendant 20 mn. puis à 40 mA par gel jusqu'à la fin (soit environ 4-5 h).

4.2.3 Coloration au bleu colloïdal

Après démoulage du gel, les protéines sont fixées par trempage dans un mélange de 30 % d'éthanol, 2 % d'acide orthophosphorique 85 % (3 à 4 fois 30 mn ou pendant la nuit). Le gel est alors rincé par 2% d'acide orthophosphorique 85 % (3 fois 15 mn). Enfin, le gel est coloré dans une solution qui contient (dans l'ordre) : 2% d'acide orthophosphorique 85%, 12,5% de sulfate d'ammonium, 20 % d'éthanol et 5 mL.L⁻¹ de Bleu G-250 à 2% (préparé dans l'eau chaude). Le gel est conservé dans de l'eau contenant 2% de glycérol, photographié, et parfois séché au four (Easy Breeze gel Dryer, Hoefer Scientific Instrument) entre deux feuilles de papier cellophane.

4.2.4 Découpage des gels d'électrophorèse

Les spots ou bandes colorées correspondant aux protéines d'intérêt séparées par électrophorèse 1D ou 2D sont découpées du gel à l'aide d'un scalpel ou d'un emporte pièce sur une plaque de verre préalablement nettoyée au savon et à l'eau chaude puis à l'alcool pour éliminer toute trace de kératine. Les spots ou bandes sont placées dans des tubes « Biopur » (Eppendorf) de 0,5 mL avec 5% d'éthanol.

4.3 Analyse LC-MS-MS des spots

Ces analyses ont été effectuées par Mathilde Louwagie et Laurianne Kuhn du laboratoire d'Etude et de Dynamique des Protéomes du CEA de Grenoble.

4.4 Activité sur gel d'électrophorèse

Afin de visualiser une activité estérase ou peroxydase sur gel, les échantillons protéiques à analyser sont séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes. Pour ce faire, l'extrait protéique est mélangé à quelques mg de sucrose et de bleu de bromophénol avant le dépôt sur un gel d'acrylamide à 12,5%. Le gel est préparé en tampon Tris-Borate 0,1 M, pH 9.

4.4.1 Activité estérase

L'activité estérase est mise en évidence par une coloration spécifique au Fast Blue RR (Sigma) en présence d' α -naphtyl acétate (Sigma) Après migration à ampérage constant 30 mA, le gel est coloré dans un tampon phosphate 0,1M pH 6.2 contenant 2% d' α -naphtyl

acétate et 5 % de Fast Blue RR. La lecture est effectuée après 15 mn d'incubation. L'apparition d'une coloration noire est révélatrice de l'activité.

4.4.2 Activité peroxydase

La présence d'un cytochrome P450 peut être mise en évidence par une coloration au TMBZ (3,3',5,5' tétraméthyl benzydine, Sigma). Après séparation électrophorétique, le gel est immergé à l'abri de la lumière dans une solution de TMBZ (450 mg.L⁻¹) dans une solution d'acétate de sodium 25 mM, pH 5 contenant du méthanol (30%). Après une heure d'incubation, du peroxyde d'hydrogène est ajouté à raison de 0,1 % final. Après 15 mn d'incubation avec une agitation, une coloration bleue témoigne de l'activité peroxydase.

4.5 Western Blot

Cette méthode a pour objectif de vérifier la présence de protéines recombinantes obtenues avec le vecteur pET15b ayant une étiquette poly-histidine par détection immunoenzymatique dite de Western Blot.

2 µg de protéine purifiée ou 20 à 100 µg d'extrait protéique total sont séparés sur un gel SDS-PAGE. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Optitran BAS83) sous l'effet d'un champ électrique (Fast-Blot B33, Biometra. 150V pendant 20mn). Une coloration rapide de la membrane au rouge Ponceau-S (1% dans l'acide acétique 5% (v/v)) permet de vérifier le transfert de protéines et de découper la bande du marqueur. Après rinçage dans du PBS-Tween (NaCl 0,14 M ; KCl 2,7 M ; KH₂PO₄ 1,5 mM ; Na₂HPO₄ 8,1 mM et Tween 20 0,5% (v/v)), la membrane est incubée avec de la BSA (3% p/v) dans du PBS-Tween pendant 30 mn à 1 h. La membrane est ensuite incubée avec des anticorps anti-His-Tag couplés à la peroxydase Sigma (d = 1/3000) dans du PBS-Tween pendant 1 h. Après 5 lavages de 2 mn dans du PBS-Tween, la membrane est essorée légèrement avec un papier absorbant puis recouverte de réactifs ECLTM (Amersham) pendant 1 mn. La membrane est égouttée et placée dans une cassette contre un film photographique ECLTM. Après une durée d'exposition de 10 s à quelques mn selon l'intensité du signal, le film est révélé selon un procédé photographique classique.

5 Outils bioinformatiques

Les séquences de nucléotidiques ou peptidiques ont été alignées par le logiciel ClustalX. Les arbres phylogéniques ont été réalisés selon la méthode du Neighbour Joining et visualisés avec le logiciel TreeView. Ces logiciels sont téléchargeables gratuitement sur le site suivant : http://mybiopack.ifrance.com/mybiopack_en.html.

RESULTATS

1 Sélection de souches dégradant le 2-EHN

Au début de ce projet de thèse, la question de la biodégradabilité du 2-EHN était en suspens car aucune étude n'avait été menée pour déterminer quels pouvaient être les critères importants présidant à biodégradation de ce composé. Nous étions en lieu de craindre que la biodégradabilité du 2-EHN serait difficile pour les raisons suivantes :

- la rareté dans l'environnement des microorganismes dotés de l'équipement enzymatique pour dégrader les composés branchés;
- la difficulté d'accès des microorganismes à un substrat quelque peu volatil (tension de vapeur de 27 Pa à 20°C),
- et la toxicité d'un substrat, légèrement soluble dans les milieux de culture mais cependant largement hydrophobe ($\log K_{OW} = 5,24$).

L'ensemble de ces éléments devait être pris en compte pour définir les conditions de sélection de micro-organismes appropriés.

Pour sélectionner des souches capables de dégrader du 2-EHN, il convenait de disposer d'un test de dégradation adapté aux particularités du substrat. Le test de Sturm a été considéré à l'origine car il est utilisé couramment pour mesurer la biodégradabilité des produits commerciaux (OCDE). Il s'agit d'un test où le composé à tester est soumis à une biomasse cellulaire constituée par une boue de station d'épuration (STEP) d'eaux urbaines. La dégradation est alors mesurée par la production totale de CO₂ piégé en milieu alcalin. Comme l'a noté justement Battersby *et al.* (1999), le test de Sturm n'est applicable qu'aux produits organiques solubles dans l'eau et ayant une faible volatilité. Ce test ne convenait donc pas pour le 2-EHN qui est doté d'une solubilité restreinte (12,6 mg.L⁻¹) et d'une tension de vapeur appréciable (27 Pa à 20°C).

Un autre test, celui défini par la norme NF ISO 14593 d'octobre 2005 sur "l'évaluation en milieu aqueux de la biodégradabilité aérobie ultime des composés organiques par analyse du carbone inorganique dans des récipients hermétiquement clos" pouvait être également envisagé, puisque le 2-EHN est un composé volatil. Ce test dit "du CO₂ dans l'espace de tête" se déroule dans une fiole fermée, avec un faible volume de liquide, contenant des microflores de boues de station d'épuration urbaine (STEP), et un espace de tête suffisamment grand pour contenir

l'oxygène nécessaire à la dégradation du substrat. Le temps du test de dégradation est de 28 jours et la dégradation du substrat résiduel est évaluée par la mesure du CO₂ produit dans l'espace de tête de la fiole et du COT (carbone organique total) résiduel dans le milieu. La quantité de substrat est de 2 à 40 mg.L⁻¹. Pour appliquer le test du "CO₂ dans l'espace de tête" au cas du 2-EHN, il eût fallu que le 2-EHN soit d'avantage soluble. Compte tenu de la pression de vapeur saturante et d'après la loi des gaz parfaits, 2 mg.L⁻¹ de 2-EHN environ sont contenus à saturation dans la phase vapeur à 20°C et de l'ordre de 3 mg.L⁻¹ à 30°C, température à laquelle s'effectuent les tests. A saturation, peu de 2-EHN est donc solubilisé et accessible au micro-organisme dans la phase aqueuse (12,6 mg.L⁻¹ à 20°C). Dans les conditions du test "CO₂ dans l'espace de tête", les quantités de substrat était alors trop faibles pour conduire à des mesures précises du substrat.

Nous avons donc préféré nous inspirer du test mis au point pour la biodégradabilité des gazoles (Penet *et al.* 2004), celui-ci autorisant de surcroît l'examen des cas où la biodégradation du substrat est incomplète et pour lesquels s'accumulent certains métabolites. Afin de prendre en compte le caractère inhibiteur probable du substrat, le 2-EHN a été introduit dans le réacteur après dissolution dans une phase solvant inerte non métabolisable (non aqueous phase liquid ou NAPL, dans la terminologie anglo-saxonne) telle que 2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane (HMN). La phase NAPL sert alors de réservoir pour le substrat hydrophobe et atténue la concentration solubilisée dans le milieu. Au fur et à mesure de sa consommation, le substrat est transféré de la phase solvant vers le milieu de culture. De la sorte, l'inhibition par excès de concentration de substrat a toutes chances d'être levée.

A l'aide du test défini pour le 2-EHN, les premiers essais de biodégradation ont été effectués en utilisant des microflore de STEP urbaines, puis en utilisant des microflore de raffineries. Les tests ont été étendus à des souches pures de collection qui étaient connues pour leur capacité de dégradation des hydrocarbures. Comme nous le verrons, certains micro-organismes présentent une capacité de dégradation intéressante.

ARTICLE 1

Floriane Solano-Serena ¹*, Elodie Nicolau ², Grégory Favreau ¹, Yves Jouanneau ³ & Rémy Marchal ²

Biodegradability of 2- Ethylhexyl nitrate (2-EHN), a cetane improver of diesel oil

¹ Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, EA 1068
Ecole Nationale d'Ingénieurs de Limoges, Université de Limoges
Parc ESTER Technopole
87068 Limoges Cedex, France

* Author to whom all correspondence should be addressed: leglise@ensil.unilim.fr

² Département de Biotechnologie, Institut Français du Pétrole,
92852 Rueil-Malmaison Cedex, France

³ Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV
CEA, CNRS, Université Joseph Fourier UMR 5249
38054 Grenoble, France

Accepté dans Biodegradation le 11 juin 2008.

Online first : DOI 10.1007/s10532-008-9202-6

Biodegradability of 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN), a cetane improver of diesel oil

Floriane Solano-Serena · Elodie Nicolau ·
Grégory Favreau · Yves Jouanneau ·
Rémy Marchal

Received: 23 October 2007 / Accepted: 11 June 2008
© Springer Science+Business Media B.V. 2008

Abstract The 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN) is currently added to diesel oil to improve ignition and boost cetane number. The biodegradability of this widely used chemical needed to be assessed in order to evaluate the environmental impact in case of accidental release. In aerobic liquid cultures, biodegradation of 2-EHN was assessed in biphasic liquid cultures using an inert non-aqueous phase liquid such as 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN) as solvent for the hydrophobic substrate. 2-EHN was found to be biodegradable by microbial communities from refinery wastewater treatment plants, but was recalcitrant to those of urban wastewater treatment facilities. Out of eighteen hydrocarbon-polluted or non-polluted soil samples, six microbial populations were also able to degrade 2-EHN. However, strain isolation from these microbial populations was rather

difficult suggesting close cooperation between members of the microbial communities. Specific axenic bacterial strains selected for their ability to catabolize recalcitrant-hydrocarbons were also tested for their capacity to degrade 2-EHN. In liquid cultures with HMN phase as non-aqueous phase liquid, some *Mycobacterium austroafricanum* strains were found to degrade and mineralize 2-EHN significantly.

Keywords 2-Ethylhexyl nitrate ·
Biodegradation · Mineralization ·
Soil microbial population · *Mycobacterium*

Abbreviations

2-EHN	2-Ethylhexyl nitrate
MTBE	Methyl <i>tert</i> -butyl ether
NOAEL	No observed adverse effect level
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonane
NAPL	Non-aqueous phase liquid
WWTP	Wastewater treatment plant

Introduction

The 2-Ethylhexyl nitrate (2-EHN), the nitric acid ester of 2-ethyl-1-hexanol (Fig. 1), is currently added in significant amounts (0.05%–0.4%) to diesel oil to improve ignition and boost cetane number (Guibet and Faure 1999; Bornemann et al. 2002). 2-EHN is a large-scale commodity, the worldwide production of

F. Solano-Serena (✉) · G. Favreau
Groupement de Recherche Eau Sol Environnement, EA
1068 Ecole Nationale d'Ingénieurs de Limoges,
Université de Limoges Parc ESTER Technopole, 87068
Limoges Cedex, France
e-mail: leglise@ensil.unilim.fr

E. Nicolau · R. Marchal
Département de Biotechnologie, Institut Français du
Pétrole, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France

Y. Jouanneau
Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV
CEA, CNRS, UMR 5249, Université Joseph Fourier,
38054 Grenoble, France

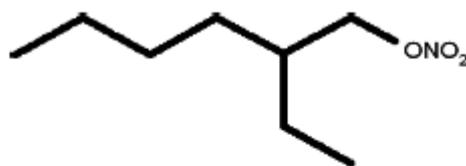


Fig. 1 Molecular structure of 2-Ethylhexyl nitrate ($C_8H_{17}NO_3$). Main physico-chemical properties (ATC 2006): vapor pressure at 20°C: 27Pa; solubility in water at 20°C: 12.6 mg l⁻¹; logK_{ow}: 5.24; liquid density: 0.96

which is estimated to be about 100,000 tons per year. It has long been considered as presenting no particular risk to human health. 2-EHN was also non-mutagenic according to the Ames test. Upon acute oral or dermal administration to mammals, it seemed relatively non-toxic (ATC 2006). Nevertheless, 2-EHN has been found to be significantly more harmful when administered in repeated doses. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) in rats over a 28-day period was only 28 mg kg⁻¹ d⁻¹ (Someroja and Savolinen 1983). The low NOAEL level indicates that biodegradability may be a key factor in the overall 2-EHN environmental risk assessment. Indeed, in the case of accidental release biodegradability will determine the residual concentration in the environment and exposure may become chronic if no degradation occurs.

Under environmental conditions, many organic contaminants are biodegraded by local indigenous microorganisms (Röling and van Verseveld 2002). Removal of contaminants depends on the intrinsic biodegradability of molecules, on physical parameters existing on site, such as temperature and oxygen (Morgan and Watkinson 1989; Leahy and Colwell 1990) and on degradative capacity of local microbial populations. The biodegradation of contaminating molecules often involves cometabolism and cooperation between microorganisms (Marchal et al. 2003). In addition, strains with particular metabolic capacities, such as *Mycobacterium* or *Rhodococcus* bacteria (Sakai et al. 2004; Bogan et al. 2003; Ferreira et al. 2006), are frequently involved in the biodegradation of recalcitrant-hydrocarbons.

The intrinsic biodegradability of organic pollutants such as 2-EHN has to be determined since it is a key element in risk assessment. It is usually assessed using laboratory tests derived from those designed for commercial products (Strotmann et al. 2004).

However, as indicated by Battersby et al. (1999), current test guidelines designed for water-soluble, organic compounds with low volatility are unsuitable for most oil products. Tests have therefore been specifically designed for oil products (Battersby et al. 1999); they are performed using a pre-exposed inoculum with a duration of three months. Specific tests involving an oil-degrading microbial population and biological additives to enhance biodegradation have also been designed for particular products, such as bioremediation additives (Haines et al. 2005).

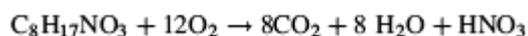
The intrinsic biodegradability of 2-EHN has received little investigation. 2-EHN was not found to be readily biodegradable in the standard CO₂ headspace test since the yield of biodegradation failed to attain 60% within 28 days (ATC 2006). As little information was available on aerobic biodegradation of 2-EHN, our study aimed at evaluating the intrinsic biodegradability of 2-EHN under different laboratory conditions. For this purpose, microbial populations from wastewater treatment plants and from soil were used. 2-EHN biodegradation by some *Actinobacteria* species was also investigated because of the recognized ability of these microorganisms to attack recalcitrant molecules.

Materials and methods

Culture medium

The vitamin-supplemented mineral salts medium described by Bouchez et al. (1995) was used as nutrient solution. The solution was autoclaved at 121°C for 20 min without vitamins, which were sterilized by filtration at 0.22 µm and added to the medium after cooling. The carbon source was 2-EHN at 768 mg l⁻¹ of culture medium (equivalent to 421 mg C l⁻¹ or 351 µmol C flask⁻¹) for microbial populations and 480 mg l⁻¹ (equivalent to 263 mg C l⁻¹ or 219 µmol C flask⁻¹) for pure strains.

The equation for complete mineralization of 2-EHN under aerobic conditions is:



The conditions used allowed aerobic biodegradation to occur under non limiting conditions, in particular with respect to oxygen, which was in excess in flask headspace.

Biodegradation

Microorganisms

A variety of sources were used for 2-EHN biodegradation tests:

- Samples from five distinct urban wastewater treatment plants (WWTP) and from two refinery WWTP treating water previously used along refinery treatment processes. Sludge was centrifuged at 3,000 g for 20 min and re-suspended in the nutrient solution at a final concentration of 1 g l⁻¹ (dry weight). After centrifugation (3,000 g for 20 min), the supernatant was discarded and sludge pellets were stored at -20°C for up to six months without significant loss of biodegradation capacity.
- Samples from ten non-polluted soils (samples 1 to 10) and from eight polluted soils (samples 11–18). Microbial suspensions were directly obtained by dispersing 5 g l⁻¹ of soil sample into the nutrient solution. The characteristics of the soil samples which had been used for diesel biodegradation (Penet et al. 2006) are indicated in Table 3.

Several pure strains (Table 1) were also used for 2-EHN biodegradation tests. These strains are mainly branched-hydrocarbon-degrading bacteria. Precultures were performed in liquid medium containing Tween 80 (2.5 g l⁻¹). 2-EHN biodegradation tests

were inoculated with centrifuged precultures at an optical density (580 nm) of 0.2.

Culture conditions

The biodegradation tests were performed in 120-ml flasks closed with Teflon-coated stoppers and sealed with aluminum caps. 2-EHN was added to 10 ml of inoculated culture medium in presence of 500 µl of 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane (HMN). HMN was used as a non-aqueous phase liquid (NAPL) to reduce the toxicity and volatility of 2-EHN. Cultures were incubated at 30°C with shaking (150 rpm). The overall aerobic biodegradation kinetics were regularly monitored by GC analysis of CO₂ in the flask headspace. CO₂ production was similarly monitored in control flasks without 2-EHN addition.

Experiments were carried out in duplicate. Abiotic controls supplemented with sodium azide (1 g l⁻¹) were performed under similar conditions. At the end of the incubation period, 2 ml of dichloromethane were introduced into the flasks and abiotic controls which were shaken for 1 h and then stored overnight at 4°C before analysis. The residual 2-EHN was determined by GC-FID-analysis of dichloromethane phase.

The abiotic recovery ratio of the substrate was calculated as 2-EHN recovered in the abiotic flasks

Table 1 Strains used in the study

Strain	Reference or sources
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP2012	Francois et al. (2002)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP2015	Lopes Ferreira et al. (2006)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP2138	IFP collection
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP2154	IFP collection
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP2155	IFP collection
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP2173	Solano-Serena et al. (2004)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> Spyr_Ge_1	J. C. Willison ^a
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> BHF004	J. C. Willison ^a
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> C6	Jouanneau et al. (2005)
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> ATCC 29678	Johnson et al. (2004)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> mc2155	Poupin et al. (1999)
<i>Mycobacterium</i> sp. IFP2009	Béguin et al. (2003)
<i>Mycobacterium</i> sp. 6PY1	Krivobok et al. (2003)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP2006	Chauvaux et al. (2001)
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP2007	Chauvaux et al. (2001)
<i>Pseudomonas citronellolis</i> ATCC 13674	Fall et al. (1979)
<i>Pseudomonas putida</i> Gpo1	Smith and Hyman (2004)

^a Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV—CEA, CNRS, Université Joseph Fourier UMR 5249, 38054 Grenoble, France

with respect to initial 2-EHN supplied. The 2-EHN biodegradation yield was the ratio of 2-EHN biodegraded in test flasks to substrate recovered in abiotic controls.

The net CO₂ production was calculated as the difference between the final quantities of CO₂ in the test flasks and in the hydrocarbon-free flask. The mineralization extent was the carbon ratio between the net CO₂ produced and the carbon content of the substrate at the beginning of the experiment. Mineralization yield was taken as the carbon ratio between the net CO₂ produced and the substrate consumed.

Strain isolation

Microbial populations enriched in 2-EHN biodegraders were obtained from 4-week-old subcultures. Strain isolation was performed on solid medium composed of the mineral salts solution (Bouchez et al. 1995) and 15 g l⁻¹ agar. Petri dishes were incubated at 30°C in sealed jars saturated with 2-EHN vapor as only carbon and energy source. Isolated strains were then tested in liquid cultures for their biodegradation capacity, 2-EHN being provided either through a liquid HMN phase (8 µl of 2-EHN in 0.5 ml of HMN) or a saturated headspace. Microbial growth was determined by optical density at 580 nm.

Chromatographic analyses

Carbon dioxide was measured with a Girdel Serie 30 chromatograph equipped with a catharometric detector and a CTRI column (Alltech). The carrier gas was helium and the column temperature was 60°C. The injector and detector temperatures were 100°C. Samples (250 µl) of the headspace gas in culture flasks were withdrawn with a gas-tight syringe and injected into the chromatograph for CO₂ analysis.

Residual 2-EHN was quantified with a Varian model 3400 gas chromatograph equipped with a flame ionization detector and a CP SIL 5CB capillary column (Chrompack) (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm). The carrier gas was hydrogen. The injector temperature was 250°C. The detector temperature was 280°C. The column temperature was first set at 100°C and increased to 125°C at 4°C min⁻¹. Decaline was used as an internal standard.

Nucleic acid extraction and strain identification

For each strain, genomic DNA was extracted from the pellet from a 5 ml Tween 80-grown culture (Solano-Serena et al. 2004).

The 16S rRNA genes were cloned in pCR2.1 TOPO vector (Invitrogen) using TOPO TA cloning, according to manufacturer's instructions. The sequence of the forward primer F8 was 5'-AGAGTTTGATYMTG GCTCAG-3', and the sequence of the reverse primer 1492R was 5'-CGGTTACCTTGTTACGACCT-3' (Grabowski et al. 2005). The 16S rRNA gene was sequenced by Genome Express. Strains were identified using Blast on the NCBI server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Sequences have been deposited in the GenBank database under accession numbers EU544515 for strain IFP 14.1 and EU544516 for strain S5.

Chemicals

The 2-EHN (CAS Number 27247-96-7) and HMN, were obtained from Sigma Aldrich Chimie (France). Mineral salts were from VWR (France).

Results and discussion

Because of its hydrophobic nature (log K_{ow} of 5.24), and slight solubility in water (12.6 mg l⁻¹ at 20°C), 2-EHN biodegradability could not be adequately estimated by the standard Sturm test which has been designed for freely-soluble substrates of low volatility (Battersby et al. 1999). As currently performed for hydrophobic compounds, a NAPL system involving HMN was used (Bouchez et al. 1995; Garcia-Junco et al. 2003; Muñoz et al. 2008; Kirkwood et al. 2008). Our preliminary experiments confirmed that HMN had no toxic effect on microbial cells (Wodzinski and Johnson 1968), that it was not biodegradable (Schaeffer et al 1979) and that it could prevent 2-EHN toxicity (data not shown).

Biodegradation of 2-EHN by WWTP microbial populations

As mainly recommended by the current norms on chemicals (OECD 1992a, 1992b), biodegradability was determined using activated-sludge as inoculum.

Biodegradation

Table 2 CO₂ productions from 2-EHN by WWTP microbial populations

Microbial population	Incubation period (days)	CO ₂ produced ^a (μmol)	Mineralization extent ^b (%)
Urban WWTP 1	35	0	0
Urban WWTP 2	35	37	11
Urban WWTP 3	28	8	2
Urban WWTP 4	28	0	0
Urban WWTP 5	28	-3	0
Refinery WWTP 1	49	192	55
Refinery WWTP 2	35	235	67

WWTP: Waste Water Treatment Plant

^a Amount of CO₂ produced per flask. CO₂ production of substrate-free flasks has been subtracted. Tests were performed in duplicate for 28 days with 8 μl of 2-EHN, i.e. 351 μmol C flask⁻¹. Mean value are indicated

^b Carbon molar ratio of production CO₂ to initial carbon introduced

Five samples from distinct urban WWTPs on the one hand and two samples from oil refinery WWTPs on the other were used. Biodegradation tests were performed in HMN-containing medium. CO₂ released in the flask headspaces was monitored during incubation until no additional CO₂ was produced. Final CO₂ productions by WWTP microbial populations are indicated in Table 2.

Microbial communities from urban WWTPs 1, 4 and 5 exhibited no biodegradation capacity since the CO₂ evolved in test flasks after about four weeks did not significantly differ from that of 2-EHN-free flasks. The CO₂ productions from the urban WWTPs 2 and 3 showed only a slight mineralization of 2-EHN. Urban WWTP microbial populations were therefore not competent for complete 2-EHN-biodegradation although they had been previously shown to be able to degrade both diesel oil (Penet et al. 2006) and gasoline (Solano-Serena et al. 1999). In contrast to urban WWTP microbial populations, activated-sludge samples from refinery WWTPs mineralized 2-EHN significantly, since up to 67% of carbon in the initial substrate was transformed into CO₂. Their efficiency in 2-EHN biodegradation suggested that they might be composed of microorganisms having the specific catabolic ability to biodegrade branched hydrocarbons. Such a peculiar metabolic trait had already been observed for branched-hydrocarbon biodegradation (Solano-Serena et al. 2000b).

Biodegradation of 2-EHN by environmental microbial populations

Various soil samples were used as inocula in order to assess the distribution of 2-EHN biodegradation activity in environmental microbial populations. Soil samples were taken either from uncontaminated (microbial populations 1–10) or contaminated (microbial populations 11–18) soils. The tests were performed in HMN-containing liquid cultures (Table 3).

The amount of recovered 2-EHN in abiotic flasks was at least 71% of the amount initially supplied. Considering the volatility of 2-EHN, such an abiotic recovery value was quite satisfactory. Actually, abiotic losses were in the same order of magnitude as those determined for hydrocarbons of low molecular weight (Solano-Serena et al. 2000a) or for diesel oil (Penet et al. 2006). 2-EHN biodegradation yield was found to be variable depending on the soil. Five microbial populations (no. 6, 10, 11, 12, 13) degraded 2-EHN by less than 10%, confirming the partial recalcitrance of the molecule. A biodegradation yield higher than 90% was obtained with six microbial communities (no. 4, 7, 9, 14, 15, 16) which had previously been shown to extensively degrade diesel oil (Penet et al. 2006). Among microbial populations from polluted soils, the most efficient ones were from diesel-polluted soils. Although the lag phase was sometimes long, these results confirm the huge and varied biodegradation capacity of soil microbial populations toward xenobiotics. The microbial populations origin had no influence on the biodegradation capacity, since competent populations were found both in polluted and unpolluted soils. In contrast to gasoline or diesel oil biodegradation (Marchal et al. 2003), soil-exposure to hydrocarbon contaminants was not compulsory for the microbial population to acquire 2-EHN-biodegradation capacity.

Selection of 2-EHN biodegraders

In order to enrich microbial populations in 2-EHN degraders, microbial populations exhibiting biodegradation capacities were sub-cultured in liquid HMN-containing medium. Because growth of biomass could not be measured in soil suspensions, subcultures were monitored by following CO₂ production in the headspace (Solano-Serena et al. 2000c). The lag period decreased with sub-culturing and disappeared

Table 3 2-EHN biodegradation by soil microbial populations

Soil	Micro-organisms source ^a	Incubation period (days)	Lag time(days)	Abiotic recovery ^b (%)	Biodegradation yield ^c (%)	Mineralization yield ^d (%)
1	Garden	60	18	82	17 ^e	0 ^e
2	Field	75	0	102	43	34
3	Garden	60	n.d.	96	41	5
4	Pine forest	75	10	71	97 ^e	67 ^e
5	Garden	60	22	78	11	41
6	Garden	60	n.d.	74	0	0
7	Vineyard	86	23	99	100	81
8	Forest	60	18	97	27 ^e	86 ^e
9	Garden	71	23	91	102	62
10	Garden	60	n.d.	84	0	0
11	Polluted site (jet fuel, 2.0)	60	8	89	7	75
12	Polluted site (jet fuel, 2.4)	60	29	107	3	100
13	Polluted site (jet fuel, 2.2)	60	n.d.	84	4	0
14	Polluted site (diesel oil, 10.0)	60	17	89	100	74
15	Polluted site (diesel oil, 2.7)	60	35	89	100	59
16	Polluted site (diesel oil, 4.4)	60	8	107	100	68
17	Polluted site (crude oil, 9.0)	47	10	87	17	25
18	Polluted site (crude oil, 10.0)	43	0	108	59	44

Tests were performed in duplicate unless otherwise stated, at 30°C with 8 µl of 2-EHN, i.e. 7.68 mg flask⁻¹

^a Pollution type and amounts of contaminating hydrocarbons in g per kg of soil dry weight are indicated between parentheses

^b 2-EHN recovered in the abiotic flasks with respect to initial 2-EHN supplied

^c Calculated as the ratio of the amount of substrate biodegraded in test flasks to the amounts of recovered substrate in the abiotic controls

^d Carbon molar ratio of production CO₂ to biodegraded substrate

^e Only one test was performed

n.d., Not determined

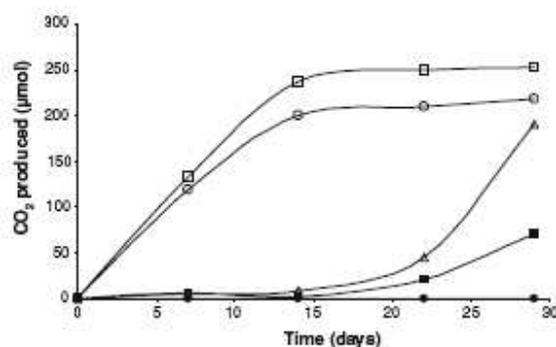


Fig. 2 Kinetics of CO₂ production for 2-EHN-free (●), first (■), second (Δ), third (O) and fourth (□) cultures from soil sample 14. Cultures were incubated at 30°C, with HMN. Flasks contained 8 µl of 2-EHN, i.e. 351 µmol C flask⁻¹

at the third culture (Fig. 2). Similarly, the time required for maximal CO₂ production to occur decreased from 30 days in the first culture to 12 days in the fourth. Total CO₂ production was also higher in the fourth culture than in the third indicating a clear adaptation of the bacterial community.

In order to isolate 2-EHN biodegraders from the last subcultures, samples were diluted and spread on solid mineral medium with 2-EHN provided as vapor. After three transfers on solid medium, thirteen bacterial colonies were isolated and tested for their growth capacity on 2-EHN in the HMN-containing liquid medium. Only one of them (strain IFP14.1) was able to grow under these conditions. Using this strain, total 2-EHN biodegradation was observed, the mineralization yield reaching 40%. Strain isolation from 2-EHN-

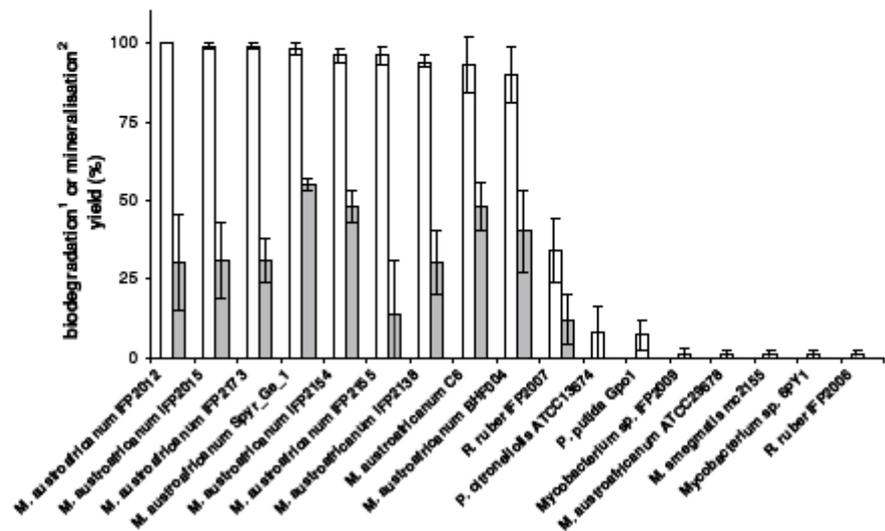
Biodegradation

Table 4 Mineralization of 2-EHN by two isolated strains

Strain	CO ₂ produced ^a (μmol)		Growth (O.D. _{580 nm})	
	2-EHN free flask	Test flask	2-EHN free flask	Test flask
<i>Mycobacterium</i> sp. S5	0.23	4.67	0.010	0.230
<i>Aurantimonas altamirensis</i> IFP14.1	0.00	1.16	0.001	0.217

^a Amount of CO₂ produced per flask after 4 days

Fig. 3 Biodegradation (open bar) and mineralization (grey bar) yields for 17 specific axenic bacterial strains. The biodegradation test was performed at 30°C for 28 days, with 5 μl of 2-EHN, i.e. 219 μmol C flask⁻¹. Calculated as the ratio of the amount of substrate biodegraded in test flasks to the amount of recovered substrate in the abiotic controls. Test was performed in triplicate. Carbon molar ratio of CO₂ production to biodegraded substrate. Test was performed in triplicate.



degrading microbial populations was therefore rather complex, probably because of the cooperative processes prevailing in the microbial communities. A similar difficulty in strain isolation was encountered for cyclohexane and complete biodegradation could only be obtained using strain association (Beam and Perry 1974; Solano-Serena et al. 2000a).

The thirteen strains isolated on solid medium were able to form colonies, which however indicates that they could use 2-EHN as a growth substrate when supplied as vapor phase. Thus, liquid cultures with 2-EHN provided in the gas phase were performed. Only two isolates were able to produce minor CO₂ amounts in these conditions (Table 4), which were identified as *Aurantimonas altamirensis* and *Mycobacterium* sp., respectively, by 16S rRNA gene analysis.

Biodegradation of 2-EHN by pure strains

Since strain isolation was not really successful, various hydrocarbon-degrading-microorganisms from strain collections were tested for their 2-EHN biodegradation capacity in liquid cultures. As 2-EHN is an ethyl-

substituted ester, strains with capacities in branched-alkane biodegradation were chosen. These mainly belonged to the *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* (CMN) group. Other strains tested included *P. putida* Gpo1, harboring a non hemic system of alkane hydroxylation (van Beilen et al. 2003), and *P. citronellolis* ATCC 13674, a strain capable of branched-alkane biodegradation (Fall et al. 1979; Bhattacharya et al. 2003). The kinetics of 2-EHN mineralization was monitored over 28 days. As already noted for soil microbial populations, values of abiotic recovery were satisfactory and reached at least 70% of the initial substrate (data not shown). From the CO₂ evolved and the substrate consumed in tests, biodegradation and mineralization yields were calculated (Fig. 3). Mineralization was not calculated when the biodegradation yield was below 10%, i.e. for seven strains. Only one strain not belonging to *M. austroafricanum* was able to significantly degrade and mineralize 2-EHN (*R. ruber* IFP2007). For nine strains of *M. austroafricanum*, the biodegradation yield was over 90%. With *M. austroafricanum* C6, IFP2154 and Spyr_Ge_1, mineralization yields were close to 50%.

Considering that a significant fraction of the carbon source was used to produce cell biomass, it could be inferred that little or no intermediary metabolites accumulated during growth. In contrast, *M. austroafricanum* IFP2012, IFP2015, IFP2173 and IFP2138 displayed mineralization yields close to 30%, suggesting that metabolite accumulation occurred. Only one strain of *M. austroafricanum* displayed no biodegradation capacity (*M. austroafricanum* ATCC29678, formerly *M. vaccae* JOB5).

In fact, *M. austroafricanum* belongs to the fast-growing Mycobacteria group, which forms a coherent phylogenetic branch clearly separated from the slow-growing Mycobacteria. The fast-growing Mycobacteria can be readily isolated from environmental samples and their biodegradation capacities for various hydrocarbons such as mono- (Tay et al. 1998) and poly- (Leys et al. 2005) aromatic hydrocarbons, linear, branched (Solano-Serena et al. 2000a) and cyclic (Beam and Perry 1973; Bogan et al. 2003) alkanes, methyl *tert*-butyl ether (MTBE) and ethyl *tert*-butyl ether (Francois et al. 2002; Lopes Ferreira et al. 2006) have clearly been demonstrated. Hydrocarbon uptake is favored by the high hydrophobicity of the cell wall composed of large amounts of C60–C90 mycolic acids, contributing up to 60% of the cell wall (Brennan and Nikaido 1995). The mycolic acid profile in the CMNs depends on the carbon source and influences the selectivity of uptake and transport of alkanes (Sokolovska et al. 2003). Among Gram-positive bacteria, the huge flexibility of Mycobacteria in terms of both metabolism and cell wall structure certainly explains their capacity for 2-EHN biodegradation.

Conclusion

Although 2-EHN is a large-scale commodity that can be considered as a potential pollutant for soils and aquifers, little information on its biodegradability is available. According to the standard procedure of CO₂ Headspace Test (ATC 2006), 2-EHN was considered as being not readily biodegradable. In the present study, the biodegradability of 2-EHN was demonstrated. This was achieved using a NAPL system involving HMN or silicone oil (data not shown) and microbial communities derived from refinery WWTPs. HMN addition to culture system could remove the inhibition resulting from substrate

excess by gradually releasing 2-EHN into aqueous phase as it was consumed.

Biodegradation capacities of 2-EHN were not extensively distributed among microbial populations, since only refinery WWTP microbial populations and some of the soil microbial populations were able to degrade 2-EHN. This molecule has a branched structure, the biodegradation of which probably requires particular microorganisms harbouring specific pathways such as the so-called citronellol pathway which removes *anteiso* methyl groups of branched alkanes (Fall et al. 1979). The hydrocarbon contaminations might enrich microbial populations with degraders, but exposure duration to contaminant had to be long enough for giving the opportunity for the microbial population to adapt to degrade xenobiotic, as already suggested for MTBE (Moreels et al. 2004).

Several microbial populations were able to degrade 2-EHN. Strains isolation from microbial populations was, however, quite difficult, as it was for the biodegradation of gasoline additives such as MTBE (Francois et al. 2002, Rohwerder et al. 2006). Only two isolates utilized 2-EHN when provided in the vapor phase and only one isolate grew slightly under the conditions of our standard liquid test. In fact, complex microbial communities appeared to be efficient for 2-EHN biodegradation, probably because of the commensalisms phenomenon existing between microorganisms of the population. Some intermediary metabolites might be produced by degraders with limited biodegradation capacities. Accumulated metabolites can then serve as carbon sources for other organisms, allowing extensive mineralization of the substrate by complex microbial population.

Most strains of *M. austroafricanum* were found capable of extensive 2-EHN biodegradation. These findings actually highlight the great versatility of those strains for the biodegradation of hydrophobic compounds to which 2-EHN belongs.

Acknowledgments We thank Dr. John C. Willison for the gift of *M. austroafricanum* strains BHF004, Spyr_Ge_1, C6 and for critical reading of the manuscript.

References

- ATC (2006) High production volume: challenge program for nitric acid, 2-ethylhexylester. <http://www.epa.gov/hpv/pubs/summaries/ni/tracd2/c14932rt.pdf>

Biodegradation

- Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR, Starkey M, CONCAWE Biodegradation Task Force (1999) An 'inherent' biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38:3219–3225. doi:10.1016/S0045-6535(98)00552-9
- Beam HW, Perry JJ (1973) Co-metabolism as a factor in microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons. *Arch Mikrobiol* 91:87–90. doi:10.1007/BF00409542
- Beam HW, Perry JJ (1974) Microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons via co-metabolism and commensalism. *J Gen Microbiol* 82:163–169
- Béguin P, Chauvaux S, Miras I, Francois A, Fayolle F, Monot F (2003) Genes involved in the degradation of ether fuels by bacteria of the *Mycobacterium/Rhodococcus* group. *Oil Gas Sci Technol Rev IFP* 58:489–495
- Bhattacharya D, Sarma PM, Krishnan S, Mishra S, Lal B (2003) Evaluation of genetic diversity among *Pseudomonas citronellolis* strains isolated from oily sludge-contaminated sites. *Appl Environ Microbiol* 69:1435–1441. doi:10.1128/AEM.69.3.1435-1441.2003
- Bogan BW, Lahner LM, Sullivan WR, Paterek JR (2003) Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *J Appl Microbiol* 94:230–239. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01824.x
- Bornemann H, Scheidt F, Sander W (2002) Thermal decomposition of 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN). *J Chem Kinet* 34:34–38. doi:10.1002/kin.10017
- Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP (1995) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:156–164. doi:10.1007/BF00170638
- Brennan PJ, Nikaido H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64:29–63. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.000333
- Chauvaux S, Chevalier F, Le Dantec C, Fayolle F, Miras I, Kunst F et al (2001) Cloning of a genetically unstable cytochrome P-450 gene cluster involved in degradation of the pollutant ethyl tert-butyl ether by *Rhodococcus ruber*. *J Bacteriol* 183:6551–6557. doi:10.1128/JB.183.22.6551-6557.2001
- Fall RR, Brown JL, Schaeffer TL (1979) Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* 38:715–722
- Francois A, Mathis H, Godefroy D, Piveteau P, Fayolle F, Monot F (2002) Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl Environ Microbiol* 68:2754–2762. doi:10.1128/AEM.68.6.2754-2762.2002
- Garcia-Junco M, Gomez-Lahoz C, Niqui-Arroyo JL, Ortega-Calvo JJ (2003) Biosurfactant- and Biodegradation-Enhanced Partitioning of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Nonaqueous-Phase Liquids. *Environ Sci Technol* 37:2988–2996. doi:10.1021/es020197q
- Guibet JC, Faure BE (1999) *Fuels and Engines: technology, energy, environment*. Editions Technip, Paris
- Haines JR, Kleiner EJ, McClellan KA, Koran KM, Holder EL, King DW et al (2005) Laboratory evaluation of oil spill bioremediation products in salt and freshwater systems. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32:171–185. doi:10.1007/s10295-005-0218-1
- Johnson EL, Smith CA, O'Reilly KT, Hyman MR (2004) Induction of methyl tertiary butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. *Appl Environ Microbiol* 70:1023–1030. doi:10.1128/AEM.70.2.1023-1030.2004
- Jouanneau Y, Willison JC, Meyer C, Krivobok S, Chevron N, Besombes JL et al (2005) Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environ Sci Technol* 39:5729–5735. doi:10.1021/es050412d
- Kirkwood KM, Chernik P, Foght JM, Gray MR (2008) Aerobic biotransformation of decalin (decahydronaphthalene) by *Rhodococcus* spp. *Biodegradation*. doi:10.1007/s10532-008-9181-7
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y (2003) Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* 185:3828–3841. doi:10.1128/JB.185.13.3828-3841.2003
- Leahy JG, Colwell RR (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* 54:305–315
- Leys NM, Ryngaert A, Bastiaens L, Wattiau P, Top EM, Verstraete W et al (2005) Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Ecol* 51:375–388. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.015
- Lopes Ferreira NL, Maciel H, Mathis H, Monot F, Fayolle-Guichard F, Greer CW (2006) Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. *Appl Microbiol Biotechnol* 70:358–365. doi:10.1007/s00253-005-0074-y
- Marchal R, Penet S, Solano-Serena F, Vandecasteele JP (2003) Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil Gas Science and Technol-Rev IFP* 58:441–448
- Moreels D, Bastiaens L, Ollevier F, Merckx R, Diels L, Springael D (2004) Evaluation of the intrinsic methyl tert-butyl ether (MTBE) biodegradation potential of hydrocarbon contaminated subsurface soils in batch microcosm systems. *FEMS Microbiol Ecol* 49:121–128. doi:10.1016/j.femsec.2004.02.016
- Morgan P, Watkinson RJ (1989) Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. *FEMS Microbiol Rev* 5:277–299. doi:10.1016/0168-6445(89)90025-9
- Muñoz R, Chambaud M, Sergio Bordel S, Villaverde S (2008) A systematic selection of the non-aqueous phase in a bacterial two liquid phase bioreactor treating α -pinene. *Appl Microbiol Biotechnol* 79:33–41. doi:10.1007/s00253-008-1400-y
- OECD (1992a) 301 Ready Biodegradability, OECD guidelines for testing of chemicals. Organisation for Economic Co-operation and development, Paris
- OECD (1992b) 302 B Zahn-Wellens/EMPA Test, OECD guidelines for testing of chemicals. Organisation for Economic Co-operation and development, Paris
- Penet S, Vendeuvre C, Bertoncini F, Marchal R, Monot F (2006) Characterisation of biodegradation capacities of

- environmental microflorae for diesel oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Biodegradation* 17:577–585. doi:10.1007/s10532-005-9028-4
- Poupin P, Ducrocq V, Hallier-Soulier S, Truffaut N (1999) Cloning and characterization of the genes encoding a cytochrome P450 (PipA) involved in piperidine and pyrrolidine utilization and its regulatory protein (PipR) in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *J Bacteriol* 181:3419–3426
- Rohwerder T, Breuer U, Benndorf D, Lechner U, Müller RH (2006) The alkyl tert-butyl ether intermediate 2-hydroxyisobutyrate is degraded via a novel cobalamin-dependent mutase pathway. *Appl Environ Microbiol* 72:4128–4135. doi:10.1128/AEM.00080-06
- Roling WF, van Verseveld HW (2002) Natural attenuation: what does the subsurface have in store? *Biodegradation* 13:53–64. doi:10.1023/A:1016310519957
- Sakai Y, Takahashi H, Wakasa Y, Kotani T, Yurimoto H, Miyachi N (2004) Role of alpha-methylacyl coenzyme A racemase in the degradation of methyl-branched alkanes by *Mycobacterium* sp. strain P101. *J Bacteriol* 186:7214–7220. doi:10.1128/JB.186.21.7214-7220.2004
- Schaeffer TL, Cantwell SG, Brown JL, Watt DWS, Fall RR (1979) Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl Environ Microbiol* 38:742–746
- Smith CA, Hyman MR (2004) Oxidation of methyl tert-butyl ether by alkane hydroxylase in dicyclopropylketone-induced and n-octane-grown *Pseudomonas putida* GPo1. *Appl Environ Microbiol* 70:4544–4550. doi:10.1128/AEM.70.8.4544-4550.2004
- Sokolovska I, Rozenberg R, Riez C, Rouxhet PG, Agathos SN, Wattiau P (2003) Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl Environ Microbiol* 69:7019–7027. doi:10.1128/AEM.69.12.7019-7027.2003
- Solano-Serena F, Marchal R, Ropars M, Lebeault JM, Vandecasteele JP (1999) Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. *J Appl Microbiol* 86:1008–1016. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00782.x
- Solano-Serena F, Marchal R, Casaregola S, Vasnier C, Lebeault JM, Vandecasteele JP (2000a) A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* 66:2392–2399. doi:10.1128/AEM.66.6.2392-2399.2000
- Solano-Serena F, Marchal R, Lebeault JM, Vandecasteele JP (2000b) Distribution in the environment of degradative capacities for gasoline attenuation. *Biodegradation* 11:29–35. doi:10.1023/A:1026594717754
- Solano-Serena F, Marchal R, Lebeault JM, Vandecasteele JP (2000c) Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of culture-headspace composition. *Lett Appl Microbiol* 30:19–22. doi:10.1046/j.1472-765x.2000.00631.x
- Solano-Serena F, Marchal R, Heiss S, Vandecasteele JP (2004) Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *J Appl Microbiol* 97:629–639. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02344.x
- Someroja S, Savolinen H (1983) Neurochemical effects of ethylhexyl nitrate in rats. *Toxicol Lett* 19:189–193. doi:10.1016/0378-4274(83)90281-3
- Strotmann U, Reuschenbach P, Schwarz H, Pagga U (2004) Development and evaluation of an online CO₂ evolution test and a multicomponent biodegradation test system. *Appl Environ Microbiol* 70:4621–4628. doi:10.1128/AEM.70.8.4621-4628.2004
- Tay ST, Hemond HF, Polz MF, Cavanaugh CM, Dejesus I, Krumholz LR (1998) Two new *Mycobacterium* strains and their role in toluene degradation in a contaminated stream. *Appl Environ Microbiol* 64:1715–1720
- van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits TH, Witholt B (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 58:427–440
- Wodzinski RS, Johnson MJ (1968) Yields of bacterial cells from hydrocarbons. *Appl Microbiol* 16:1886–1891

2 Dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173

Comme le montrent les précédents résultats, il est difficile d'isoler des souches capables de dégrader le 2-EHN. Parmi les 18 souches pures hydrocarbonoclastes seules certaines souches de *M. austroafricanum* testées sont capables de dégrader le 2-EHN sans toutefois le minéraliser totalement. *M. austroafricanum* IFP 2173 a pour particularité de dégrader le 2-EHN sans phase solvant (HMN). C'est la raison pour laquelle nous avons entrepris l'étude cinétique de la dégradation du 2-EHN avec cette souche.

2.1 Cinétique de la dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173

Afin de caractériser la dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173, diverses études cinétiques de dégradation ont été mises en œuvre. Pour ce faire, des mesures de la dégradation, rapides globales et indirectes, ont été effectuées. Elles concernent la production de CO₂ ou de la consommation de dioxygène.

2.1.1 Influence du substrat de préculture

Avant chaque test de biodégradation, chaque souche est cultivée sur MMSYE avec 2.5 g.L⁻¹ de Tween 80 (Polysorbate 80 CAS: 9005-65-6). Cette source de carbone amphiphile évite la formation de floccs au cours de la préculture. A titre de comparaison, d'autres sources de carbone ont été testées comme substrat de préculture. Il s'agit du succinate de disodium (4 g.L⁻¹) choisi car il est directement dégradé en l'absence de voie anaplérotique et ne nécessite théoriquement pas d'induction enzymatique particulière pour son utilisation en tant que source de carbone. L'acétate de sodium (4 g.L⁻¹) est aussi une source de carbone facilement métabolisable pour les bactéries du groupe CMN. L'iso-octane ou 2,2,4-triméthylpentane (500 mg.L⁻¹) est un substrat particulier que la souche *M. austroafricanum* IFP 2173 est capable de dégrader en induisant à cette occasion un cytochrome P450. Le glycérol (500mg.L⁻¹) est aussi une source de carbone simple mais nécessitant la présence de certaines enzymes (déshydrogénases). A l'issue de ces précultures contenant différentes sources de carbone, des tests de biodégradation du 2-EHN ont été mis en place et la cinétique de production de CO₂ a été mesurée (**Figure 4.1**).

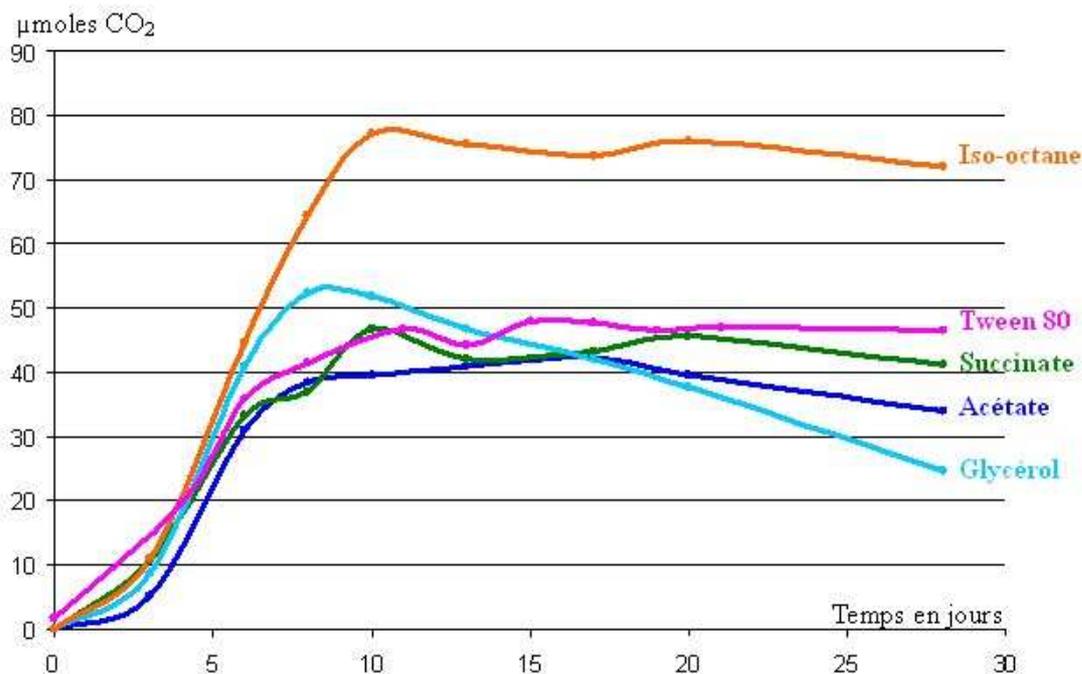


Figure 4.1: Cinétique de dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173 en présence de HMN : Influence du substrat de préculture

Le succinate, l'acétate et le Tween80 sont des sources de carbone adéquates pour les précultures de *M. austroafricanum* IFP 2173 et assurent une dégradation convenable du 2-EHN. Le **tableau 4.1** rassemble les performances finales des tests de biodégradation effectués avec ces précultures.

Tableau 4.1: Influence du substrat de préculture sur les performances finales de biodégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173

Substrat de préculture	Vitesse maximale de dégradation (μmole CO ₂ /jour)	Taux de recouvrement abiotique (%)	Taux de dégradation (%)	Rendement de minéralisation (%)
Tween 80	8.9	72	99 (+/- 1)	31 (+/- 7)
Acétate de sodium	10.1	71	94 (+/- 4)	37 (+/- 6)
Succinate de di-sodium	8.6	71	93 (+/- 2)	37 (+/- 16)
Glycérol	12.4	70	92 (+/- 2)	50 (+/- 1)
Iso-octane	12.2	70	97 (+/- 3)	51 (+/- 3)

Les taux de dégradation avoisinent les 100% après 28 jours avec les précultures sur iso-octane et Tween 80. Avec préculture sur glycérol, la croissance est plus lente. Le taux de minéralisation du 2-EHN est de 50% pour les précultures sur glycérol et iso-octane. Il est

d'environ 35% sur Tween80, acétate et succinate. Lorsque *M. austroafricanum* IFP 2173 est précultivée sur iso-octane, l'induction du cytochrome P450 ou du système Alk (Solano-Serena *et al.* 2004) pourrait être à l'origine de l'amélioration d'activité qui est constatée pour la dégradation du 2-EHN.

2.1.2 Influence du mode d'apport du 2-EHN

L'influence du mode d'apport du substrat a été testée par respirométrie. Dans les essais standards, le milieu de culture contient 0,05% (v/v) de 2-EHN, additionné de 5% de HMN (v/v). Une autre phase réservoir inerte a été testée, il s'agit de l'huile de silicone (47V20, Prolabo). Par ailleurs, la souche *M. austroafricanum* IFP 2173 est capable de croissance en l'absence de HMN. Nous avons suivi la dégradation du 2-EHN à 30°C par mesure de l'O₂ consommé en présence de 5% d'HMN, en présence de 5% d'huile de silicone et sans phase solvant (**Figure 4.2**).

La dégradation du 2-EHN est légèrement améliorée par le remplacement du HMN par l'huile de silicone. La consommation finale d'O₂ est légèrement augmentée. Cependant, la vitesse maximale de biodégradation n'est pas modifiée. L'huile de silicone semble assurer une meilleure disponibilité du substrat pour le micro-organisme.

En l'absence de phase solvant, la croissance de *M. austroafricanum* IFP 2173 est possible à 30°C. La croissance est cependant plus lente ($\mu = 0,3 \text{ jour}^{-1}$) et la quantité finale d'O₂ consommé est aussi moins importante.

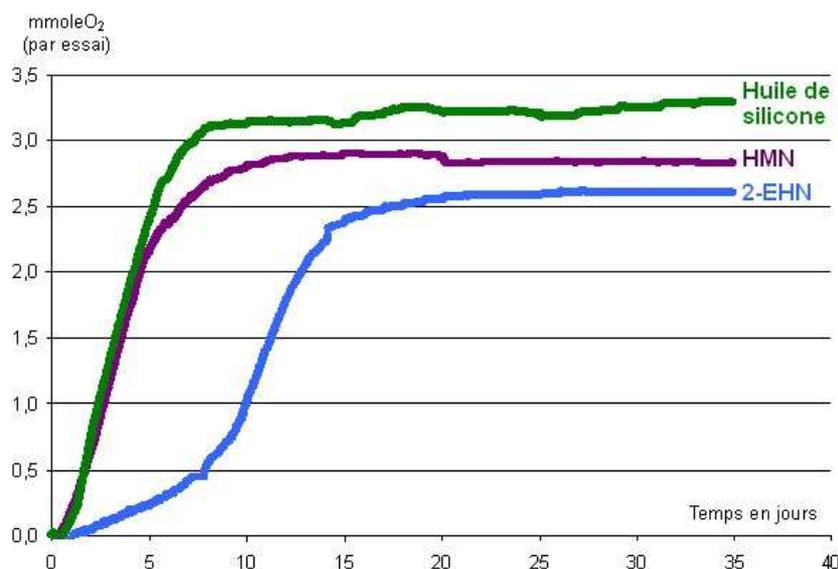


Figure 4.2: Influence de la nature de la phase solvant sur la dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173.

2.1.3 Influence de la température

La cinétique de consommation d'O₂ par *M. austroafricanum* IFP 2173 a été testée à 20°C et à 30°C en présence de HMN, en conditions standard (**Figure 4.3**).

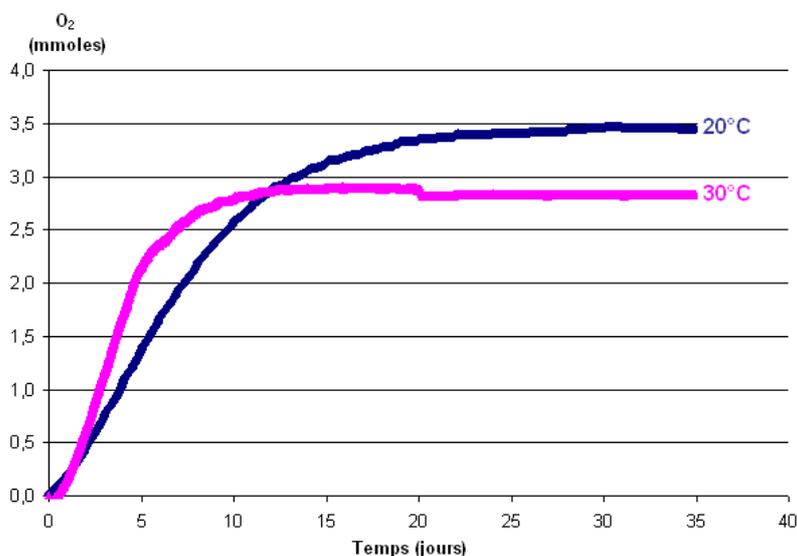


Figure 4.3: Cinétiques de consommation d'O₂ par *M. austroafricanum* IFP 2173 : Influence de la température

La consommation d'O₂ à 30°C est plus rapide qu'à 20°C. En revanche, la quantité finale d'O₂ consommée est plus forte à 20°C qu'à 30°C. A 30°C, la tension de vapeur du 2-EHN est plus élevée (27 Pa à 20°C contre 42 Pa environ à 30°C). Pour une température plus forte, il y a plus de 2-EHN dans la phase vapeur, qui n'est pas immédiatement disponible pour le microorganisme.

Le **Tableau 4.2** représente les paramètres de croissance calculés pour les différents systèmes.

Tableau 4.2 : Variations des conditions de culture sur 2-EHN de *M. austroafricanum* IFP 2173

Systèmes testés	Vitesse max de consommation d'O ₂ (mmole/jour)	Consommation d'O ₂ maximale expérimentale (mmoles)	Quantité de 2-EHN résiduel (mg.L ⁻¹)
avec HMN à 20°C	3.1	3.5	1
avec huile de silicone à 20°C	3.5	3	0
sans solvant à 20°C	NC*	NC*	270‡
avec HMN à 30°C	5.3	4.5	0
avec huile de silicone à 30°C	5.8	5	0
sans solvant à 30°C	0,3	2.6	0*

* NC: absence de croissance

‡ : L'extraction du 2-EHN est partielle en l'absence de HMN.

Quelle que soit la température du test, les cinétiques de consommation d'O₂ sont légèrement plus rapides en présence d'huile de silicone qu'en présence de HMN. Quel que soit le solvant utilisé la consommation d'O₂ est plus rapide à 30°C qu'à 20°C. Alors que la croissance est possible à 30°C en l'absence de solvant, elle ne l'est plus à 20°C.

Ces résultats soulignent le fait que le 2-EHN est biodégradable dans des conditions particulières de température et de mode d'apport du substrat.

2.2 Étude préliminaire de la voie de dégradation

2.2.1 Étude du système d'attaque du substrat

Afin de caractériser l'étape initiale de dégradation du 2-EHN, nous avons examiné l'action des inhibiteurs des mono-oxygénases. Les tests de dégradation du 2-EHN ont été réalisés en présence de pentyne ou d'azoles (**Tableau 4.3**).

Tableau 4.3: Action des inhibiteurs de mono-oxygénases sur la dégradation du 2-EHN

Inhibiteur	Consommation du substrat ^a (%)	Croissance ^b (DO ₆₀₀)	Rendement de minéralisation (%)	Présence d'intermédiaire ^c
Pentyne	0	0	-	-
Clotrimazole	94	0,45	94	++
Methimazole	93	0,36	93	++
Metronidazole	85	0,40	85	++
Econazole	94	0,10	94	++
Miconazole	80	0,14	79	++
Ketoconazole	73	0,20	73	++

^a : par rapport au témoin abiotique

^b : en tenant compte de l'absorption du témoin endogène.

^c : absence (-) ou présence (+) de la 4-éthyl dihydrofuran-2(3H)-one.

La pentyne est un alcyne en C₅. C'est un substrat suicide des mono-oxygénases. Le 2-EHN n'est pas dégradé lorsque de la pentyne est introduite dans le milieu (400 mg.L⁻¹). L'inhibition de la dégradation du 2-EHN par la pentyne montre donc l'intervention d'une mono-oxygénase, vraisemblablement au niveau de l'attaque initiale du substrat.

Les azoles sont des inhibiteurs possibles des cytochromes P450. Leur utilisation à raison de 10 mg.L⁻¹ n'empêche pas la dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173. La dégradation du 2-EHN pourrait donc impliquer une mono-oxygénase de type non hémique. Les fortes valeurs de rendement de minéralisation s'expliquent par le fait que la souche IFP 2173 a utilisé le DMSO, qui a servi à diluer les azoles, comme source de carbone.

2.2.2 Utilisation du 2-EHN comme source d'azote

Un milieu MMSYE sans azote ni ammoniacal a été testé afin de savoir si le 2-EHN pouvait servir de source d'azote pour *M. austroafricanum* IFP 2173 (**Tableau 4.4**).

Tableau 4.4: Utilisation du 2-EHN comme source d'azote

Conditions de culture	Taux de dégradation (%)	Rendement de minéralisation (%)	Recouvrement abiotique (%)
avec HMN, avec NH ₄ ⁺	99 (+/-1)	20 (+/-4)	72
avec NH ₄ ⁺	99 (+/-1)	20 (+/-6)	ND*
avec HMN sans NH ₄ ⁺	98 (+/-1)	21 (+/-6)	80
sans HMN, sans NH ₄ ⁺	98 (+/-1)	13 (+/-1)	ND*

ND* : Le calcul du taux de recouvrement abiotique en l'absence de HMN n'est pas possible en raison de la forte tension de vapeur du 2-EHN.

Même en l'absence de NH_4^+ , le 2-EHN est dégradé totalement dans conditions testées. Ainsi, le groupement nitrate du 2-EHN semble pouvoir servir de source d'azote pour le micro-organisme.

2.2.3 Dégradation du 2-éthylhexanol et de l'acide 2-éthylhexanoïque

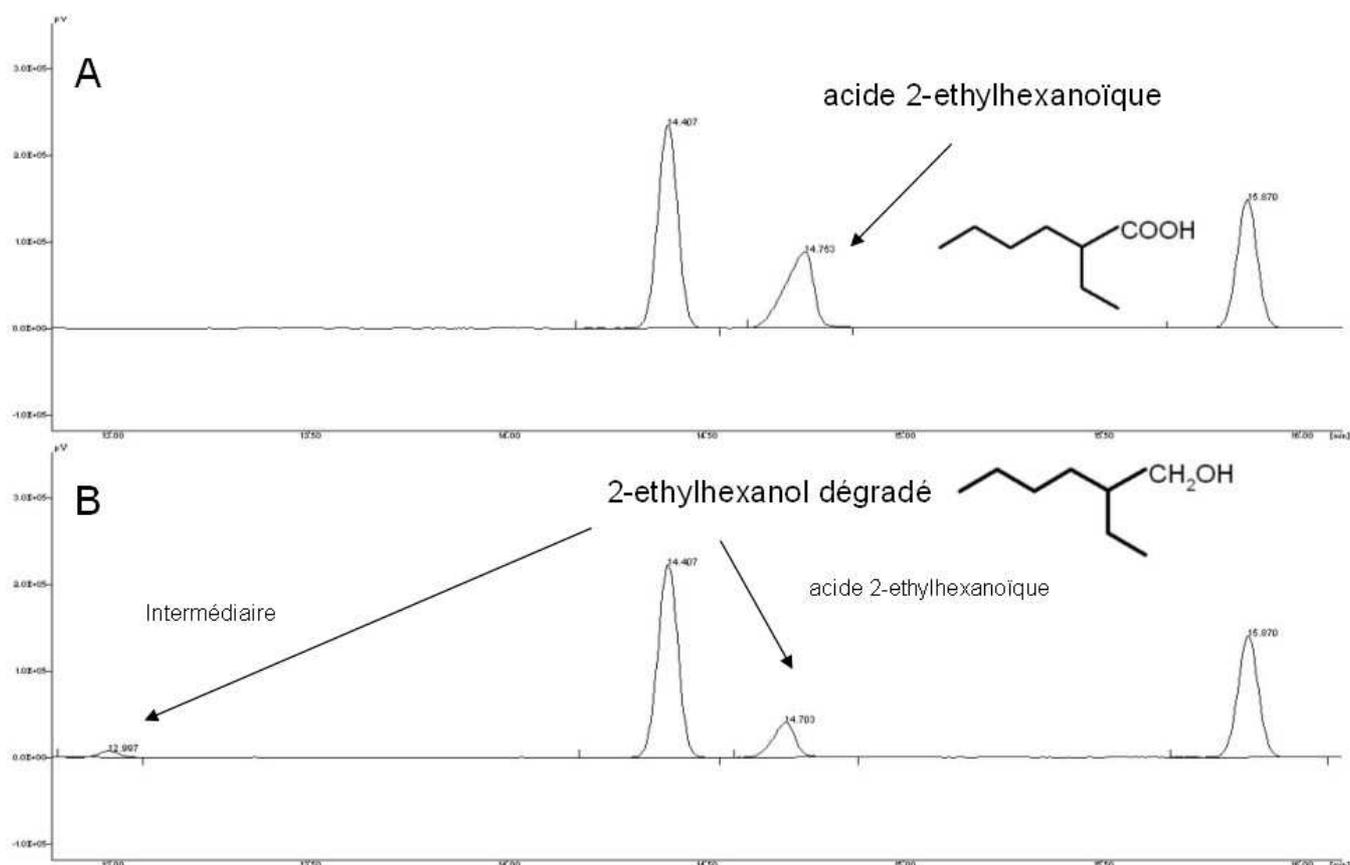
Afin de comprendre si la dégradation du 2-EHN est susceptible de passer par le 2-éthylhexanol puis à l'acide 2-éthylhexanoïque, la dégradation de ces deux intermédiaires potentiels a été testée (**Tableau 4.5**).

Tableau 4.5: Dégradation du 2-éthylhexanol et de l'acide 2-éthylhexanoïque par *M. austroafricanum* IFP 2173

Substrat	Taux de dégradation (%)*	Rendement de minéralisation (%)*
2-éthylhexanol	100 (+/-0)	10,6 (+/-11)
acide 2-éthylhexanoïque	40 (+/-0)	23 (+/- 20)
2-EHN	99 (+/- 1)	31 (+/- 7)

* : Les essais ont été réalisés en triplicates pendant 28 jours.

Le 2-éthylhexanol est complètement dégradé alors que l'acide 2-éthylhexanoïque ne l'est qu'incomplètement. Pour le 2-éthylhexanol, le rendement de minéralisation est de 10,6 % seulement, ce qui signifie que des métabolites se sont probablement accumulés. Si l'on examine le chromatogramme final de dégradation du 2-éthylhexanol, on repère un intermédiaire de dégradation (dénommé provisoirement "intermédiaire X") ainsi que l'acide 2-éthylhexanoïque (**Figure 4.4 B**). En tant que substrat, l'acide 2-éthylhexanoïque est dégradé à 40% et minéralisé à 23%, ce qui laisse supposer que ce dernier est dégradé plus extensivement mais très lentement. La **figure 4.4 A** met en évidence que l'intermédiaire X ne s'accumule pas. Signalons que dans la littérature, l'acide 2-éthylhexanoïque est parfois considéré comme toxique pour les micro-organismes (Nalli *et al.*, 2002).



Figures 4.4: Chromatogrammes obtenus après la dégradation par *M. austroafricanum* IFP 2173 de: A: L'acide 2-éthylhexanoïque, B: Le 2-éthylhexanol

Les pics non identifiés sont la *cis*- et *trans*-décaline utilisée comme standard internes pour le dosage du 2-EHN résiduel.

D'après ces résultats, la dégradation du 2-EHN est susceptible passer par le 2-éthylhexanol. On assiste à l'accumulation de l'intermédiaire X, mais pas à celle de celle de l'acide 2-éthylhexanoïque.

2.2.4 Essais de dérivatisation de l'intermédiaire accumulé

Afin de déterminer sa structure, l'intermédiaire X a été estérifié puis silylé. L'estérification permet de savoir s'il y a un acide carboxylique dans la molécule inconnue. Un groupement méthyle se fixe sur le groupement R-COOH libre pour former un groupement R-COO-CH₃ qui se traduit par un déplacement de pic en CPG. Ensuite, on effectue une silylation qui permet de fixer un groupement Si-(CH₃)₃ sur les groupements R-OH formant ainsi un groupement R-O-Si-(CH₃)₃. Ces transformations chimiques ont été effectuées sur le milieu de culture où le 2-EHN a été dégradé, c'est-à-dire soit sur le milieu lyophilisé soit sur l'intermédiaire extrait par un solvant. Les conditions d'analyse testées et leurs résultats figurent dans le **Tableau 4.6**.

L'intermédiaire X n'a pas pu être dérivé dans ces conditions. Les méthodes d'estérification et de silylation ont été validées avec des produits standards (alcools et acides carboxyliques). Aucune dérivation n'a été réussie sur l'intermédiaire X

Tableau 4.6: Essais de synthèses de dérivés sur l'intermédiaire de dégradation.

Traitement de l'intermédiaire	Estérification*	Silylation*	Résultats
Filtré puis lyophilisé	-	Selon Matériel et Méthodes	Pas de dérivé
Filtré puis lyophilisé	En milieu acide	Selon Matériel et Méthodes	Pas de dérivé
Saponifié puis Lyophilisé	En milieu acide	Selon Matériel et Méthodes	Pas de dérivé
MTBE évaporé sous N ₂	En milieu acide	-	Pas de dérivé
MTBE	En milieu acide	Selon Matériel et Méthodes	Pas de dérivé
Cyclohexane	En milieu alcalin	-	Pas de dérivé
Cyclohexane	-	Selon Matériel et Méthodes	Pas de dérivé
Cyclohexane	Par du diazométhane	-	Pas de dérivé

*Le protocole expérimental est détaillé dans la partie matériel et méthodes.

L'ensemble de ces résultats font partie des essais préliminaires qui ont pour objectif de comprendre la voie de dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173. Ils ne sont pas présentés dans l'article n°2 "Catabolism of 2-ethyhexyl nitrate by *M. austroafricanum* IFP 2173", même si certaines observations y sont citées.

L'article présente certains aspects cinétiques de la voie de dégradation du 2-EHN ainsi que l'identification de l'intermédiaire X (qui n'aurait pu aboutir sans le travail d'analyse de Lucien Kerhoas et la synthèse de la molécule par Martine Lettere à l'INRA de Versailles).

2.3 Voie catabolique du 2-EHN

ARTICLE 2 ACCEPTE DANS APPLIED ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, LE 12 AOUT 2008.

Catabolism of 2-Ethylhexyl nitrate (2-EHN) by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173

Elodie Nicolau¹, Lucien Kerhoas², Martine Lettere², Yves Jouanneau³, Rémy Marchal¹

¹ IFP, Département de Biotechnologie et Chimie de la Biomasse, 1-4 avenue du Bois Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France

² INRA, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France

³ CEA, DSV, iRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, 17 rue des Martyrs F-38054 Grenoble ; CNRS, UMR5249, F-38054 Grenoble ; Université Joseph Fourier F-38000 Grenoble, France.

Running title: Catabolism of 2-Ethylhexyl nitrate

Corresponding author : Rémy Marchal, IFP, Département de biotechnologie 1-4 avenue Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex France ; E-mail: remy.marchal@ifp.fr; Phone : 33 (0)1 47 52 69 24.

Biodegradation of 2-Ethylhexyl Nitrate by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173[∇]

Elodie Nicolau,¹ Lucien Kerhoas,² Martine Lettere,² Yves Jouanneau,³ and Rémy Marchal^{1*}

IFP, Département de Biotechnologie et Chimie de la Biomasse, 1-4 avenue du Bois Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France¹; INRA, Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques, Route de St-Cyr, 78026 Versailles Cedex, France²; and CEA, DSV, IRTSV, Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, 17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble, CNRS, UMR5249, F-38054 Grenoble, and Université Joseph Fourier, F-38000 Grenoble, France³

Received 21 May 2008/Accepted 12 August 2008

2-Ethylhexyl nitrate (2-EHN) is a major additive of fuel that is used to increase the cetane number of diesel. Because of its wide use and possible accidental release, 2-EHN is a potential pollutant of the environment. In this study, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173 was selected from among several strains as the best 2-EHN degrader. The 2-EHN biodegradation rate was increased in biphasic cultures where the hydrocarbon was dissolved in an inert non-aqueous-phase liquid, suggesting that the transfer of the hydrophobic substrate to the cells was a growth-limiting factor. Carbon balance calculation, as well as organic-carbon measurement, indicated a release of metabolites in the culture medium. Further analysis by gas chromatography revealed that a single metabolite accumulated during growth. This metabolite had a molecular mass of 114 Da as determined by gas chromatography/mass spectrometry and was provisionally identified as 4-ethylidihydrofuran-2(3H)-one by liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. Identification was confirmed by analysis of the chemically synthesized lactone. Based on these results, a plausible catabolic pathway is proposed whereby 2-EHN is converted to 4-ethylidihydrofuran-2(3H)-one, which cannot be metabolized further by strain IFP 2173. This putative pathway provides an explanation for the low energetic efficiency of 2-EHN degradation and its poor biodegradability.

2-Ethylhexyl nitrate (2-EHN) is the nitric ester of 2-ethyl-1-hexanol. It is added at 0.05% to 0.4% to diesel formulations in order to increase the cetane number. As a result of the extensive use of diesel worldwide, the 2-EHN market is about 100,000 tons per year.

Although biodegradability has for a long time been regarded as a relevant characteristic of chemicals, it was only recently incorporated into safety assessments. In the case of fuel oils, large volumes of oxygenates, such as methyl-*tert*-butyl ether (MTBE), have been added to gasoline since 1992 (19). Because of a lack of knowledge about their biodegradability and insufficient safety regulation, pollution cases resulting from accidental releases occurred in many countries. In the United States, for example, as many as 250,000 sites may have been polluted from leaking underground fuel tanks (35). Poor knowledge of the biodegradation of widely used chemicals may also hide unforeseen concerns relating to the toxicity of metabolic products. For example, the degradation of chlorinated aromatics, such as 4-chlorocatechol, in soil gave rise to the formation of an antibiotic, protoanemonin, which is detrimental to soil microcosms (6).

In case of accidental release of 2-EHN into the environment, the fate and impact of the pollution are unpredictable because of the scarcity of data on 2-EHN biodegradation. Screening tests have been recommended by both the U.S. Environmental Protection Agency (34) and the Organization for Economic

Cooperation and Development (24) to evaluate the biodegradability of commercial substances. In this context, the so-called criterion of “ready biodegradability” requires that the tested substance be biodegraded to a level of 60% within 28 days (5). Standard degradation experiments showed that 2-EHN could not be considered readily biodegradable (American Chemistry Council Petroleum Additives Panel High Production Volume Challenge Program final submission for nitric acid, 2-ethylhexyl ester, 2006). It was assumed in this study that 2-EHN was poorly available to microbial communities because of its low water solubility and its high volatility.

In fact, 2-EHN displays both a low vapor pressure, corresponding to about 1.9 mg/liter at 20°C, and a moderate solubility in water (12.6 mg/liter at 20°C). Therefore, 2-EHN is expected to form a separate organic phase in aqueous solution even when present in small amounts. 2-EHN is also a rather hydrophobic molecule, as indicated by a log $K_{o/w}$ (octanol-water partition coefficient) value of 5.24. Hydrophobic compounds with log $K_{o/w}$ values in the range of 1 to 5 are often toxic to cells because they insert into the lipid bilayer of the cell membrane, disturbing its integrity and causing cell permeabilization (13, 22).

The backbone of 2-EHN is a branched alkane, a type of molecule that is more resistant to biodegradation than linear alkanes. The metabolism of both linear and branched hydrocarbons by bacteria involves enzymes of the β -oxidation pathway (3). In the case of branched alkanes, their degradation may lead to the formation of β -substituted acyl-coenzyme A intermediates that block β -oxidation (27). Such a metabolic blockage has been encountered during the degradation of terpenoids, such as citronellol, geraniol, and nerol (10, 28). If a

* Corresponding author. Mailing address: IFP, Département de Biotechnologie, 1-4 avenue Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France. Phone: 33 (0)1 47 52 69 24. Fax: 33 (0)1 47 52 70 01. E-mail: remy.marchal@ifp.fr.

[∇] Published ahead of print on 22 August 2008.

quaternary carbon atom occurs at the end of an alkane chain, the result is a molecule quite resistant to microbial attack (18).

In a recent study, microbial communities endowed with the ability to degrade 2-EHN were obtained by enrichment from activated sludge or soil samples (33). The isolation of pure strains able to utilize 2-EHN as a sole source of carbon and energy proved rather difficult. Nevertheless, among several strains of fast-growing mycobacteria previously isolated on other hydrocarbons, some strains, all identified as *Mycobacterium austroafricanum*, were found to degrade 2-EHN.

In the present study, the kinetics of 2-EHN degradation by selected strains was investigated. *M. austroafricanum* IFP 2173, which showed the highest rate of degradation, was chosen for further investigation of 2-EHN catabolism. As a means to reduce the expected toxic effect of 2-EHN on bacterial cells and increase its bioavailability in aqueous media, bacterial cultures were mostly carried out in biphasic media. Such biphasic cultures, including a non-aqueous-phase liquid (NAPL) that serves as a solvent for the hydrophobic substrate, have already been implemented to facilitate the degradation of various toxic or recalcitrant compounds (2, 4, 8, 12, 25, 26). A metabolite that accumulated during growth was detected in the culture medium and identified by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS-MS). Based on our data, a plausible pathway for 2-EHN catabolism by *M. austroafricanum* IFP 2173 is proposed.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms and culture conditions. The strains used in this study were *M. austroafricanum* IFP 2173 (30), isolated on iso-octane; *M. austroafricanum* IFP 2012 (11) and *M. austroafricanum* IFP 2015 (15), both isolated on MTBE; and *M. austroafricanum* C6 (14), *M. austroafricanum* Spyr_Ge_1, and *M. austroafricanum* BHF 004 (J. C. Willison, unpublished data), all isolated on pyrene.

The culture medium consisted of a mineral salts solution (7) supplemented with 0.1 g/liter of yeast extract. The carbon source was added after medium sterilization (120°C for 20 min). All cultures were incubated at 30°C with shaking (150 rpm).

Chemicals. 2-EHN (Chemical Abstract Service [CAS] registry number 27247-96-7), 2-ethylhexanol, 2-ethylhexanoic acid, MTBE, decahydronaphthalene, 3-methylidihydrofuran-2(3H)-one, diethyl zinc, and heptamethylnonane (HMN) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Mineral salts were from VWR (Fontenay-sous-Bois, France).

Biodegradation experiments. Biodegradation tests were performed in 120-ml flasks closed with Teflon-coated stoppers and sealed with aluminum caps. Unless otherwise indicated, 4.8 mg of 2-EHN (or 2-ethylhexanol or 2-ethylhexanoic acid) was added to 10 ml of the medium supplemented with 500 µl of 2,2,4,4,6,8,8-HMN. Cultures were adjusted to an optical density at 600 nm of 0.2 using washed pellets of centrifuged precultures grown on Tween 80 (2.5 g/liter) as the sole source of carbon. The degradation rate was monitored by measuring at regular intervals by gas chromatography (GC) the CO₂ evolved in the headspace. Residual 2-EHN was estimated as described below in triplicate. Abiotic controls were supplemented with mercuric chloride (0.2 mg/liter), and endogenous controls, lacking a carbon source but containing HMN, were performed under similar conditions.

Analyses of substrate and products. Cultures grown on 2-EHN were filtered on a polytetrafluoroethylene membrane (0.45 µm), and the cell biomass was determined as dry weight after lyophilization of the cell pellet. When HMN was omitted from the growth medium, the total organic carbon (TOC) was measured on the filtrates using a TOC-5050 carbon analyzer (Shimadzu) according to the European norm NF EN 1484. Residual 2-EHN in the culture filtrate, as well as derived metabolites, was extracted with 10 ml of MTBE containing 0.05% (vol/vol) decahydronaphthalene as an internal standard. After 30 min of shaking and static overnight incubation at 4°C, the solvent extracts were analyzed by GC with flame ionization detection (FID). A Varian 3400 chromatograph (Sugarland) equipped with a CP-Sil Pona CB column (0.25 mm by 50 m) obtained from Chrompack (Raritan, NJ) was used. The carrier gas was helium. The tempera-

tures of the injector and the detector were set at 250 and 280°C, respectively. The column temperature was varied from 100°C to 200°C at 4°C/min and then from 200°C to 259°C at 20°C/min.

Time courses of 2-EHN degradation and metabolite excretion were performed in flasks that were sacrificed at regular time intervals. CO₂ in the flask headspace was measured with a Varian 3400 gas chromatograph (Sugarland) equipped with a catharometric detector and a PorapakQ (80/100 mesh, 2 m; Chrompack, Raritan, NJ). The net amount of CO₂ produced was determined as the difference between the final quantities found in the test flasks and that found in hydrocarbon-free flasks.

Kinetics of O₂ consumption. Continuous monitoring of substrate oxidation was carried out through measurement of O₂ consumption using a respirometer (Sapromat D12-S; Voith, Germany). Flasks containing 250 ml of culture medium and 125 µl of 2-EHN as a carbon source were inoculated with *M. austroafricanum* IFP 2173 to an optical density at 600 nm of 0.1. Incubation was carried out at 30°C with shaking in the presence or absence of HMN (12.5 ml). Cultures and substrate-free controls were performed in triplicate.

Chemical synthesis of 4-EDF. 4-Ethylidihydrofuran-2(3H)-one (4-EDF) was synthesized according to a published procedure (1). To a three-necked flask containing dry toluene (5 ml), copper(II) trifluoromethanesulfonic acid (0.025 mmol) and triethylphosphite (0.05 mmol) were successively added. The mixture was stirred for 30 min at room temperature to obtain a colorless solution. After it cooled to -20°C, zinc diethyl (5 mmol previously dissolved in hexane) was added, followed by furan-2(5H)-one (5 mmol). The reaction mixture was allowed to warm to 0°C for 6 h and was then incubated at room temperature and monitored by GC. After completion of the reaction, the mixture was hydrolyzed with aqueous 5 N HCl and then extracted with diethyl ether (2 × 15 ml); the organic phase was dried over MgSO₄ and concentrated in vacuo. The crude product was purified by column chromatography on SiO₂ using a mixture of diethyl ether/pentane [80/20] as the eluent.

Coupled MS analyses. GC/MS-MS analysis was carried out under chromatographic conditions identical to those described above for GC-FID. Mass spectra were acquired in the split mode with a time-of-flight mass spectrometer (Tempus TOF MS; Thermo Finnigan).

LC/MS-MS was performed using a high-performance LC system (Alliance 2695; Waters, Guyancourt, France) coupled to a Quattro LC triple-quadrupole mass spectrometer (Micromass, Manchester, United Kingdom) with an electrospray interface. Data were acquired in the positive or negative ionization mode and processed with the MassLynx NT 4.0 system. The electrospray source voltages were as follows: capillary, 3.2 kV; extractor, 2 V; and cone voltage, 22 and 17 V under positive mode. The source block and desolvation gas stream were heated at 120°C and 350°C, respectively. Nitrogen was used as the nebulization and desolvation gas (75 and 350 liters h⁻¹, respectively). For MS-MS, collisional induced dissociation was performed under argon (2.5 × 10⁻³ mbar) at a collision energy set between 10 and 40 eV.

RESULTS

Time course of 2-EHN biodegradation by selected strains. The kinetics of 2-EHN biodegradation was studied using a few bacterial strains previously selected from among environmental isolates and collection strains for the ability to attack the compound (33). Most of these strains were identified as members of the genus *Mycobacterium*. In order to avoid growth inhibition due to 2-EHN toxicity, HMN was added as NAPL to the bacterial cultures, and biodegradation time courses were monitored by measuring the CO₂ production in the culture headspace. The biodegradation kinetics were found to vary widely depending on the bacterial strains (data not shown). *M. austroafricanum* IFP 2173 was the fastest and most efficient of the microorganisms tested, since it produced the largest amount of CO₂ (37 µmol per flask) after 13 days of incubation. *M. austroafricanum* IFP 2173 was also the only strain able to grow on 2-EHN in the absence of HMN (data not shown).

Effect of the 2-EHN supply mode on the biodegradation rate. The impact of NAPL addition on 2-EHN biodegradation by

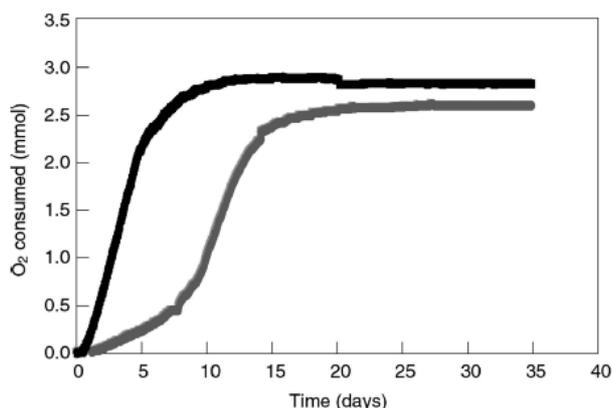


FIG. 1. Effect of a NALP (HMN) on the rate of oxygen consumption by *M. austroafricanum* IFP 2173. Cultures (250 ml) were grown in the flasks of a respirometer and contained 125 μ l of 2-EHN as a carbon source. The cultures were incubated in the presence (black line) or absence (gray line) of HMN (12.5 ml).

strain IFP 2173 was studied through continuous monitoring of substrate-dependent oxygen consumption by respirometry.

In the culture lacking HMN, O₂ uptake started after a lag phase of about 1 day and then increased with time according to a sigmoidal curve (Fig. 1). The maximal growth rate (μ_{max}) could be deduced from the oxygen uptake rate, assuming that the biomass yield remained constant during growth. Over a 9-day period of growth, μ_{max} was calculated to be 0.29 day⁻¹ on average, corresponding to a generation time of 2.4 days. In the HMN-containing culture, the lag phase was shorter, and the O₂ uptake became linear after a very short exponential phase ($\mu_{max} = 0.29$ day⁻¹). The maximal rate of O₂ uptake was 5.3 mmol/day, and the overall O₂ consumption reached a maximum of 2.9 mmol, compared to 2.6 mmol for cells grown without HMN.

The effect of the 2-EHN concentration on growth was studied in HMN-containing cultures (Fig. 2). The concentration of 2-EHN had little effect on the specific growth rate. During the linear phase of growth, the O₂ uptake rate increased proportionally to the 2-EHN concentration in the culture medium up to 3 g/liter. This indicated that the 2-EHN diffusion rate from

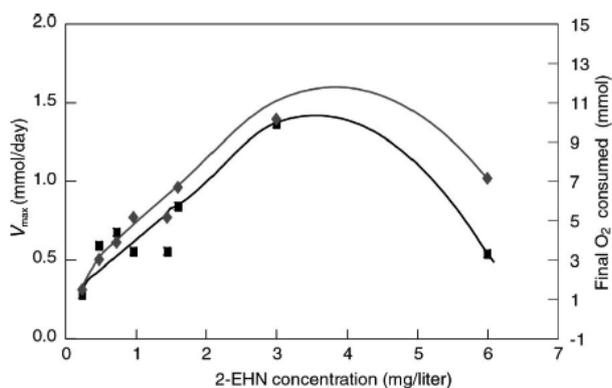


FIG. 2. Effect of the 2-EHN concentration on oxygen consumption by *M. austroafricanum* IFP 2173. Biphasic cultures contained a variable concentration of 2-EHN and 12.5 ml of HMN. The maximal rates of O₂ uptake or metabolism (V_{max}) (■) and overall O₂ consumption (◆) were determined.

TABLE 1. Carbon balance of 2-EHN biodegradation by *M. austroafricanum* IFP 2173^a

Substrate or product	Mass change ^b (mg/liter)	Carbon balance	
		Carbon change ^b (mg/liter)	Carbon recovery (%)
2-EHN	482	269	0
Cell biomass	94	50 ^c	19
CO ₂ ^d	115	31	12
TOC ^e	165	165	61
Total products			92

^a Cultures (10 ml) were performed at 30°C in 120-ml flasks.
^b Considering the whole content of the culture flasks.
^c The carbon/dry-biomass ratio was assumed to be 52% (17). The dry biomass was determined from 100-ml cultures grown in 1-liter flasks.
^d CO₂ was determined after acidification of the culture.
^e TOC was measured in the culture fluid after filtration through a 0.22- μ m membrane.

HMN to the water phase was a limiting factor for bacterial growth. At 2-EHN concentrations higher than 3 g/liter, bacterial growth was inhibited, as indicated by both lower oxygen uptake rates and lower overall O₂ consumption. For 2-EHN concentrations lower than 3 g/liter, no residual substrate was detected in the culture medium by the end of growth, and the O₂ consumption was roughly proportional to the amount of substrate supplied.

Carbon balance of 2-EHN biodegradation by *M. austroafricanum* IFP 2173. In order to determine the carbon balance of 2-EHN biodegradation, *M. austroafricanum* IFP 2173 was cultivated in mineral medium lacking HMN to avoid perturbation of TOC measurements by HMN. The culture was stopped when no more CO₂ was released, which coincided with the total consumption of 2-EHN (see Fig. 4). The biomass formed, the TOC in the filtered culture medium, and the amount of CO₂ released were measured. The carbon recovery as metabolites and cell biomass was calculated by taking into account the elementary compositions of the substrate and products (Table 1). A carbon recovery rate of 92% was obtained for the 2-EHN bioconversion. Carbon converted into biomass (94 mg/liter) and CO₂ (165 mg/liter) amounted together to only 33% of the total carbon produced. Accordingly, a high proportion of the substrate-derived carbon was recovered in the clarified culture medium (67%), possibly reflecting metabolite accumulation.

Identification of a metabolite excreted in the culture. GC-FID analysis of culture fluid extracts performed during 2-EHN degradation experiments revealed a gradual increase in the concentration of an unknown compound with a retention time shorter than that of 2-EHN. This finding suggested that a metabolite might have accumulated during growth and accounted for the substantial level of TOC previously detected in the supernatants of 2-EHN-grown cultures. High-resolution mass spectral analysis of this compound (Fig. 3a) showed that it had a molecular mass of 114.07 Da and the chemical formula C₆H₁₀O₂. The mass spectrum of this compound did not match any of the spectra currently available in the databases. Nevertheless, a comparison of the LC/MS-MS data of the excreted product with those of 3-methyldihydrofuran-2(3H)-one, a commercially available product, revealed several common fragment ions. The analysis also indicated that the molecule

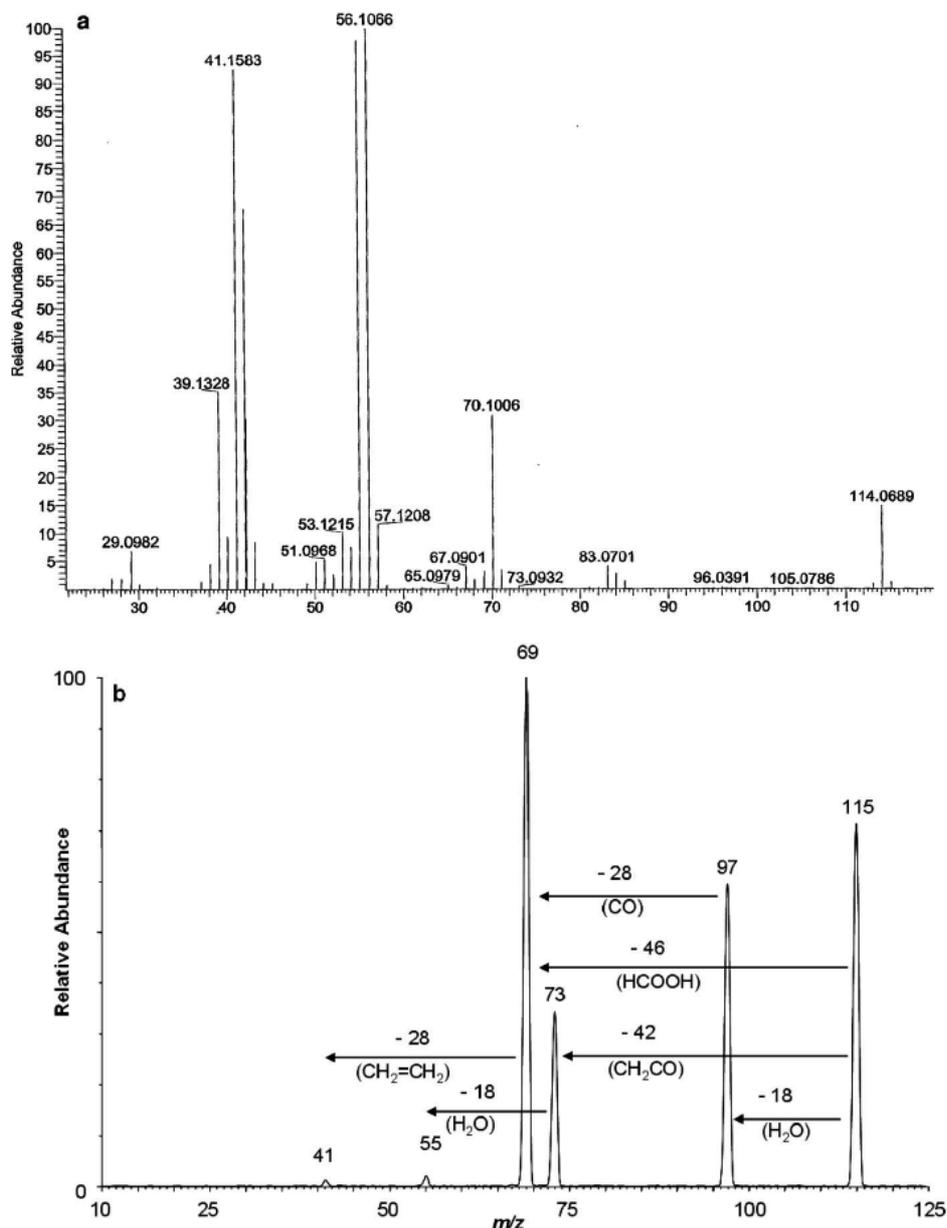


FIG. 3. MS characterization of the metabolite produced by strain IFP 2173 upon degradation of 2-EHN. (a) High-resolution electron impact mass spectrum of the accumulated metabolite as obtained by GC-MS analysis. (b) Collisional induced dissociation/MS-MS product ion spectrum of the protonated molecule (MH^+) obtained by LC/MS-MS analysis at a collision energy of 10 eV.

did not contain any carboxylic or hydroxyl groups (Fig. 3b). Taken together, our data indicated that the product of interest might be 4-EDF, which can also be designated β -ethyl- γ -butyrolactone. In order to confirm the structure of the metabolite, the chemical synthesis of 4-EDF was undertaken as described in Materials and Methods (1). The LC/MS-MS characteristics of the synthesized lactone were identical to those of the metabolite, confirming that the product that accumulated in cultures of *M. austroafricanum* IFP 2173 grown on 2-EHN was 4-EDF.

The rate of 4-EDF accumulation was assessed by GC-FID analysis of the culture fluid during growth. Figure 4 shows that 4-EDF formation and CO_2 release were concurrent with 2-EHN degradation.

Biodegradation of 2-EHN-derived compounds. As a means to elucidate the pathway of 2-EHN biodegradation by *M. austroafricanum* IFP 2173, we tested compounds with structures derived from 2-EHN as possible substrates. 2-Ethylhexanol, the primary alcohol resulting from 2-EHN hydrolysis, was biodegraded, yielding 2-ethylhexanoic acid and 4-EDF. 2-Ethylhexanoic acid, the product resulting from 2-ethylhexanol oxidation, was not biodegraded, even in the presence of HMN. This compound is considered to be toxic for most bacteria (21). It should be noted that 2-EHN can be used as a sole nitrogen source by strain IFP 2173, indicating that nitrate is formed, probably as a result of an initial attack on 2-EHN by an esterase (data not shown). 2-EHN biodegradation was also tested in the presence of isooctane, the compound on which *M. austroaf-*

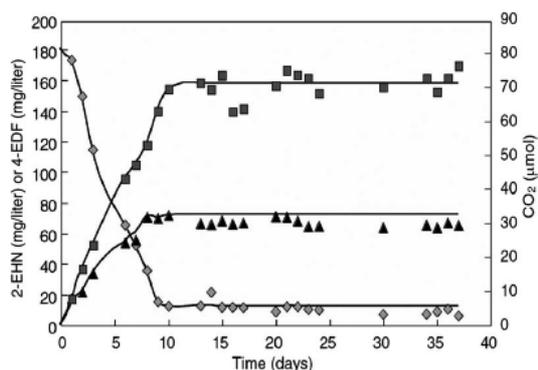


FIG. 4. Accumulation of 4-EDF during 2-EHN biodegradation. Parallel cultures were carried out in 120-ml flasks and removed at the times indicated for extraction and measurements of 2-EHN (\blacklozenge) and 4-EDF (\blacktriangle). CO_2 (\blacksquare) was measured in a separate culture flask. Residual 2-EHN is the fraction of hydrocarbon that stayed bound to the flask wall and stopper and remained inaccessible to bacteria.

ricanum IFP 2173 was selected. Diauxic growth was observed, with the strain degrading isooctane first and then 2-EHN into 4-EDF (data not shown).

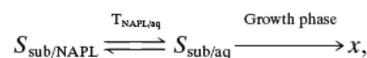
DISCUSSION

2-EHN is a recalcitrant compound that was considered not readily biodegradable according to standard procedures (American Chemistry Council Petroleum Additives Panel High Production Volume Challenge Program final submission for nitric acid, 2-ethylhexyl ester, 2006). However, we demonstrated in the present study that selected strains of mycobacteria were able to slowly utilize 2-EHN as a sole source of carbon under defined culture conditions. The poor biodegradability of 2-EHN might be the consequence of two factors: first, the rare occurrence of microorganisms able to use it as a carbon source, and second, its inhibitory effect on bacterial growth even at a low concentration. 2-EHN inhibition was illustrated by the experiment shown in Fig. 2 and by the lack of growth of all strains tested in HMN-free cultures, except *M. austroafricanum* IFP 2173. This strain, isolated for its ability to degrade isooctane, a branched alkane (31), demonstrated broad capabilities for hydrocarbon biodegradation (16, 32). Like many members of the *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* group of gram-positive bacteria, it may be resistant to toxic hydrocarbons, thanks to the properties of its cell envelope, which is highly rigid and contains mycolic acids (29). In mycobacteria, mycolic acids are very long fatty acids (C_{60} to C_{90}) that contribute up to 60% of the cell wall (9). The specific cell wall composition of the *M. austroafricanum* strains studied here probably accounts for their resistance to 2-EHN.

However, it is unclear whether the unique ability of strain IFP 2173 to grow on 2-EHN without NAPL is due to a cell wall composition slightly different from that of other strains or to some other strain-specific trait.

Biphasic cultures, involving the addition of an inert NAPL like HMN, were found to be critical for 2-EHN biodegradation and bacterial growth. In the HMN-free cultures, the dissolved fraction of 2-EHN represented only a minor part of the substrate supplied, since it partitioned into three distinct phases,

i.e., the gas phase, the aqueous phase, and the bulk of insoluble 2-EHN. During the biodegradation process, the uptake of dissolved substrate was counterbalanced by the equilibrium transfer of 2-EHN from the bulk of the substrate ($S_{\text{sub/NAPL}}$) to the aqueous substrate ($S_{\text{sub/aq}}$) according to the following scheme:



where $S_{\text{sub/NAPL}}$ and $S_{\text{sub/aq}}$ represent the amounts of substrate in the bulk and in the aqueous phases, respectively; x is the cell biomass; and $T_{\text{NAPL/aq}}$ is the substrate transfer rate of 2-EHN to the culture medium. In HMN-containing cultures, the dissolved 2-EHN was mainly confined to NAPL. Because of the high hydrophobicity of their cell walls, microbial cells tightly adhered to NAPL, and direct contact was thus the most probable mode of substrate uptake (8, 12). Accordingly, the large NAPL volume (500 μl of HMN versus 5 μl of 2-EHN in the case of the NAPL-free culture), which increased substrate bioavailability, probably accounted for its higher efficiency of assimilation by the microorganisms. Such conditions of substrate delivery were apparently required to promote the growth on 2-EHN of *M. austroafricanum* strains other than strain 2173.

The biodegradation of 2-EHN by *M. austroafricanum* IFP 2173 illustrates the remarkable metabolic capabilities of this strain for recalcitrant hydrocarbons. Indeed, it can degrade another methyl branched alkane, 2,2,4-trimethylpentane (31), suggesting that it produces enzymes specific for the degradation of anteiso-alkanes. Nevertheless, our results indicate that the degradation of 2-EHN by strain IFP 2173 is partial and gives rise to the release of an acyl with an ethyl substituent in the beta position. At least two reasons might explain the accumulation of this metabolite: (i) strain IFP 2173 lacks enzymes able to degrade it, and (ii) because of the ethyl group in the beta position, the metabolite might block the enzyme catalyzing the next step in the degradation of branched alkanes.

Considering the high biodegradation potential of strain IFP 2173, it was recently observed that this strain can degrade other xenobiotic compounds structurally related to 2-EHN, such as bis(2-ethylhexyl)phthalate (data not shown), used as a plasticizer (21, 23). The biodegradation of this compound by *Mycobacterium* sp. strain NK0301 has been reported (20). This bacterium utilized phthalate as a carbon and energy source and left the carbon skeleton of the 2-ethylhexyl moiety intact, releasing it as 2-ethylhexanol or 2-ethylhexanoic acid. In comparison, strain IFP 2173 degraded bis(2-ethylhexyl) phthalate and utilized the 2-ethylhexyl moiety, achieving a higher degree of degradation (data not shown).

The biodegradation of 2-EHN by strain IFP 2173 gave rise to the accumulation of a lactone, which was identified as 4-EDF. The lactone formed by cyclization of a breakdown product, a branched pentanoic acid, which was not metabolized further by the bacteria. The partial degradation of 2-EHN certainly explains the observed slow growth ($\mu_{\text{max}} = 0.29 \text{ day}^{-1}$) and poor growth yield of cultures utilizing this compound as a sole C source.

Considering the structure of the intermediate metabolite and the known degradation pathway of *n*-alkanes (18), we propose for the first time a plausible metabolic pathway for

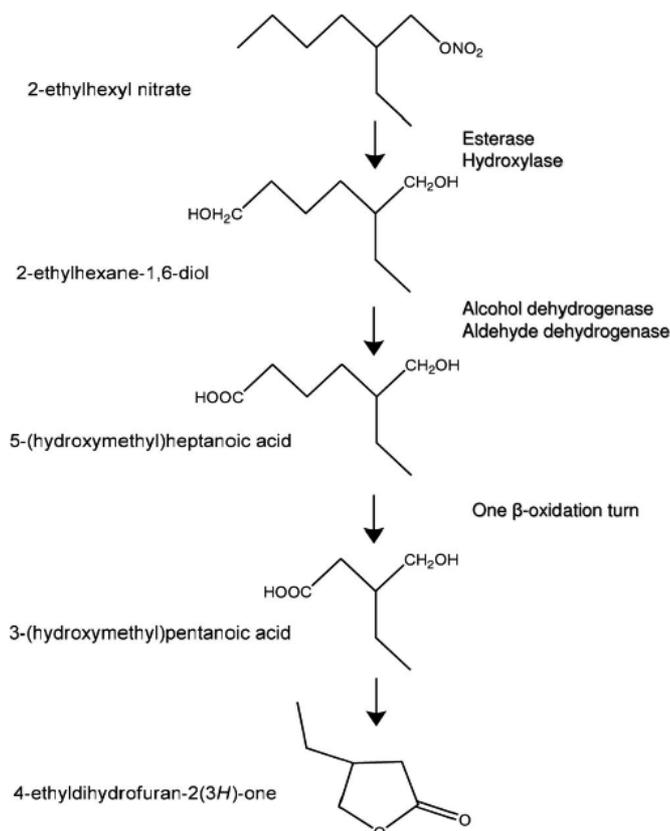


FIG. 5. Proposed pathway for 2-EHN biodegradation by *M. austroafricanum* IFP 2173.

2-EHN degradation (Fig. 5). The pathway would start by a simultaneous or sequential attack of the molecule on both extremities, with an esterase activity hydrolyzing the nitric ester bond and an oxygenase catalyzing the hydroxylation of the distal methyl group. The involvement of an esterase that would release nitrate was inferred from the observation that strain IFP 2173 utilized 2-EHN as a nitrogen source. The existence in this strain of a hydroxylase active on branched alkane is expected, since it grows on isooctane (31). The intermediate metabolite that would form, 2-ethylpentan-1,6-diol, is proposed to be oxidized to a carboxylic acid in two steps involving successively an alcohol and an aldehyde dehydrogenase. After activation by coenzyme A, the resulting 5-(hydroxymethyl)heptanoic acid would undergo one cycle of classical β -oxidation to give 3-(hydroxymethyl)pentanoic acid, which would spontaneously convert to 4-EDF by cyclization. Since the substrate underwent a single turn of β -oxidation, only two carbon atoms (out of eight in 2-EHN) could reach the tricarboxylic acid cycle, accounting for the low percentage of carbon released as CO₂ (12%).

The proposed pathway now needs to be assessed experimentally by identifying enzymes involved in 2-EHN degradation. To this end, we have undertaken a proteomic analysis to discover the proteins that are induced upon incubation of strain IFP 2173 with 2-EHN.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE) fellowship from the Association Nationale

de la Recherche Technique (ANRT) to E. Nicolau and grants from the IFP.

We thank F. L eglise for helpful discussions and J. C. Willison for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Alexakis, A., J. Vastra, and P. Mangeney. 1997. Acceleration of the conjugate addition of diethyl zinc to enones by either Cu(OTf)₂ or trivalent phosphorus ligands. *Tetrahedron Lett.* **38**:7745–7748.
- Allen, C. C., D. R. Boyd, F. Hemenstall, M. J. Larkin, and N. D. Sharma. 1999. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to *cis*-dihydrodiols by soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1335–1339.
- Alvarez, H. M. 2003. Relationship between beta-oxidation pathway and the hydrocarbon-degradation profile in actinomycete bacteria. *Int. Biodegrad. Biodeg.* **52**:35–42.
- Ascon-Cabrera, M., and J. M. Lebeault. 1993. Selection of xenobiotic-degrading microorganisms in a biphasic aqueous-organic system. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1717–1724.
- Battersby, N. S., D. Ciccognani, M. R. Evans, D. King, H. A. Painter, D. R. Peterson, M. Starkey, et al. 1999. An 'inherent' biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* **38**:3219–3235.
- Blasco, R., R. M. Wittich, M. Mallavarapu, K. N. Timmis, and D. H. Pieper. 1995. From xenobiotic to antibiotic, formation of protoanemonin from 4-chlorocatechol by enzymes of the 3-oxoadipate pathway. *J. Biol. Chem.* **270**:29229–29235.
- Bouchez, M., D. Blanchet, and J. P. Vandecasteele. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:156–164.
- Bouchez-Naitali, M., H. Rakatozafy, R. Marchal, J. Y. Leveau, and J. P. Vandecasteele. 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* **86**:421–428.
- Brennan, P. J., and H. Nikaido. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:29–63.
- Fall, R. R., J. L. Brown, and T. L. Schaeffer. 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:715–722.
- Francois, A., H. Mathis, D. Godefroy, P. Piveteau, F. Fayolle, and F. Monot. 2002. Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2754–2762.
- Goswami, P., and H. D. Singh. 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnol. Bioeng.* **37**:1–11.
- Heipieper, H. J., F. J. Weber, J. Sikkema, H. Keweloh, and J. A. M. de Bont. 1994. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends Biotechnol.* **12**:409–415.
- Jouanneau, Y., J. C. Willison, C. Meyer, S. Krivobok, N. Chevron, J. L. Besombes, and G. Blake. 2005. Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environ. Sci. Technol.* **39**:5729–5735.
- Lopes Ferreira, N., H. Maciel, H. Mathis, F. Monot, F. Fayolle-Guichard, and C. W. Greer. 2006. Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **70**:358–365.
- Lopes Ferreira, N., H. Mathis, D. Labbe, F. Monot, C. W. Greer, and F. Fayolle-Guichard. 2007. *n*-Alkane assimilation and tert-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**:909–919.
- McCarty, P. L. 1972. Energetics of organic matter degradation, p. 91–118. *In* R. Mitchell (ed.), *Water pollution microbiology*. Wiley Interscience, New York, NY.
- Mc Kenna, E. J. 1972. Microbial metabolism of normal and branched chain alkanes, p. 73–97. *In* *Degradation of synthetic organic molecules in the biosphere*. Proceedings of the San Francisco Conference, Academy of Science, Washington, DC. U.S. Academy of Science, Washington, DC.
- Moran, M. 2007. Occurrence of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates in source water and drinking water in the United States, p. 57–98. *In* O. Hutzinger (ed.), *The handbook of environmental chemistry: fuel oxygenates*, vol. 5. Water pollution. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Nakamiya, K., S. Hashimoto, H. Ito, J. S. Edmonds, A. Yasuhara, and M. Morita. 2005. Microbial treatment of bis(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride with isolated bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:115–119.
- Nalli, S., D. G. Cooper, and J. A. Nicell. 2002. Biodegradation of plasticizer by *Rhodococcus rhodochromus*. *Biodegradation* **13**:343–352.
- Neumann, G., N. Kabelitz, A. Zehndorf, A. Miltner, H. Lippold, D. Meyer, A. Schmid, and H. J. Heipieper. 2005. Prediction of the adaptability of *Pseudomonas putida* DOT-T1E to a second phase of a solvent for economically sound two-phase biotransformations. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6606–6612.

23. Nishioka, T., M. Iwata, T. Imaoka, M. Mutoh, Y. Egashira, T. Nishiyama, T. Shin, and T. Fujii. 2006. A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**:2394–2399.
24. Organization for Economic Cooperation and Development. 1993. Guidelines for the testing of chemicals. OCED editions, part 3. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
25. Ortega-Calvo, J. J., and M. Alexander. 1994. Roles of bacterial attachment and spontaneous partitioning in the biodegradation of naphthalene initially present in non-aqueous-phase liquids. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2643–2646.
26. Sandrin, T. R., W. B. Kight, W. J. Maier, and R. M. Maier. 2006. Influence of a nonaqueous phase liquid (NAPL) on biodegradation of phenanthrene. *Biodegradation* **17**:423–435.
27. Schaeffer, T. L., S. G. Cantwell, J. L. Brown, D. S. Watt, and R. R. Fall. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**:742–746.
28. Seubert, W., and E. Fass. 1964. Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. IV. The purification and properties of beta-isohexenylglutacoyl-CoA-hydratase and beta-hydroxy-beta-isohexenylglutaryl-CoA-lyase. *Biochem. Z.* **341**:23–34.
29. Sokolovska, I., R. Rozenberg, C. Riez, P. G. Rouxhet, S. N. Agathos, and P. Wattiau. 2003. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:7019–7027.
30. Solano-Serena, F., R. Marchal, S. Casaregola, C. Vasnier, J. M. Lebeault, and J. P. Vandecasteele. 2000. A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2392–2399.
31. Solano-Serena, F., R. Marchal, S. Heiss, and J. P. Vandecasteele. 2004. Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *J. Appl. Microbiol.* **97**:629–639.
32. Solano-Serena, F., R. Marchal, J. M. Lebeault, and J. P. Vandecasteele. 2000. Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of culture-headspace composition. *Lett. Appl. Microbiol.* **30**:19–22.
33. Solano-Serena, F., E. Nicolau, G. Favreau, Y. Jouanneau, and R. Marchal. Biodegradability of 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN), a cetane improver of diesel oil. *Biodegradation*, in press.
34. U.S. Environmental Protection Agency. 1982. Chemical fate test guidelines; EPA 560/6-82-003, NTIS PB82-23308. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
35. Waul, C. K., E. Arvin, and J. E. Schmidt. 2007. Microbial degradation of MTBE in reactors, p. 213–248. *In* O. Hutzinger (ed.), *The handbook of environmental chemistry: fuel oxygenates*, vol. 5. Water pollution. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

3 Analyse protéomique des enzymes impliquées dans la voie de dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173.

Le terme protéome est apparu la première fois en 1995 (Wassinger *et al.*, 1995). Il s'agit de l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule ou d'un tissu à un instant donné et dans des conditions données. C'est le produit final de l'expression d'un génome. Alors que le génome reste relativement constant d'une cellule à une autre, le transcriptome est considéré comme dynamique mais son analyse consiste à identifier, à un temps donné les séquences codantes du génome qui sont exprimées. Cependant, celui-ci ne prend pas en compte les fluctuations dues aux régulations post-traductionnelles des protéines. En revanche, le protéome est « dynamique » et varie de façon importante en fonction de différents facteurs comme l'environnement cellulaire, l'état physiologique des cellules, le stress et dans notre cas précis, la présence de produits toxiques comme le 2-EHN (Graves *et al.*, 2002). C'est le protéome de *M. austroafricanum* IFP 2173 que nous étudierons dans ce chapitre. Le génome de cette bactérie n'est pas connu, mais nous avons fait l'hypothèse qu'il était assez proche des génomes d'autres mycobactéries disponibles dans les bases de données pour identifier les protéines induites en présence de 2-EHN.

3.1 Stratégie d'analyse protéomique

Cette première partie présente la démarche expérimentale employée pour identifier les protéines de la souche IFP 2173 impliquées dans la dégradation du 2-EHN. Les outils d'analyse protéomique utilisés dans cette étude sont sommairement décrits car ceux-ci se sont considérablement perfectionnés ces dernières années, notamment depuis l'avènement des techniques de spectrométrie de masse pour l'analyse et le séquençage peptidique.

3.1.1 Analyse des protéines induites sur 2-EHN

M. austroafricanum IFP 2173 utilise le 2-EHN comme unique source de carbone et doit donc synthétiser des enzymes spécifiques à son assimilation. L'objectif de l'analyse est de comparer le profil des protéines sur 2-EHN à celui des protéines présentes sur un autre substrat témoin pour cibler et identifier les enzymes responsables de la dégradation du 2-EHN.

3.1.1.1 Choix de la méthode d'analyse : électrophorèse 1D ou 2D ?

L'analyse de base des protéines consiste à les dénaturer en présence de SDS et à les faire migrer sur un gel d'électrophorèse en fonction de leur masse moléculaire. C'est une méthode simple à mettre en œuvre et reproductible. Elle peut être utilisée pour séparer des

protéines ayant des masses comprises entre 10 et 300 kDa. A partir des années 1975, l'introduction de la technique d'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) par, entre autres, Klose (1975) et Scheele (1975) a permis de faire évoluer les outils d'analyse des protéines. L'électrophorèse bidimensionnelle consiste à séparer dans un premier temps les protéines en fonction de leur point isoélectrique, sur un gel d'acrylamide contenant un gradient de pH. C'est l'étape d'IEF, pour isoélectrofocalisation. Cette technique a été perfectionnée par les travaux de Görg *et al.* (2000) qui précisent l'importance de la température de l'isoélectrofocalisation et du choix des ampholytes pour la reproductibilité de la séparation des protéines. Dans un second temps, les protéines qui ont migré en fonction de leur point isoélectrique, sont séparées en fonction de leur masse moléculaire en conditions dénaturantes. Cette méthode d'analyse comporte de nombreux avantages. Elle permet d'analyser avec précision la charge et la masse des protéines. Elle permet, d'une part, de visualiser les modifications post-traductionnelles, les phosphorylations et les glycosylations. D'autre part elle permet de faire une carte du protéome. Il existe des bases de données de ces cartes disponibles sur Internet comme par exemple à l'adresse suivante : <http://www.expasy.org/ch2d/2d-index.html>. Néanmoins, certaines difficultés liées à la solubilisation et à la préparation de certaines protéines font qu'il est impossible de visualiser l'ensemble des protéines. Ainsi les protéines membranaires hydrophobes, les protéines extrémophiles (hypersalines), les protéines de taille extrême (très petites < 10 kDa ou très grandes > 300 kDa) et les protéines présentant des valeurs de pI extrêmes (basique ou acide) sont rarement détectées sur gel 2D, à moins d'employer des conditions de séparation particulières. De plus, il peut y avoir des biais dans l'analyse liés à l'hyperabondance de certaines protéines, à l'agrégation de glycoprotéines et au mauvais transfert de protéines de la première dimension vers la deuxième.

J'ai dans un premier temps fait l'analyse des protéines sur des gels d'électrophorèse monodimensionnelle (1DE), puis bi-dimensionnelle (2DE). J'ai été confrontée à des problèmes de séparation des protéines membranaires en gels 2DE, comme illustré par la **figure 4.5**. Les protéines ne sont pas correctement séparées en fonction de leur point isoélectrique et ont mal migré dans la deuxième dimension. Bien que certains auteurs aient réussi à améliorer la qualité de ces gels en optimisant la méthode de préparation des protéines membranaires (Sabirova *et al.*, 2006), j'ai préféré analyser les protéines membranaires sur gel SDS-PAGE classique. J'ai amélioré la résolution de ces protéines sur gel SDS-PAGE en utilisant un système de tampon tris-tricine selon la méthode de Schägger *et al.* (2006), plutôt que le système tris-glycine (méthode classique de Laemmli *et al.* (1979)).

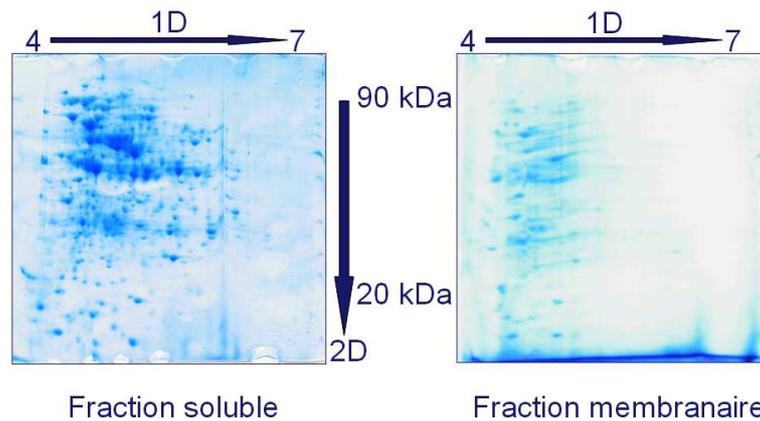


Figure 4.5 : Comparaison de gels d'électrophorèse bidimensionnelle de protéines solubles et membranaires de la souche IFP 2173 incubée sur 2-EHN

Une illustration de la résolution des protéines obtenue dans les deux conditions d'électrophorèse est représentée sur la **figure 4.6**.

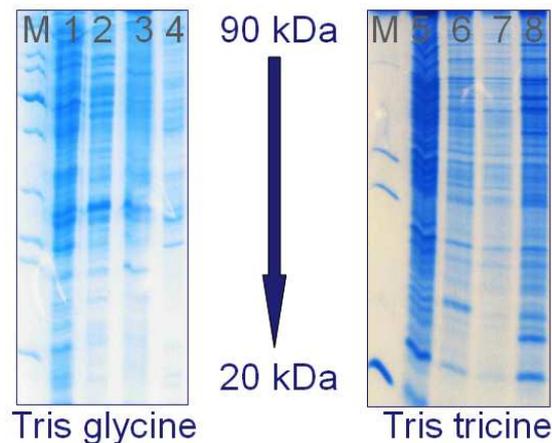


Figure 4.6 : Comparaison de la migration de protéines de la souche IFP 2173 sur gel Tris-glycine et sur gel Tris-tricine.

M : Marqueurs de poids moléculaire.

1 : Fraction protéique soluble sur Tween 80.

2 : Fraction protéique membranaire sur Tween 80.

3 : Fraction protéique soluble sur 2-EHN.

4 : Fraction protéique membranaire sur 2-EHN

5 : Fraction protéique membranaire sur Tween 80.

6 : Fraction protéique membranaire sur 2-EHN.

7 : Fraction protéique membranaire sur succinate.

8 : Fraction protéique membranaire sur 2-EHN

Ainsi, après la mise au point des protocoles, la stratégie d'analyse adoptée fut la suivante :

- L'analyse des protéines solubles a été effectuée par électrophorèse bi-dimensionnelle.
- Les protéines membranaires ont été séparées sur gels Tris-tricine SDS-PAGE.

3.1.1.2 Choix du substrat témoin

L'objectif est de comparer les protéines induites sur 2-EHN par rapport à un substrat de croissance témoin. Les cultures sur 2-EHN, ont été ensemencées à une D.O.₆₀₀ variant de 0,8 à 1 avec des bactéries ayant au préalable poussé sur un substrat de préculture comme l'acétate, le succinate, le Tween 80, le glycérol ou l'isooctane. L'étude de l'influence du substrat de préculture sur la cinétique de dégradation du 2-EHN, décrite p 88-89, montre qu'avec l'acétate, du succinate ou du Tween 80 comme substrat de préculture, la cinétique de dégradation du 2-EHN est similaire. J'ai aussi testé le glucose (qui provoque souvent une répression catabolique) et l'éthanol pour les cultures et les précultures de la souche IFP 2173. J'ai comparé les résultats d'électrophorèse 1D et 2D et j'ai choisi d'utiliser l'acétate comme substrat de référence. C'est un bon substrat pour la souche IFP 2173 et de plus, le métabolisme de l'acétate ne met pas en jeu d'enzymes spécifiques de la dégradation des acides gras. Une illustration de ces résultats pour l'électrophorèse bi-dimensionnelle est représentée par la **figure 4.7**. En comparant les gels 2D sur acétate et sur 2-EHN, j'ai pu identifier une trentaine de protéines spécifiques à la culture sur 2-EHN.

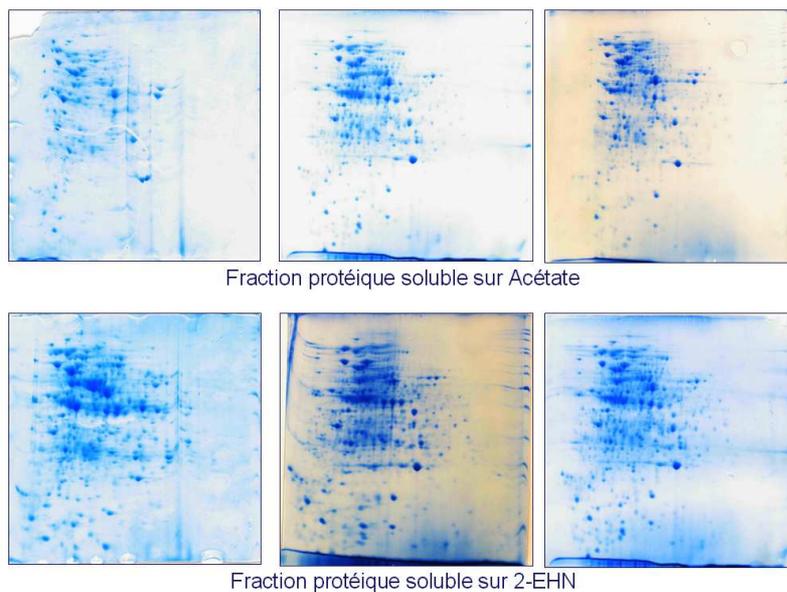


Figure 4.7 : Analyse bi-dimensionnelle des protéines solubles de la souche IFP 2173 sur acétate et sur 2-EHN. Des échantillons de 450 µg de protéines ont été déposés sur chacun des gels colorés au bleu colloïdal.

Cette approche protéomique différentielle, basée sur une comparaison visuelle des gels 2DE a permis de sélectionner des spots 2DE spécifiquement induits sur 2-EHN. Cependant, bien que les gels aient été reproduits au moins trois fois, l'analyse n'est pas quantitative. Il aurait fallu pour cela traiter les résultats de répliquats de gels avec un logiciel d'analyse comme Melanie

(Image Master) et faire des analyses statistiques. Cependant, nous avons voulu confirmer nos résultats par un marquage métabolique en présence des acides aminés radioactifs.

3.1.1.3 Marquage métabolique au ^{35}S

Le marquage métabolique consiste à introduire dans le milieu de culture des acides aminés radioactifs, comme par exemple la méthionine marquée au ^{35}S .

Lors de la culture de la souche IFP 2173 sur 2-EHN et sur acétate, la méthionine et la cystéine marquées au ^{35}S ont été ajoutées et se sont incorporées dans les protéines *in vivo* au cours de l'incubation (5h sur acétate et 30 h sur 2-EHN). Les protéines ont ensuite été extraites et analysées en électrophorèse 1D pour la fraction protéique membranaire et 2DE pour les protéines solubles selon le même mode opératoire que celui décrit dans la partie matériel et méthodes (pages 70-75).

Les résultats d'autoradiographie des gels ont révélé que la plupart des spots de protéines spécifiques à l'extrait 2-EHN étaient les mêmes que ceux déjà mis en évidence par coloration au bleu de Coomassie.

3.1.2 Identification des protéines en LC-MS/MS

Le principe d'analyse des spots 2DE ou bandes 1DE est représenté par le schéma de la **figure 4.8**. Les protéines contenues dans le gel sont digérées par la trypsine qui coupe les polypeptides après une lysine ou une arginine. Le mélange de peptides ainsi obtenu est analysé en chromatographie liquide sur une microcolonne puis analysé dans un premier détecteur de masse qui permet de donner une carte de la masse de tous les peptides (ions parents). Chaque peptide est alors fragmenté dans le second analyseur de masse ce qui permet d'établir sa séquence en acides aminés (ions fils). Ces informations de séquence sont confrontées à celles des bases de données pour identifier les protéines dont les peptides sont dérivés.

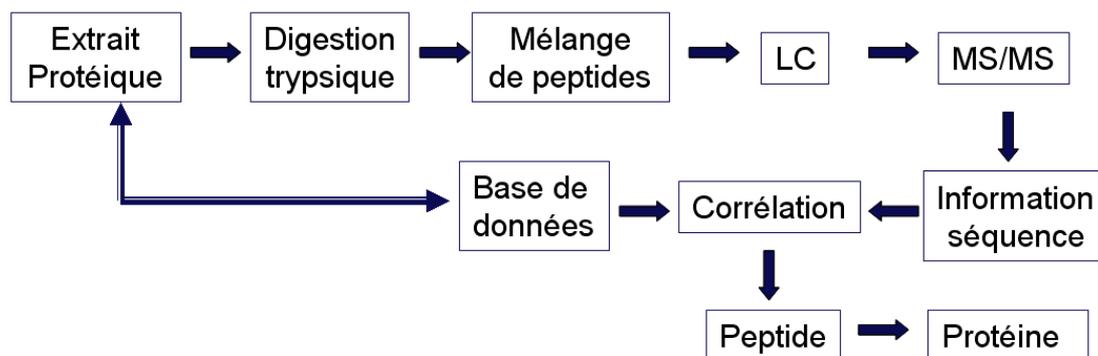


Figure 4.8 : Méthode d'analyse protéomique par LC-MS/MS.

Pour exploiter toutes les séquences peptidiques issues de l'analyse MS/MS, un logiciel, MASCOT, permet d'analyser ces séquences en les confrontant aux bases de données (**figure 4.9**). Grâce au logiciel MASCOT (logiciel d'identification des protéines utilisant des résultats de spectrométrie de masse, Matrix Science, http://www.matrixscience.com/pdf/Brochure_01-2-2005.pdf), les données analytiques sont comparées aux données théoriques obtenues par digestion *in silico* des protéines disponibles dans les bases. A ce jour 18 génomes de mycobactéries séquencés et annotés sont disponibles dans les bases de données et il a 87925 entrées de protéines de mycobactéries dans la base de données UniProtKB/TrEMBL. En général, chaque protéine est identifiée par plusieurs peptides. Les peptides qui ne correspondent pas à 100 % aux peptides théoriques de la protéine de référence ne sont pas inclus dans l'analyse. Un score basé sur le résultat d'analyse d'un peptide donné en MS/MS est attribué à chaque peptide. Le score est $10 * \text{Log} (P)$ où P est la probabilité que la corrélation entre le peptide analysé et la séquence peptidique de référence dans les bases de données soit un évènement aléatoire. Si le score individuel d'un peptide est supérieur à 39, cela signifie que la probabilité pour que le peptide analysé et le peptide de référence soit identiques de manière aléatoire est inférieure à 5 %. Les scores des protéines sont calculés en faisant la somme des scores des peptides constitutifs. Enfin, Mascot calcule le % de la protéine couvert par les peptides retrouvés lors de l'analyse en LC-MS/MS ; c'est le taux de recouvrement ou « **coverage** ».

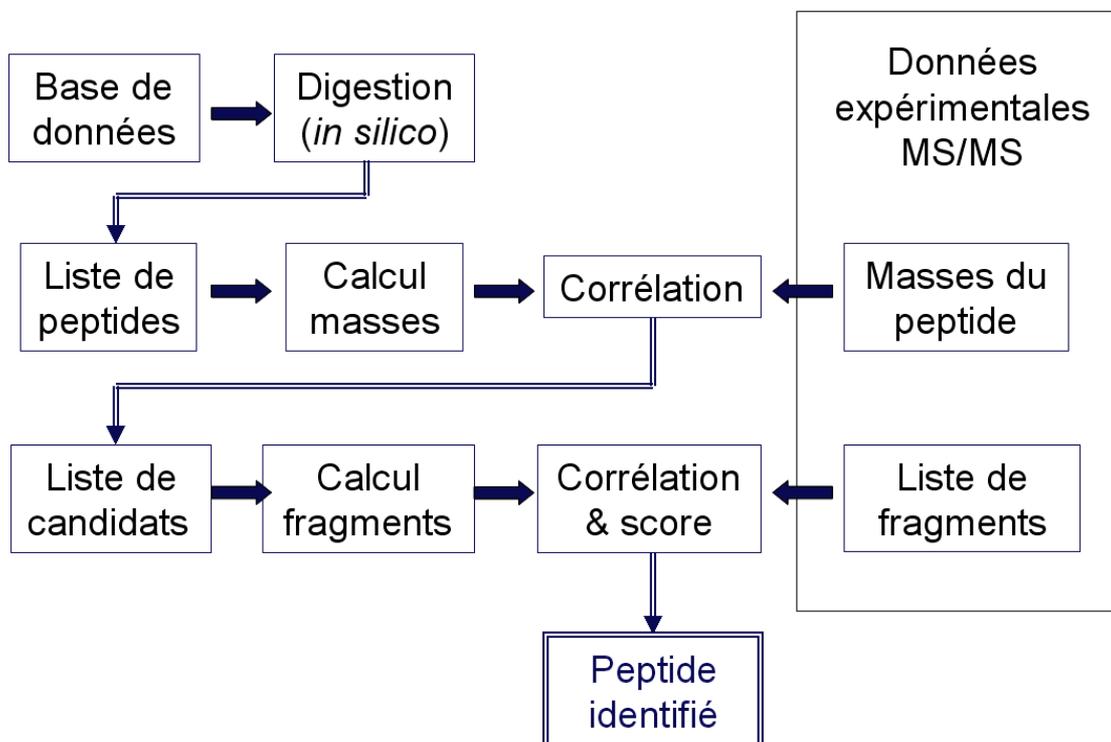


Figure 4.9 : Principe d'identification des protéines par MASCOT

Afin de transférer les données d'identifications générées par Mascot sur Excel, un logiciel libre, élaboré au Laboratoire d'Etude Dynamique des Protéomes (CEA de Grenoble) nommé IRMa (IRMa, CEA/DSV/iRTSV/LEDyP) est utilisé. Ce logiciel permet en outre de vérifier les peptides identifiés lorsqu'ils présentent un faible score d'identification. Il tient compte des mauvaises coupures par la trypsine (« miscleavage »), des modifications des peptides comme l'oxydation de méthionines lors de la préparation des échantillons. Et il indique certains résultats de masse comme le nombre de spectres permettant l'identification d'un peptide et le nombre de peptides servant à identifier une protéine. Ces valeurs permettront de donner une valeur d'abondance relative des protéines.

Une protéine peut être identifiée par au minimum un peptide à condition que son score soit supérieur à 120. Plusieurs protéines sont identifiées (1 à 5 en moyenne) par set de peptides analysé pour un spot 2D. Le score, le nombre de peptides servant à l'identification et le « coverage » de chacune de ces protéines permet de les différencier. La protéine qui a le meilleur score et le plus grand nombre de peptides identifiés est probablement la protéine d'intérêt, ou du moins la plus abondante dans l'échantillon.

Sur un gel SDS-PAGE, toutes les protéines sont séparées uniquement en fonction de leur masse. Dans une bande, il peut y avoir jusqu'à 100 protéines, qui une fois digérées à la trypsine donneront plusieurs centaines de peptides à identifier. Dans le lot de protéines identifiées, il est alors difficile de déterminer celles qui sont effectivement impliquées dans la dégradation du 2-EHN. Dans ce qui suit, nous avons utilisé une approche comparative, extrait 2-EHN versus extrait acétate, pour l'analyse des protéines membranaires.

3.1.3 Une analyse quantitative des protéines membranaires

L'approche mise en œuvre est basée sur une méthode semi-quantitative qui permet de comparer les extraits protéiques de bactéries exposées au 2-EHN à des bactéries témoins (sur acétate) en analysant l'intégralité des protéines séparables par SDS-PAGE. Sur chaque piste du gel d'électrophorèse exactement 5 µg de protéines ont été séparées. Pour chacune des pistes, 13 bandes ont été découpées, et chacune d'elles a été analysée par digestion peptidique et LC/MS-MS comme indiqué précédemment.

A partir des données d'identification de peptides, on peut obtenir des données semi quantitatives en se basant sur le nombre de peptides observés pour identifier une protéine et à la qualité des spectres d'identification des peptides. Il est alors possible de donner une estimation de la quantité relative des protéines présentes dans l'échantillon. Je présente ici

deux méthodes utilisées pour calculer l'abondance relative des protéines dans nos expériences.

3.1.3.1 Protein Abundance Index

Le nombre de peptides observés permettant l'identification d'une protéine est comparé au nombre de peptides observables. Les peptides observables représentent l'ensemble des peptides théoriquement produits par la digestion totale de la protéine sauf ceux qui sont exclus par les paramètres de l'analyse c'est à dire les trop petits, les trop grands et les très hydrophobes. Le rapport entre peptides observés et peptides observables est défini comme étant le « Protein Abundance Index » ou PAI. Le PAI est fonction de l'abondance relative des protéines car, plus une protéine est abondante plus il y a de chances de détecter ses peptides constitutifs par LC/MS. Dans la littérature, on trouve plutôt une forme exponentielle de ce rapport, donnée par la formule ci-dessous pour que les valeurs numériques obtenues soient comprises entre 0 et 9. Le résultat de ce calcul donne à chaque protéine une valeur d'emPAI pour « exponentially modified Protein Abundance Index ».

$$\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}-1}$$

Cette analyse permet d'une part d'identifier de manière assez exhaustive les protéines présentes dans chacun des échantillons (témoin et essai) et d'autre part de comparer le niveau d'expression des protéines entre les deux conditions expérimentales.

La méthode mathématique utilisée par Mascot utilisée pour calculer le nombre de peptides observés par rapport au nombre de peptides observables est basée sur la publication de Ishihama *et al.* (2005). Les auteurs calculent le nombre de peptides observables en fonction de la masse de la protéine et du nombre de lysine et d'arginine. Concernant le nombre de peptides observés, ils ne tiennent pas compte de leur état de charge. Suite au passage des échantillons au niveau de l'électrospray, les peptides sont chargés une, deux voire trois fois. Ainsi un même peptide peut être compté deux ou trois fois. Ce qui n'est pas représentatif du nombre de peptides observés expérimentalement. De ce fait, la méthode de calcul des emPAI a été modifiée pour ne pas compter plusieurs fois les peptides ayant plusieurs états de charge (nouvelle version du logiciel IRMa).

Afin de comparer les pistes acétate et 2-EHN le pourcentage d'abondance des protéines déduit des valeurs des emPAI est calculé selon la formule : % abondance = emPAI * 100 / $\Sigma(\text{emPAI})$ de la piste. Il est indiqué dans l'annexe 1 par l'expression « notre emPAI » à la différence de l'emPAI calculé par Mascot.

3.1.3.2 Spectral count

Le spectral count représente le nombre total de spectres peptidiques identifiés pour une protéine. C'est une approche de quantification plus fine que le calcul des emPAI. Elle est citée dans de nombreux articles récents comme Xia *et al.* (2007) et Fu *et al.* (2008).

Un pourcentage d'abondance est aussi calculé. Pour pouvoir faire la comparaison entre la piste acétate et la piste 2-EHN, il est nécessaire de comparer la valeur du spectral count à la somme des valeurs de spectral count de l'échantillon. C'est sur cette base que nous nous baserons pour analyser les résultats de cette étude protéomique.

Dans le cas de l'analyse des protéines de la souche IFP 2173, la bactérie de référence est *M. vanbaalenii* PYR-1, celle qui vient après est *M. gilvum* PYR-GCK, deux bactéries qui ont été isolées pour leur capacité à dégrader le pyrène. Même si la souche *M. austroafricanum* IFP 2173 a de nombreuses protéines proches de celles de *M. vanbaalenii* PYR-1, cette dernière n'est pas capable de dégrader le 2-EHN.

Les résultats de nos travaux sont présentés dans l'article 3 :

3.2 Article 3

Proteomic identification of enzymes involved in 2-EHN biodegradation in *Mycobacterium austroafricanum* IFP2173

Elodie Nicolau¹, Lauriane Kuhn², Rémy Marchal³, Yves Jouanneau¹

¹ Laboratoire de Chimie et Biologie des Métaux, and ² Laboratoire d'Étude de la Dynamique des Protéomes, CEA, DSV, IRTSV, 38054 GRENOBLE, France.

³ Département de Biotechnologie, Institut Français du Pétrole, 92852 Rueil-Malmaison Cedex, France

Keywords : *Mycobacterium austroafricanum*, 2-ethylhexyl nitrate, alkane hydroxylase, AlkB, CYP153, β -oxidation.

Running title: Enzymes involved in 2-EHN degradation

Corresponding author:

Yves Jouanneau

LCBM/iRTSV, CEA-Grenoble

F-38054 Grenoble Cedex 9, France.

Tel. : 33 (0)4 38 78.43.10; Fax : 33 (0)4 38 78.51.85

Email : yves.jouanneau@cea.fr

Abstract

2-Ethyhexyl nitrate (2-EHN) is a synthetic chemical used as a diesel fuel additive, which can be slowly degraded by *Mycobacterium austroafricanum* IFP2173. In this study, the enzymes involved in 2-EHN degradation have been investigated by proteomic analyses. Two-dimensional gel electrophoresis showed that 35 cytoplasmic proteins were up-regulated in cells exposed to 2-EHN. Most proteins were identified as enzymes of the β -oxidation. A thorough analysis of the proteome identified over 1300 proteins, 365 of which were found to be up-regulated on 2-EHN. These proteins include multiple isoenzymes of the β -oxidation, two alcohol and one aldehyde dehydrogenases as well as proteins involved in regulation and response to stress. Interestingly, four cytochromes P450 appeared to be induced on 2-EHN, including one CYP153 which functions as an alkane hydroxylase. Like *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, strain IFP2173 was found to contain two *alkB*-like genes encoding putative membrane-bound alkane hydroxylases. RT-PCR experiments demonstrated that the gene encoding the CYP153 protein as well as the *alkB* genes were expressed on 2-EHN. Hence, almost all the enzymes required for the biodegradation of 2-EHN by strain IFP2173 have been identified, including three oxygenases that might catalyse the initial hydroxylation step.

1. Introduction

2-ethylhexyl nitrate (2-EHN) is a xenobiotic compound used as a gasoline additive. Due to its explosive properties, 2-EHN is considered as the best cetane improver for diesel oil, including bio-diesels that might be used in the near future [1, 2]. In case of accidental release, 2-EHN is a serious health hazard as humans exposed to this chemical were found to suffer from various symptoms including headache, dizziness, chest discomfort, palpitations or nausea [3]. Although 2-EHN was considered not readily biodegradable by US EPA [4], it was recently reported that it could be degraded by *Mycobacterium austroafricanum* [5].

Soil *Mycobacteria* have been described for their ability to degrade a wide range of aliphatic and aromatic hydrocarbons, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [6-8], and fuel additives such as methyl *tertio*-butyl-ether (MTBE) [9, 10]. These bacteria are well equipped to degrade hydrocarbons, which they used as carbon sources. Their bacterial wall, rich in mycolic acids, confers resistance to toxic hydrophobic pollutants and may facilitate access to hydrocarbons [11, 12]. Moreover, soil *Mycobacteria* contain oxygenases of different types, which play a crucial role in the degradation of both aliphatic and aromatic hydrocarbons. For instance, monooxygenases catalyze the first step in the degradation of alkanes. C₅-C₁₆ alkanes are substrates of two kinds of enzymes, either integral-membrane non-heme diiron monooxygenases (AlkB) [13], or cytochromes P450 [14]. Growth on alkanes requires metabolic adaptation as shown for the marine bacterium *Alcanivorax borkumensis* SK2 [15]. Proteomic analysis revealed that alkane utilisation may proceed via different pathways, involving two AlkB hydroxylases, one putative flavin monooxygenase and three P450 cytochromes. Bacterial adaptation to alkane utilisation resulted in a strongly modified metabolism, with consequences on carbon flux and membrane lipid composition [15].

In previous studies, *M. austroafricanum* IFP 2173 was isolated on iso-octane [16], then selected for its ability to degrade 2-EHN [5]. Degradation of 2-EHN was found to be incomplete, yielding a 6-carbon γ -lactone, which accumulated as a dead-end product. A degradation pathway was proposed involving hydroxylation of the methyl group in distal position, then oxidation to the carboxylic acid, and further metabolism through one cycle of β -oxidation [17]. In order to identify the enzymes involved in this pathway, we have undertaken a proteomic analysis of the proteins up-regulated in cells exposed to 2-EHN. Because the genome sequence of strain IFP 2173 is unknown, we tentatively identified relevant proteins by comparing their peptide sequences to those of orthologs found in the data bases, especially proteins from fast-growing *Mycobacteria*. Besides focusing on enzymes

involved in 2-EHN degradation, this study gives an insight into proteins possibly involved in the response of bacteria to exposure to a toxic and hydrophobic xenobiotic compound.

2. Material and methods

2.1. Bacterial strain and growth conditions

M. austroafricanum strain IFP 2173 was grown on a mineral salts medium at 30°C as described previously [17]. The carbon source was acetate (4 g/l) and 2-EHN (500 mg/l). Growth was monitored by measurements of the optical density (OD) at 600 nm. To prepare 2-EHN-induced cells, acetate grown-cells were washed and resuspended to an OD of 1.5 in culture medium, then incubated for five days with 2-EHN.

2.2. In vivo ³⁵S labelling of proteins

For labelling experiments, bacteria were incubated with 2-EHN or acetate (control) in the presence of a mixture of ³⁵S-labelled methionine and cysteine (0.1 mCi, Easytag Express protein-labelling mix; NEN Life Science Products). Bacteria were incubated for 6 h (acetate) or 30 h (2-EHN) at 30°C. In a control experiment, bacteria were incubated without exogenous C-source for 30h. Protein extracts were prepared as described below and analyzed by 2D electrophoresis and SDS-PAGE.

2.3. Preparation of protein extracts

Cell-free extracts were prepared by ultrasonication as previously described [18]. Ultracentrifugation at 240,000 g for 1 h was performed to separate soluble proteins from the membrane fraction, using an Optima TLX Ultracentrifuge (Beckman Instruments). Supernatant fractions were treated with benzonase (2,000 U; Merck), and subsequently dialysed for 4-5 h at 4°C against 5 mM phosphate buffer, pH 7.5, containing 1 mM MgCl₂, then overnight against ultrapure water. Samples were immediately processed as described below or stored at -20°C.

2.4. Two dimensional gel electrophoresis

Two-dimensional (2D) gel electrophoresis was carried out as described previously [18], with minor modifications. Briefly, 400 µg protein samples (or labelled extracts equivalent to 4.2 10⁴ cpm) were applied to 18-cm IPG strips (ReadyStrip; Biorad) and fractionated in the pH range 4 to 7 by isoelectric focusing for a total of approximately 70 kVh. Second dimension

electrophoresis was carried out on 12.5 % polyacrylamide gels in a Protean II xi cell (Biorad) at 20 mA per gel for 15-16 h, using a Tris-glycine buffer system [19]. The proteins were visualised by colloidal blue G-250 staining as described by Neuhoff [20], except that ethanol replaced methanol. Gels were photographed with a Canon camera. ³⁵S labelled gels were stained, dried, and exposed to X-ray films for 3 weeks (Kodak BioMax MR). All gels were performed in triplicate, except for gels containing labelled proteins. Comparison of 2D gel patterns and spot intensities was carried out by visual inspection of gels. Only spots that were absent in control extracts or that repeatedly showed an estimated intensity at least twice as high on 2-EHN extracts compared to control extracts were taken into consideration. Proteins up-regulated in acetate-grown cells are not discussed in this study.

2.5. SDS-PAGE of membrane fractions

Protein pellets from high speed ultracentrifugation were homogenized in a volume equivalent to 1/10 the initial volume of extract with 25 mM HEPES pH 7.5, containing 10 % of ethylene glycol. Protein samples were adjusted to 1 % SDS, 2.5 % β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.001 % bromophenol blue and 150 mM Tris-HCl, pH 7.0, prior to separation by SDS-PAGE on a 12.5 % polyacrylamide gel in the Tris-Tricine buffer system [21]. Proteins were stained with colloidal blue G-250 as described above.

2.6. Protein digestion

Protein bands were manually excised from the gels and automatically prepared (EVO150, Tecan). Samples were washed several times by incubation in 25 mM NH_4HCO_3 for 15 min and then in 50 % (v/v) acetonitrile containing 25mM NH_4HCO_3 for 15 min. Gel pieces were then dehydrated with 100 % acetonitrile and then incubated with 7 % H_2O_2 for 15 min before being washed again with the destaining solutions described above. 0.15 μg of modified trypsin (Promega, sequencing grade) in 25 mM NH_4HCO_3 was added to the dehydrated gel spots for an overnight incubation at 37°C. Peptides were then extracted from gel pieces in three 15 min sequential extraction steps in 30 μL of 50% acetonitrile, 30 μL of 5% formic acid and finally 30 μL of 100% acetonitrile. The pooled supernatants were then dried under vacuum.

2.7. Nano-LC-MS/MS analysis.

For nano-LC-MS/MS analysis, the dried extracted peptides were resuspended in water containing 2.5 % acetonitrile and 2.5 % trifluoroacetic acid. A nano-LC-MS/MS analysis was

then performed (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap, Thermo Fischer Scientific). The method consisted in a 60-minute gradient at a flow rate of 300 nL/min using a gradient from two solvents: A (5% acetonitrile and 0.1% formic acid in water) and B (80% acetonitrile and 0.08% formic acid in water). The system includes: a 300 µm X 5 mm PepMap C18 precolumn and a 75 µm X 150 mm C18 column (Gemini C18 phase). MS and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fischer Scientific) and processed automatically using Mascot Daemon software (Matrix Science).

Consecutive searches against the SwissProt/Trembl database were performed for each sample using an intranet version of Mascot 2.0. Peptide modifications allowed during the search were: N-acetyl (protein), dioxidation (M), oxidation (M), cysteic acid (C) and sulphone (M). Proteins showing two peptides with a score higher than the query threshold (p-value <0.05) were automatically validated with an home-made software (IRMa, CEA/DSV/iRTSV/LEDyP). Each protein identified by only one peptide was checked manually using the classical fragmentation rules.

For each identified protein, the emPAI and spectral count values were calculated and reported in the result tables (http://www.matrixscience.com/help/quant_empai_help.html). From these values, abundance rates were then calculated as percentages of the whole set of identified proteins according to the formula: Abundance of proteinX = (spectral count (proteinX) * 100) / (Σ spectral counts for all_proteins).

2.8. RNA extraction and RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 50-mL cultures of strain IFP 2173 using standard procedures [22]. Bacteria were grown to an OD₆₀₀ of 0.7, then centrifuged at 10,000 g, and resuspended in 200 µL of 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8, containing 1.5 mg/mL lysozyme and 25 µg/mL lysostaphine (Sigma Life Science). After 10 min at 37°C, RNA were extracted using the RiboPure™-Bacteria kit (Ambion, Austin, Texas). Crude RNA samples (2 µg) were treated with Turbo DNase (Ambion). Resulting RNA preparations were quantified using a Nanodrop apparatus (NanoDrop Technologies). RT-PCR was performed with 10 ng of RNA preparation using the One step RT-PCR kit (Promega, France). PCR amplification of internal gene sequences was carried out with the following primer pairs: for *alkB1*, *alkB1-F* (5'-CGTGATCATGGGTGCCTAC-3') and *alkB1-R* (5'-CCAGAACGTCTCACCGAAG-3'); for *alkB2*, *alkB2-F* (5'-CCTGATGTTCCCTCGTGATCC-3') and *alkB2-R* (5'-CTTGTCGACGTCGCTCATC-3'); for CYP153, P450fw1 and P450rw3 [23]; for the aldehyde dehydrogenase encoding gene (*alkH*), *ALDH1-F* (5'-

GCACCGTGCTGATCATCGGTGC-3') and ALDH1-R (5'-CCAGGCGATGCGCTTGGCG-3'), for the 16S RNA gene, P16S-F (5'-GGTCTAATACCGAATACACCCTTCT-3') and P16S-R (5'-CCAGGAATTCCAGTCTCCC-3'). RT-PCR reactions were carried out as follows: 45 min at 45°C, 3 min at 95°C, 32 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 62°C and 30 s at 72°C, 5 min final elongation at 72°C. Products were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels.

2.9. Nucleotide sequences

The nucleotide sequences *alkB1rubA1rubA2tetR*, *alkB2*, CYP153, *alkH* (partial) were deposited under accession number FJ009005, FJ009004, FJ009003, FJ2074720, respectively.

3. Results

3.1. Identification of cytoplasmic proteins up-regulated on 2-EHN

In order to identify proteins up-regulated on 2-EHN, protein profiles of cells incubated with this compound were compared to those of cells grown on acetate. Cytoplasmic proteins were prepared and analysed by 2D gel electrophoresis while membrane-associated proteins present in the high-speed centrifugation pellet of cell extracts were separated by SDS-PAGE.

Comparison of 2D gel protein profiles revealed that more than 30 protein spots were either absent in acetate-grown cells or at least two-fold more abundant in 2-EHN-grown cells (Fig. 1). To confirm these results, we performed ³⁵S-labeling experiments where cells were exposed to 2-EHN for 30 h (6 h for reference cells). Autoradiographies of the 2D gel showed markedly different patterns (Fig. 1, C & D). Most labelled proteins uniquely detected in 2-EHN-exposed cells corresponded to spots previously identified based on stained gel comparison, but three additional 2-EHN-specific polypeptides were found. The position of these extra polypeptides has been reported on the 2D image in Fig. 1A. The proteins of interest were tentatively identified by LC-MS/MS analysis of tryptic digests followed by a search for peptide matches in the data bases using Mascot (see Materials and Methods for details). A total of 35 proteins were identified based on close similarities with orthologs found in *M. vanbalenii* PYR1 and related *Mycobacterium* strains from soil (Table 1). One set of induced proteins was clearly associated to the β -oxidation of fatty acids. Some of the enzymes involved in this pathway were found in multiple isoforms, including acetyl-CoA acyltransferase (2 copies), acyl-CoA dehydrogenase (7 copies), enoyl-CoA hydratase/isomerase (4 copies). Consistent with this finding, the reference *Mycobacterium* strains mentioned above were found to contain multiple

gene copies coding for enzymes of the β -oxidation in their genome (Table S1). Other proteins up-regulated on 2-EHN included dehydrogenases, diverse metabolic enzymes and proteins involved in cell response to stress (Table 1).

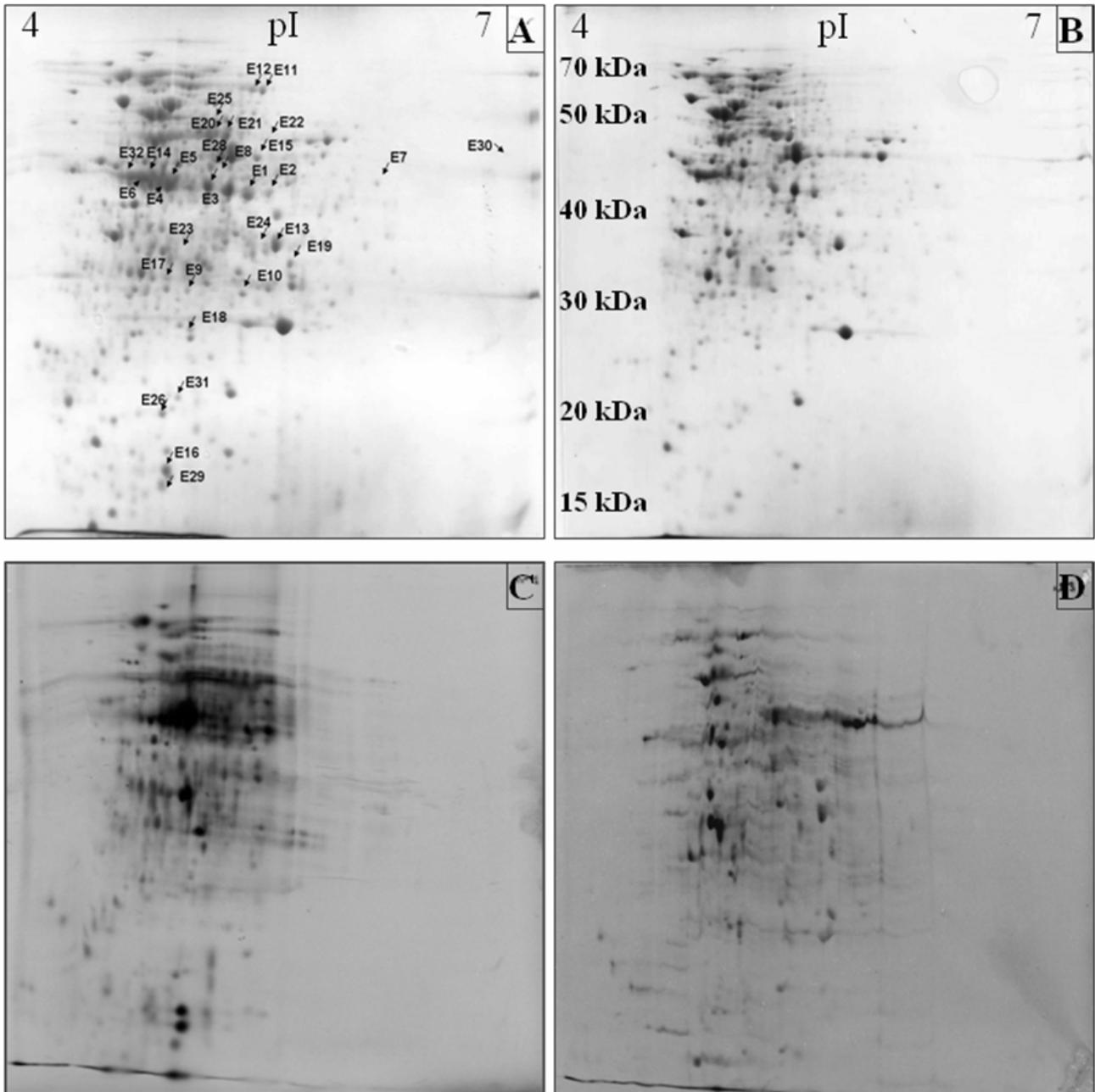


Figure 1: 2D gel map of soluble proteins from *M. austroafricanum* IFP 2173.

Isoelectric focusing was performed in the 4-7 pH range.

A: cells grown on 2-EHN, **B:** cells grown on acetate, **C:** ³⁵S labelled proteins induced on 2-EHN, **D:** ³⁵S labelled proteins induced on acetate. 2-EHN-specific protein spots are numbered in panel A.

Table 1: Cytoplasmic proteins up-regulated upon incubation of *M. austroafricanum* IFP 2173 on 2-EHN

Enzyme or protein function	Spot #	2-EHN induction	³⁵ S-labelling on 2-EHN	pI	Mol Mass	Score	Coverage (%)	Peptides	SwissProt/TrEMBL	Micro-organism
Fatty acid metabolism										
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein	E1	+++	+++	5,3	41116	186	9,95	3	A4TFJ1	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
	E2	+++	+++	5,4		180	8,58	3		
	E1	+++	+++	5,3	40821	133	10,78	3	A3Q1G5	<i>Mycobacterium</i> sp. JLS
	E2	+++	+++	5,4	40989	702	31,72	10	A1TCG6	<i>M.vanbaalenii</i> PYR-1
	E3	+++	-	5,15	42234	112	9,92	2	A4T8F2	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
	E4	+++	+++	4,8	39744	265	18,01	4	A1TDA6	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E7	++	++	5,87	42108	118	5,74	2	A4TFI8	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
	E8	+++	+	5,2	41520	585	36,32	9	A1T5U2	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Enoyl-CoA hydratase/isomerase	E9	+++	+	4,9	29971	133	9,09	2	A1TDW3	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E10	-	+++	5,1	27387	121	11,29	2	A4TFL1	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
	E9	+++	+++	4,85	27478	280	21,69	5	A1TE56	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD-binding	E9	+++	+++	4,85	26666	35	5,37	1	A4TDN8	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
	E11	++	++	5,4	76177	586	19,36	11		
Acetyl-CoA C-acyltransferase (EC 2.3.1.16)	E12	++	++	5,4		381	10,84	7	A1TF87	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E1	+++	+++	5,4	39836	591	32,41	9	A1TDW4	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Acyl-ACP thioesterase	E13	++	+++	4,9	42130	189	11,49	3	A1TF88	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E10	+++	+++	5,3	70417	117,03	3,28	2	A1T388	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Dehydrogenases										
Alcohol dehydrogenase GroES domain protein	E14	+++	+++	4,75		370	18,89	5		
	E4	+++	+++	4,77	38681	409	26,39	5	A4TFL6	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
	E5	+++	+++	4,8		307	17,95	4		
FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase	E15	+++	+++	5,55	42755	319	17,78	5		
	E7	+++	+	5,8		152	9,21	3	A4TFL9	<i>M. gilvum</i> PYR-GC
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR	E17	+++	++	4,9	29920	164	15,44	3	A1T1A7	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E18	+++	+++	4,9	30143	102	10,22	2	Q1BFX1	<i>Mycobacterium</i> sp. MCS

Enzyme or protein function	Spot #	2-EHN induction	³⁵ S- labelling on 2-EHN	pI	Mol Mass	Score	Coverage (%)	Peptides	SwissProt/ TrEMBL	Micro-organism
(S)-2-hydroxy-acid oxidase	E30	+++	-	7	42022	169	9,56	3	A1T4N1	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Dihydrolipoamide dehydrogenase	E22	++	++	5,6	49719	370	17,52	6	A1T382	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Lysine biosynthesis										
Dihydrodipicolinate synthase	E24	++	-	5,4	31436.7	163	11,81	3	A1T7Q1	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Dihydrodipicolinate reductase (EC 1.3.1.26)	E23	++	-	4,8	25816	59	7,69	1	A1T7N8	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Protein synthesis										
Serine-tRNA ligase (EC 6.1.1.11)	E25	+++	+++	4,8	60542.4	128	5,82	2	A1TGX4	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Ketol-acid reductoisomerase (EC 1.1.1.86)	E3	+++	+++	5,2	36513	158	5,44	2	Q1BAR7	<i>Mycobacterium sp. CMS</i>
Nitrogen assimilation										
Alanine dehydrogenase (EC 1.4.1.1)	E28	-	+++	5,2	38907	203	10,76	3	A1T7L9	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Oxidative phosphorylation										
ATP synthase epsilon chain (EC 3.6.3.14) (ATP synthase F1 sector epsilon subunit)	E29	+++	+++	4,8	13330	85	9,09	1	P45822	<i>M. leprae</i> TN
CO₂ hydratation										
Carbonic anhydrase	E31	++	++	4,8	18225	272	32,73	6	A1TDF0	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Glycolysis / glyconeogenesis										
Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	E32	+++	+++	4,7	42102	435	24,08	6	A1T8L1	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E6	+++	+++	4,75		572	27,75	8		
Stress response										
Heat shock protein Hsp20	E26	+++	+++	4,8	15648.4	177	26,76	3	A1T4V8	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
UspA	E24	+++	+++	5,4	31354	85	4,91	1	A1T4W2	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Miscellaneous										
Putative esterase precursor	E18	+++	+++	5	35010	79	6,29	1	A1T6C2	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Chloride peroxidase (EC 1.11.1.10)	E19	++	-	5,7	30410	173	14,86	3	A1T5E7	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1

Enzyme or protein function	Spot #	2-EHN induction	³⁵ S- labelling on 2-EHN	pI	Mol Mass	Score	Coverage (%)	Peptides	SwissProt/ TrEMBL	Micro-organism
Antibiotic biosynthesis monooxygenase	E16	+++	+++	4,8	11741	56	16,04	1	Q1B2M9	<i>Mycobacterium</i> sp. MCS
Allophanate hydrolase subunit 1	E10	+++	+++	5,3	25092	142	9,65	2	A1T1V3	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Fumarate lyase	E20	+++	++	5,1	49944	579	24,25	10	A1TE24	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
	E21	+++	++	5,1	49944	538	27,37	8		
HpcH/HpaI aldolase	E23	++	-	4,8	29032	202	12,93	4	A1TCG4	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Ribonuclease PH (EC 2.7.7.56)	E23	++	-	4,8	27449	75	4,82	2	A1T7Q1	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Glycyl-tRNA synthetase, alpha2 dimer	E22	++	++	5,6	59543	405	18,11	7	A1TBP9	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase precursor	E23	++	-	4,8	29262	195	15,79	3	A1T4U4	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Cyclic nucleotide-binding:regulatory protein, Crp	E27	+++	-	9,6	24776	409	39,56	7	A1T6A5	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1
Phosphoribosyltransferase: Erythromycin esterase	E12	++	++	5,4	74587	49	1,62	1	A1T4X7	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1

Table S1: Copy number of 2-EHN-induced proteins in strain IFP 2173 compared to the expected copy number of relevant proteins in closest strains as deduced from genome analysis

Enzymes possibly involved in 2-EHN biodegradation	Number of copies induced on 2-EHN		Number of gene copies coding for the enzyme		
	1D analysis	2D analysis	<i>M. vanbaalenii</i> PYR-1	<i>M. gilvum</i> PYR-GCK	<i>Mycobacterium</i> sp. KMS
Cytochrome P450/CYP153	2/2	0	49	51	52
Esterase	4	1	10	8	8
Alcohol dehydrogenase GroES domain protein	2	1	15	13	19
Aldehyde dehydrogenase	1	0	21	18	18
Acetyl-CoA acetyltransferase	1	2	13	17	4
Acyl CoA dehydrogenase domain protein	11	7	71	63	71
Enoyl-CoA hydratase/isomerase	2	4	20	15	40
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD-binding	2	1	2	1	2
Thiolase	0	0	3	3	3

3.2. 2-EHN induction of membrane-associated proteins

Since membrane proteins are generally difficult to analyze by regular 2D gel electrophoresis, we chose to separate the insoluble high-speed fractions of cell extracts by one dimension SDS-PAGE. When stained protein profiles of 2-EHN versus acetate-grown cells were compared no obvious differences were observed. However, ^{35}S radioactive labelling revealed that some proteins, including a prominent 45 kDa, became clearly labelled upon exposure to 2-EHN (Fig. S1). In order to identify proteins of interest, protein sets from 2-EHN and acetate grown cells were separated by SDS-PAGE, and subjected to proteomic analysis. Data processing using Mascot and a locally developed software (IRMa) identified over 1300 proteins most of which had counterparts in the proteome of *M. vanbaalenii* PYR1. A summary of proteins found to be common or specific to each cell treatment is presented in tables S2 and S3 in supplementary material (at the end of the thesis). From the set of common proteins, a subset was selected based on abundance rates more than twice as high for the 2-EHN treated cells as compared to control cells. This protein subset (65 proteins) as well as those found to be specific to the 2-EHN treatment (300 proteins) were tentatively classified in terms of enzyme category or metabolic function, with special emphasis on enzymes related to alkane degradation. An inventory of the classified proteins is summarized in Table 2. A total of 17 proteins have been identified

as enzymes of the β -oxidation of fatty acids, four of which were already detected in the 2D gel analysis. Consistent with the 2D gel data, numerous proteins up-regulated on 2-EHN were dehydrogenases including 12 short-chain dehydrogenase/reductases (SDR). Several proteins were likely involved in the response to stress, other presumably act as transcriptional regulators. The analysis highlighted two alcohol dehydrogenases and one aldehyde dehydrogenase possibly implicated in the early steps of the 2-EHN degradation pathway (see below). Interestingly, enzymes of the central metabolism previously shown to be essential for alkane assimilation [15] have been detected including two phosphoenolpyruvate synthases involved in gluconeogenesis. Enzymes related to the metabolism of lipids were also identified, suggesting that membrane modifications might occur as part of the bacterial adaptation to growth on a hydrophobic substrate.

Four P450 cytochromes were identified, two of which are potentially capable of alkane hydroxylation. The latter two proteins, which belong to the CYP153 subclass of P450, were exclusively produced on 2-EHN. The most abundant of the two enzymes, identified by 11 peptides (36% coverage), was found to be closely related to the CYP153 enzyme from *Mycobacterium* sp. XHN-1500 [24].

It is to note that many cytoplasmic proteins were recovered in the membrane fractions, indicating that they might have been trapped in membrane vesicles that formed upon cell lysis. On the other hand, membrane proteins relevant to the metabolism of alkanes were not detected in either protein extract. This was the case for the trans-membrane AlkB hydroxylase that is known to catalyze the initial oxidation reaction of alkanes in many bacteria [13].

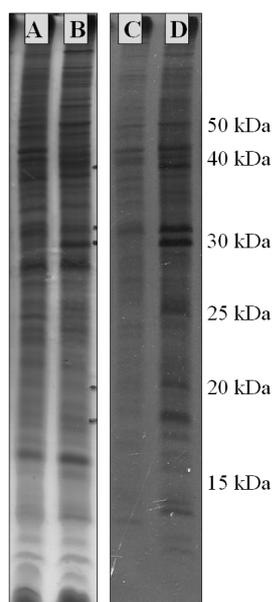


Figure S1: SDS-PAGE analysis of membrane-associated proteins in cells grown on acetate or exposed to 2-EHN.

A: protein extract from acetate grown cells, **B:** protein extract from cells exposed to 2-EHN, **C:** ^{35}S labelled proteins induced on acetate, **D:** ^{35}S labelled proteins induced on 2-EHN

Table 2: Functional classification of proteins more abundant or exclusively detected on 2-EHN

Enzyme or general protein function	Number of proteins	
	exclusively found on 2-EHN	More abundant on 2-EHN
Beta oxidation	17	1
P450 hydroxylases	4	0
Esterases	3	1
Dehydrogenases	2 ADH	1 ALDH (1)
SDR	10	2
Stress response	12	9
Regulation	21	3
Lipid metabolism/cell wall	13/1	1/3
Ribosomal proteins	12	2
N-metabolism	3	1
General metabolism	74	22
ABC transporter proteins	22	3
Other	64	6
Putative uncharacterized	42	10

3.3. Occurrence of several putative alkane monooxygenases in strain IFP2173

Our proteomic analysis revealed that one cytochrome P450 with close similarity with a well characterized alkane hydroxylase (CYP153) was 2-EHN-specific. In order to learn more on this protein, its structural gene was PCR-amplified using genomic DNA from strain IFP2173 and specific oligonucleotides designed after the gene sequence of *CYP153A* from strain XHN-1500 [24]. A 1261 bp gene was obtained, which displayed high sequence similarity with its counterpart from strain XHN-1500 (99 % identities), resulting in a predicted protein having only two amino acid changes compared to CYP153A.

In a previous study, a gene potentially involved in isoalkane degradation was found in strain IFP2173 and identified as an *alkB* gene based on partial sequence determination [16]. A BLAST search showed that this gene was closely related to *alkB* from *M. vanbaalenii* PYR-1. This strain has two alkane monooxygenase genes, one of which is associated with two genes encoding rubredoxins. Primers were designed after the *alkB* gene sequences of *M. vanbaalenii* PYR-1, and used to amplify corresponding genes from strain IFP 2173 genomic DNA. Two *alkB*-like genes were found in two separate loci, which displayed exactly the same gene arrangement as that found in *M. vanbaalenii* PYR-1. In particular, the *alkB1* gene was followed by two rubredoxin genes, named *rubA1* and *rubA2*, almost identical to homologous genes of *M. vanbaalenii* PYR-1 (99% identity). The second *alkB* gene (*alkB2*) was 98% identical to its counterpart in strain PYR-1.

3.4. RT-PCR evidence for the expression of three alkane hydroxylases in 2-EHN fed cells

Since none of the AlkB-like hydroxylase was detected in extracts of strain IFP2173 upon proteomic analysis, we carried out RT-PCR experiments to determine whether the corresponding genes were expressed under the growth conditions used in this study. Transcripts of the *alkB1* and *alkB2* genes were equally detectable in acetate and 2-EHN-fed cells (Fig. 2). Further analysis showed that a transcript specific for the gene encoding the CYP153 hydroxylase described above was also detected in both 2-EHN and acetate-grown cells (Fig. 2). This finding is consistent with the fact that the enzyme was clearly identified by proteomic analysis in 2-EHN-fed cells but contrasted with the finding that it was absent in acetate-grown cells. Perhaps cells growing on acetate produce the CYP153 protein at a low level or in a transient manner during a particular phase of growth, so that it passed undetected.

A single aldehyde dehydrogenase appeared to be up-regulated in 2-EHN-fed cells to a level at least 2-fold as high as in acetate-grown cells. Using primers designed after the gene encoding an orthologous aldehyde dehydrogenase from strain PYR-1 (A1P1A6), a DNA fragment, which perfectly matched the target gene sequence, was PCR-amplified from IFP2173 genomic DNA. RT-PCR demonstrated that this gene was transcribed in both acetate and 2-EHN fed cells (Fig. 2). The deduced sequence of the closely related PYR-1 enzyme displayed 39% sequence identity with the product of the *alkH* gene from *P. putida* GPo1.

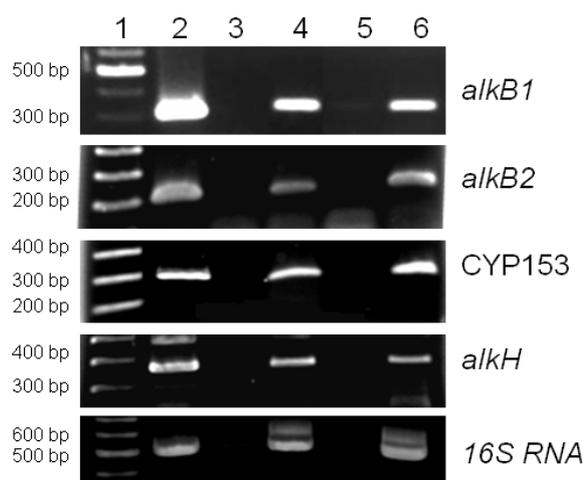


Figure. 2: Expression of genes relevant to 2-EHN degradation as analyzed by Reverse Transcription (RT)-PCR. Lane 1, DNA ladder ; lane 2, PCR amplicon generated from gDNA; lane 3, Control on RNA from 2-EHN-grown cells with reverse transcriptase omitted; lane 4, RNA from acetate-grown cells; lane 5, RNA from 2-EHN-grown cells.

4. Discussion

The present study deals with the metabolic adaptation of a bacterium which was forced to grow on a xenobiotic compound being a poor carbon source and a toxic substance. Our proteomic analysis identified over 1300 proteins based on sequence information available in the data bases even though the genome of strain IFP2173 was unknown. Most proteins were identified as orthologs from strain *M. vanbaalenii* PYR-1 or related *Mycobacterium* species, thus reflecting the high degree of conservation of protein sequences in the proteomes from fast-growing *Mycobacterium* species isolated from various places around the world. Besides catabolic enzymes allowing the bacterium to utilize 2-EHN as carbon source, many up-regulated proteins were found to be involved in lipid metabolism, regulation and response to stress, and might help bacteria to adapt to the toxic and/or hydrophobic character of 2-EHN. The following discussion focuses on enzymes that might be implicated in 2-EHN degradation.

In a previous study, we showed that strain IFP2173 partially degraded 2-EHN to a compound identified as 4-ethyltetrahydrofuran-2(3H)-one, and we proposed a degradation pathway outlined in figure 3 [17]. Every step in the pathway can be assigned at least one enzyme found among the proteins up-regulated on 2-EHN, except for the last step of the β -oxidation which is catalyzed by a thiolase. Since three thiolase genes are present in the genomes of three related *Mycobacterium* species (Table S1), at least one thiolase is expected to be produced by strain IFP2173 grown on 2-EHN. Perhaps, the enzyme was synthesized in small amounts and passed undetected in our proteomic analysis.

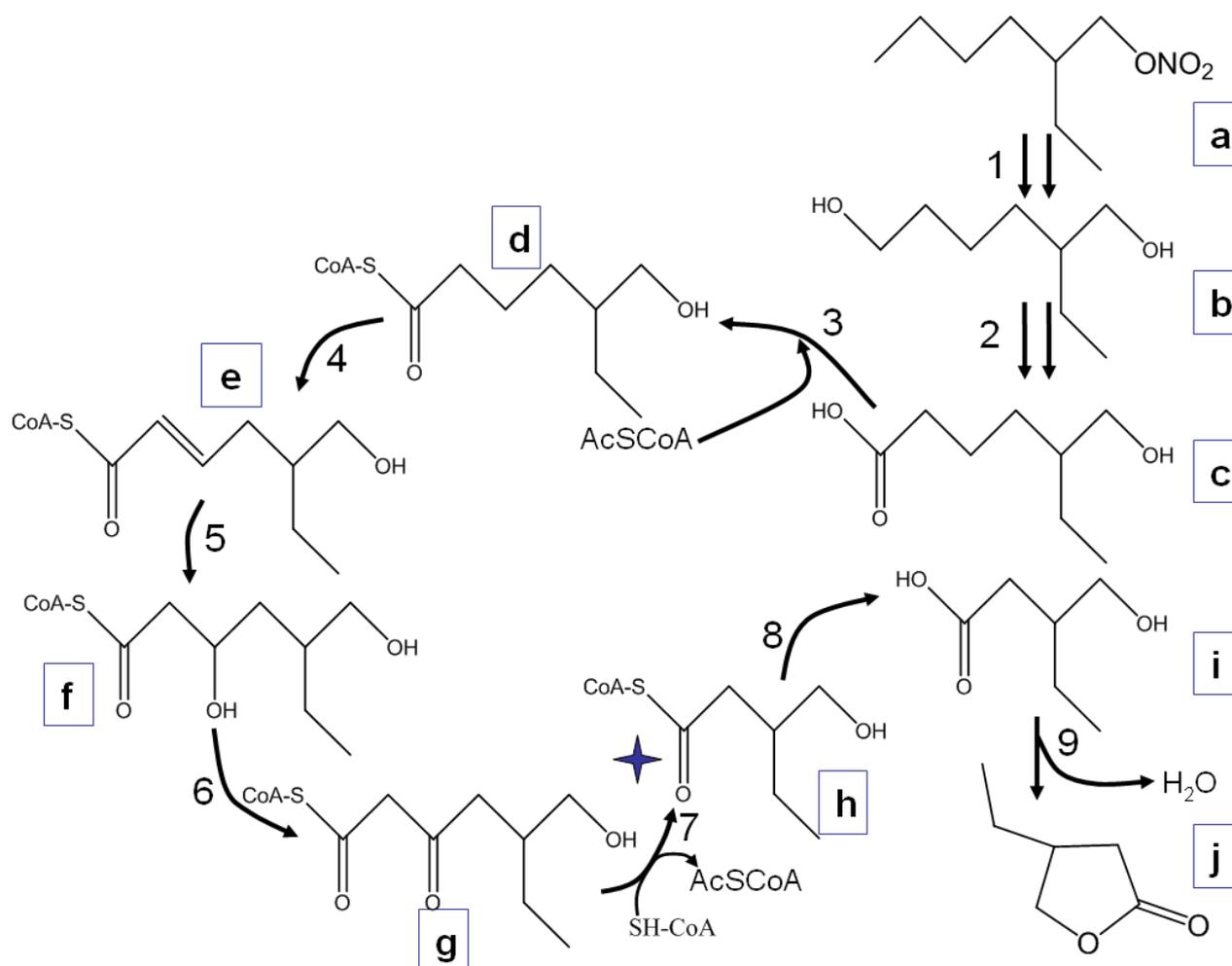


Figure 3: Proposed pathway and enzymes involved in 2-EHN degradation

Products: **a:** 2-ethylhexyl nitrate; **b:** 2-ethylpentane-1,5-diol; **c:** 5-(hydroxymethyl)heptanoic acid; **d:** 5-(hydroxymethyl)heptanoyl CoA; **e:** 5-(hydroxymethyl)heptan-2-enoyl CoA; **f:** 3-hydroxy-5-(hydroxymethyl)heptanoyl CoA; **g:** 5-(hydroxymethyl)-3-ketoheptanoyl CoA; **h:** 3-(hydroxymethyl)-pentanoyl CoA; **i:** 3-(hydroxymethyl)-pentanoic acid; **j:** 4-ethylidihydrofuran-2-(3H)one

Enzymes: **1:** alkane hydroxylase (AlkB1, AlkB2 or CYP153) and esterase, **2:** alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenases, **3** and **8:** acyl CoA acyltransferase, **4:** Acyl CoA dehydrogenase, **5:** Enoyl CoA hydratase, **6:** Hydroxyacyl CoA dehydrogenase, **7:** Thiolase, **9:** spontaneous cyclisation.

★ Indicates that β -oxidation is blocked by the ethyl chain in β position.

We identified four alkane hydroxylases that might catalyze the first step in 2-EHN degradation *i.e.* the hydroxylation of the distal methyl group. Two enzymes are similar to the classical AlkB membrane-bound enzymes that were found to play a pivotal role in alkane degradation by *P. putida* GPo1 [25] and *A. borkumensis* SK2 [26]. The AlkB proteins were not detected in the membrane fraction of IFP 2173 in either growth conditions, even when searching the proteomic data for the expected peptides derived from their deduced protein sequence. Nevertheless, specific transcripts for the corresponding genes were found in cells grown on acetate or exposed to 2-EHN suggesting that the proteins were synthesized. Perhaps, the AlkB proteins were poorly solubilized in SDS or yielded few tryptic peptides detectable by LC-MS/MS. The two other plausible enzymes that can initiate 2-EHN degradation are soluble cytochromes P450 of the CYP153 subfamily. Although many genes encoding cytochromes P450 are present in the genomes of related *Mycobacterium* species (Table 2), sequence alignments indicated that none of the gene products was related to the CYP153 (data not shown). In addition, the CYP153 proteins identified in strain IFP 2173 were found to be mainly produced on 2-EHN, suggesting that at least one of these enzymes takes part in the degradation. CYP153 cytochromes hydroxylate linear or cyclic alkanes with medium chain length [24]. For instance, the CYP153A6 from *Mycobacterium* sp. XHN1500, which is the closest ortholog of the major CYP153 from IFP 2173, preferentially utilizes octane [24], but can also hydroxylate substrates with a bulky structure like limonene [24]. CYP153-like genes have been found in other Actinomycetes as well as in α and β -proteobacteria, and three groups were distinguished based on phylogenetic considerations [13]. Like other bacterial cytochromes, the CYP153 enzymes function with two electron carriers, a NAD(P)H-oxidoreductase and a ferredoxin. In this respect, a FAD-binding oxidoreductase that might be functionally associated with one of the CYP153 from IFP2173 has been identified by the 2D gel approach (Table 1), and four such reductases were detected by the whole proteome approach (Tables S2 & S3).

An esterase is also required to hydrolyze the nitro-ester bond of 2-EHN. A chloride peroxidase was found among the 2-EHN-induced proteins in the 2D gel analysis (A1T5E7), which showed the classical consensus sequence (GX₂SXG) typical for the active site of esterases. This type of enzyme is active on carboxylic esters [27], but it is unknown whether it could remove the nitro group of 2-EHN. Our proteomic analysis revealed that four other putative esterases up-regulated on 2-EHN can potentially catalyze this reaction (Tables S2 & S3). Since strain IFP 2173 can use 2-ethylhexanol and transform it to 2-

ethylhexanoic acid and 4-ethyltetrahydrofuran-2(3H)-one [17], it may be inferred that hydrolysis of the ester bond precedes the hydroxylation of the distal methyl group in the biodegradation pathway.

The subsequent step in the degradation pathway is the conversion of the 2-ethylpentane-1,5-diol to an aldehyde by an alcohol dehydrogenase (ADH). Three 38-kDa ADH were apparently associated to 2-EHN metabolism, which are predicted to have a zinc-binding domain and a GroES-like structure. A different and larger alcohol dehydrogenase (AlkJ; 61 kDa) is involved in alkane oxidation in *P. putida* GPo1. However, a deletion of *alkJ* did not affect alkane degradation, indicating that this reaction does not require a specific alcohol dehydrogenase [25].

A single 2-EHN-specific aldehyde dehydrogenase (ALDH) was detected by SDS-PAGE and peptide analysis. Examination of the sequence of the orthologous enzyme of strain PYR-1 (A1T1A6) showed that it might be composed of a catalytic domain and a LuxC-like domain [28]. Interestingly, the detected ALDH showed 39 % sequence identity with AlkH encoded by the *alk* operon, which is involved in alkane biodegradation in *P. putida* GPo1 [29].

The biosynthesis of multiple isoenzymes of the β -oxidation pathway in response to cell exposure to 2-EHN is intriguing. Many *Mycobacterium* species are known to thrive on alkanes, but the redundancy of β -oxidation enzymes had not been previously reported, although it could be predicted from the abundance of genes coding for such enzymes in available genome sequences of *Mycobacteria* (Table S1). In contrast, the hydrocarbonoclastic bacterium *A. borkumensis* SK2 produced relatively few specific enzymes when growing on alkanes [15]. Perhaps, the greater number of isoenzymes found in soil *Mycobacteria* reflects a more versatile metabolism, adapted to a diet made of diverse hydrocarbons present in their environment.

2-EHN is a derivative of a branched alkane, that is a type of organic compound known for its resistance to microbial degradation. Indeed, the size and position of the substituent and the degree of branching all affect microbial alkane utilization, by hindering β -oxidation. Some bacteria may overcome β -oxidation blockage such as *Pseudomonas citronellolis* which uses a β -carboxylase in citronellol degradation [30]. In the case of 2-EHN, the ethyl group in β position prevented its complete degradation by *M. austroafricanum* IFP 2173. To achieve the complete mineralization of 2-EHN, one strategy would consist to isolate a bacterium

able to metabolize the 4-EDF intermediate and then associate this isolate with strain IFP 2173 in co-cultures.

5. References

- [1] Szybist, J. P., Boehman, A. L., Taylor, J. D., McCormick, R. L., Evaluation of formulation strategies to eliminate the biodiesel NO_x effect. *Fuel Processing Technology* 2005, 86, 1109-1126.
- [2] Ban-Weiss, G. A., Chen, J. Y., Buchholz, B. A., Dibble, R. W., A numerical investigation into the anomalous slight NO_x increase when burning biodiesel; A new (old) theory. *Fuel Processing Technology* 2007, 88, 659-667.
- [3] Gołofit-Szymczak, M., *International Journal Of Occupational Safety and Ergonomics*, CIOP PIP, Warszawa, Czerniakowska 2005.
- [4] The American Chemistry Council Petroleum additives panel, 2006, p. 11.
- [5] Solano-Serena, F., Nicolau, E., Favreau, G., Jouanneau, Y., Marchal, R., Biodegradability of 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN), a cetane improver of diesel oil. *Biodegradation* 2008.
- [6] Kim, Y. H., Engesser, K. H., Kim, S. J., Physiological, numerical and molecular characterization of alkyl ether-utilizing rhodococci. *Environ Microbiol* 2007, 9, 1497-1510.
- [7] Dean-Ross, D., Cerniglia, C. E., Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1996, 46, 307-312.
- [8] Wang, R. F., Cao, W. W., Cerniglia, C. E., Phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading mycobacteria by 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiol Lett* 1995, 130, 75-80.
- [9] Francois, A., Mathis, H., Godefroy, D., Piveteau, P., *et al.*, Biodegradation of methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Appl Environ Microbiol* 2002, 68, 2754-2762.
- [10] Lopes Ferreira, N., Maciel, H., Mathis, H., Monot, F., *et al.*, Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006, 70, 358-365.
- [11] Lee, M., Kim, M. K., Kwon, M. J., Park, B. D., *et al.*, Effect of the synthesized mycolic acid on the biodegradation of diesel oil by *Gordonia nitida* strain LE31. *J Biosci Bioeng* 2005, 100, 429-436.
- [12] Sokolovska, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P. G., *et al.*, Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69, 7019-7027.

- [13] van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007, 74, 13-21.
- [14] Maier, T., Forster, H. H., Asperger, O., Hahn, U., Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem Biophys Res Commun* 2001, 286, 652-658.
- [15] Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N., Golyshin, P. N., Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *J Bacteriol* 2006, 188, 3763-3773.
- [16] Solano-Serena, F., Marchal, R., Heiss, S., Vandecasteele, J. P., Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *J Appl Microbiol* 2004, 97, 629-639.
- [17] Nicolau, E., Kerhoas, L., Lettere, M., Jouanneau, Y., Marchal, R., Biodegradation of 2-ethylhexyl nitrate by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74, 6187-6193.
- [18] Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., *et al.*, Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* 2003, 185, 3828-3841.
- [19] Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227, 680-685.
- [20] Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W., Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988, 9, 255-262.
- [21] Schagger, H., Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006, 1, 16-22.
- [22] Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (Eds.), *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [23] van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A., Just, A., *et al.*, Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Appl Environ Microbiol* 2006, 72, 59-65.
- [24] van Beilen, J. B., Holtackers, R., Luscher, D., Bauer, U., *et al.*, Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* 2005, 71, 1737-1744.

- [25] van Beilen, J. B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R., Witholt, B., DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* 1992, 6, 3121-3136.
- [26] Schneiker, S., Dos Santos, V. A., Bartels, D., Bekel, T., *et al.*, Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat Biotechnol* 2006, 24, 997-1004.
- [27] Bornscheuer, U. T., Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* 2002, 26, 73-81.
- [28] Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., *et al.*, CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* 2007, 35, D237-240.
- [29] van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., *et al.*, Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* 2001, 147, 1621-1630.
- [30] Fall, R. R., Brown, J. L., Schaeffer, T. L., Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* 1979, 38, 715-722.

3.2.1 Complément d’analyse de la fraction de protéines membranaires

La quantité de protéines retrouvées par cette analyse figure dans le **tableau 4.7**.

Tableau 4.7 : Nombre de protéines de la souche IFP 2173 identifiées par LC-MS/MS

	Nombre de protéines de la fraction membranaire	
	Acétate	2-EHN
Total des protéines identifiées	919	899
Nombre de protéines spécifiques	320	300
Nombre de protéines communes	599 dont 65 induites sur 2-EHN*	

* la valeur de l’abondance relative calculée à partir des données de spectral count est deux fois supérieure sur 2-EHN que sur acétate.

Les tableaux donnant l’intégralité des résultats de cette analyse protéomique figure en **annexe 1** page 194.

Nous avons recherché dans l’ensemble des protéines identifiées celle qui étaient intrinsèquement membranaires c’est à dire susceptibles de contenir des segments transmembranaires avec une version du logiciel, HMMTOP (Tusnady *et al.*, 2001) modifiée par le Laboratoire d’Etude Dynamique des Protéomes (CEA de Grenoble) pour traiter plusieurs séquences protéiques simultanément.

Les résultats ont montré qu’environ 70 % des protéines identifiées au cours de ces analyses ne présentent pas de domaine transmembranaire (**figure 4.10**). Bon nombre de ces protéines sont cytoplasmiques et sont certainement piégées dans des vésicules membranaires lors de la lyse des cellules. De plus, parmi ces protéines membranaires, il y a beaucoup de protéines liées à la membrane, qui n’ont pas de segments transmembranaires mais qui ont une nature hydrophobe. L’analyse ne nous permet pas de le savoir.

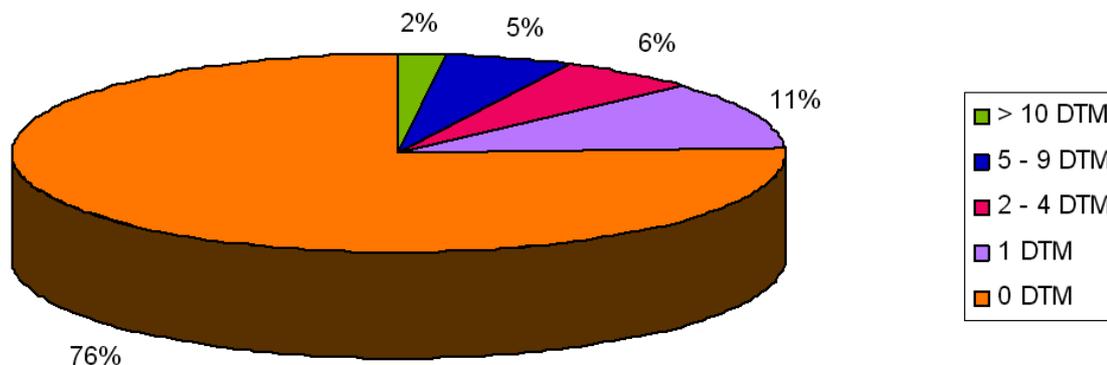


Figure 4.10 : Répartition des protéines contenant ou non des domaines transmembranaires

3.2.2 Limites de la méthode

L'analyse protéomique mise en oeuvre a conduit à l'identification de plus 1300 protéines ce qui est remarquable compte tenu du fait que le génome de la bactérie n'est pas connu. La méthode d'identification et de quantification des protéines a toutefois ses limites :

- Lors de l'identification des protéines par le logiciel MASCOT, les peptides qui ne correspondent à aucune protéine présente dans les bases de données ne sont pas pris en compte. Bien que les bases de données soient de plus en plus riches en séquences de génomes bactériens, on peut rater une protéine d'intérêt au cours de l'analyse. Par exemple, certains spots 2D n'ont pas pu être identifiés.
- Lors du calcul du PAI (Protein Abundance Index), on estime une abondance relative des peptides et on en déduit une abondance relative de protéine. Cette estimation n'est pas tout à fait juste même si les appareils utilisés pour l'analyse sont très performants. Par exemple, il peut y avoir des isoenzymes avec un ou plusieurs peptides en commun. Parmi ces dernières, on ne retiendra que celle qui a le meilleur score et le meilleur taux de recouvrement. Il est alors possible d'écartier, au niveau de la synthèse des résultats, d'autres identifications de ces protéines. Il peut alors y avoir un léger biais.
- Le calcul du spectral count est a priori plus juste puisque nous utilisons le nombre de spectres obtenus dans l'analyse, qui dépend de l'abondance des peptides. Mais nous faisons toujours une approximation entre le résultat de l'analyse des peptides et la quantification des protéines.

3.3 La découverte de P450 alcane monooxygénase de type CYP153 chez la souche IFP 2173

Au cours de l'analyse d'une bande à 47 kDa, correspondant à une protéine marquée au ³⁵S, quatre cytochromes P450 ont été identifiés sur quarante protéines au total, dont un ressemblait à une alcane hydroxylase de type CYP153. Ce cytochrome est différent de la cinquantaine de P450 de *M. vanbaalenii* PYR-1, mais possède une séquence très proche du CYP153A de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 trouvée par van Beilen *et al.* (2005b). Ce cytochrome a été largement étudié par Funhoff *et al.* (2006), tous les détails de son analyse figurent dans l'étude bibliographique pages 26 à 31.

Ce cytochrome est soluble mais des prédictions de séquence indiquent une région hydrophobe qui pourrait se lier à la membrane, ce qui expliquerait pourquoi il est retrouvé dans la fraction membranaire.

Ce CYP153 se retrouve parmi les protéines exclusivement produites sur 2-EHN. De par son classement en fonction de son abondance relative (40^{ème} position sur un total de 899 protéines), c'est la deuxième protéine spécifique la plus abondante. Son rôle dans la dégradation du 2-EHN a été étudié dans la dernière partie des résultats.

4 Étape initiale de dégradation du 2-EHN

L'étude protéomique des enzymes potentiellement impliquées dans la dégradation du 2-EHN a permis de mettre en évidence une alcane mono-oxygénase. Il s'agit d'un cytochrome P450 de type CYP153. Lors d'études antérieures sur *M. austroafricanum* IFP 2173, une alcane hydroxylase de type AlkB a été identifiée. Elle serait impliquée dans la dégradation de l'isooctane (Solano-Serrena *et al.*, 2004). A partir de l'analyse de séquences de génomes de mycobactéries récemment publiées, j'ai cloné et obtenu la séquence complète du gène *alkB1* codant pour l'alcane hydroxylase membranaire de *M. austroafricanum* IFP 2173 et j'ai trouvé un second gène codant pour une alcane hydroxylase appelée *alkB2*. Afin d'étudier les propriétés de ces enzymes, j'ai entrepris leur expression en système recombinant pour savoir si l'une d'elles était impliquée dans l'étape initiale de dégradation du 2-EHN.

4.1 Les alcane hydroxylases de type *alkB*

4.1.1 Le gène *alkB1*

A l'origine, ce gène a été trouvé et en partie séquencé par Floriane Solano-Serrena *et al.* lors de l'étude de la dégradation de l'iso-octane par la souche IFP2173. Le numéro d'accession est AAQ88276. Nous disposons donc d'une séquence partielle qui correspondait parfaitement à l'alcane mono-oxygénase *Mvan_1742* de *M. vanbaalenii* PYR-1. Sur la base de cette information de séquence et des séquences des gènes *Mvan_1741*, *Mvan_1743*, *Mvan_1744*, *Mvan_1745* et *Mvan_1747*, j'ai conçu des oligonucléotides pour amplifier les gènes correspondants de la souche IFP 2173, ainsi que les gènes voisins. Les conditions de PCR ont nécessité l'ajout de DMSO à hauteur de 5 %, en raison de la séquence riche en GC et/ou de structures de l'ADN (tiges-boucles) susceptibles de gêner la répllication par l'ADN polymérase. Après avoir purifié les produits PCR de taille attendue, je les ai clonés dans un vecteur commercial (pDrive) et les ai fait séquencés (Génome Express ; Meylan 38). La taille des fragments PCR obtenus ainsi que les gènes qu'ils contenaient sont indiqués dans les **figures 4.11** et **4.12**. Le tableau 2.3b dans Matériel et Méthodes liste les plasmides construits dans cette étude (page 58).

Le gène *alkB1*, composé de 1271 pb, fait partie d'un groupe de gènes comprenant aussi deux gènes de rubrédoxines, nommées *rubA1* (174 pb) et *rubA2* (183 pb). Les gènes *rubA1* et *rubA2* sont dans la même phase de lecture que le gène *alkB1*. Ils sont enchevêtrés au gène qui les précède par une séquence **GTGA**. Dans les deux cas, le codon start est **GTG** pour gènes

rubA1 et *rubA2* et le codon stop est **TGA** pour le gène précédent. Il n’y a pas de gène codant pour une rubrédoxine réductase comme c’est le cas pour l’opéron de *Pseudomonas putida* Gpo1 (van Beilen *et al.* 2003). Seules 31 bases séparent ces trois gènes de celui codant un facteur de transcription, nommé *tetR* (732 pb). Nous avons inclus dans le fragment amplifié par PCR une séquence non codante de 345 pb en amont du gène *alkB1* susceptible de contenir la région promotrice.

L’organisation et la séquence nucléique de cet ensemble de quatre gènes sont très proches de celles trouvées dans la région correspondante du génome de *M. vanbaalenii* PYR-1 (98 % d’identité de séquence) (**Figure 5.11**).

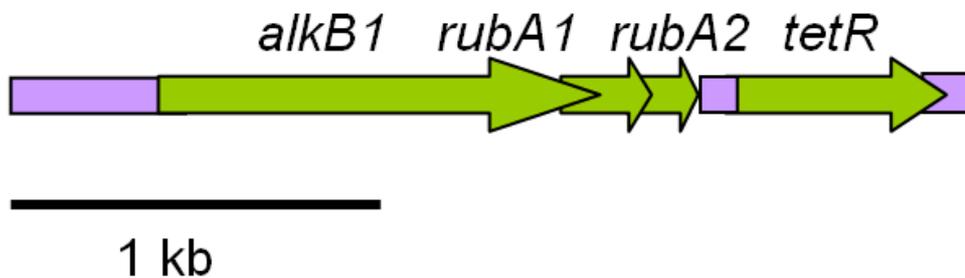


Figure 4.11 : Carte du locus contenant le gène *alkB1*

Les gènes sont représentés par des flèches vertes, les régions non codantes sont en mauve.

4.1.2 Le gène *alkB2*

M. vanbaalenii PYR-1 possède un autre gène qui code pour une autre alcane monooxygénase. J’ai eu accès via la base de donnée NCBI, à la séquence de ce gène *Mvan_3100* ainsi qu’à celles des gènes voisins *Mvan_3099* et *Mvan_3101*, à partir desquelles j’ai conçu des oligonucléotides pour amplifier les gènes correspondant de *M. austroafricanum* IFP 2173. J’ai obtenu par PCR un produit d’environ 2600 pb. L’analyse de la séquence a montré que la séquence du fragment cloné de la souche IFP 2173 était à 99 % identique à la région homologue de *M. vanbaalenii* PYR-1. Ainsi, le gène trouvé code potentiellement pour une alcane mono-oxygénase et je l’ai appelé *alkB2* (1185 pb). L’analyse a aussi montré la présence d’un gène homologue à *Mvan_3101* en aval de *alkB2*, qui code pour une « short chain dehydrogenase ».

Une illustration du locus contenant le gène *alkB2* est représentée par la **figure 4.12**.

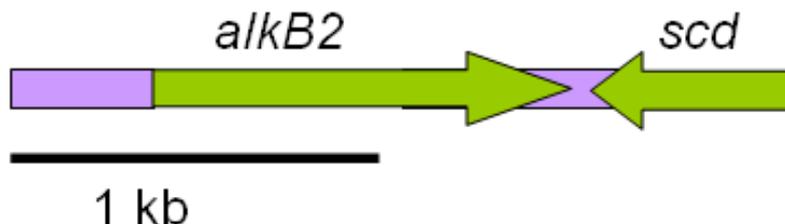


Figure 4.12 : Représentation du locus contenant le gène *alkB2* de *M. austroafricanum* IFP 2173

Les gènes sont représentés par des flèches vertes, les régions non codantes sont colorées en mauve.

Les souches de *Mycobacterium* sp. KMS, JLS, MCS et *M. smegmatis* mc²155 possèdent un seul gène d'alcane hydroxylase de type *alkB* dans le génome, alors que les souches *M. vanbaalenii* PYR-1 et *M. gilvum* en ont deux. D'après cette analyse de génomes, les mycobactéries n'ont pas plus de deux alcane hydroxylases transmembranaires et nous avons supposé que c'était le cas aussi pour *M. austroafricanum* IFP 2173.

4.1.3 Clonage et expression chez *Escherichia coli*

Dans un premier temps, le clonage et l'expression des gènes *alkB* de *M. austroafricanum* IFP 2173 ont été effectués chez *E. coli*. En effet, bien que selon les prédictions de structure, l'alcane hydroxylase comporte six domaines transmembranaires, certains auteurs ont réussi à exprimer ce type d'enzyme chez *E. coli*. L'alcane hydroxylase de *Pseudomonas putida* Gp01 a ainsi été exprimé dans une souche de *E. coli* BL21 à l'aide d'un plasmide de type pET portant le promoteur fort du phage T7 (Shanklin & Whittle, 2003).

De même, le gène de l'alcane hydroxylase de *Gordonia* sp. TF6 a été exprimée chez *E. coli* associé aux gènes de deux rubrédoxines et d'une rubrédoxine réductase. La co-expression de ces gènes a conduit à la synthèse d'un système fonctionnel capable de dégrader les *n*-alcane de C₅ à C₁₃ (Fujii *et al.*, 2004). Sur la base de ces résultats décrits dans la littérature, l'expression chez *E. coli* des gènes *alkB* de la souche IFP 2173 a été entreprise.

4.1.3.1 Stratégie de clonage

Les gènes *alkB* ont été insérés dans les plasmides pET9a et pET15b (Novagen), sous le contrôle du promoteur T7. Le plasmide pET15b a pour particularité de produire une protéine recombinante portant une étiquette poly-histidine en N-ter.

Le gène *alkB1* ainsi que les gènes *rubA1* et *rubA2* ont été amplifiés par PCR, donnant un fragment de 1629 pb qui a été inséré dans chacun des plasmides d'expression, pET9a et pET15b, via les sites de restriction NdeI et BamHI. Les plasmides ainsi obtenus sont

respectivement nommés pEN06 et pEN07. En raison de la présence d'un site de restriction BamHI dans la séquence du gène *alkB2*, la séquence codante de ce gène (1185 pb) a été amplifiée avec un site BglII à l'extrémité 3', compatible avec le site BamHI, puis inséré dans pET15b et pET9a via leurs sites NdeI et BamHI. Les plasmides obtenus sont nommés respectivement pEN15 et pEN16.

4.1.3.2 Surproduction de AlkB1 dans *E. coli*

Les séquences des gènes *alkB1-rubA1-rubA2* et de *alkB2* ont chacun 12 % de codons rares chez *E. coli*. Ainsi, la souche de *E. coli* RosettaTM qui permet la traduction des ARN contenant ces codons rares (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC et GGA) a été transformée dans un premier temps par le plasmide pEN07 (pET15b contenant les gènes *alkB1-rubA1-rubA2*).

La souche *E. coli* RosettaTM contenant les gènes *alkB1-rubA1-rubA2* sur le plasmide pEN07, a été utilisée pour étudier l'expression des protéines recombinantes. Afin de limiter la formation de corps d'inclusion et de favoriser la synthèse de protéine inactive, l'induction a été réalisée à 25°C pendant 14 heures. L'extrait protéique total et la fraction protéique membranaire obtenue après ultracentrifugation 30 mn à 230 000 g ont été analysés par SDS-PAGE (**figure 4.13**). L'extrait induit montre que deux bandes polypeptidiques de 46 kDa et de 38 kDa sont plus abondantes (piste 2). La fraction protéique membranaire (piste 3) contient aussi ces 2 protéines, la bande à 46 kDa étant nettement prépondérante. Cette bande est peu visible dans la fraction non induite (piste 1). Comme la protéine recombinante était marquée par une étiquette poly-histidine, nous avons analysé par Western blot anti-His-tag la présence de la protéine AlkB1. Cette dernière est bien détectée et a une taille apparente de 46 kDa correspondant à la bande majeure colorée au bleu de Coomassie. La bande à 38 kDa pourrait résulter d'une protéolyse partielle de la protéine recombinante.

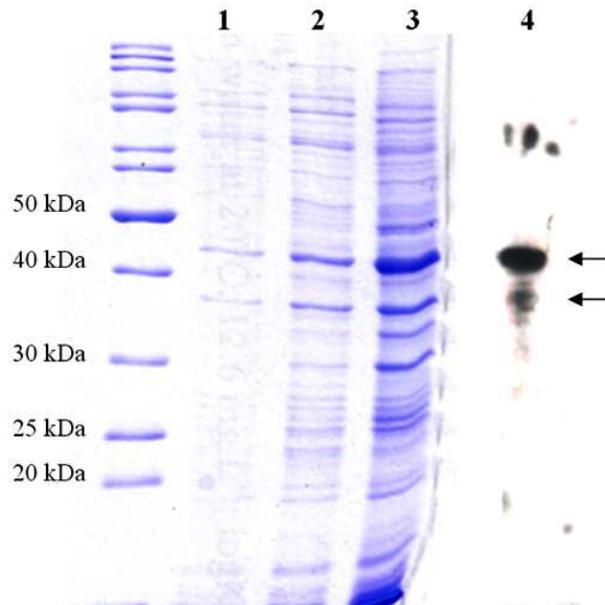


Figure 4.13 : Expression de la protéine AlkB1 à l'aide du plasmide pEN07 dans *E. coli* RosettaTM

1 : Extrait protéique total non induit

2 : Extrait protéique total après 14 h d'induction à 25°C.

3 : Extrait protéique membranaire, obtenu après 30 mn d'ultracentrifugation

4 : Détection par Western blot de la protéine marquée par une étiquette poly-histidine.

Ces résultats montrent que la protéine AlkB1 est majoritairement dans la fraction membranaire. La manière dont nous avons construit le système d'expression permet *a priori* de faire des essais de dégradation des alcanes. Il n'y a pas de rubrédoxine réductase pour que le système soit fonctionnel comme cela a été décrit dans la littérature. En revanche, il est possible qu'une réductase aspécifique de *E. coli* prenne le relais.

En ce qui concerne le gène *alkB2*, j'ai effectué le clonage dans les plasmides pET9a et pET15b. Cependant, je n'ai pas testé l'expression de ces constructions car il aurait fallu que je co-exprime ce gène avec au moins un gène de rubrédoxine pour produire un système enzymatique actif vis-à-vis des alcanes. Or je n'ai pas réussi à faire une telle construction.

Etant donné ces résultats, j'ai choisi de changer de système d'expression et de tester la synthèse de l'alcane hydroxylase AlkB dans une bactérie hôte phylogénétiquement plus proche de *M. austroafricanum* IFP 2173, *M. smegmatis* mc²155. Afin de pouvoir tester l'action de l'AlkB sur les *n*-alcanes et sur le 2-EHN.

4.1.4 Clonage et expression chez *Mycobacterium smegmatis* mc²155

M. smegmatis mc²155 est une bactérie largement utilisée comme outil génétique pour exprimer des protéines de mycobactéries, provenant en général de souches pathogènes. Son

génomique a été séquencé et annoté en 2006. Elle convient *a priori* mieux à l'expression de protéines généralement retrouvées dans des corps d'inclusion chez *E. coli*. *M. smegmatis* mc²155 est équipée d'une seule alcane hydroxylase de type AlkB qui dégrade les alcanes de longueur de chaîne supérieure ou égale à C₁₂ (Lopes Ferreira *et al.*, 2007). D'après l'analyse de son génome le gène codant pour une alcane hydroxylase est suivi de deux gènes codant chacun pour une rubrédoxine, l'organisation des gènes est semblable à celle du locus *alkB1* de IFP 2173. D'ailleurs, la séquence nucléotidique de *alkB1-rubA1-rubA2* de la souche IFP 2173 présente 87 % d'identité de séquence avec la région homologue de *M. smegmatis* mc²155. D'autre part, cette souche ne dégrade pas le 2-EHN, ceci a été montré dans la première partie des résultats (Résultats 1 page 79), mais possède tout le système enzymatique requis pour dégrader des acides gras. C'est donc une souche de choix pour tester l'activité *in vivo* des alcane hydroxylases de *M. austroafricanum* IFP 2173. Ainsi, on peut faire l'hypothèse que si le gène *alkB1* est requis pour l'étape initiale de dégradation du 2-EHN, l'expression de ce gène dans la souche mc²155 pourrait rendre la bactérie hôte capable de dégrader cet hydrocarbure.

4.1.4.1 Stratégie de clonage

Les gènes *alkB* de *M. austroafricanum* IFP 2173 ont été insérés dans le plasmide pHLD69 qui possède deux origines de réplication, une reconnue par *E. coli*, l'autre par *Mycobacterium* (**figure 4.14**). pHLD69 n'a pas de promoteur en amont du site d'insertion des gènes d'intérêt. C'est la raison pour laquelle nous devons insérer un fragment englobant la séquence promotrice située en amont du gène. Il a été décrit dans la littérature que le site d'initiation de la transcription est situé 96 bases avant le codon start du gène *alkB* de *Pseudomonas putida* Gpo1 (Nieboer *et al.* 1997).

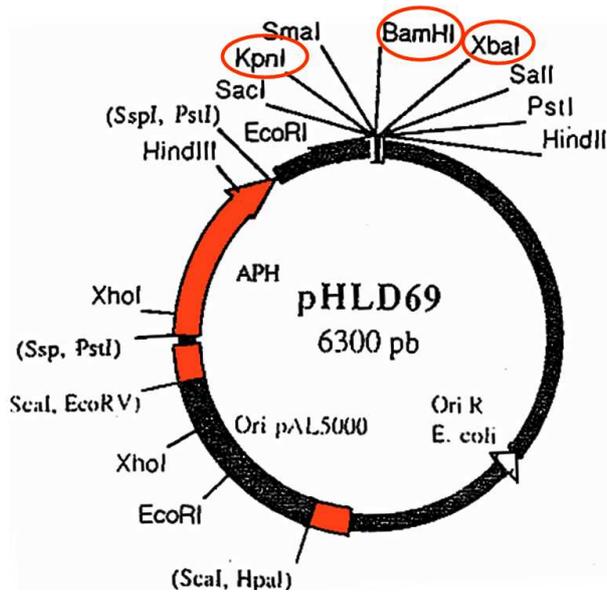


Figure 4.14 : Carte du plasmide pHLD69.

Les sites utilisés pour insérer les gènes *alkB* sont entourés en orange. D'après Pascal Poupin, Université de Metz.

Les séquences amont des gènes *alkB* ont été analysées à l'aide du logiciel Neutral Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Deux régions situées respectivement à 95 pb et 108 pb en amont du codon d'initiation des gènes *alkB1* et *alkB2* ont ainsi été mises en évidence. Ces séquences sont les suivantes :

```

-95  CGTGTCTTAGACAGGCGACAAAATGCGCTCTTATAGTCAACGGCAGGAGGTG  -55  ...ATG --alkB1-->
-108 ACGAGATTTGCCTGCGGCGGGCACCACCTGGTATGACGGCGTTACCCAATCG  -68  ...ATG --alkB2-->
    
```

Le logiciel repère des éléments conservés dans les promoteurs procaryotes, comme la TATA-box. Deux séquences voisines des séquences consensus TATAAT et TTGCACA des promoteurs de *E. coli*, et généralement situées à 10 et 35 bases en amont du site d'initiation de la transcription, ont en effet été trouvées par cette analyse, suggérant que ces régions font bien partie des promoteurs des gènes *alkB*.

Nous avons cloné les gènes *alkB1-rubA1-rubA-tetR* et *alkB2* dans pHLD69 de telle sorte que les gènes soient précédés par une région de 300 pb en amont des gènes *alkB*, qui d'après notre analyse, devrait contenir le promoteur (**figure 4.15**). Le clonage de gènes *alkB1-rubA1-rubA2* et *alkB1-rubA1-rubA2-tetR* dans pHLD69 a nécessité de faire un clonage intermédiaire dans le plasmide pUC18 permettant d'utiliser les sites de restriction KpnI et BamHI. Ce sont les constructions pEN10 et pEN11.

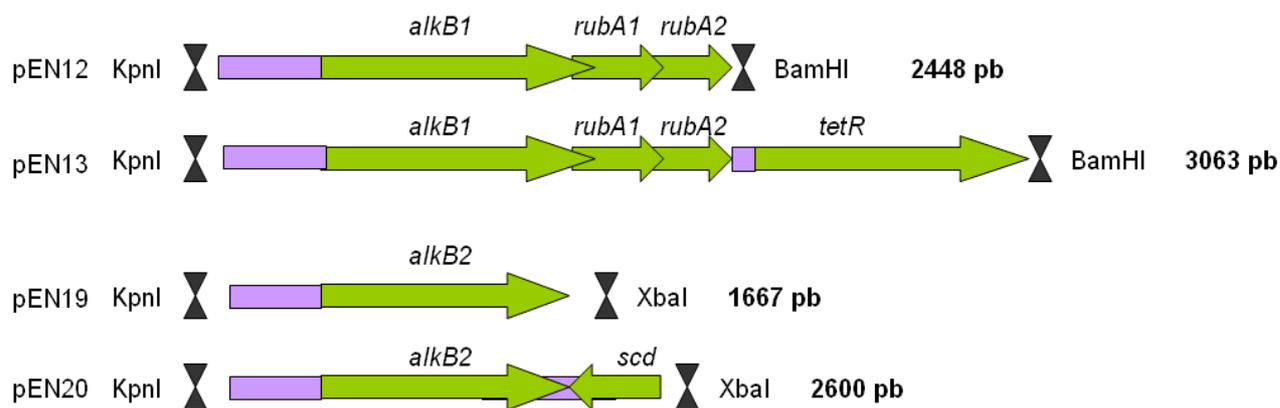


Figure 4.15 : Plasmides dérivés de pHLD69 construits pour exprimer les gènes *alkB* de IFP2173 dans *Mycobacterium*.

Les zones non codantes sont schématisées en violet, les gènes en vert. Les sites de restriction utilisés pour les constructions sont indiqués.

Quatre constructions ont ainsi été réalisées et transférées chez *Mycobacterium smegmatis* mc²155 par électroporation. Des clones transformants ont été obtenus après 10 jours d'incubation à 30°C sur milieu PTYG₂₀ additionné de kanamycine²⁰. Plusieurs clones ont alors été cultivés à 30°C en milieu liquide MMSYE avec du Tween80 comme unique source de carbone. *M. smegmatis* mc²155 a été transformée par les plasmides dérivés de pHLD69 avec une efficacité de 3.10³ transformants.μg⁻¹ ADN.

4.1.4.2 Tests d'induction de AlkB chez *M. smegmatis* mc²155

Les souches transformantes de *M. smegmatis* mc²155 décrites précédemment ont été cultivées sur *n*-octane, utilisé comme seule source de carbone. La croissance de ces souches transformées sur *n*-octane à 30°C a duré 19 jours et les D.O.₆₀₀ des souches étaient relativement faibles, comprises entre 0,1 et 0,5.

L'extrait protéique total et la fraction membranaire de chaque souche ont été analysés par SDS PAGE afin de détecter la présence des protéines de la souche IFP 2173. La **figure 4.16** représente le gel à 12,5 % d'acrylamide sur lequel toutes les constructions ont été analysées. Dans les extraits bruts de protéines, aucune bande correspondant à l'AlkB1 (46-48 kDa) ou l'AlkB2 (44 kDa) n'a été mise en évidence. Les rubrédoxines RubA1 et RubA2 de masses respectives 6447 Da et 6790 Da, ont une taille trop petite pour être détectables sur ce gel. Quant au facteur de transcription TetR (28,5 kDa), aucune bande majoritaire ne correspond à la taille de cette protéine.

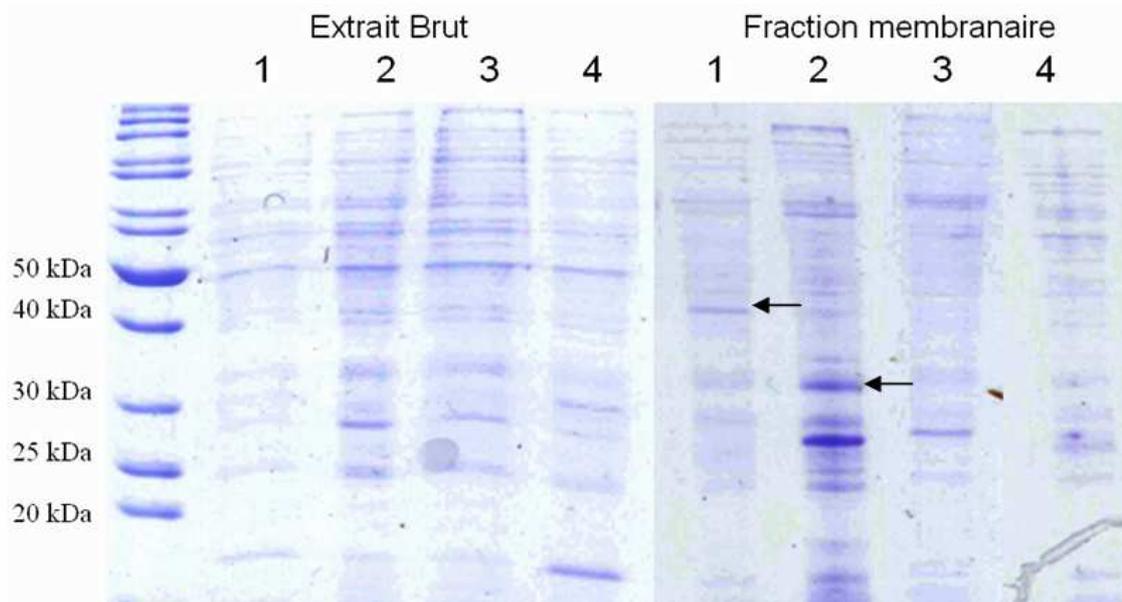


Figure 4.16 : Expression des AlkB dans pHLD69.

1. *M. smegmatis* mc²155 pEN12 ; 2. *M. smegmatis* mc²155 pEN13 ; 3. *M. smegmatis* mc²155 pEN19 ; 4. *M. smegmatis* mc²155 pEN20.

Dans la fraction membranaire, il y a une légère bande à 46 kDa sur la piste 1. Elle n'est pas retrouvée sur la seconde piste, alors qu'il s'agit dans les deux cas de souches contenant un plasmide portant *alkB1*. Dans l'extrait 2 une bande peut correspondre en taille au facteur de transcription TetR (28,5 kDa). En ce qui concerne les constructions portant le gène *alkB2*, sur les pistes 3 et 4, il n'y a pas de bande clairement détectable aux alentours de 45 kDa. Si l'on ne détecte pas d'enzyme de type AlkB dans ces constructions, cela ne veut pas dire que la protéine n'est pas synthétisée, mais qu'elle est peu visible par SDS-PAGE. En effet, lors de l'analyse protéomique, aucune des protéines AlkB n'a été identifiée dans les fractions membranaires de IFP 2173, alors les transcrits correspondants sont détectables par RT-PCR.

4.1.4.3 Test de dégradation du 2-EHN

Les souches contenant les plasmides pEN12 pEN13, pEN19 et pEN20 ont été testées pour leur capacité à dégrader le 2-EHN. Pour ce faire, des tests de dégradation ont été mis en œuvre selon un protocole décrit dans la partie 1 des résultats page 76. Le suivi de la production de CO₂ est le premier indicateur de dégradation. Le dosage du 2-EHN résiduel, en fin de test, permet de confirmer si le substrat a été dégradé. Les résultats ont montré qu'aucune des souches d'expression testées n'a dégradé le 2-EHN de manière significative. En outre, les souches ont été incapables de dégrader le *n*-octane ou l'hexane. Ces tests de dégradation ont été effectués par Gabriela Della-Giustina au cours de son stage à l'IFP.

Ainsi, il n'a pas été possible de répondre à la question : qui de l'AlkB1 ou de l'AlkB2 intervient dans l'étape initiale de dégradation du 2-EHN ?

4.2 Le cytochrome P450 de type CYP153

Grâce à l'approche protéomique, un cytochrome P450 ayant une séquence très proche de celle du cytochrome P450 de type CYP153A de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (van Beilen *et al.*, 2006) a été découvert.

4.2.1 Mise en évidence

La séquence nucléique du cytochrome P450 de type CYP153 de la souche HXN-1500 est enregistrée dans les bases de données, sous le numéro d'accèsion AJ783967. Les séquences adjacentes au gène sont connues. Les séquences en amont du CYP153A n'ont pas été décrites dans les bases de données mais il y aurait un système de régulation à deux composants, avec une histidine kinase et un régulateur de transcription à deux composants LuxR. En aval du CYP153A de la souche HXN-1500, il y a une ferrédoxine réductase et une ferrédoxine. Des oligonucléotides ont été conçus en utilisant le début et la fin du gène CYP153A de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (Q65A64) et utilisés comme amorces de PCR avec l'ADNg de *M. australfricanum* IFP 2173 comme matrice. Nous avons obtenu un produit PCR d'environ 1250 pb, taille comparable à celle du gène de référence (1261 pb). Le séquençage de ce produit PCR a révélé qu'il s'agissait bien d'un gène très proche de celui de la souche HXN-1500 (99 % d'identité). La comparaison des séquences protéiques déduites montre que seuls deux acides aminés sont différents, Ser9 est remplacé par Asn et Glu159 par Asp dans le CYP153-1 de IFP 2173. D'après l'étude de van Beilen *et al.* (2006) et celle de Funhoff *et al.* (2006) réalisées sur le CYP153A de *Mycobacterium* sp. HXN-1500, ces acides aminés ne font pas partie du site actif. Le spectre d'action vis-à-vis des alcanes de ce CYP153-1 serait *a priori* le même que celui de la souche HXN-1500, c'est-à-dire qu'il catalyserait l'hydroxylation des alcanes de C₅ à C₁₆.

4.2.2 Clonage et expression du *cyp153-1* chez *E. coli*

Etant donné que les séquences adjacentes au gène *cyp153-1* n'ont pas été retrouvées, il nous était impossible d'avoir la séquence promotrice de ce gène. De ce fait, nous ne pouvions pas utiliser le vecteur de clonage pHLD69 pour faire l'expression dans *M. smegmatis*. Pour ce qui est de l'expression chez *E. coli*, nous aurions pu utiliser comme précédemment les vecteurs pET9a ou pET15b. Cependant, en cas défaut d'expression, instabilité ou corps d'inclusion, nous n'aurions pas eu d'alternative.

Récemment, un système d'expression chez *M. smegmatis* mc² a été mis au point pour l'expression de protéines de souches pathogènes comme *M. tuberculosis*. Ce système rend possible la surexpression de protéines difficiles à produire sous forme recombinante chez *E. coli*, soit parce qu'il s'agit de protéines membranaires, soit parce qu'elles ne se replient pas correctement et forment des corps d'inclusion (Goldstone *et al.*, 2008).

Le plasmide pUYB1062 utilisé dans notre étude est présenté par la **figure 4.17**

Ce plasmide a deux origines de répllication, l'une est reconnue par *E. coli* et l'autre par *Mycobacterium*, et il porte un gène de résistance à l'hygromycine. De plus, il possède un promoteur T7 indirectement inductible par IPTG, qui fonctionne selon le même principe que les promoteurs T7 des vecteurs de type pET dans *E. coli*. La souche de *M. smegmatis* utilisée pour l'expression, appelée mc²4517 possède vraisemblablement le gène de la T7 polymérase inséré dans son génome, bien que cela n'ait pas été publié. Nous savons d'autre part que la souche est porteuse d'un marqueur de résistance à la kanamycine, sans doute introduit lors de l'insertion du gène de la T7 polymérase.

Le gène *cyp153-1* a 4 sites de restriction BamHI dans sa séquence. De ce fait, nous avons été obligés de l'insérer dans pUYB1062N via les sites HindIII et NdeI. Le plasmide obtenu a été nommée pEN26.

Dans un premier temps, l'expression a été réalisée chez *E. coli* RosettaTM. L'induction par l'IPTG a été réalisée pendant 14 heures à 25°C. La **figure 4.18** met en évidence qu'une protéine de 46 kDa est produite majoritairement dans l'extrait total induit (piste 2) et dans une moindre mesure dans la fraction soluble (piste 3).

Figure 4.17 : Carte du plasmide pUYB1062.
 Les sites utilisés pour l'insertion du *cyp153-1* sont entourés en orange.

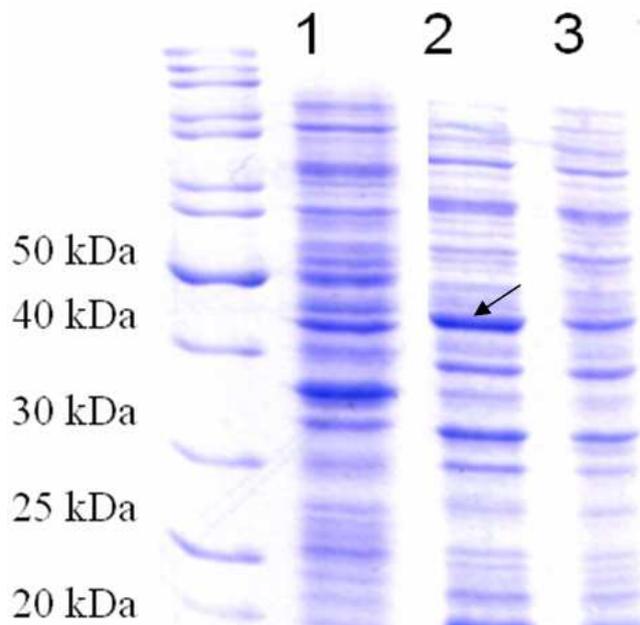
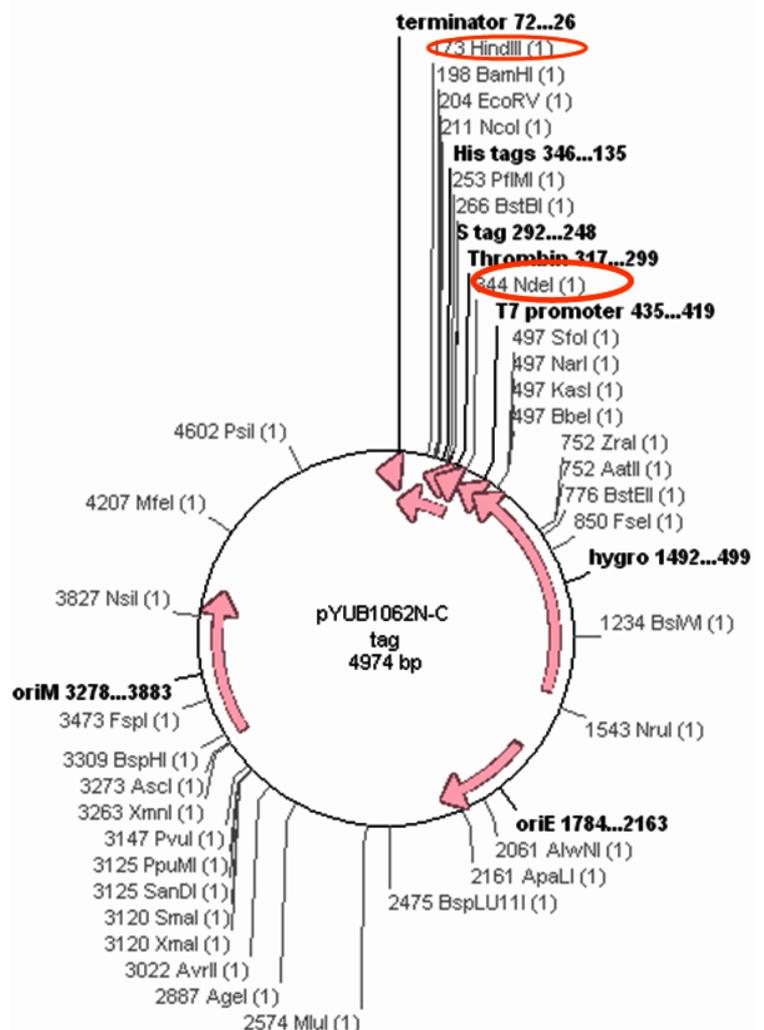


Figure 4.18 : Contrôle de l'expression du CYP153-1 chez *E.coli* par SDS-PAGE.

1 : Extrait protéique total de *E. coli* pEN26 non induit
 2 : Extrait protéique total de *E. coli* pEN26 après 14 h d'induction à 25°C.
 3 : Extrait protéique soluble de *E. coli* pEN26 après 14h d'induction 25°C.

La taille de la protéine majoritaire est en bon accord avec la masse théorique du CYP153-1 qui est de 47689 Da. Cependant, nous n'avons pas la preuve que c'est la protéine attendue puisque nous n'avons ni anticorps anti-CYP153, ni la possibilité de reconnaître un tag introduit dans la séquence par construction avec des anticorps spécifiques (anti-His-Tag, par exemple).

Puisque ce gène *cyp153-1* a été cloné dans un plasmide d'expression utilisable chez *Mycobacterium*, nous avons tenté de faire l'expression de la protéine chez *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷.

4.2.3 Test d'expression chez *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷

M. smegmatis mc²⁴⁵¹⁷ a été transformé avec le plasmide pEN26 par électroporation. Les clones résistant à l'hygromycine ont été sélectionnés et mis à pousser en milieu liquide sur 7H9/ADC/Tween80 avec de l'hygromycine et de la kanamycine. Je n'ai pas réussi à faire pousser cette souche en présence des deux antibiotiques. En revanche, il a été possible de faire pousser *M. smegmatis* mc²¹⁵⁵ transformée par pEN26 en présence d'hygromycine uniquement. Cependant, aucune expression du CYP153-1 n'a pu être observée (**Figure 4.19**). Il y a eu cependant une très forte surexpression d'une protéine de 65 kDa de *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷. Cette protéine a été identifiée par Goldstone *et al.* (2008) comme étant une protéine chaperone nommée GroL.

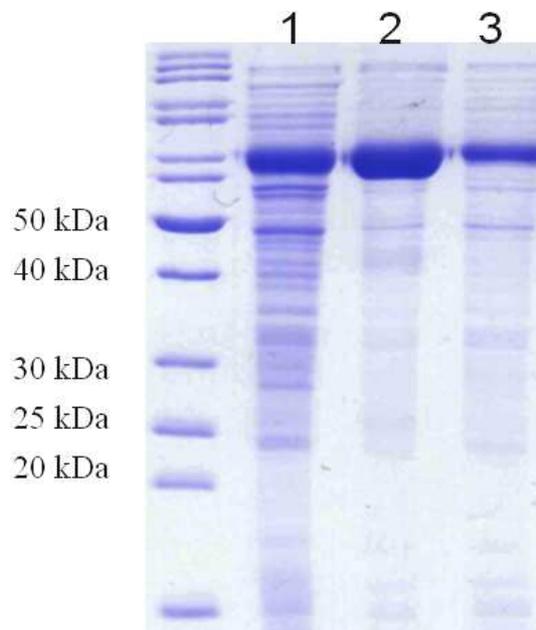


Figure 4.19 : Analyse par SDS-PAGE d'extraits de *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷ contenant pEN26
 1 : Extrait protéique total de *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷ sans plasmide
 2 : Extrait protéique total de *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷ contenant pEN26 non induit par l'IPTG
 3 : Extrait protéique total de *M. smegmatis* mc²⁴⁵¹⁷ contenant pEN06 induit par l'IPTG 24 h à 25°C.

Aucune protéine de 47 kDa n'est induite en présence d'IPTG. Ce système n'est donc pas fonctionnel en l'état. Il est dans un premier temps nécessaire de revoir les conditions de transformation de *M. smegmatis* mc²4517 par pEN26.

Nos résultats partiels ne permettent pas de savoir pour le moment quelle alcane hydroxylase est impliquée dans l'étape initiale de dégradation du 2-EHN.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette thèse avait pour objet d'étudier la biodégradation du 2-éthylhexyl nitrate (2-EHN), un composé, employé comme additif procétane des gazoles (Suppes *et al.*, 2001). Principalement produit en France, il est donc très largement utilisé par l'industrie pétrolière. Cependant, l'impact environnemental qu'il est susceptible d'exercer en cas de déversement accidentel est encore méconnu. Dans ce contexte, l'étude que nous avons entreprise présente un double intérêt :

- au point de vue la réglementation, elle répond à la question de la biodégradabilité de ce contaminant potentiel des eaux et des sols, et met en évidence les paramètres clés qui président à sa biodégradation. Elle "renseigne" producteurs et utilisateurs sur les risques environnementaux encourus lors de son utilisation ;
- d'un point de vue scientifique, elle apporte une contribution nouvelle aux connaissances des mécanismes de biodégradation du 2-EHN et des alcanes branchés. A ce jour, la dégradation des alcanes branchés est restreinte aux alcanes méthylés comme le pristane, le phytane et le citronellole. A notre connaissance, il n'existe aucune étude sur la dégradation des hydrocarbures de courtes chaînes, alpha-substitués par un groupement éthyle.

Le critère de biodégradabilité "immédiate" tel que défini par l'OCDE pour les composés chimiques stipule que le composé testé doit être biodégradé à hauteur de 70 % (selon la mesure du COD, équivalent à 60 % selon la mesure de la DThO) dans les 28 jours du test. De surcroît, cette valeur cible doit être atteinte dans un intervalle de temps maximal de dix jours. Tout composé satisfaisant à ces conditions peut être alors considéré comme "facilement biodégradable". Au commencement de notre étude, la biodégradabilité du 2-EHN n'était pas renseignée. L'US EPA (United States, Environmental Protection Agency) a publié les résultats d'un plan d'expérimentation dans lesquels figuraient des éléments préliminaires. Le rapport de l'US EPA indiquait notamment que le 2-EHN n'est pas "facilement" biodégradable (*ready biodegradability*) selon le test normalisé du "CO₂ dans l'espace de tête" (*CO₂ headspace test*). Les auteurs avaient conclu que la faible solubilité du 2-EHN, conjuguée à sa volatilité, rendait le produit très peu biodisponible, ce qui contribuait à l'absence de biodégradation. (The American Chemistry Council Petroleum additives panel, 2006). Par

rapport à ce constat, notre travail a apporté la preuve que le 2EHN est effectivement biodégradable, et a apporté des données inédites sur la biodégradation du 2-EHN.

1 Biodégradabilité du 2-EHN

Le recours à des cultures biphasiques dans lesquelles une phase non aqueuse servait de réservoir de substrat (HMN), a été une des clés de la réussite de ce projet, car cela permettait de tenir compte à la fois du caractère volatil, de l'hydrophobicité et du caractère toxique du 2-EHN. Aucune des souches capables d'utiliser le 2-EHN comme seule source de carbone ne le minéralise totalement. Parmi les souches de *Mycobacterium austroafricanum* capables de dégrader le 2-EHN, la souche IFP 2173 est la plus performante, car c'est la seule capable de dégrader le 2-EHN en l'absence de HMN. *M. austroafricanum* IFP 2173 a donc été utilisée pour entreprendre les études cinétiques et rechercher la voie de dégradation du 2-EHN.

2 Voie de dégradation du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173

La minéralisation du 2-EHN n'est que partielle puisqu'on assiste à l'accumulation d'un intermédiaire de dégradation. L'intermédiaire présumé, la 4-éthylidihydrofuran-2(3H)-one (4-EDF), plus communément appelé β -éthyl- γ -butyrolactone, a été identifié sans ambiguïté par des analyses chromatographiques concordantes et par synthèse chimique (collaboration avec Lucien Kerhoas et Martine Lettere de l'INRA de Versailles).

Grâce à la structure de la 4-EDF, nous avons proposé une voie de dégradation plausible pour le 2-EHN (**figure 5.1**). *M. austroafricanum* IFP 2173 a été isolé pour sa capacité à dégrader l'iso-octane (Solano-Serena *et al.*, 2004) mais ne peut pas métaboliser la 4-EDF. Des essais de dégradation simultanée du 2-EHN et de l'isooctane n'ont pas permis de minéraliser totalement le 2-EHN. Il semble donc que la souche ne dispose pas d'enzyme capable de catalyser l'élimination du groupement éthyle et/ou hydroxyméthyle *antéiso*-terminaux de l'acide 3-(hydroxyméthyl) pentanoïque. La réaction concurrente de lactonisation de l'acide 3-(hydroxyméthyl) pentanoïque est thermodynamiquement très favorable et peut avoir empêché la dégradation complète du 2-EHN.

3 Recherche des enzymes impliquées dans la voie de dégradation du 2-EHN

Les enzymes impliquées dans la voie de dégradation « partielle » du 2-EHN par *M. austroafricanum* IFP 2173 ont été recherchées par une approche protéomique. Nous avons identifié 35 protéines solubles spécifiques par électrophorèse bi-dimensionnelle. L'identification des protéines induites a été confirmée par comparaison de gels 2DE colorés au bleu colloïdal et par un marquage métabolique au ^{35}S . Les protéines membranaires (transmembranaires et associées à la membrane) ont été analysées sur gel SDS-PAGE, et comparées grâce à une identification exhaustive en LC-MS/MS. Nous avons comparé le degré d'expression des protéines sur la base de l'abondance relative calculée à partir d'indices de l'abondance de peptides, les « Spectral count » et les « emPAI ». Le résultat de l'analyse a montré que 300 protéines sont spécifiques au 2-EHN et que 65 sont plus abondantes sur 2-EHN et que les enzymes clés de la voie de dégradation des acides gras sont induites.

Parmi ces enzymes figurent les enzymes de la β -oxydation, toutes retrouvées, lors de l'analyse protéomique des protéines solubles, sauf la thiolase qui catalyse la dernière étape du cycle. Plusieurs copies de ces enzymes ont été retrouvées au cours de l'analyse. Ceci permet d'une part de mettre en évidence la redondance de ces enzymes et d'autre part de montrer que la souche IFP 2173 est bien équipée pour dégrader les acides gras. Nous avons retrouvé plusieurs enzymes ayant une activité estérase et d'autres impliquées dans le métabolisme de l'azote. Ceci conforte les résultats qui ont montré que la bactérie utilise le 2-EHN comme unique source d'azote. Une protéine certainement impliquée dans la synthèse des acides mycoliques, « mycolic acid condensate », méritera que l'on s'attarde sur son mode d'action car elle est induite sur 2-EHN.

Pour l'étape initiale de dégradation du 2-EHN, deux cytochromes P450 alcane 1-mono-oxygénase de type CYP153 ont été mis en évidence, l'un d'eux étant l'une des protéines induites les plus abondantes. Il s'agit du CYP153-1 qui a 99 % d'identité de séquence avec CYP153A de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (van Beilen *et al.* 2006).

Toutes ces protéines pourraient intervenir dans la voie de dégradation du 2-EHN. Néanmoins, afin d'attribuer un rôle à chacune d'entre elles, il faut vérifier qu'elles interviennent effectivement dans la voie métabolique. Le clonage et l'expression de certaines enzymes a été entrepris et permettra à terme de connaître plus précisément leur activité catalytique et leur implication dans la dégradation du 2-EHN.

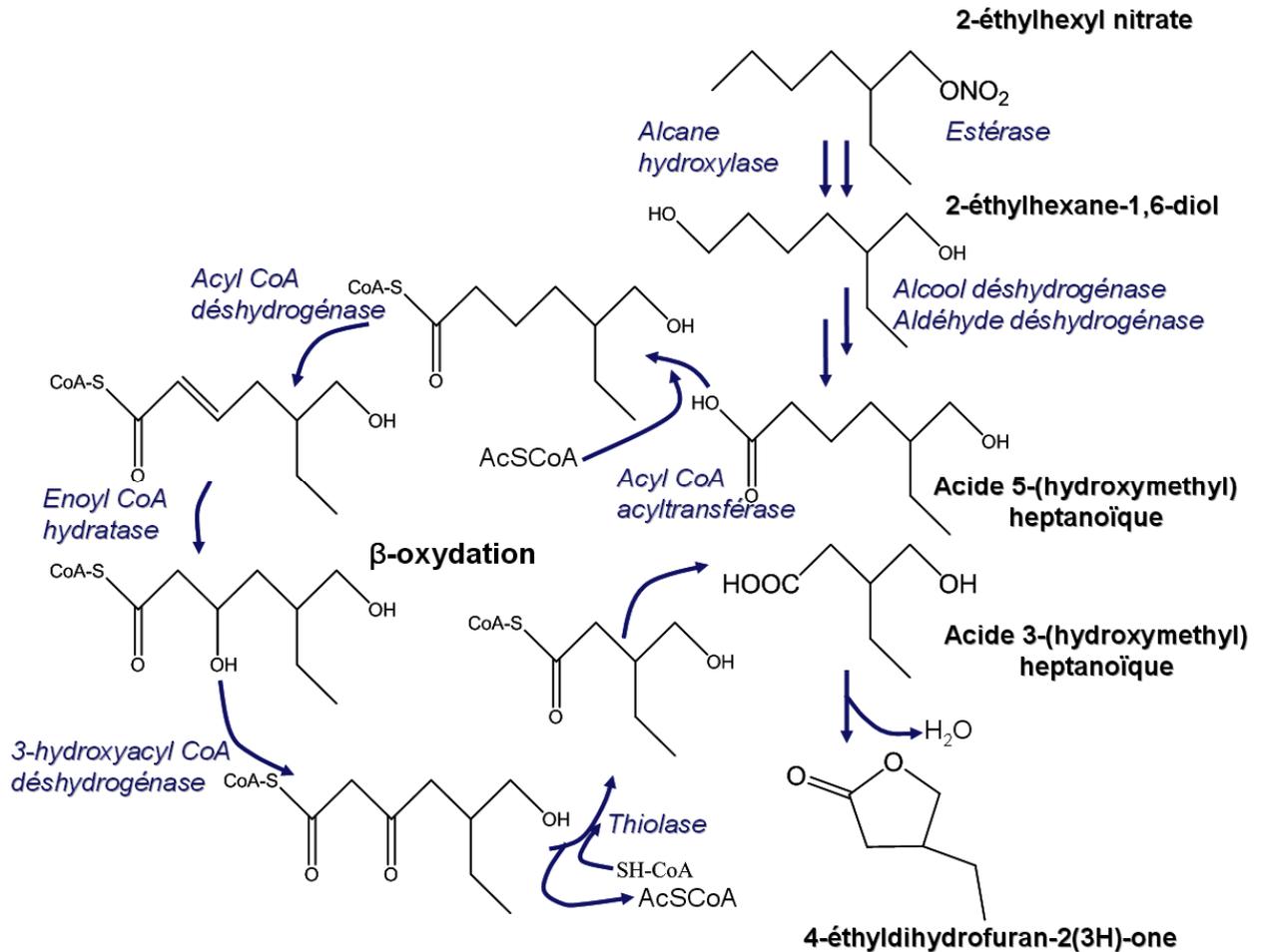


Figure 5.1 : Voie de dégradation du 2-EHN et enzymes impliquées chez *M. austroafricanum* IFP2173

4 Existence de multiples alcane hydroxylases dans la souche IFP 2173

La plupart des protéines identifiées sont similaires à celles du génome de *M. vanbaalenii* PYR-1. Cette souche a été étudiée pour sa capacité à dégrader les HAP (Moody *et al.*, 2005), et son génome a été séquencé en 2006 puis ré-annoté en avril 2008. Comme elle ne faisait pas partie du lot de souches dont j'ai testé la capacité à dégrader le 2-EHN au début de cette étude, j'ai refait des tests pour savoir si la souche PYR-1 dégradait le 2-EHN. Les résultats ont montré que même si elle possède un grand nombre d'enzymes en commun *M. austroafricanum* IFP 2173, elle ne dégrade pas le 2-EHN.

En me basant sur des séquences du génome de la souche PYR-1, j'ai cloné deux gènes codant pour des alcane hydroxylases membranaires à partir du génome de IFP 2173. Les alcane hydroxylases de la souche IFP 2173 sont presque identiques à celles de la souche PYR-1.

La souche IFP 2173 a donc deux alcane hydroxylases membranaires et au moins un cytochrome P450 de type CYP153.

5 AlkB ou CYP153 ?

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que *M. austroafricanum* IFP 2173 est équipée de trois alcane hydroxylases, deux membranaires à fer binucléaire et une à fer hémique. Je n'ai à ce jour pas trouvé de gène codant pour le second CYP153 identifié grâce à l'analyse protéomique. La représentation de l'organisation des gènes tels qu'ils ont été retrouvés est illustrée par la **figure 5.2**.

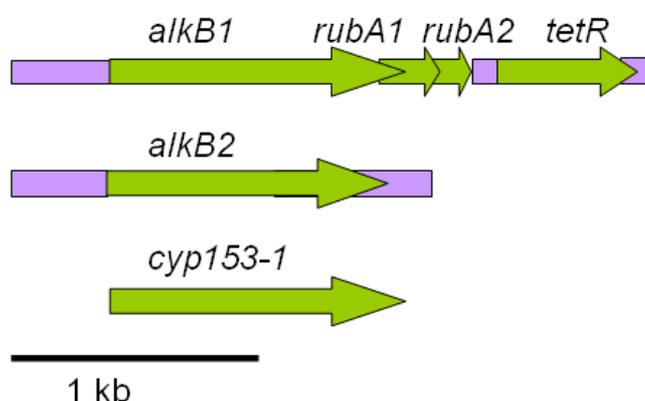


Figure 5.2 : Organisation génétique des alcane hydroxylases retrouvées chez *M. austroafricanum* IFP 2173

Quelques résultats d'analyse supplémentaires apportent des informations sur l'expression de ces enzymes, en rapport avec le métabolisme du 2-EHN :

Des expériences de RT-PCR (amplification par PCR après traitement à la reverse transcriptase) ont montré que des gènes codant pour les alcane hydroxylases transmembranaire sont transcrits dans la souche IFP 2173 en croissance sur plusieurs substrats carbonés dont l'acétate et le 2-EHN. Curieusement, aucune des deux alcane hydroxylases membranaires n'a été détectée lors de l'analyse protéomique, suggérant qu'elles n'ont pas été séparées sur gel SDS ou bien qu'elles ont donné très peu de peptides identifiables par LC-MS.

Le cytochrome P450 de type CYP153-1 est clairement induit sur 2-EHN, selon l'analyse protéomique.

Ces résultats incitent à penser que c'est plutôt le CYP153 qui serait impliqué dans l'étape initiale d'oxydation du 2-EHN, mais nous ne pouvons pas exclure *a priori* la participation de l'une ou l'autre des alcane hydroxylases.

Une bactérie comportant trois alcane hydroxylases de même nature a été mise en évidence suite au séquençage du génome de *Alcanivorax borkumensis* SK2 (Schneiker *et al.*, 2006). D'après les études menées sur cette bactérie, il a été montré que son AlkB1 oxyde les alcanes de C₅ à C₁₆ et l'AlkB2 vise les alcanes de C₈ à C₁₆. Concernant le CYP153, son spectre d'action n'a pas été déterminé mais les auteurs ont noté que son expression est constitutive (Martins dos Santos *et al.*, 2008). Seule une caractérisation biochimique pourra nous permettre de conclure sur le spectre d'action des alcane hydroxylases de la souche IFP 2173.

6 Expression et Clonage des alcanes hydroxylases

Afin de savoir quelle alcane hydroxylase est impliquée dans l'étape initiale de dégradation du 2-EHN, nous n'avions pas d'autre choix que de faire le clonage et l'expression de ces enzymes. Les alcane hydroxylases membranaires et le cytochrome P450 de type CYP153 *a priori* soluble n'ont pas été produits de façon satisfaisante chez *E. coli* pour vérifier leur activité vis-à-vis du 2-EHN. Nous avons alors testé l'expression chez *M. smegmatis* mc². Pour ce faire, nous avons utilisé deux systèmes d'expression différents :

Pour les gènes *alkB*, nous avons utilisé un système d'expression des gènes chez *Mycobacterium smegmatis* mc²155 qui a fait ses preuves pour exprimer un cluster de gènes impliqués dans la dégradation du pyrène (Pagnout *et al.*, 2007). Malgré les précautions prises pour insérer les gènes *alkB* et leurs séquences promotrices, nous n'avons pas mis en évidence d'oxydation du 2-EHN. Plusieurs raisons peuvent être évoquées pour expliquer ce résultat :

1 *M. smegmatis* mc²155 n'a peut-être pas reconnu les séquences promoteurs des gènes de *M. austroafricanum* IFP 2173.

2 Les alcane hydroxylases n'ont pas été synthétisées en quantité suffisante ou n'ont pas été correctement insérées dans la membrane

3 La transformation de *M. smegmatis* mc²155 n'a peut être pas marché bien que tous les tests aient été effectués en présence de l'antibiotique approprié.

Les constructions que j'ai réalisées devront donc être vérifiées pour s'assurer de la présence des gènes *alkB* dans les souches transformées et pour savoir si les protéines sont bien synthétisées.

Pour le cytochrome CYP153-1, nous avons tenté l'expression dans la souche *M. smegmatis* mc²4517 optimisée pour la synthèse de protéines recombinantes (Goldstone *et al.*,

2008). Cependant, nous n'avons pu obtenir de souche transformée contenant le gène codant le CYP153-1.

Ces résultats laissent en suspens la question de l'alcane hydroxylase impliquée dans la dégradation du 2-EHN.

7 Perspectives

Cette thèse a permis de bien dégager la problématique de la dégradation du 2-EHN. Quatre axes majeurs de poursuites des recherches sont à envisager :

- La recherche d'une bactérie capable soit de dégrader la 4-EDF, soit de minéraliser totalement le 2-EHN.
- La caractérisation des alcane hydroxylases de la souche IFP 2173.
- La recherche d'une ou plusieurs protéines spécifiques expliquant la capacité de dégradation du 2-EHN par la souche IFP 2173.
- L'utilisation de protéines spécifiques au 2-EHN pour mettre au point des marqueurs de la dégradation des alcanes récalcitrants à la biodégradation dans les sols.

Recherche d'un microorganisme capable de dégrader la 4-EDF

Afin de démontrer que l'intermédiaire de dégradation du 2-EHN n'est pas récalcitrant, il conviendrait d'entreprendre des essais pour isoler des bactéries qui minéralisent la 4-EDF. Nous pourrions procéder comme lors de la tentative d'isolement de souches sur 2-EHN (Solano-Serena *et al.*, 2008). Grâce la 4-EDF synthétisé par voie chimique, nous disposons de suffisamment de produit pour isoler des souches capables de dégrader ce composé. Si une telle souche était isolée, il serait alors possible de minéraliser totalement le 2-EHN en utilisant deux souches : la souche IFP 2173 qui produit la 4-EDF et la souche isolée qui l'utilise comme substrat. Le 2-EHN pourrait donc ainsi être dégradé en utilisant ces deux bactéries, en comensalisme.

Pour approfondir cette étude, nous pourrions essayer de récupérer le gène qui est responsable de la dégradation de la 4-EDF, chez cette seconde bactérie, et de l'introduire chez *M. austroafricanum* IFP 2173. La souche IFP 2173 ainsi transformée pourrait être capable de minéraliser totalement le 2-EHN.

Identification de l'alcane hydroxylase impliquée dans l'étape initiale de dégradation du 2-EHN

J'ai montré que la souche de *M. austroafricanum* IFP 2173 possède au moins trois alcane hydroxylases.

Chaque gène d'alcane hydroxylase trouvé a été cloné dans un système d'expression qui permet de tester leur activité vis-à-vis des alcanes et du 2-EHN.

Je n'ai pas pu montrer l'activité des alcane hydroxylases transmembranaires, AlkB1 et AlkB2 vis-à-vis des alcanes en C₆, C₈ et du 2-EHN avec le système d'expression utilisé chez *M. smegmatis* mc²155. J'ai testé la dégradation du 2-EHN par *P. putida* Gpo1 pGec47ΔB-pCom8-PFR1500 (van Beilen *et al.*, 2005) et il s'avère que cette souche exprimant le CYP153 de *Mycobacterium* sp. HXN-1500 (qui a deux acides aminés de différence avec celui de la souche IFP 2173) ne dégrade pas le 2-EHN, ni le 2-éthylhexanol.

Pour poursuivre nos travaux, il conviendrait, d'utiliser un autre vecteur d'expression chez *Mycobacterium smegmatis*. Ainsi, les alcane hydroxylases de la souche IFP 2173 pourraient être insérées dans ce vecteur. Ces derniers seront utilisés pour transformer *M. smegmatis*. Ces souches transformées seraient alors testées vis à vis des *n*-alcanes et du 2-EHN.

Recherche de protéines spécifiques facilitant la dégradation du 2-EHN par la souche IFP 2173

La souche IFP 2173 est la seule qui dégrade le 2-EHN sans HMN (en milieu biphasique). Je pense que cette particularité pourrait avoir deux origines :

- la synthèse de biosurfactants par la bactérie,
- une modification de sa paroi par modification des peptidoglycanes ou de la composition en acides mycoliques.

Concernant le premier point, j'ai observé que le milieu de culture liquide devenait trouble lors de la dégradation du 2-EHN par la souche IFP 2173. Ce phénomène n'est pas dû à la biomasse mais à la présence de substances visiblement hydrophobes puisqu'elles forment un film sur l'eau. Ce surnageant de culture mériterait d'être analysé pour savoir s'il s'agit effectivement de biosurfactants.

L'analyse protéomique a permis de trouver certaines protéines impliquées dans le métabolisme des lipides membranaires comme les « glycosyl transférase » ou le « mycolic acid condensate ». Etant donné l'hydrophobicité de la paroi (**figure 5.3**) sur 2-EHN. En effet,

la souche forme des agrégats très hydrophobes, en suspension, dans le milieu liquide. Nous pouvons penser la bactérie modifie son enveloppe pour accéder au substrat. Des analyses comme celles de Bouchez-Naïtali *et al.* (1999) pourraient être entreprises dans un premier temps. Nous pourrions essayer de déterminer la composition en glycosides et en glycolipides, déterminer la tension interfaciale et la tension de surface (potentiel γ) et mesurer l'hydrophobicité cellulaire (par détermination du pourcentage d'adhérence à l'hexadécane). A terme, il conviendrait de rechercher les enzymes responsables de ces modifications.



Figure 5.3 : Photo de *M. austroafricanum* IFP 2173 en milieu aqueux et en présence de 2-EHN

Recherche de marqueurs de la dégradation du 2-EHN dans les sols

Par une approche protéomique

Grâce à la somme de données accumulées par l'analyse protéomique, nous avons un panel de protéines induites ou spécifiques de la dégradation des hydrocarbures et plus particulièrement du 2-EHN que l'on peut classer parmi les hydrocarbures branchés récalcitrants à la dégradation. En analysant les protéines des bactéries du sol par électrophorèse 1D et 2D, puis en les identifiant par analyse en LC-MS/MS, tel que cela a été décrit par Benndorf *et al.*, (2007) nous pourrions déterminer le métaprotéome d'un sol contaminé par les hydrocarbures. Les résultats de l'analyse des protéines induites sur 2-EHN pourront alors être utilisés, à titre de comparaison, pour retrouver des protéines marqueurs de la dégradation des hydrocarbures. En comparant le jeu de données du métaprotéome du sol et celui obtenu sur 2-EHN nous pourrions retrouver des protéines marqueurs de la dégradation des hydrocarbures.

Par une approche génomique

Il s'agit ici de cibler les gènes codant des enzymes présentes dans le sol et susceptibles d'agir vis-à-vis des hydrocarbures. Pour ce faire, nous pourrions extraire des ADN du sol et faire par simple analyse PCR avec des oligonucléotides spécifiques des gènes *alkB1*, *alkB2* et de *cyp153* pour rechercher ces enzymes, indiquant une activité de dégradation des alcanes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Adekambi, T., Colson, P. & Drancourt, M. (2003). rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **41**, 5699-5708.

Alvarez, H. M. (2003). Relationship between beta-oxidation pathway and the hydrocarbon-degradation profile in actinomycete bacteria. *International Biodeterioration and biodegradation* **52**, 35-42.

Arndt, A. & Eikmanns, B. J. (2007). The alcohol dehydrogenase gene adhA in *Corynebacterium glutamicum* is subject to carbon catabolite repression. *J Bacteriol* **189**, 7408-7416.

Arpigny, J. L. & Jaeger, K. E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J* **343 Pt 1**, 177-183.

Ashraf, W., Mihdhir, A. & Murrell, J. C. (1994). Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiol Lett* **122**, 1-6.

Asperger, O., Naumann, A. & Kleber, H. P. (1981). Occurrence of cytochrome P450 in *Acinetobacter* strains after growth on n-hexadecane. *FEMS Microbiol Lett* **11**, 309-312.

ATC (2004). 2-Ethylhexyl nitrate (2EHN). In *Best Practice Manual*, pp. 1-24: Additives Technical Committee-Europe. Document 79.

Aurilia, V., Parracino, A. & D'Auria, S. (2008). Microbial carbohydrate esterases in cold adapted environments. *Gene* **410**, 234-240.

Ayala, M. & Torres, E. (2004). Enzymatic activation of alkanes: constraints and prospective. *Applied Catalysis A: General* **272**, 1-13.

B

Ban-Weiss, G. A., Chen, J. Y., Buchholz, B. A. & Dibble, R. W. (2007). A numerical investigation into the anomalous slight NO_x increase when burning biodiesel; A new (old) theory. *Fuel Processing Technology* **88**, 659-667.

Bassan, A., Blomberg, M. R. & Siegbahn, P. E. (2004). A theoretical study of the cis-dihydroxylation mechanism in naphthalene 1,2-dioxygenase. *J Biol Inorg Chem* **9**, 439-452.

Battersby, N. S., Ciccognani, D., Evans, M. R., King, D., Painter, H. A., Peterson, D. R. & Starkey, M. (1999). An 'inherent' biodegradability test for oil products: description and

results of an international ring test. CONCAWE Biodegradation Task Force. *Chemosphere* **38**, 3219-3235.

Baulard, A. R., Besra, G. S. & Brennan, P. J. (1999). The cell wall core of *Mycobacterium*: structure, biogenesis and genetics. In *Mycobacteria : Molecular biology and virulence*, pp. 240-286. Edited by C. a. D. Ratledge, J.W. Blackwell science Ltd. U.K.

Béguin, P., Chauvaux, S., Miras, I., Francois, A., Fayolle, F. & Monot, F. (2003). Genes Involved in the Degradation of Ether Fuels by bacteria of the *Mycobacterium/Rhodococcus* Group. *Oil & Gas Science and Technology - Rev IFP* **58**, 489-495.

Benndorf, D., Balcke, G. U., Harms, H. & von Bergen, M. (2007). Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *ISME J* **1**, 224-234.

Bogan, B. W., Lahner, L. M., Sullivan, W. R. & Paterek, J. R. (2003). Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *J Appl Microbiol* **94**, 230-239.

Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 73-81.

Bouchez-Naitali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J. Y. & Vandecasteele, J. P. (1999). Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J Appl Microbiol* **86**, 421-428.

Bouchez, M., Blanchet, D. & Vandecasteele, J. P. (1995a). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 156-164.

Bouchez, M., Blanchet, D. & Vandecasteele, J. P. (1995b). Substrate availability in phenanthrene biodegradation: transfer mechanism and influence on metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **43**, 952-960.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.

Britton, L. N. (1984). Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. 89-129.

Butler, W. R. & Guthertz, L. S. (2001). Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of *Mycobacterium* species. *Clin Microbiol Rev* **14**, 704-726.

C

Catelani, D., Colombi, A., Sorlini, C. & Treccani, V. (1977). Metabolism of quaternary carbon compounds: 2,2-dimethylheptane and tertbutylbenzene. *Appl Environ Microbiol* **34**, 351-354.

Cavener, D. R. (1992). GMC oxidoreductases. A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. *J Mol Biol* **223**, 811-814.

Chauvaux, S., Chevalier, F., Le Dantec, C., Fayolle, F., Miras, I., Kunst, F. & Beguin, P. (2001). Cloning of a genetically unstable cytochrome P-450 gene cluster involved in degradation of the pollutant ethyl tert-butyl ether by *Rhodococcus ruber*. *J Bacteriol* **183**, 6551-6557.

D

de Vries, G. E., Harms, N., Maurer, K., Papendrecht, A. & Stouthamer, A. H. (1988). Physiological regulation of *Paracoccus denitrificans* methanol dehydrogenase synthesis and activity. *J Bacteriol* **170**, 3731-3737.

Dean-Ross, D. & Cerniglia, C. E. (1996). Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **46**, 307-312.

Deeth, R. J. & Dalton, H. (1998). Methane activation by methane monooxygenase: free radicals, Fe-C bonding, substrate dependent pathways and the role of the regulatory protein. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **3**, 302-306.

Denison, M. S. & Whitlock, J. P., Jr. (1995). Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes. *J Biol Chem* **270**, 18175-18178.

Dubbels, B. L., Sayavedra-Soto, L. A. & Arp, D. J. (2007). Butane monooxygenase of *Pseudomonas butanovora*: purification and biochemical characterization of a terminal-alkane hydroxylating diiron monooxygenase. *Microbiology* **153**, 1808-1816.

E

Eggink, G., Lageveen, R. G., Altenburg, B. & Witholt, B. (1987). Controlled and functional expression of the *Pseudomonas oleovorans* alkane utilizing system in *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **262**, 17712-17718.

Eggink, G., Engel, H., Vriend, G., Terpstra, P. & Witholt, B. (1990). Rubredoxin reductase of *Pseudomonas oleovorans*. Structural relationship to other flavoprotein oxidoreductases based on one NAD and two FAD fingerprints. *J Mol Biol* **212**, 135-142.

European Environment Agency (2007). Progress in management of contaminated sites (CSI 015): http://themes.eea.europa.eu/IMS/IMS/ISpecs/ISpecification20041007131746/IAssessment1152619898983/view_content.

F

Fall, R. R., Brown, J. L. & Schaeffer, T. L. (1979). Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* **38**, 715-722.

Feng, L., Wang, W., Cheng, J. & other authors (2007). Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5602-5607.

Floyd, M. M., Tang, J., Kane, M. & Emerson, D. (2005). Captured diversity in a culture collection: case study of the geographic and habitat distributions of environmental isolates held at the american type culture collection. *Appl Environ Microbiol* **71**, 2813-2823.

Fojan, P., Jonson, P. H., Petersen, M. T. & Petersen, S. B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **82**, 1033-1041.

Forster-Fromme, K., Chattopadhyay, A. & Jendrossek, D. (2008). Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA. *Microbiology* **154**, 789-796.

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

Fu, X., Gharib, S. A., Green, P. S., Aitken, M. L., Frazer, D. A., Park, D. R., Vaisar, T. & Heinecke, J. W. (2008). Spectral index for assessment of differential protein expression in shotgun proteomics. *J Proteome Res* **7**, 845-854.

Fujii, T., Narikawa, T., Takeda, K. & Kato, J. (2004). Biotransformation of various alkanes using the *Escherichia coli* expressing an alkane hydroxylase system from *Gordonia* sp. TF6. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**, 2171-2177.

Funhoff, E. G., Bauer, U., Garcia-Rubio, I., Witholt, B. & van Beilen, J. B. (2006). CYP153A6, a soluble P450 oxygenase catalyzing terminal-alkane hydroxylation. *J Bacteriol* **188**, 5220-5227.

G

Goldstone, R. M., Moreland, N. J., Bashiri, G., Baker, E. N. & Shaun Lott, J. (2008). A new Gateway vector and expression protocol for fast and efficient recombinant protein expression in *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Expr Purif* **57**, 81-87.

Gołofit-Szymczak, M. (2005). 2-EHN Documentation. In *International Journal Of Occupational Safety and Ergonomics*. Warszawa, Czerniakowska CIOP PIP. <http://www.ciop.pl/12444.html#rs2#rs2>.

Gonzalez-Duarte, R. & Albalat, R. (2005). Merging protein, gene and genomic data: the evolution of the MDR-ADH family. *Heredity* **95**, 184-197.

Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. & Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**, 1037-1053.

Goswami, P. & Singh, H. D. (1991). Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering* **37**, 1-11.

Graves, P. R. & Haystead, T. A. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63.

Guengerich, F. P. & MacDonald, T. L. (1990). Mechanisms of cytochrome P-450 catalysis. *Faseb J* **4**, 2453-2459.

H

Hamamura, N., Storfa, R. T., Semprini, L. & Arp, D. J. (1999). Diversity in butane monooxygenases among butane-grown bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**, 4586-4593.

Hamamura, N., Yeager, C. M. & Arp, D. J. (2001). Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides* sp. strain CF8. *Appl Environ Microbiol* **67**, 4992-4998.

Hartman, S., De Bont, J. A. M. & Stackebrandt, E. (2006). The Genus *Mycobacterium* - Nonmedical. In *Prokaryotes*, pp. 889-918. Edited by Springer. New York.

Heiss-Blanquet, S., Benoit, Y., Marechaux, C. & Monot, F. (2005). Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J Appl Microbiol* **99**, 1392-1403.

Hempel, J., von Bahr-Lindstrom, H. & Jornvall, H. (1984). Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *Eur J Biochem* **141**, 21-35.

Hempel, J., Nicholas, H. & Lindahl, R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci* **2**, 1890-1900.

Hiltunen, J. K. & Qin, Y. (2000). beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim Biophys Acta* **1484**, 117-128.

Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M. & Engelhardt, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 3963-3967.

Hommel, R. K. (1994). Formation and function of biosurfactant for degradation of water-insoluble substrate. In *Biochemistry of microbial degradation*, pp. 63-87. Edited by C. Raledge. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Houssaini-Iraqi, M., Lazraq, M. H., Clavel-Seres, S., Rastogi, N. & David, H. L. (1992). Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* **69**, 239-244.

I

Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J. & Mann, M. (2005). Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1265-1272.

J

Johnson, E. L., Smith, C. A., O'Reilly, K. T. & Hyman, M. R. (2004). Induction of methyl tertiary butyl ether (MTBE)-oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1023-1030.

Jornvall, H. (1994). The alcohol dehydrogenase system. *EXS* **71**, 221-229.

Jouanneau, Y., Willison, J. C., Meyer, C., Krivobok, S., Chevron, N., Besombes, J. L. & Blake, G. (2005). Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environ Sci Technol* **39**, 5729-5735.

K

Karakousis, P. C., Bishai, W. R. & Dorman, S. E. (2004). *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cell Microbiol* **6**, 105-116.

Kim, I. S., Park, J.-S. & Kim, K.-W. (2001). Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry *Applied Geochemistry* **16**, 1419-1425.

Kim, S. J., Kweon, O., Freeman, J. P., Jones, R. C., Adjei, M. D., Jhoo, J. W., Edmondson, R. D. & Cerniglia, C. E. (2006). Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1045-1054.

Kloos, K., Munch, J. C. & Schloter, M. (2006). A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods* **66**, 486-496.

Klose, J. (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243.

Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M. P., Meulenberg, C. H., Kingma, J. & Witholt, B. (1989a). The *Pseudomonas oleovorans* *alkBAC* operon encodes two structurally related rubredoxins and an aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* **264**, 5442-5451.

Kok, M., Oldenhuis, R., van der Linden, M. P., Raatjes, P., Kingma, J., van Lelyveld, P. H. & Witholt, B. (1989b). The *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase gene. Sequence and expression. *J Biol Chem* **264**, 5435-5441.

Kopp, D. A. & Lippard, S. J. (2002). Soluble methane monooxygenase: activation of dioxygen and methane. *Curr Opin Chem Biol* **6**, 568-576.

Kotani, T., Kawashima, Y., Yurimoto, H., Kato, N. & Sakai, Y. (2006). Gene structure and regulation of alkane monooxygenases in propane-utilizing *Mycobacterium* sp. TY-6 and *Pseudonocardia* sp. TY-7. *J Biosci Bioeng* **102**, 184-192.

Krivobok, S., Kuony, S., Meyer, C., Louwagie, M., Willison, J. C. & Jouanneau, Y. (2003). Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* **185**, 3828-3841.

L

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Larkin, M. J., Kulakov, L. A. & Allen, C. C. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus*--masters of catabolic versatility. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 282-290.

Leahy, J. G. & Colwell, R. R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev* **54**, 305-315.

Lee, M., Kim, M. K., Kwon, M. J., Park, B. D., Kim, M. H., Goodfellow, M. & Lee, S. T. (2005). Effect of the synthesized mycolic acid on the biodegradation of diesel oil by *Gordonia nitida* strain LE31. *J Biosci Bioeng* **100**, 429-436.

Lopes Ferreira, N., Maciel, H., Mathis, H., Monot, F., Fayolle-Guichard, F. & Greer, C. W. (2006). Isolation and characterization of a new *Mycobacterium austroafricanum* strain, IFP 2015, growing on MTBE. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**, 358-365.

Lopes Ferreira, N., Mathis, H., Labbe, D., Monot, F., Greer, C. W. & Fayolle-Guichard, F. (2007). n-Alkane assimilation and tert-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**, 909-919.

Loviny, T., Norton, P. M. & Hartley, B. S. (1985). Ribitol dehydrogenase of *Klebsiella aerogenes*. Sequence of the structural gene. *Biochem J* **230**, 579-585.

M

MacKintosh, R. W. & Fewson, C. A. (1987). Microbial aromatic alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Prog Clin Biol Res* **232**, 259-273.

Maier, T., Forster, H. H., Asperger, O. & Hahn, U. (2001). Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 652-658.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J. B., Derbyshire, M. K. & other authors (2007). CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res* **35**, D237-240.

Martins dos Santos, V. A. P., Yakimov, M. M., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2008). Genomic Insights into oil Biodegradation in marine Systems. In *Microbial Degradation Genomics and Molecular Biology*, pp. 270-295. Edited by E. Diaz. Norfolk, UK: Caister Academic Press.

Matsushita, K., Nagatani, Y., Shinagawa, E., Adachi, O. & Ameyama, M. (1991). Reconstitution of the ethanol oxidase respiratory chain in membranes of quinoprotein alcohol dehydrogenase-deficient *Gluconobacter suboxydans* subsp. alpha strains. *J Bacteriol* **173**, 3440-3445.

Mc Kenna, E. J. (1972). Microbial oxidation of methyl branched alkanes. In *Degradation of synthetic organic molecule in the biosphere*. San Francisco, Academy of science, Washington, D.C.

McKenna, E. J. & Kallio, R. E. (1971). Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 1552-1554.

Middlebrook, G., Cohn, M. L. & Schaefer, W. B. (1954). Studies on isoniazid and tubercle bacilli. III. The isolation, drug-susceptibility, and catalase-testing of tubercle bacilli from isoniazid-treated patients. *Am Rev Tuberc* **70**, 852-872.

Middlebrook, G. & Cohn, M. L. (1958). Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods. *Am J Public Health Nations Health* **48**, 844-853.

Miura, Y. (1978). Mechanism of liquid hydrocarbon uptake by micro-organisms. *J Microbiol Methods* **6**, 99-112.

Moody, J. D., Freeman, J. P. & Cerniglia, C. E. (2005). Degradation of benz[a]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. *Biodegradation* **16**, 513-526.

Munro, A. W. & Lindsay, J. G. (1996). Bacterial cytochromes P-450. *Mol Microbiol* **20**, 1115-1125.

N

Nagy, P. L., Marolewski, A., Benkovic, S. J. & Zalkin, H. (1995). Formyltetrahydrofolate hydrolase, a regulatory enzyme that functions to balance pools of tetrahydrofolate and one-carbon tetrahydrofolate adducts in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 1292-1298.

Nakamiya, K., Sato, A., Takahara, Y. & Iida, T. (1985). Microbial oxidation of isoterpenoid alkanes, phytane, norpristane and farsnesane. *Agric Biol Chem* **49**, 1993-2002.

Nakamiya, K., Hashimoto, S., Ito, H., Edmonds, J. S., Yasuhara, A. & Morita, M. (2005). Microbial treatment of bis (2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride with isolated bacteria. *J Biosci Bioeng* **99**, 115-119.

Nalli, S., Cooper, D. G. & Nicell, J. A. (2002). Biodegradation of plasticizer by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation* **13**, 343-352.

Nalli, S., Cooper, D. G. & Nicell, J. A. (2006). Interaction of metabolites with *R. rhodochrous* during the biodegradation of di-ester plasticizers. *Chemosphere*.

Narhi, L. O. & Fulco, A. J. (1987). Identification and characterization of two functional domains in cytochrome P-450BM-3, a catalytically self-sufficient monooxygenase induced by barbiturates in *Bacillus megaterium*. *J Biol Chem* **262**, 6683-6690.

Nebert, D. W. & Nelson, D. R. (1991). P450 gene nomenclature based on evolution. *Methods Enzymol* **206**, 3-11.

Nelson, D. R. (2003). Cytochrome P450 gene superfamily.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.

Nicolau, E., Kerhoas, L., Lettere, M., Jouanneau, Y. & Marchal, R. (2008). Biodegradation of 2-ethylhexyl nitrate by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173. *Appl Environ Microbiol* **74**, 6187-6193.

Nieboer, M., Gunnewijk, M., van Beilen, J. B. & Witholt, B. (1997). Determinants for overproduction of the *Pseudomonas oleovorans* cytoplasmic membrane protein alkane hydroxylase in alk⁺ *Escherichia coli* W3110. *J Bacteriol* **179**, 762-768.

Nishioka, T., Iwata, M., Imaoka, T., Mutoh, M., Egashira, Y., Nishiyama, T., Shin, T. & Fujii, T. (2006). A mono-2-ethylhexyl phthalate hydrolase from a *Gordonia* sp. that is able to dissimilate di-2-ethylhexyl phthalate. *Appl Environ Microbiol* **72**, 2394-2399.

O

O'Connell, M. A., Orr, G. & Shapiro, L. (1990). Purification and characterization of fatty acid beta-oxidation enzymes from *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **172**, 997-1004.

Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M. & other authors (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng* **5**, 197-211.

P

Pagnout, C., Frache, G., Poupin, P., Maunit, B., Muller, J. F. & Ferard, J. F. (2007). Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: expression in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *Res Microbiol* **158**, 175-186.

Palomo, J. M., Segura, R. L., Fernandez-Lorente, G., Pernas, M., Rua, M. L., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. (2004). Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog* **20**, 630-635.

Pamp, S. J. & Tolker-Nielsen, T. (2007). Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 2531-2539.

Paul, T. R. & Beveridge, T. J. (1992). Reevaluation of envelope profiles and cytoplasmic ultrastructure of mycobacteria processed by conventional embedding and freeze-substitution protocols. *J Bacteriol* **174**, 6508-6517.

Pelletier, I. & Altenbuchner, J. (1995). A bacterial esterase is homologous with non-haem haloperoxidases and displays brominating activity. *Microbiology* **141** (Pt 2), 459-468.

Penet, S., Marchal, R., Sghir, A. & Monot, F. (2004). Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**, 40-47.

Penet, S., Vendevre, C., Bertoncini, F., Marchal, R. & Monot, F. (2006). Characterisation of biodegradation capacities of environmental microflorae for diesel oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Biodegradation*, 1-9.

Peng, X., Taki, H., Komukai, S. & other authors (2006). Characterization of four *Rhodococcus* alcohol dehydrogenase genes responsible for the oxidation of aromatic alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**, 824-832.

Petersen, E. I., Valinger, G., Solkner, B., Stubenrauch, G. & Schwab, H. (2001). A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases. *J Biotechnol* **89**, 11-25.

Peterson, J. A., Kusunose, M., Kusunose, E. & Coon, M. J. (1967). Enzymatic omega-oxidation. II. Function of rubredoxin as the electron carrier in omega-hydroxylation. *J Biol Chem* **242**, 4334-4340.

Peterson, J. A. & Coon, M. J. (1968). Enzymatic omega-oxidation. 3. Purification and properties of rubredoxin, a component of the omega-hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. *J Biol Chem* **243**, 329-334.

Peterson, J. A., Lorence, M. C. & Amarneh, B. (1990). Putidaredoxin reductase and putidaredoxin. Cloning, sequence determination, and heterologous expression of the proteins. *J Biol Chem* **265**, 6066-6073.

Peterson, J. A., Lu, J. Y., Geisselsoder, J., Graham-Lorence, S., Carmona, C., Witney, F. & Lorence, M. C. (1992). Cytochrome P-450terp. Isolation and purification of the protein and cloning and sequencing of its operon. *J Biol Chem* **267**, 14193-14203.

Petit, J. F. & Lederer, E. (1984). The structure of the mycobacterial cell wall. In *The Mycobacteria*, pp. 301-322. Edited by L. G. Kubica G.P. Wayne. New York, USA: Marcel Dekker.

Pirnicks, M. P. (1977). Microbial oxidation of methyl branched alkanes. *Crit Rev Biotechnol* **5**, 413-422.

Pirnicks, M. P., Atlas, R. M. & Bartha, R. (1974). Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *J Bacteriol* **119**, 868-878.

Poupin, P., Ducrocq, V., Hallier-Soulier, S. & Truffaut, N. (1999). Cloning and characterization of the genes encoding a cytochrome P450 (PipA) involved in piperidine and pyrrolidine utilization and its regulatory protein (PipR) in *Mycobacterium smegmatis* mc²155. *J Bacteriol* **181**, 3419-3426.

R

Reid, M. F. & Fewson, C. A. (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* **20**, 13-56.

Ringuet, H., Akoua-Koffi, C., Honore, S., Varnerot, A., Vincent, V., Berche, P., Gaillard, J. L. & Pierre-Audigier, C. (1999). hsp65 sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* **37**, 852-857.

Rojo, F. (2005). Specificity at the end of the tunnel: understanding substrate length discrimination by the AlkB alkane hydroxylase. *J Bacteriol* **187**, 19-22.

Rontani, J. F., Bertrand, J. C., Blanc, F. & Giushi, G. (1986). Gas Chromatography and gas chromatography/mass spectrometry applied to the determination of a new pathway of pristane degradation by a marine mixed bacterial population. *Mar Chem* **18**, 9-16.

Rosenberg, E. (1986). Microbial surfactants. *Crit Rev Biotechnol* **3**, 109-132.

Roy, P. K., Singh, H. D. & Baruah, J. N. (1978). Metabolism of n-alkane in *Endomycopsis lipolytica* (*Saccharomycopsis lipolytica*): Part IV--Characteristics of lipid formation from n-alkanes by non-proliferating cells. *Indian J Biochem Biophys* **15**, 456-461.

S

Sabirova, J. S., Ferrer, M., Lunsdorf, H., Wray, V., Kalscheuer, R., Steinbuchel, A., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2006a). Mutation in a "tesB-like" hydroxyacyl-coenzyme A-specific thioesterase gene causes hyperproduction of extracellular polyhydroxyalkanoates by *Alcanivorax borkumensis* SK2. *J Bacteriol* **188**, 8452-8459.

Sabirova, J. S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K. N. & Golyshin, P. N. (2006b). Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *J Bacteriol* **188**, 3763-3773.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S. & Fall, R. R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl Environ Microbiol* **38**, 742-746.

Schagger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* **1**, 16-22.

Scheele, G. A. (1975). Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J Biol Chem* **250**, 5375-5385.

Schneiker, S., Dos Santos, V. A., Bartels, D. & other authors (2006). Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nat Biotechnol* **24**, 997-1004.

Seubert, W. & Fass, E. (1964). Studies on the Bacterial Degradation of Isoprenoids. Iv. The Purification and Properties of Beta-Isohexenylglutaconyl-Coa-Hydratase and Beta-Hydroxy-Beta-Isohexenylglutaryl-Coa-Lyase. *Biochem Z* **341**, 23-34.

Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G. & Munck, E. (1997). Mossbauer studies of alkane omega-hydroxylase: evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2981-2986.

Shanklin, J. & Whittle, E. (2003). Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane omega-hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. *FEBS Lett* **545**, 188-192.

Shaw, J. P. & Harayama, S. (1990). Purification and characterisation of TOL plasmid-encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *Eur J Biochem* **191**, 705-714.

Shen, Y., Stehmeier, L. G. & Voordouw, G. (1998). Identification of Hydrocarbon-Degrading Bacteria in Soil by Reverse Sample Genome Probing. *Appl Environ Microbiol* **64**, 637-645.

Singer, M. E. & Finnerty, W. R. (1984). *Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes.* New York: Macmillan Publisher.

Smith, C. A. & Hyman, M. R. (2004). Oxidation of methyl tert-butyl ether by alkane hydroxylase in dicyclopropylketone-induced and n-octane-grown *Pseudomonas putida* GPO1. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4544-4550.

Smits, T. H., Balada, S. B., Witholt, B. & van Beilen, J. B. (2002). Functional analysis of alkane hydroxylases from gram-negative and gram-positive bacteria. *J Bacteriol* **184**, 1733-1742.

Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R., Jr. (1990). Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **4**, 1911-1919.

Sokolovska, I., Rozenberg, R., Riez, C., Rouxhet, P. G., Agathos, S. N. & Wattiau, P. (2003). Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7019-7027.

Solano-Serena, F., Marchal, R., Ropars, M., Lebeault, J. M. & Vandecasteele, J. P. (1999). Biodegradation of gasoline: kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. *J Appl Microbiol* **86**, 1008-1016.

Solano-Serena, F., Marchal, R., Casaregola, S., Vasnier, C., Lebeault, J. M. & Vandecasteele, J. P. (2000a). A *Mycobacterium* strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2392-2399.

Solano-Serena, F., Marchal, R., Lebeault, J. M. & Vandecasteele, J. P. (2000b). Selection of microbial populations degrading recalcitrant hydrocarbons of gasoline by monitoring of culture-headspace composition. *Lett Appl Microbiol* **30**, 19-22.

Solano-Serena, F., Marchal, R., Heiss, S. & Vandecasteele, J. P. (2004). Degradation of isooctane by *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2173: growth and catabolic pathway. *J Appl Microbiol* **97**, 629-639.

Solano-Serena, F., Nicolau, E., Favreau, G., Jouanneau, Y. & Marchal, R. (2008). Biodegradability of 2-ethylhexyl nitrate (2-EHN), a cetane improver of diesel oil. *Biodegradation*.

Someroja, S. & Savolainen, H. (1983). Neurochemical effects of ethylhexyl nitrate in rats. *Toxicol Lett* **19**, 189-193.

Sophos, N. A., Pappa, A., Ziegler, T. L. & Vasiliou, V. (2001). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2000 update. *Chem Biol Interact* **130-132**, 323-337.

Sophos, N. A. & Vasiliou, V. (2003). Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* **143-144**, 5-22.

Soror, S. H., Verma, V., Rao, R., Rasool, S., Koul, S., Qazi, G. N. & Cullum, J. (2007). A cold-active esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): from genome sequence to enzyme activity. *J Ind Microbiol Biotechnol* **34**, 525-531.

Sugimoto, M., Tanabe, M., Hataya, M., Enokibara, S., Duine, J. A. & Kawai, F. (2001). The first step in polyethylene glycol degradation by sphingomonads proceeds via a flavoprotein alcohol dehydrogenase containing flavin adenine dinucleotide. *J Bacteriol* **183**, 6694-6698.

Suppes, G. J., Goff, M., Burkhart, M. L., Bockwinkel, K., Mason, M. H., Botts, J. B. & Heppert, J. A. (2001). Multifunctional Diesel Fuel Additives from Triglycerides. *Energy Fuels* **15**, 151-157.

Szybist, J. P., Boehman, A. L., Taylor, J. D. & McCormick, R. L. (2005). Evaluation of formulation strategies to eliminate the biodiesel NO_x effect. *Fuel Processing Technology* **86**, 1109-1126.

T

Takemura, H., Kondo, K., Horinouchi, S. & Beppu, T. (1993). Induction by ethanol of alcohol dehydrogenase activity in *Acetobacter pasteurianus*. *J Bacteriol* **175**, 6857-6866.

Tamarit, J., Cabiscol, E., Aguilar, J. & Ros, J. (1997). Differential inactivation of alcohol dehydrogenase isoenzymes in *Zymomonas mobilis* by oxygen. *J Bacteriol* **179**, 1102-1104.

The American Chemistry Council Petroleum additives panel (2006). High Production Volume Challenge program Final Submission for Nitric Acid, 2-Ethylhexyl Ester, pp. 11.

Thijsse, G. J. E. & Van der Linden, A. C. (1961). Iso-alkanes oxidation by a *Pseudomonas*. *Ant van Leeuw* **27**, 171-179.

Toyama, H., Mathews, F. S., Adachi, O. & Matsushita, K. (2004). Quinohemoprotein alcohol dehydrogenases: structure, function, and physiology. *Arch Biochem Biophys* **428**, 10-21.

Tusnady, G. E. & Simon, I. (2001). The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**, 849-850.

U

Ueda, T. & Coon, M. J. (1972). Enzymatic oxidation. VII. Reduced diphosphopyridine nucleotide-rubredoxin reductase: properties and function as an electron carrier in hydroxylation. *J Biol Chem* **247**, 5010-5016.

V

- Vahaoja, P., Kuokkanen, T., Valimaki, I., Vuoti, S. & Peramaki, P. (2005).** Biodegradabilities of some chain oils in groundwater as determined by the respirometric BOD OxiTop method. *Anal Bioanal Chem* **381**, 445-450.
- van Beilen, J. B., Eggink, G., Enequist, H., Bos, R. & Witholt, B. (1992a).** DNA sequence determination and functional characterization of the OCT-plasmid-encoded alkJKL genes of *Pseudomonas oleovorans*. *Mol Microbiol* **6**, 3121-3136.
- van Beilen, J. B., Penninga, D. & Witholt, B. (1992b).** Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *J Biol Chem* **267**, 9194-9201.
- van Beilen, J. B., Wubbolts, M. G. & Witholt, B. (1994).** Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* **5**, 161-174.
- van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Rothlisberger, M. & Witholt, B. (2001).** Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology* **147**, 1621-1630.
- van Beilen, J. B., Neuenschwander, M., Smits, T. H., Roth, C., Balada, S. B. & Witholt, B. (2002a).** Rubredoxins involved in alkane oxidation. *J Bacteriol* **184**, 1722-1732.
- van Beilen, J. B., Smits, T. H., Whyte, L. G., Schorcht, S., Rothlisberger, M., Plaggemeier, T., Engesser, K. H. & Witholt, B. (2002b).** Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ Microbiol* **4**, 676-682.
- van Beilen, J. B., Li, Z., Duetz, W. A., Smits, T. H. & Witholt, B. (2003).** Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology - Rev IFP* **58**, 427-440.
- van Beilen, J. B., Marin, M. M., Smits, T. H., Rothlisberger, M., Franchini, A. G., Witholt, B. & Rojo, F. (2004).** Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Environ Microbiol* **6**, 264-273.
- van Beilen, J. B. & Funhoff, E. G. (2005).** Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Curr Opin Biotechnol* **16**, 308-314.
- van Beilen, J. B., Holtackers, R., Luscher, D., Bauer, U., Witholt, B. & Duetz, W. A. (2005a).** Biocatalytic production of perillyl alcohol from limonene by using a novel *Mycobacterium* sp. cytochrome P450 alkane hydroxylase expressed in *Pseudomonas putida*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1737-1744.
- van Beilen, J. B., Smits, T. H., Roos, F. F., Brunner, T., Balada, S. B., Rothlisberger, M. & Witholt, B. (2005b).** Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *J Bacteriol* **187**, 85-91.

van Beilen, J. B., Funhoff, E. G., van Loon, A. & other authors (2006). Cytochrome P450 Alkane Hydroxylases of the CYP153 Family Are Common in Alkane-Degrading Eubacteria Lacking Integral Membrane Alkane Hydroxylases. *Appl Environ Microbiol* **72**, 59-65.

van Beilen, J. B. & Funhoff, E. G. (2007). Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 13-21.

Vandecasteele, J. P. (2005). Biodegradation des hydrocarbures aliphatiques et alicycliques. In *Microbiologie Pétrolière*, pp. 173-239. Edited by E. Technip. Paris.

Varela, E., Bockle, B., Romero, A., Martinez, A. T. & Martinez, M. J. (2000). Biochemical characterization, cDNA cloning and protein crystallization of aryl-alcohol oxidase from *Pleurotus pulmonarius*. *Biochim Biophys Acta* **1476**, 129-138.

W

Wang, Y., Ogawa, M., Fukuda, K., Miyamoto, H. & Taniguchi, H. (2006). Isolation and identification of mycobacteria from soils at an illegal dumping site and landfills in Japan. *Microbiol Immunol* **50**, 513-524.

Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A. & other authors (1995). Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**, 1090-1094.

Watkinson, R. J. & Morgan, P. (1990). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation* **1**, 79-92.

Wei, Y., Schottel, J. L., Derewenda, U., Swenson, L., Patkar, S. & Derewenda, Z. S. (1995). A novel variant of the catalytic triad in the *Streptomyces scabies* esterase. *Nat Struct Biol* **2**, 218-223.

Whyte, L. G., Smits, T. H., Labbe, D., Witholt, B., Greer, C. W. & van Beilen, J. B. (2002). Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5933-5942.

Wick, L. Y., Pasche, N., Bernasconi, S. M., Pelz, O. & Harms, H. (2003). Characterization of multiple-substrate utilization by anthracene-degrading *Mycobacterium frederiksbergense* LB501T. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6133-6142.

X

Xia, Q., Hendrickson, E. L., Wang, T., Lamont, R. J., Leigh, J. A. & Hackett, M. (2007). Protein abundance ratios for global studies of prokaryotes. *Proteomics* **7**, 2904-2919.

Y

Yokoyama, S., Yokoyama, R., Kinlaw, C. S. & Harry, D. E. (1990). Molecular evolution of the zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenase genes. *Mol Biol Evol* **7**, 143-154.

Z

Zuber, B., Chami, M., Houssin, C., Dubochet, J., Griffiths, G. & Daffe, M. (2008). Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol* **190**, 5672-5680.

ANNEXES

ANNEXES

Table S2: Proteins found in both 2-EHN and acetate-grown cells.

Relative abundances of proteins based on peptide spectral counts were calculated as indicated in Materials and Methods. Lines shown on a light gray background highlight proteins more abundant n 2-EHN than on acetate. Proteins found to be at least two-fold more abundant on 2-EHN than on acetate were shown on dark gray background

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RPOC_MYCVP	147052.31	3093,40	147052	37,35	46	0,3609	0,3539	1,02	0,88	2391,62	147052	33,16	38	0,2572	0,2649	1,12	0,74
UPF0182 protein Mvan_1814 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	Y1814_MYCVP	109188.24	1779,18	109188	32,14	22	0,2582	0,1820	0,74	0,71	1879,76	109188	31,24	23	0,2860	0,1960	0,97	0,87
Bacterial nucleoid protein Hbs - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T702_MYCVP	21780.83	759,14	21781	33,33	9	1,0708	0,5482	1,02	0,90	724,28	21781	33,33	8	0,7972	0,4486	0,96	1,23
Glutamate dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCE6_MYCVP	176342.48	1352,96	176342	16,84	21	0,0625	0,0922	0,34	0,45	2187,41	176342	24,89	31	0,1259	0,1534	0,86	0,85
Protein translocase subunit secA 1 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	SECA1_MYCVP	104706.66	2582,72	104707	44,69	36	0,4502	0,4132	0,77	0,72	2022,14	104707	34,38	27	0,3074	0,2631	0,79	0,73
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFZ4_MYCVP	41883.71	1161,06	41884	49,87	13	0,4323	0,3425	1,62	2,12	898,64	41884	30,79	10	0,2623	0,2312	0,72	0,93
60 kDa chaperonin - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T352_MYCVP	56479.01	1566,86	56479	53,42	18	0,4498	0,3608	0,48	0,31	1595,22	56479	48,43	18	0,4404	0,3651	0,69	0,25
Aldehyde dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1A6_MYCVP	50532.71	995,56	50533	36,17	11	0,1837	0,2007	0,20	0,26	1261,03	50533	37,91	15	0,5043	0,3239	0,59	0,76
ATP synthase subunit alpha - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	ATPA_MYCVP	58539.13	1811,65	58539	51,11	21	0,5222	0,4408	1,11	0,40	1169,06	58539	35,74	16	0,2985	0,2854	0,56	0,25

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Glycerol dehydratase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGM8_MYCVP	79383.7	593,87	79384	13,17	8	0,0552	0,0750	0,15	0,19	1110,18	79384	28,40	15	0,1694	0,1679	0,55	0,71
60 kDa chaperonin - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T577_MYCVP	56450.72	1321,39	56451	53,41	16	0,2760	0,2985	0,28	0,26	1421,39	56451	50,49	18	0,4070	0,3651	0,52	0,67
DoxX family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAJ9_MYCVP	28987.64	635,93	28988	38,89	8	0,3046	0,2808	0,28	0,36	864,06	28988	46,30	11	1,0185	0,4816	0,51	0,65
ATP synthase B chain - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD58_MYCVP	47254.07	1431,81	47254	53,61	17	0,4578	0,4414	0,86	1,12	1458,72	47254	49,65	18	0,8895	0,4943	0,49	0,64
ATP synthase F1, beta subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD55_MYCVP	51712.54	2655,75	51713	84,89	27	2,9295	0,9114	1,27	0,19	1491,79	51713	59,57	17	0,4829	0,3838	0,49	0,13
Alanyl-tRNA synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8E8_MYCVP	96732.02	1359,64	96732	32,74	18	0,1474	0,1629	0,33	0,26	1415,76	96732	29,04	17	0,1661	0,1526	0,49	0,31
Elongation factor Tu - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	EFTU_MYCVP	43775.51	1353,75	43776	70,28	18	1,2031	0,5601	0,71	0,35	1259,20	43776	59,45	16	1,1674	0,4577	0,45	0,13
SPFH domain, Band 7 family protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8R6_MYCVP	43890.91	900,84	43891	43,50	11	0,2296	0,2458	0,24	0,31	741,35	43891	31,83	11	0,3050	0,2488	0,45	0,58
AMP-dependent synthetase and ligase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDN5_MYCVP	65646.4	959,91	65646	36,41	15	0,2148	0,2162	0,26	0,35	787,24	65646	26,51	12	0,1762	0,1602	0,44	0,29
2-oxoglutarate dehydrogenase E2 component - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB23_MYCVP	60755.09	978,12	60755	29,48	13	0,1873	0,1965	0,22	0,29	959,23	60755	29,48	13	0,2170	0,1989	0,42	0,54
60 kDa chaperonin 2 GroEL2 - M. ulcerans (strain Agy99)	A0PNL7_MYCUA	56524.08	661,97	56524	20,15	9	0,0967	0,1315	0,15	0,02	761,22	56524	20,33	10	0,1314	0,1529	0,42	0,04
Conserved large membrane protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1J6_MYCVP	109259.06	1344,01	109259	22,72	18	0,1163	0,1386	0,44	0,41	959,62	109259	18,35	14	0,0806	0,1018	0,42	0,54
2-oxoglutarate decarboxylase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	KGD_MYCVP	136894.62	954,84	136895	14,47	15	0,0620	0,0832	0,25	0,07	809,17	136895	14,39	12	0,0704	0,0647	0,42	0,22

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
ATPase AAA-2 domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG29_MYCVP	93507.17	1032,39	93507	20,71	16	0,1092	0,1455	0,30	0,21	1162,87	93507	26,94	18	0,1338	0,1726	0,41	0,27
Aldehyde dehydrogenase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T359_MYCVP	54677.22	1099,65	54677	37,02	13	0,2668	0,2285	0,30	0,40	825,97	54677	25,75	9	0,1728	0,1390	0,39	0,51
ATP synthase subunit alpha - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	ATPA_MYCS2	58852.41	958,43	58852	27,48	12	0,2568	0,1835	0,40	0,00	736,01	58852	23,18	9	0,1549	0,1263	0,39	0,00
DNA-directed RNA polymerase subunit beta - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RPOB_MYCVP	128409.17	1376,65	128409	20,82	19	0,1304	0,1208	0,42	0,40	1240,67	128409	19,88	19	0,1051	0,1222	0,39	0,25
DNA-directed RNA polymerase - <i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	A6W5T1_KINRA	144009.61	900,42	144010	10,39	13	0,0542	0,0662	0,26	0,00	777,98	144010	9,01	11	0,0489	0,0552	0,39	0,00
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - <i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)	RPOC_THEFY	145204.74	788,40	145205	9,62	13	0,0457	0,0655	0,24	0,00	702,21	145205	8,26	11	0,0405	0,0547	0,39	0,00
ATP synthase F1, beta subunit - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4T8K2_9MYCO	52187.69	2008,64	52188	66,88	21	1,5056	0,5401	1,00	0,00	1024,92	52188	45,57	13	0,2780	0,2472	0,38	0,00
Elongation factor Tu - <i>M. paratuberculosis</i>	EFTU_MYCPA	43743.51	1015,79	43744	43,32	13	0,7066	0,3194	0,57	0,00	972,63	43744	39,55	12	0,6819	0,2850	0,37	0,00
DNA-directed RNA polymerase - <i>Salinispora tropica</i> CNB-440	A4XBQ5_9ACTO	143940.44	741,96	143940	8,94	12	0,0424	0,0604	0,22	0,00	648,53	143940	7,57	10	0,0370	0,0496	0,37	0,00
AMP-dependent synthetase and ligase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA99_MYCVP	106130.07	1438,73	106130	23,96	18	0,1541	0,1439	0,40	0,52	928,03	106130	20,75	14	0,0904	0,1055	0,35	0,45
UPF0182 protein Mmcs_1415 - <i>M. sp.</i> (strain MCS)	Y1415_MYCSS	109334.6	628,51	109335	11,18	8	0,0430	0,0519	0,21	0,02	641,59	109335	11,68	9	0,0622	0,0601	0,35	0,07
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1Q8_MYCVP	49410.64	1189,46	49411	46,17	15	0,2884	0,3316	0,37	0,48	1365,88	49411	51,28	16	0,4428	0,3729	0,34	0,44
30S ribosomal protein S3 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RS3_MYCVP	30690.16	617,05	30690	36,79	9	0,2354	0,3100	0,21	0,28	623,34	30690	42,14	9	0,2928	0,3137	0,34	0,38

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5C6_MYCVP	91158.67	620,81	91159	17,03	9	0,0665	0,0733	0,17	0,22	731,42	91159	16,06	12	0,1289	0,1051	0,34	0,44
Phage shock protein A, PspA - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7R2_MYCVP	29466.92	807,29	29467	46,32	9	0,4682	0,3303	0,26	0,35	1048,76	29467	71,32	13	1,2702	0,6392	0,32	0,42
Peroxidase/catalase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA09_MYCVP	82156.54	842,93	82157	16,49	10	0,0757	0,0941	0,17	0,22	941,76	82157	21,69	12	0,1382	0,1196	0,32	0,38
Carbamoyl-phosphate synthase large chain - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	CARB_MYCVP	119250.73	610,18	119251	10,43	10	0,0578	0,0607	0,18	0,14	865,98	119251	15,11	14	0,0899	0,0915	0,32	0,36
Nitrate reductase, alpha subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDS1_MYCVP	135975.57	1050,54	135976	16,18	17	0,0718	0,0977	0,29	0,36	929,28	135976	13,59	13	0,0523	0,0716	0,32	0,42
30S ribosomal protein S13 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RS13_MYCVP	14342.78	526,60	14343	43,85	6	0,6226	0,5441	0,24	0,31	609,61	14343	43,85	7	0,6589	0,7424	0,31	0,40
Extracellular solute-binding protein, family 1 precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9P5_MYCVP	35423.05	540,96	35423	24,53	6	0,1874	0,1411	0,29	0,38	841,48	35423	36,96	8	0,3061	0,2121	0,31	0,38
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBP7_MYCVP	69303.03	1404,49	69303	45,56	20	0,3063	0,3080	0,48	0,62	1062,61	69303	32,86	15	0,1771	0,2025	0,31	0,40
Dihydrolipoyl dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T382_MYCVP	49718.61	464,47	49719	18,63	6	0,0593	0,0927	0,16	0,14	587,09	49719	22,62	8	0,1055	0,1349	0,31	0,18
AMP-dependent synthetase and ligase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAZ4_MYCVP	64511.65	768,07	64512	28,16	10	0,0922	0,1272	0,16	0,21	747,42	64512	28,16	10	0,1808	0,1287	0,31	0,40
2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component - M. gilvum PYR-GCK	A4T8U7_9MYCO	140933.68	715,11	140934	10,69	11	0,0396	0,0560	0,20	0,03	599,96	140934	9,45	9	0,0460	0,0452	0,31	0,07
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - Corynebacterium diphtheriae	RPOC_CORDI	147891.15	614,69	147891	7,59	9	0,0374	0,0423	0,21	0,03	540,78	147891	7,29	8	0,0322	0,0376	0,31	0,04
FAD dependent oxidoreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5J9_MYCVP	63539.49	1189,55	63539	41,03	15	0,2456	0,2266	0,32	0,41	1109,48	63539	40,00	16	0,2396	0,2523	0,30	0,38

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Isocitrate lyase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9D2_MYCVP	85792.26	933,38	85792	19,00	15	0,1136	0,1497	0,28	0,24	886,95	85792	20,28	14	0,0926	0,1383	0,30	0,25
ATP synthase F1, alpha subunit - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4T8K0_9MYCO	59050.4	749,96	59050	22,39	10	0,2150	0,1429	0,30	0,00	612,56	59050	20,34	8	0,1239	0,1085	0,30	0,00
Bacterioferritin - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9J5_MYCVP	18317.24	748,74	18317	62,05	9	1,6935	0,7578	0,37	0,14	730,59	18317	74,70	10	1,7920	0,9583	0,28	0,13
Extracellular solute-binding protein, family 3 precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7U0_MYCVP	29017.56	747,69	29018	45,88	9	0,3571	0,3383	0,29	0,38	762,24	29018	45,88	9	0,4403	0,3423	0,28	0,36
ATP synthase F1, beta subunit - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0R200_MYCS2	51584.43	1643,00	51584	53,85	17	0,7422	0,3807	0,87	0,00	898,38	51584	37,82	11	0,2102	0,1976	0,28	0,00
AMP-dependent synthetase and ligase - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4T8Y5_9MYCO	65400.96	389,69	65401	10,61	5	0,0605	0,0543	0,20	0,03	401,91	65401	12,79	6	0,0959	0,0678	0,28	0,09
HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIB - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCI4_MYCVP	134838.59	264,43	134839	3,76	4	0,0125	0,0195	0,05	0,07	834,03	134839	10,94	12	0,0484	0,0659	0,28	0,36
Fatty acid synthase, bacterial type - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCK2_MYCVP	327946.1	174,16	327946	1,07	3	0,0037	0,0058	0,04	0,05	683,86	327946	5,03	12	0,0180	0,0247	0,28	0,33
MihF - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8H3_MYCVP	11674.48	516,78	11674	48,11	7	3,2965	1,1166	0,45	0,47	608,39	11674	57,55	8	1,9287	1,5586	0,27	0,27
Transcriptional regulator, Crp/Fnr family - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGA5_MYCVP	24776.19	323,81	24776	32,00	5	0,1467	0,1768	0,12	0,16	686,61	24776	50,67	9	0,6026	0,4429	0,27	0,34
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1P9_MYCVP	43299.94	1043,36	43300	54,45	12	0,4050	0,2861	0,45	0,55	679,34	43300	41,48	9	0,2481	0,1895	0,27	0,34
Fumarate reductase/succinate dehydrogenase flavoprotein domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFF3_MYCVP	59931.0	1352,68	59931	43,42	17	0,3187	0,2995	0,36	0,47	844,85	59931	26,10	11	0,2028	0,1611	0,27	0,34
Saccharopine dehydrogenase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC30_MYCVP	44785.73	955,50	44786	43,20	13	0,2784	0,3083	0,24	0,31	679,93	44786	27,92	8	0,2088	0,1543	0,27	0,34

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Polyribonucleotide nucleotidyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7L4_MYCVP	80123.29	452,60	80123	12,73	7	0,0622	0,0635	0,17	0,22	767,72	80123	22,68	12	0,1321	0,1236	0,27	0,34
Polyphosphate kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T704_MYCVP	81338.97	171,12	81339	4,06	2	0,0157	0,0160	0,04	0,05	913,16	81339	24,63	12	0,1294	0,1213	0,27	0,27
2-oxo-acid dehydrogenase E1 subunit, homodimeric type - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBI4_MYCVP	103009.75	613,54	103010	10,26	9	0,0460	0,0635	0,13	0,17	587,05	103010	10,15	9	0,0605	0,0643	0,27	0,34
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T396_MYCVP	22999.38	536,81	22999	43,06	6	0,2076	0,2553	0,11	0,14	809,82	22999	52,15	11	0,5926	0,7389	0,25	0,33
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1R6_MYCVP	28219.06	604,56	28219	33,98	8	0,2261	0,2926	0,13	0,17	721,65	28219	33,98	8	0,2392	0,2960	0,25	0,33
UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4V6_MYCVP	29922.71	443,60	29923	24,18	5	0,0885	0,1383	0,11	0,14	669,81	29923	24,91	7	0,2185	0,2226	0,25	0,33
Alpha amylase, catalytic region - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD28_MYCVP	78030.41	545,95	78030	15,51	8	0,0643	0,0766	0,13	0,17	873,03	78030	24,54	12	0,1152	0,1279	0,25	0,33
Putative esterase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9L3_MYCVP	36354.8	377,24	36355	15,76	5	0,1804	0,1082	0,20	0,26	384,59	36355	15,76	5	0,1909	0,1095	0,25	0,33
L-glutamine synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB29_MYCVP	53650.54	1239,90	53651	40,86	15	0,4236	0,2917	0,49	0,55	546,85	53651	21,97	7	0,1251	0,1032	0,25	0,25
ATPase AAA-2 domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2U7_MYCVP	92274.31	335,18	92274	8,00	6	0,0290	0,0454	0,11	0,07	667,87	92274	16,47	11	0,0622	0,0930	0,25	0,16
1,4-alpha-glucan branching enzyme - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD29_MYCVP	83368.61	466,88	83369	10,83	6	0,0592	0,0508	0,16	0,21	532,34	83369	12,55	7	0,0871	0,0613	0,25	0,33

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2Q8_MYCVP	109506.69	895,00	109507	15,50	11	0,0642	0,0749	0,20	0,26	682,44	109507	12,86	9	0,0620	0,0600	0,25	0,33
Protein translocase subunit secA 1 - M. ulcerans (strain Agy99)	SECA1_MYCUA	106260.2	635,61	106260	8,49	9	0,0551	0,0613	0,21	0,05	460,87	106260	8,39	8	0,0526	0,0542	0,25	0,15
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCD8_MYCVP	16174.64	701,99	16175	83,89	8	1,6011	0,7674	0,32	0,41	741,96	16175	83,89	8	1,6942	0,7765	0,24	0,31
50S ribosomal protein L15 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4S5_MYCVP	15519.49	419,19	15519	40,82	5	0,3059	0,3500	0,25	0,33	566,93	15519	41,50	6	0,7314	0,4837	0,24	0,31
50S ribosomal protein L1 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL1_MYCVP	24964.24	723,87	24964	45,22	8	0,4016	0,3559	0,18	0,14	770,36	24964	50,00	9	0,5970	0,4395	0,24	0,18
Elongation factor Tu - M. duvalii (S)-2-hydroxy-acid oxidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1C3G9_9MYCO	23566.19	547,69	23566	44,39	7	0,8844	0,3127	0,32	0,00	667,99	23566	44,39	8	1,2899	0,3937	0,24	0,00
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4N1_MYCVP	42021.73	722,28	42022	36,65	10	0,1457	0,2276	0,16	0,12	635,59	42022	33,33	8	0,1777	0,1680	0,24	0,22
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Y8_MYCVP	20555.4	199,02	20555	16,24	3	0,1068	0,1143	0,15	0,19	244,71	20555	16,24	3	0,1130	0,1157	0,24	0,31
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCF2_MYCVP	57046.1	496,72	57046	16,99	7	0,0716	0,0948	0,13	0,17	492,63	57046	19,50	8	0,1013	0,1133	0,24	0,31
60 kDa chaperonin 1 - Thermobifida fusca (strain YX)	CH601_THEFY	57487.32	254,68	57487	6,51	4	0,0312	0,0488	0,07	0,03	505,91	57487	9,00	5	0,0636	0,0637	0,24	0,00
Preprotein translocase secA1 1 subunit - M. tuberculosis (strain F11)	A1QWH6_MYCTF	107535.98	546,83	107536	8,09	8	0,0490	0,0529	0,20	0,05	380,50	107536	7,98	7	0,0463	0,0461	0,24	0,15
30S ribosomal protein S7 - M. gilvum PYR-GCK	A4T1R4_9MYCO	17521.48	551,37	17521	55,35	8	0,8417	0,6586	0,30	0,31	607,46	17521	55,35	8	0,5667	0,6664	0,22	0,20
50S ribosomal protein L22 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4P4_MYCVP	16544.97	406,66	16545	46,67	4	0,4657	0,2238	0,24	0,31	498,71	16545	48,00	5	0,2880	0,3181	0,22	0,29
ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T364_MYCVP	32123.51	563,77	32124	37,67	8	0,2979	0,2415	0,22	0,29	707,36	32124	40,75	9	0,4191	0,2923	0,22	0,27

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
ATPase associated with various cellular activities, AAA_3 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Q6_MYCVP	41506.06	998,86	41506	56,10	15	0,3970	0,4439	0,29	0,38	794,73	41506	46,49	11	0,2075	0,2708	0,22	0,29
Cell division ATP-binding protein FtsE - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6D4_MYCVP	25537.54	316,49	25538	28,02	5	0,1404	0,1697	0,08	0,10	366,91	25538	28,45	5	0,1871	0,1717	0,22	0,29
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2R3_MYCVP	66326.37	789,44	66326	27,57	12	0,1236	0,1562	0,18	0,24	730,60	66326	26,91	11	0,1058	0,1408	0,22	0,29
UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4W2_MYCVP	31270.4	133,12	31270	8,80	2	0,0281	0,0439	0,04	0,05	429,13	31270	25,00	5	0,2042	0,1323	0,22	0,24
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGZ8_MYCVP	55019.72	634,76	55020	21,00	9	0,0872	0,1363	0,12	0,16	597,51	55020	15,40	8	0,1062	0,1185	0,22	0,29
Succinate dehydrogenase subunit A - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5G6_MYCVP	64130.25	990,75	64130	27,62	13	0,1727	0,1825	0,22	0,29	632,41	64130	18,70	9	0,0985	0,1135	0,22	0,29
LGFP repeat protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7V3_MYCVP	71365.92	694,50	71366	25,31	8	0,0811	0,0852	0,17	0,22	583,00	71366	20,99	7	0,0858	0,0735	0,22	0,29
Protein kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T414_MYCVP	103885.82	147,63	103886	4,34	3	0,0121	0,0189	0,04	0,05	709,70	103886	13,77	10	0,0540	0,0721	0,22	0,29
Aminopeptidase N. Metallo peptidase. MEROPS family M01 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCD4_MYCVP	94980.44	516,04	94980	13,09	8	0,0447	0,0609	0,17	0,22	477,13	94980	13,56	8	0,0473	0,0616	0,22	0,29
10 kDa chaperonin - M. gilvum PYR-GCK	A4TEN7_9MYCO	10770.58	331,03	10771	68,04	5	0,4107	0,6418	0,08	0,10	475,80	10771	79,38	6	0,9011	0,9452	0,21	0,27
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8C8_MYCVP	26926.39	438,55	26926	32,38	7	0,2445	0,2562	0,17	0,22	644,14	26926	44,67	10	0,5102	0,4634	0,21	0,27
DivIVA family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAW0_MYCVP	29817.8	1165,83	29818	71,22	15	1,0267	0,8246	0,53	0,69	643,51	29818	38,38	10	0,3079	0,3904	0,21	0,27

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Bacterioferritin - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TAG8_9MYCO	18401.28	440,88	18401	29,94	6	0,9266	0,3605	0,29	0,03	471,07	18401	29,94	6	0,6413	0,3648	0,21	0,04
Enolase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	ENO_MYCVP	44948.04	1267,83	44948	56,26	15	0,2772	0,3879	0,38	0,38	1143,66	44948	44,68	13	0,2627	0,3108	0,21	0,16
Rieske - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB03_MYCVP	44233.66	1311,11	44234	39,30	16	0,5227	0,4445	0,33	0,43	779,82	44234	27,11	10	0,1646	0,2140	0,21	0,27
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGU3_MYCVP	28306.91	212,10	28307	18,29	3	0,0948	0,0780	0,07	0,09	450,15	28307	28,79	6	0,1969	0,1924	0,21	0,27
ATP synthase gamma chain - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	ATPG_MYCVP	33565.26	649,50	33565	36,57	9	0,2382	0,2703	0,28	0,36	601,71	33565	28,80	7	0,1534	0,1894	0,21	0,27
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T852_MYCVP	44157.67	1005,45	44158	36,91	11	0,3183	0,2440	0,22	0,16	532,56	44158	19,70	6	0,1238	0,1084	0,21	0,27
Catalase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA03_MYCVP	77886.79	800,51	77887	24,51	13	0,1411	0,1406	0,36	0,38	671,98	77887	19,58	10	0,1051	0,1018	0,21	0,27
ABC transporter domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9W6_MYCVP	70700.0	1094,87	70700	32,87	15	0,1494	0,1949	0,24	0,31	584,85	70700	18,69	9	0,0973	0,1006	0,21	0,27
Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TF27_9MYCO	63033.42	810,81	63033	32,46	9	0,1938	0,1147	0,25	0,26	550,56	63033	22,16	7	0,0889	0,0851	0,21	0,18
Probable malate:quinone oxidoreductase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	MQO_MYCVP	55846.63	668,00	55847	28,38	9	0,1118	0,1335	0,16	0,21	518,80	55847	16,80	6	0,0777	0,0815	0,21	0,27
Beta-ketoacyl synthase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9S5_MYCVP	156802.47	888,64	156802	13,11	15	0,0454	0,0709	0,24	0,31	798,21	156802	12,08	14	0,0443	0,0662	0,21	0,27
Alanyl-tRNA synthetase - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QWQ4_MYCS2	96723.12	432,75	96723	8,20	6	0,0328	0,0431	0,11	0,00	431,49	96723	8,20	6	0,0404	0,0436	0,21	0,00
50S ribosomal protein L23 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL23_MYCVP	10923.02	204,34	10923	43,00	3	0,2683	0,2634	0,11	0,14	380,42	10923	64,00	6	0,6195	0,9257	0,20	0,25

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
50S ribosomal protein L10 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL10_MYCVP	18544.88	632,03	18545	61,90	8	0,5910	0,5873	0,22	0,29	680,18	18545	61,90	8	0,7742	0,5943	0,20	0,25
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAI8_MYCVP	13176.77	354,23	13177	50,42	4	0,2918	0,3139	0,11	0,14	401,46	13177	57,98	5	0,5924	0,4614	0,20	0,25
SOUL heme-binding protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB69_MYCVP	21524.92	324,87	21525	32,66	5	0,3607	0,2156	0,21	0,28	520,89	21525	47,69	8	0,6871	0,4605	0,20	0,25
Elongation factor Tu - <i>M. nonchromogenicum</i>	A1C3C9_MYCNO	23649.23	544,59	23649	44,39	7	1,0276	0,3104	0,32	0,17	552,17	23649	35,98	7	0,7853	0,3141	0,20	0,00
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8C9_MYCVP	37575.64	964,59	37576	42,57	13	0,3379	0,4097	0,26	0,35	736,81	37576	38,86	10	0,2425	0,2714	0,20	0,25
SSU ribosomal protein S5P - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4S3_MYCVP	23098.18	571,59	23098	49,77	8	0,3157	0,4014	0,16	0,17	450,69	23098	31,67	6	0,2718	0,2565	0,20	0,22
UspA domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6I2_MYCVP	30977.02	160,30	30977	11,03	2	0,0283	0,0442	0,04	0,05	490,31	30977	35,66	6	0,3353	0,1703	0,20	0,24
Elongation factor Tu - <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (strain NRRL 23338)	EFTU_SACEN	44013.56	489,58	44014	21,25	6	0,2567	0,1075	0,32	0,17	617,24	44014	21,25	7	0,2420	0,1324	0,20	0,05
Isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA13_MYCVP	82312.64	579,69	82313	16,98	9	0,0601	0,0827	0,20	0,21	756,75	82313	21,93	11	0,0799	0,1070	0,20	0,25
Amino acid permease-associated region - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGM9_MYCVP	54647.37	492,60	54647	16,27	6	0,0755	0,0827	0,29	0,38	460,97	54647	16,27	6	0,0676	0,0836	0,20	0,25
Phosphoenolpyruvate carboxylase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8L4_MYCVP	102786.23	627,78	102786	13,06	10	0,0461	0,0721	0,13	0,09	551,98	102786	12,10	10	0,0488	0,0729	0,20	0,16
ATP synthase subunit alpha - <i>M. paratuberculosis</i>	ATPA_MYCPA	59955.89	632,89	59956	15,05	8	0,1281	0,1051	0,24	0,07	391,76	59956	10,83	5	0,0603	0,0606	0,20	0,11
Alanyl-tRNA synthetase - <i>M. sp.</i> (strain KMS)	A1UFI3_MYCSK	96879.24	409,26	96879	8,59	6	0,0327	0,0430	0,09	0,00	561,74	96879	10,89	7	0,0403	0,0518	0,20	0,00

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAD9_MYCVP	15175.01	466,21	15175	53,06	7	0,4246	0,6635	0,20	0,14	487,68	15175	53,06	7	0,4493	0,6714	0,18	0,24
Electron transfer flavoprotein, alpha subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6W5_MYCVP	31955.8	510,43	31956	33,12	7	0,1285	0,2008	0,09	0,12	705,48	31956	44,83	9	0,2339	0,2954	0,18	0,24
50S ribosomal protein L5 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4R8_MYCVP	21174.14	444,09	21174	43,23	6	0,4558	0,2899	0,28	0,36	589,10	21174	54,17	6	0,5874	0,2933	0,18	0,24
ABC-1 domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4H6_MYCVP	50070.41	366,86	50070	15,60	5	0,0471	0,0737	0,08	0,10	827,41	50070	29,89	11	0,1759	0,2056	0,18	0,11
Periplasmic solute binding protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFZ5_MYCVP	31898.17	687,98	31898	34,77	9	0,4599	0,2919	0,33	0,43	574,47	31898	27,81	7	0,2742	0,2032	0,18	0,24
50S ribosomal protein L2 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL2_MYCVP	30381.28	418,18	30381	28,99	6	0,1109	0,1733	0,09	0,12	469,18	30381	29,35	6	0,2135	0,1754	0,18	0,24
Anion-transporting ATPase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGB0_MYCVP	40915.0	485,54	40915	37,47	9	0,2002	0,2030	0,16	0,21	418,21	40915	24,08	8	0,1375	0,1742	0,18	0,24
Extracellular ligand-binding receptor precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Z8_MYCVP	41593.68	1161,92	41594	67,99	14	0,4391	0,3924	0,45	0,59	726,17	41594	36,51	8	0,2066	0,1704	0,18	0,24
Putative membrane protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T117_MYCVP	15285.45	168,14	15285	18,12	2	0,1069	0,0988	0,15	0,19	235,91	15285	39,86	3	0,2424	0,1690	0,18	0,24
Glycosyltransferases-like protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGW4_MYCVP	72580.89	417,91	72581	11,84	6	0,0534	0,0595	0,11	0,14	594,15	72581	16,39	9	0,0839	0,0975	0,18	0,24
ATP synthase subunit alpha - M. sp. (strain JLS)	ATPA_MYCSJ	59602.61	503,19	59603	14,60	7	0,0903	0,0899	0,18	0,10	360,58	59603	10,54	5	0,0609	0,0611	0,18	0,07
ATP synthase epsilon chain - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	ATPE_MYCVP	13321.74	488,23	13322	44,63	4	0,3965	0,3060	0,16	0,21	493,88	13322	44,63	4	0,3003	0,3097	0,17	0,22

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative alanine and proline rich membrane protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFR0_MYCVP	17744.88	430,85	17745	56,52	6	0,3203	0,3825	0,15	0,19	402,74	17745	56,52	5	0,2590	0,2885	0,17	0,22
Photosystem I assembly BtpA - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8C7_MYCVP	28605.89	330,79	28606	24,06	6	0,2219	0,1881	0,15	0,19	432,74	28606	38,72	7	0,2348	0,2376	0,17	0,22
50S ribosomal protein L3 - <i>M. sp.</i> (strain JLS)	RL3_MYCSJ	22849.02	245,02	22849	17,39	3	0,1657	0,1010	0,11	0,03	324,64	22849	23,67	4	0,2231	0,1477	0,17	0,04
SSU ribosomal protein S1P - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAF3_MYCVP	53505.34	1353,39	53505	43,00	17	0,4253	0,3576	0,33	0,36	572,64	53505	30,04	9	0,1254	0,1428	0,17	0,18
Adenosylhomocysteinase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5W9_MYCVP	52973.93	517,43	52974	19,42	8	0,0915	0,1227	0,12	0,05	459,43	52974	18,09	7	0,0968	0,1048	0,17	0,18
Putative conserved membrane protein MmpS3 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB06_MYCVP	28694.04	269,01	28694	19,62	3	0,0700	0,0770	0,11	0,14	259,45	28694	19,62	3	0,0988	0,0779	0,17	0,22
Valyl-tRNA synthetase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC28_MYCVP	99480.1	535,51	99480	10,40	8	0,0370	0,0578	0,13	0,17	553,74	99480	12,72	9	0,0448	0,0670	0,17	0,22
Peroxidase/catalase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9D9_MYCVP	80799.68	433,75	80800	11,17	6	0,0337	0,0527	0,11	0,14	515,64	80800	15,94	7	0,0426	0,0636	0,17	0,22
Carbon starvation protein CstA - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6P1_MYCVP	81590.54	485,96	81591	11,88	7	0,0464	0,0621	0,11	0,14	463,88	81591	11,88	6	0,0491	0,0527	0,17	0,22
Alanyl-tRNA synthetase - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TBW4_9MYCO	96941.07	406,75	96941	9,42	6	0,0381	0,0430	0,11	0,03	559,98	96941	11,66	7	0,0462	0,0517	0,17	0,04
DNA-directed RNA polymerase subunit beta 2 - <i>Nocardia farcinica</i>	RPOB2_NOCF A	128526.64	571,56	128527	8,39	8	0,0398	0,0434	0,15	0,03	571,15	128527	10,19	9	0,0421	0,0501	0,17	0,04
Protein translocase subunit secA 1 - <i>M. sp.</i> (strain JLS)	SECA1_MYCSJ	106268.18	388,12	106268	5,90	6	0,0343	0,0389	0,13	0,00	281,68	106268	5,80	5	0,0263	0,0322	0,17	0,00
2-oxoglutarate decarboxylase - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	KGD_MYCS2	135859.28	341,43	135859	4,29	5	0,0157	0,0245	0,08	0,02	341,79	135859	5,26	6	0,0238	0,0301	0,17	0,04

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Beta-ketoacyl synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9S6_MYCVP	189524.92	867,84	189525	11,62	13	0,0337	0,0484	0,20	0,26	460,10	189525	5,56	7	0,0167	0,0249	0,17	0,22
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T579_MYCVP	11773.86	143,84	11774	21,50	2	0,0861	0,1345	0,03	0,03	320,95	11774	48,60	5	0,5301	0,5542	0,15	0,20
Ribosomal protein S10 - M. gilvum PYR-GCK	A4T1U3_9MYCO	11426.11	153,99	11426	35,92	3	0,1593	0,2489	0,07	0,02	238,82	11426	37,86	4	0,2663	0,3979	0,15	0,05
30S ribosomal protein S10 rpsJ - M. tuberculosis (strain F11)	A1QPC5_MYCTF	11424.13	153,99	11424	35,92	3	0,1593	0,2489	0,07	0,02	238,82	11424	37,86	4	0,2663	0,3979	0,15	0,05
H ⁺ -transporting two-sector ATPase, B/B' subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD59_MYCVP	17210.91	461,20	17211	45,78	5	0,4318	0,2961	0,24	0,31	444,73	17211	45,78	5	0,4569	0,2997	0,15	0,20
LSU ribosomal protein L4P - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4P0_MYCVP	23606.45	232,75	23606	22,43	4	0,0895	0,1398	0,08	0,10	430,92	23606	44,86	6	0,2635	0,2495	0,15	0,20
LSU ribosomal protein L1P - M. gilvum PYR-GCK	A4T1M1_9MYCO	25357.45	325,89	25357	22,17	4	0,1422	0,1275	0,11	0,05	463,58	25357	31,30	6	0,2855	0,2248	0,15	0,07
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEF9_MYCVP	30525.82	489,84	30526	31,77	6	0,1995	0,1716	0,13	0,17	623,51	30526	31,77	7	0,2505	0,2157	0,15	0,20
ATPase associated with various cellular activities, AAA_3 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGC5_MYCVP	34426.28	217,17	34426	14,74	3	0,0561	0,0624	0,05	0,07	579,76	34426	37,50	7	0,2416	0,1828	0,15	0,13
Cytochrome c oxidase, subunit II precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB08_MYCVP	38430.55	550,30	38431	34,67	7	0,1418	0,1559	0,12	0,16	488,70	38431	34,10	7	0,2032	0,1577	0,15	0,20
Citrate synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF44_MYCVP	48451.67	486,17	48452	18,18	5	0,0490	0,0766	0,07	0,09	587,60	48452	24,32	7	0,1090	0,1172	0,15	0,20
von Willebrand factor, type A - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9Q0_MYCVP	65118.94	689,72	65119	27,24	10	0,0805	0,1258	0,15	0,19	677,52	65119	25,38	9	0,0745	0,1113	0,15	0,20
AMP-dependent synthetase and ligase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T245_MYCVP	60722.78	933,89	60723	35,69	13	0,1548	0,1965	0,22	0,29	577,12	60723	21,74	8	0,0812	0,1046	0,15	0,20

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Alpha/beta hydrolase fold - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5D5_MYCVP	31289.07	441,95	31289	27,46	5	0,1324	0,1308	0,13	0,17	351,38	31289	23,24	4	0,2042	0,0998	0,15	0,20
NAD+ synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC17_MYCVP	74563.93	408,13	74564	10,49	5	0,0300	0,0469	0,07	0,09	638,35	74564	17,28	9	0,0631	0,0943	0,15	0,20
Transketolase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8M7_MYCVP	75227.79	281,66	75228	8,23	4	0,0297	0,0363	0,08	0,10	581,95	75228	19,62	8	0,0624	0,0809	0,15	0,20
AMP-dependent synthetase and ligase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5H3_MYCVP	67133.21	949,48	67133	28,04	13	0,1612	0,1714	0,22	0,29	517,85	67133	14,91	7	0,0718	0,0789	0,15	0,20
Phenylalanyl-tRNA synthetase beta subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAB4_MYCVP	88113.87	584,43	88114	13,32	9	0,0623	0,0763	0,16	0,21	559,90	88114	13,32	9	0,0586	0,0772	0,15	0,20
Cytochrome b/b6, N-terminal domain - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB04_MYCVP	60210.47	685,84	60210	19,56	10	0,1417	0,1391	0,24	0,26	430,98	60210	10,79	6	0,0708	0,0746	0,15	0,20
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T251_MYCVP	78667.29	134,80	78667	5,17	3	0,0162	0,0253	0,04	0,03	455,25	78667	13,99	7	0,0758	0,0656	0,15	0,13
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THV8_MYCVP	96551.03	815,58	96551	14,82	12	0,0684	0,0968	0,20	0,26	570,65	96551	11,74	8	0,0405	0,0605	0,15	0,20
Respiratory nitrate reductase beta subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDS0_MYCVP	61643.27	1060,15	61643	39,29	15	0,2186	0,2368	0,25	0,33	353,28	61643	12,14	5	0,0486	0,0587	0,15	0,20
ATP synthase subunit beta - Nocardia farcinica	ATPB_NOCF_A	52207.9	390,22	52208	13,29	4	0,1227	0,0543	0,33	0,05	314,11	52208	13,29	4	0,0715	0,0549	0,15	0,05
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9P1_MYCVP	52601.71	558,25	52602	28,03	7	0,0670	0,1047	0,09	0,12	306,18	52602	13,81	4	0,0587	0,0545	0,15	0,20
Translation initiation factor IF-2 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	IF2_MYCVP	96013.57	200,10	96014	5,96	4	0,0179	0,0279	0,07	0,09	323,67	96014	8,95	6	0,0294	0,0440	0,15	0,20
Lysyl-tRNA synthetase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAC7_MYCVP	120361.2	331,93	120361	5,00	5	0,0217	0,0279	0,09	0,12	433,00	120361	7,19	7	0,0316	0,0407	0,15	0,13

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Phosphoenolpyruvate synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCI3_MYCVP	87051.79	128,23	87052	3,92	2	0,0095	0,0149	0,03	0,03	420,41	87052	9,61	5	0,0524	0,0400	0,15	0,20
Chaperone protein clpB - Bordetella bronchiseptica (Alcaligenes bronchisepticus)	CLPB_BORBR	96316.62	224,40	96317	5,03	4	0,0178	0,0278	0,07	0,00	294,60	96317	5,60	5	0,0240	0,0358	0,15	0,00
SSU ribosomal protein S6P - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THY7_MYCVP	10985.83	286,46	10986	47,47	4	0,2683	0,4192	0,12	0,16	363,45	10986	56,57	6	0,6195	0,9257	0,14	0,18
SSU ribosomal protein S4P - M. gilvum PYR-GCK	A4TEJ4_9MYCO	23277.39	556,77	23277	36,02	9	0,3805	0,4893	0,21	0,28	418,02	23277	26,54	6	0,2697	0,2547	0,14	0,18
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGZ2_MYCVP	23598.15	250,77	23598	28,04	4	0,2001	0,1398	0,12	0,16	394,04	23598	41,59	6	0,3232	0,2495	0,14	0,18
DSBA oxidoreductase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBC6_MYCVP	24216.89	480,95	24217	36,82	5	0,1516	0,1823	0,09	0,07	526,49	24217	47,27	6	0,2518	0,2397	0,14	0,07
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T390_MYCVP	29972.82	370,25	29973	32,36	5	0,1400	0,1376	0,11	0,14	490,17	29973	40,73	7	0,2172	0,2214	0,14	0,18
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAS2_MYCVP	31253.41	487,89	31253	27,11	6	0,1610	0,1667	0,12	0,16	549,01	31253	30,28	7	0,2042	0,2093	0,14	0,15
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB05_MYCVP	22701.13	389,81	22701	30,10	6	0,2124	0,2608	0,21	0,28	370,39	22701	30,10	5	0,1766	0,2020	0,14	0,18
Hydroxyneurosporene-O-methyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7X3_MYCVP	39123.44	669,27	39123	40,22	10	0,2451	0,2525	0,20	0,26	611,41	39123	30,42	8	0,1710	0,1851	0,14	0,18
LSU ribosomal protein L27P - M. gilvum PYR-GCK	A4T2J3_9MYCO	9427.01	150,78	9427	23,53	2	0,2111	0,1802	0,08	0,10	157,16	9427	23,53	2	0,3669	0,1823	0,14	0,18
50S ribosomal protein L9 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL9_MYCVP	15803.65	278,21	15804	20,98	3	0,1533	0,1594	0,08	0,10	328,68	15804	20,98	3	0,2292	0,1613	0,14	0,18
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RPOA_MYCVP	37995.58	1277,69	37996	66,67	15	0,7250	0,5170	0,33	0,16	451,36	37996	26,67	7	0,1525	0,1602	0,14	0,07

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
3-ketoacyl-CoA thiolase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1Q9_MYCVP	46900.1	849,55	46900	34,74	11	0,2575	0,2233	0,29	0,38	552,85	46900	23,94	8	0,1319	0,1453	0,14	0,18
UPF0353 protein Mvan_2751 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	Y2751_MYCVP	36001.11	309,21	36001	18,96	4	0,0885	0,0832	0,09	0,12	464,31	36001	33,33	6	0,1936	0,1400	0,14	0,18
Chaperone protein dnaK - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	DNAK_MYCVP	66614.09	989,03	66614	32,56	14	0,1776	0,1918	0,28	0,36	554,42	66614	19,34	9	0,0827	0,1081	0,14	0,18
Diacylglycerol O-acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1M7_MYCVP	52477.13	794,89	52477	27,25	11	0,1554	0,1907	0,17	0,22	448,57	52477	14,05	7	0,0842	0,1062	0,14	0,18
Fumarase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE24_MYCVP	49913.9	789,08	49914	37,34	12	0,1484	0,2320	0,16	0,21	478,67	49914	18,24	6	0,0756	0,0933	0,14	0,18
Periplasmic binding protein/LacI transcriptional regulator precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC88_MYCVP	34009.97	354,01	34010	28,70	5	0,0752	0,1175	0,08	0,10	314,99	34010	23,77	4	0,0796	0,0901	0,14	0,18
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THD6_MYCVP	46746.14	331,41	46746	11,08	4	0,0775	0,0614	0,16	0,21	327,15	46746	13,44	5	0,0820	0,0808	0,14	0,18
Translation elongation factor 2 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4L5_MYCVP	76964.92	433,90	76965	11,02	6	0,0356	0,0556	0,09	0,10	633,10	76965	16,74	8	0,0691	0,0787	0,14	0,18
(S)-2-hydroxy-acid oxidase - M. gilvum PYR-GCK	A4T1S5_9MYCO	41729.6	375,05	41730	21,90	5	0,0586	0,0916	0,08	0,02	300,64	41730	16,09	4	0,0779	0,0710	0,14	0,09
Cell wall arabinan synthesis protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGU7_MYCVP	115331.22	581,86	115331	14,60	9	0,0403	0,0558	0,15	0,19	571,77	115331	10,88	7	0,0331	0,0426	0,14	0,18
Cell wall arabinan synthesis protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGU5_MYCVP	116168.62	541,55	116169	10,23	8	0,0355	0,0485	0,12	0,16	516,42	116169	7,88	7	0,0375	0,0423	0,14	0,18
Isocitrate lyase - M. avium (strain 104)	A0QGD1_MYCA1	85190.12	314,93	85190	6,59	5	0,0259	0,0405	0,11	0,02	303,43	85190	6,59	5	0,0274	0,0410	0,14	0,05
Cell wall arabinan synthesis protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGU6_MYCVP	115543.69	338,65	115544	6,45	5	0,0186	0,0291	0,08	0,10	469,23	115544	7,76	6	0,0285	0,0359	0,14	0,18

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Beta-ketoacyl synthase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9S8_MYCVP	165519.07	347,08	165519	4,06	6	0,0154	0,0241	0,08	0,10	385,36	165519	4,99	6	0,0163	0,0244	0,14	0,13
DNA-directed RNA polymerase beta' chain - <i>Clostridium difficile</i> (strain 630)	Q18CF3_CLOD6	129648.04	322,11	129648	3,40	5	0,0165	0,0257	0,09	0,00	296,86	129648	2,72	4	0,0174	0,0205	0,14	0,00
DNA-directed RNA polymerase, subunit beta-prime - <i>Chloroflexus aggregans</i> DSM 9485	A0GXV7_9CHLR	168843.91	245,39	168844	3,06	4	0,0125	0,0154	0,09	0,03	253,46	168844	3,06	4	0,0132	0,0156	0,14	0,05
50S ribosomal protein L19 - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TE75_9MYCO	12856.95	361,79	12857	34,48	5	0,3047	0,4761	0,11	0,14	351,26	12857	34,48	5	0,4539	0,4818	0,13	0,16
30S ribosomal protein S8 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RS8_MYCVP	14477.78	216,89	14478	32,06	3	0,2490	0,1789	0,09	0,12	358,21	14478	38,93	5	0,3635	0,3937	0,13	0,16
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T118_MYCVP	20045.05	443,87	20045	36,90	6	0,2596	0,3147	0,16	0,14	476,18	20045	36,90	6	0,2747	0,3185	0,13	0,11
Electron transfer flavoprotein beta-subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6W4_MYCVP	27787.45	451,32	27787	29,89	6	0,1250	0,1953	0,09	0,12	690,42	27787	40,23	8	0,2030	0,3033	0,13	0,16
Phospholipid/glycerol acyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGX1_MYCVP	28543.94	467,47	28544	30,15	6	0,1502	0,1881	0,09	0,12	530,10	28544	38,55	7	0,2348	0,2376	0,13	0,16
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG46_MYCVP	25342.79	576,71	25343	50,87	7	0,3885	0,2799	0,15	0,19	543,88	25343	40,43	6	0,2855	0,2248	0,13	0,16
Catechol O-methyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA78_MYCVP	26538.63	264,98	26539	19,09	4	0,0769	0,1202	0,05	0,07	449,53	26539	31,12	6	0,2640	0,2104	0,13	0,16
30S ribosomal protein S7 - <i>Rhodococcus</i> sp. (strain RHA1)	RS7_RHOSR	17545.53	276,98	17546	18,87	4	0,1842	0,2063	0,13	0,09	319,57	17546	18,87	4	0,1949	0,2088	0,13	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8J9_MYCVP	23966.2	174,34	23966	10,60	2	0,0377	0,0590	0,11	0,14	292,82	23966	16,24	4	0,1258	0,1390	0,13	0,16
Cell division protein FtsX - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6D5_MYCVP	33055.52	206,39	33056	13,67	3	0,0781	0,0655	0,07	0,09	366,82	33056	22,00	5	0,1297	0,1234	0,13	0,16

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Ketol-acid reductoisomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	ILVC_MYCVP	36453.67	361,64	36454	19,64	5	0,0872	0,1078	0,11	0,14	359,27	36454	16,62	5	0,0922	0,1091	0,13	0,16
Diacylglycerol O-acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB43_MYCVP	51303.36	574,67	51303	19,96	7	0,0954	0,1078	0,13	0,17	517,62	51303	20,39	7	0,1010	0,1091	0,13	0,16
Extracellular solute-binding protein, family 3 precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Y9_MYCVP	32119.17	347,34	32119	17,87	4	0,1273	0,0953	0,13	0,17	439,18	32119	17,87	4	0,1088	0,0965	0,13	0,16
Carboxyl transferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5Q6_MYCVP	58328.8	967,31	58329	39,43	13	0,1816	0,2082	0,22	0,24	505,48	58329	18,30	7	0,0737	0,0933	0,13	0,13
Peptidase S15 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7I6_MYCVP	58664.94	545,09	58665	20,00	8	0,0691	0,1080	0,13	0,17	475,96	58665	17,43	7	0,0620	0,0927	0,13	0,16
UbiA prenyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGW2_MYCVP	33217.73	457,98	33218	24,92	6	0,1214	0,1536	0,13	0,09	330,36	33218	17,94	4	0,1040	0,0926	0,13	0,16
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T593_MYCVP	53453.83	449,81	53454	14,64	7	0,0656	0,1026	0,12	0,16	427,35	53454	14,02	6	0,0694	0,0859	0,13	0,16
TAP domain protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB42_MYCVP	54943.45	657,59	54943	24,27	9	0,1146	0,1366	0,16	0,21	447,49	54943	17,64	6	0,0795	0,0832	0,13	0,16
Signal recognition particle-docking protein FtsY - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T742_MYCVP	46780.21	595,49	46780	29,41	8	0,1250	0,1440	0,16	0,16	360,17	46780	15,53	5	0,0675	0,0808	0,13	0,09
4-alpha-glucanotransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9X7_MYCVP	80487.92	494,89	80488	11,08	7	0,0472	0,0631	0,13	0,17	493,03	80488	14,09	8	0,0575	0,0746	0,13	0,16
Acetolactate synthase, large subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6Y7_MYCVP	66474.73	272,42	66475	12,58	5	0,0341	0,0534	0,07	0,09	334,99	66475	12,42	6	0,0446	0,0666	0,13	0,16
Putative monooxygenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6S6_MYCVP	56913.7	470,84	56914	17,21	8	0,0718	0,1122	0,15	0,19	359,34	56914	14,31	5	0,0644	0,0644	0,13	0,16
Succinate dehydrogenase subunit A - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1T3_MYCVP	69384.14	502,48	69384	14,44	8	0,0650	0,0879	0,12	0,09	377,69	69384	10,32	6	0,0507	0,0633	0,13	0,16

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
FAD linked oxidase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGU2_MYCVP	50540.51	603,05	50541	25,93	8	0,1124	0,1303	0,13	0,17	295,15	50541	10,46	4	0,0494	0,0569	0,13	0,16
ATPase AAA-2 domain protein - <i>Nocardioides</i> sp. (strain BAA-499 / JS614)	A1SDX3_NOCSJ	95054.72	299,18	95055	4,98	5	0,0230	0,0359	0,09	0,02	308,03	95055	6,83	6	0,0297	0,0444	0,13	0,02
Glycosyl transferase, family 51 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THY9_MYCVP	86637.79	243,41	86638	6,61	4	0,0199	0,0311	0,05	0,07	352,38	86638	8,89	5	0,0330	0,0402	0,13	0,16
Asparagine synthase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB09_MYCVP	72487.38	548,00	72487	18,09	8	0,0616	0,0834	0,15	0,19	282,10	72487	8,05	4	0,0327	0,0382	0,13	0,16
Aldehyde dehydrogenase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T550_MYCVP	55001.66	756,64	55002	29,48	10	0,1618	0,1568	0,21	0,09	219,64	55002	8,37	3	0,0252	0,0376	0,13	0,16
Mycolic acid condensase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGV5_MYCVP	196387.96	244,21	196388	2,46	4	0,0084	0,0132	0,05	0,07	301,43	196388	3,36	6	0,0136	0,0204	0,13	0,16
2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 and E2 components - <i>Rhodococcus</i> sp. (strain RHA1)	Q0S3U7_RHOSR	138268.25	283,83	138268	3,58	4	0,0122	0,0190	0,07	0,05	234,55	138268	3,66	4	0,0163	0,0192	0,13	0,07
2-oxoglutarate decarboxylase - <i>M. sp.</i> (strain JLS)	KGD_MYCSJ	139507.11	482,61	139507	5,44	7	0,0253	0,0342	0,12	0,00	280,29	139507	3,71	4	0,0161	0,0190	0,13	0,00
DNA-directed RNA polymerase - <i>Halothermothrix orenii</i> H 168	Q2ACU7_9FIRM	128792.48	235,34	128792	3,16	4	0,0131	0,0204	0,09	0,00	228,79	128792	2,48	3	0,0102	0,0153	0,13	0,00
50S ribosomal protein L6 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL6_MYCVP	19308.4	442,02	19308	41,14	5	0,3526	0,2519	0,13	0,16	498,56	19308	54,86	7	0,3731	0,4385	0,11	0,11
30S ribosomal protein S17 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4P8_MYCVP	11120.0	234,14	11120	32,67	4	0,3887	0,4058	0,15	0,19	181,39	11120	31,68	3	0,4113	0,2590	0,11	0,15
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7U1_MYCVP	28713.82	520,35	28714	32,18	6	0,2205	0,1871	0,12	0,16	535,89	28714	32,18	6	0,1935	0,1893	0,11	0,15
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9Q3_MYCVP	29611.66	339,48	29612	26,77	5	0,1430	0,1403	0,11	0,14	382,45	29612	29,64	6	0,1848	0,1816	0,11	0,15

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Ferritin, Dps family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH15_MYCVP	19916.25	194,59	19916	21,55	3	0,1116	0,1191	0,09	0,09	307,90	19916	27,62	4	0,1624	0,1764	0,11	0,11
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDV2_MYCVP	26181.85	204,22	26182	23,11	3	0,0786	0,0858	0,05	0,07	392,00	26182	41,60	5	0,1812	0,1669	0,11	0,15
Limonene-1,2-epoxide hydrolase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7R4_MYCVP	20862.81	277,46	20863	19,05	4	0,1053	0,1645	0,16	0,21	280,43	20863	19,05	4	0,1114	0,1665	0,11	0,15
Methyltransferase type 11 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1B0_MYCVP	25067.91	235,99	25068	18,06	3	0,0830	0,0904	0,08	0,10	281,83	25068	26,87	4	0,1183	0,1312	0,11	0,15
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEQ4_MYCVP	26501.09	285,59	26501	22,08	4	0,0773	0,1209	0,05	0,07	293,49	26501	19,17	4	0,1098	0,1223	0,11	0,15
Phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2X3_MYCVP	40505.98	365,41	40506	23,10	6	0,0933	0,1193	0,09	0,12	430,59	40506	22,83	6	0,0988	0,1207	0,11	0,15
TRAP transporter solute receptor, TAXI family precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6F5_MYCVP	35013.83	630,58	35014	37,76	8	0,1625	0,2134	0,13	0,17	428,27	35014	22,09	5	0,0972	0,1147	0,11	0,15
ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFZ0_MYCVP	28157.77	362,59	28158	35,14	6	0,1537	0,1922	0,12	0,16	289,71	28158	17,65	4	0,1014	0,1134	0,11	0,15
2-nitropropane dioxygenase, NPD - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFU0_MYCVP	36366.29	246,72	36366	12,73	3	0,0376	0,0587	0,04	0,05	364,80	36366	19,39	5	0,0926	0,1095	0,11	0,15
Alpha/beta hydrolase fold - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7T2_MYCVP	31804.23	229,49	31804	12,46	3	0,0618	0,0684	0,09	0,12	254,85	31804	15,92	4	0,0654	0,0977	0,11	0,15
FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9N0_MYCVP	48827.91	706,12	48828	33,70	9	0,1351	0,1595	0,21	0,28	499,91	48828	19,60	6	0,0924	0,0959	0,11	0,15

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Band 7 protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T512_MYCVP	49815.42	1182,14	49815	50,44	15	0,2851	0,3280	0,25	0,19	479,12	49815	16,15	6	0,0626	0,0936	0,11	0,15
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEE7_MYCVP	41575.61	613,09	41576	26,36	8	0,1270	0,1684	0,26	0,35	348,33	41576	17,57	5	0,0781	0,0930	0,11	0,15
Succinate-semialdehyde dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEP9_MYCVP	50555.79	401,61	50556	19,12	6	0,0834	0,0907	0,12	0,16	378,58	50556	18,70	6	0,0882	0,0918	0,11	0,15
Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDL9_MYCVP	50925.08	1067,29	50925	44,47	14	0,1819	0,2842	0,26	0,28	422,75	50925	17,95	6	0,0738	0,0911	0,11	0,15
Amidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THD7_MYCVP	51893.95	741,13	51894	25,48	9	0,1085	0,1470	0,15	0,16	469,92	51894	12,53	6	0,0720	0,0890	0,11	0,15
Bacterial translation initiation factor 3 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAC5_MYCVP	26461.63	230,45	26462	18,11	3	0,0541	0,0846	0,07	0,09	286,50	26462	18,11	3	0,0573	0,0856	0,11	0,15
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAV7_MYCVP	47795.8	850,72	47796	39,64	11	0,1581	0,2174	0,17	0,17	359,10	47796	17,37	5	0,0798	0,0788	0,11	0,09
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB24_MYCVP	31997.59	156,42	31998	8,62	2	0,0274	0,0427	0,05	0,07	198,60	31998	17,59	3	0,0648	0,0686	0,11	0,15
FAD dependent oxidoreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1B8_MYCVP	55369.17	525,51	55369	19,48	8	0,0995	0,1162	0,15	0,17	261,98	55369	12,72	5	0,0552	0,0665	0,11	0,13
Malate synthase G - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	MASZ_MYCVP	79277.96	280,05	79278	7,08	5	0,0280	0,0438	0,08	0,02	448,03	79278	9,72	7	0,0435	0,0650	0,11	0,07
Glycoside hydrolase 15-related - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBV8_MYCVP	74742.31	273,95	74742	12,08	5	0,0299	0,0468	0,07	0,09	504,25	74742	14,73	6	0,0465	0,0582	0,11	0,15
Phytoene dehydrogenase-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5F8_MYCVP	53869.01	277,64	53869	16,36	4	0,0433	0,0524	0,07	0,09	255,08	53869	16,47	4	0,0459	0,0530	0,11	0,15
DNA polymerase I - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAF8_MYCVP	99540.9	429,62	99541	11,39	8	0,0370	0,0578	0,11	0,07	370,00	99541	10,07	7	0,0336	0,0502	0,11	0,09

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFK1_MYCVP	74209.17	579,21	74209	13,20	7	0,0444	0,0693	0,09	0,12	393,44	74209	8,01	5	0,0319	0,0477	0,11	0,15
(Glutamate--ammonia-ligase) adenylyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB39_MYCVP	107801.36	406,46	107801	7,35	6	0,0245	0,0382	0,08	0,10	417,66	107801	8,16	7	0,0307	0,0459	0,11	0,15
Threonyl-tRNA synthetase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	SYT_MYCVP	77682.0	203,81	77682	5,10	3	0,0164	0,0257	0,05	0,07	408,76	77682	9,35	5	0,0304	0,0454	0,11	0,15
Acetyl-/propionyl-coenzyme A carboxylase alpha chain - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QTE1_MYCS2	63098.6	365,59	63099	12,22	5	0,0632	0,0565	0,18	0,10	219,76	63099	10,47	4	0,0473	0,0445	0,11	0,05
PTS system, fructose subfamily, IIC subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T195_MYCVP	66047.79	601,42	66048	23,83	8	0,0894	0,0933	0,17	0,22	474,48	66048	12,17	4	0,0448	0,0423	0,11	0,15
Protein translocase subunit secA 3 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	SECA3_MYCVP	87829.02	229,85	87829	6,27	4	0,0196	0,0307	0,05	0,07	389,34	87829	8,90	5	0,0325	0,0396	0,11	0,15
Protein translocase subunit secA 1 - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	SECA1_MYCS2	106422.32	476,96	106422	7,86	7	0,0343	0,0461	0,15	0,02	339,75	106422	7,14	6	0,0263	0,0393	0,11	0,02
DNA gyrase subunit A - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T108_MYCVP	139424.65	320,02	139425	4,03	5	0,0152	0,0238	0,08	0,10	421,00	139425	5,84	6	0,0196	0,0293	0,11	0,07
50S ribosomal protein L7/L12 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL7_MYCVP	13451.08	322,53	13451	28,46	4	0,1934	0,3023	0,09	0,10	428,66	13451	37,69	5	0,2962	0,4425	0,10	0,09
50S ribosomal protein L14 - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TEC7_9MYCO	13380.36	269,76	13380	24,59	4	0,2837	0,3060	0,11	0,07	261,86	13380	24,59	4	0,3003	0,3097	0,10	0,07
Putative anti-sigma regulatory factor, serine/threonine protein kinase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5N8_MYCVP	17159.68	196,42	17160	22,93	3	0,0920	0,1437	0,07	0,09	277,97	17160	28,66	4	0,1448	0,2163	0,10	0,13
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA82_MYCVP	31557.45	865,77	31557	55,59	10	0,2248	0,3512	0,17	0,22	478,34	31557	41,47	7	0,1380	0,2062	0,10	0,13

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE07_MYCVP	20733.56	219,57	20734	21,81	3	0,1060	0,1136	0,05	0,07	309,62	20734	27,13	4	0,2027	0,1677	0,10	0,13
Alpha/beta hydrolase fold - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9F2_MYCVP	32903.21	245,05	32903	16,72	4	0,0593	0,0926	0,05	0,07	409,68	32903	24,41	6	0,1303	0,1575	0,10	0,13
Probable integration host factor - Rhodococcus sp. (strain RHA1)	Q0SH36_RHOSR	11177.27	164,18	11177	19,80	2	0,1638	0,1445	0,17	0,10	161,63	11177	19,80	2	0,0979	0,1462	0,10	0,05
DSBA oxidoreductase precursor - M. gilvum PYR-GCK	A4T200_9MYCO	24231.92	302,41	24232	21,82	3	0,0864	0,0938	0,05	0,02	369,97	24232	32,27	4	0,1604	0,1366	0,10	0,02
Enolase - M. bovis	ENO_MYCBO	44834.81	424,29	44835	15,60	5	0,0538	0,0841	0,12	0,03	507,92	44835	16,08	6	0,0866	0,1064	0,10	0,02
30S ribosomal protein S11 rpsK - M. tuberculosis (strain F11)	A1QX39_MYCTF	14775.98	231,89	14776	11,94	2	0,1111	0,1023	0,07	0,09	190,77	14776	11,94	2	0,1176	0,1035	0,10	0,13
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3A0_MYCVP	30390.46	321,39	30390	22,83	4	0,0868	0,1021	0,09	0,12	323,70	30390	22,83	4	0,0919	0,1033	0,10	0,13
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDH0_MYCVP	31780.79	198,68	31781	15,63	3	0,0618	0,0684	0,05	0,07	231,69	31781	15,97	4	0,0866	0,0977	0,10	0,13
Cytochrome P450 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9R0_MYCVP	50211.14	711,33	50211	26,75	9	0,1134	0,1535	0,15	0,19	404,16	50211	16,01	6	0,0619	0,0926	0,10	0,13
Dimethyladenosine transferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEH3_MYCVP	34370.04	747,45	34370	35,26	10	0,2657	0,3075	0,17	0,22	224,93	34370	14,74	4	0,0786	0,0890	0,10	0,13
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAP0_MYCVP	52332.76	345,78	52333	14,32	6	0,0673	0,0871	0,09	0,12	401,99	52333	13,47	6	0,0713	0,0881	0,10	0,13
Putative uncharacterized protein precursor - M. gilvum PYR-GCK	A4TE47_9MYCO	27287.93	240,38	27288	17,51	3	0,1610	0,0817	0,12	0,09	287,27	27288	17,51	3	0,1360	0,0827	0,10	0,09
Putative lipoprotein LprC precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDG4_MYCVP	19224.49	162,05	19224	12,22	2	0,1167	0,0753	0,13	0,17	151,36	19224	12,22	2	0,0841	0,0762	0,10	0,13
50S ribosomal protein L17 - M. avium (strain 104)	RL17_MYCA1	19920.54	111,83	19921	7,73	1	0,0762	0,0332	0,08	0,10	173,16	19921	16,02	2	0,0806	0,0733	0,10	0,04
FAD dependent oxidoreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH18_MYCVP	51113.47	343,53	51113	12,88	5	0,0573	0,0720	0,08	0,10	355,17	51113	12,28	5	0,0606	0,0729	0,10	0,13

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEP2_MYCVP	30955.2	250,76	30955	14,23	3	0,0452	0,0706	0,04	0,02	261,52	30955	14,23	3	0,0676	0,0715	0,10	0,05
FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9R1_MYCVP	56394.71	433,15	56395	16,21	7	0,0725	0,0959	0,11	0,14	312,97	56395	11,52	5	0,0435	0,0650	0,10	0,13
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH37_MYCVP	49968.53	561,11	49969	27,13	9	0,0988	0,1544	0,13	0,17	270,46	49969	14,22	4	0,0386	0,0577	0,10	0,13
Glycoside hydrolase, family 76 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2V4_MYCVP	40764.9	399,37	40765	20,81	6	0,0756	0,1181	0,08	0,10	231,55	40765	10,54	3	0,0349	0,0522	0,10	0,13
Glycerol-3-phosphate acyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCF1_MYCVP	87701.88	427,78	87702	12,17	7	0,0491	0,0572	0,13	0,17	381,33	87702	10,41	6	0,0387	0,0486	0,10	0,13
Fructose-6-phosphate phosphoketolase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9M1_MYCVP	92300.5	153,63	92301	3,58	3	0,0137	0,0214	0,05	0,07	384,93	92301	9,30	6	0,0307	0,0459	0,10	0,09
Putative secreted protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1F2_MYCVP	34584.82	103,65	34585	5,44	1	0,0120	0,0187	0,01	0,02	187,45	34585	8,76	2	0,0421	0,0398	0,10	0,13
SSS sodium solute transporter superfamily - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDT9_MYCVP	56094.47	378,12	56094	12,26	5	0,0513	0,0646	0,15	0,19	215,42	56094	9,25	3	0,0339	0,0368	0,10	0,13
DNA-directed RNA polymerase subunit beta - <i>Corynebacterium jeikeium</i> (strain K411)	RPOB_CORJK	129023.0	180,41	129023	2,90	3	0,0166	0,0151	0,07	0,05	328,34	129023	5,97	5	0,0213	0,0262	0,10	0,02
Putative acyl-CoA carboxylase alpha subunit - <i>Nocardia farcinica</i>	Q5Z157_NOCPA	63260.5	150,34	63261	5,57	2	0,0205	0,0207	0,05	0,03	150,18	63261	5,57	2	0,0297	0,0210	0,10	0,11
Putative uncharacterized protein - <i>Collinsella aerofaciens</i> ATCC 25986	A4EA14_9ACTN	95688.54	179,08	95689	3,91	3	0,0132	0,0206	0,04	0,02	196,58	95689	3,91	3	0,0140	0,0209	0,10	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T616_MYCVP	8655.58	209,82	8656	40,96	3	0,4038	0,3763	0,05	0,07	378,15	8656	73,49	5	1,0459	1,0145	0,08	0,11

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
50S ribosomal protein L21 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC23_MYCVP	11452.45	325,02	11452	42,31	4	0,2478	0,3872	0,15	0,19	371,39	11452	42,31	4	0,3901	0,3918	0,08	0,11
UPF0234 protein Mvan_0997 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	Y997_MYCVP	17942.41	234,74	17942	30,67	4	0,1791	0,2011	0,07	0,09	344,40	17942	36,81	6	0,2539	0,3794	0,08	0,09
Acyl carrier protein - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0R0B3_MYCS2	10730.36	214,98	10730	35,05	3	0,2774	0,2713	0,07	0,03	248,68	10730	35,05	3	0,1837	0,2745	0,08	0,02
Phosphopantetheine-binding precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBI7_MYCVP	10666.37	214,98	10666	35,42	3	0,2774	0,2713	0,07	0,03	248,68	10666	35,42	3	0,1837	0,2745	0,08	0,02
Activator of Hsp90 ATPase 1 family protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF60_MYCVP	16827.59	265,80	16828	37,50	4	0,2663	0,2197	0,11	0,14	291,28	16828	37,50	4	0,2086	0,2223	0,08	0,11
50S ribosomal protein L14 - <i>Arthrobacter aurescens</i> (strain TC1)	RL14_ARTAT	13280.38	214,73	13280	19,67	3	0,1288	0,2013	0,08	0,00	211,95	13280	19,67	3	0,2099	0,2037	0,08	0,00
50S ribosomal protein L14 - <i>Nocardia farcinica</i>	RL14_NOCEFA	13365.35	214,73	13365	19,67	3	0,1274	0,1990	0,08	0,03	211,95	13365	19,67	3	0,2073	0,2014	0,08	0,05
LpqN precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEI9_MYCVP	23081.62	344,86	23082	40,61	5	0,1634	0,1956	0,08	0,10	369,11	23082	40,61	5	0,1729	0,1980	0,08	0,11
50S ribosomal protein L11 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL11_MYCVP	15058.08	278,28	15058	20,59	3	0,1647	0,1702	0,09	0,12	333,80	15058	20,59	3	0,1743	0,1723	0,08	0,11
Elongation factor Ts - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	EFTS_MYCVP	28781.21	179,32	28781	17,56	3	0,0490	0,0766	0,05	0,07	388,38	28781	28,63	5	0,0983	0,1469	0,08	0,05
Polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7T9_MYCVP	23908.19	194,65	23908	17,51	3	0,0610	0,0954	0,07	0,09	231,68	23908	25,81	4	0,1258	0,1390	0,08	0,11
Acetolactate synthase, small subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6Y8_MYCVP	18104.87	324,31	18105	32,93	4	0,1265	0,1977	0,09	0,07	257,84	18105	21,34	3	0,0906	0,1354	0,08	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8R7_MYCVP	12624.84	198,85	12625	27,19	3	0,1382	0,2159	0,05	0,07	121,84	12625	27,19	2	0,1462	0,1258	0,08	0,11

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9B3_MYCVP	13067.98	139,39	13068	22,88	2	0,2035	0,1192	0,05	0,07	154,94	13068	22,88	2	0,2153	0,1206	0,08	0,11
20S proteasome, A and B subunits - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAP3_MYCVP	27382.85	166,02	27383	16,94	3	0,0521	0,0814	0,04	0,05	225,76	27383	21,77	4	0,0786	0,1174	0,08	0,11
50S ribosomal protein L32 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL32_MYCVP	6492.73	110,78	6493	27,12	1	0,1896	0,1127	0,08	0,10	111,41	6493	27,12	1	0,2007	0,1140	0,08	0,11
Type III pantothenate kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	COAX_MYCVP	28848.07	149,37	28848	12,60	2	0,0307	0,0480	0,03	0,03	347,93	28848	29,39	4	0,0983	0,1102	0,08	0,11
Serine/threonine protein kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T125_MYCVP	45443.88	557,11	45444	27,60	8	0,0957	0,1496	0,16	0,21	379,07	45444	18,40	6	0,0699	0,1045	0,08	0,11
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T350_MYCVP	31845.42	236,76	31845	16,26	3	0,0618	0,0684	0,05	0,07	381,60	31845	21,11	4	0,0654	0,0977	0,08	0,11
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Q7_MYCVP	33202.59	312,29	33203	18,27	4	0,0774	0,0915	0,09	0,12	365,59	33203	17,94	4	0,1040	0,0926	0,08	0,11
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T170_MYCVP	42140.77	293,70	42141	11,75	4	0,0444	0,0693	0,05	0,07	292,51	42141	12,79	5	0,0768	0,0916	0,08	0,11
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha - Streptomyces coelicolor	RPOA_STRCO	36673.04	471,33	36673	18,92	6	0,1279	0,1351	0,15	0,05	234,70	36673	14,41	4	0,0725	0,0824	0,08	0,02
4-aminobutyrate aminotransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T889_MYCVP	47123.38	216,66	47123	9,35	3	0,0282	0,0440	0,05	0,07	321,29	47123	15,42	5	0,0536	0,0801	0,08	0,11
Sensor protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6Y3_MYCVP	48712.68	498,46	48713	22,85	7	0,0875	0,1152	0,15	0,12	315,70	48713	16,97	5	0,0516	0,0771	0,08	0,09
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2U8_MYCVP	29022.16	189,48	29022	12,55	3	0,0920	0,0759	0,09	0,12	205,12	29022	12,55	3	0,0973	0,0769	0,08	0,11

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDK4_MYCVP	29079.3	341,21	29079	19,92	3	0,0690	0,0759	0,05	0,07	347,92	29079	18,80	3	0,0730	0,0769	0,08	0,11
Cytochrome P450 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2N9_MYCVP	48860.61	354,08	48861	15,54	5	0,0605	0,0758	0,09	0,12	308,81	48861	13,51	5	0,0640	0,0767	0,08	0,11
NAD(P) transhydrogenase, alpha subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1C1_MYCVP	52667.06	509,42	52667	20,29	8	0,0923	0,1236	0,13	0,09	300,99	52667	16,53	5	0,0585	0,0704	0,08	0,09
Extracellular solute-binding protein, family 1 precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8D2_MYCVP	47323.48	788,79	47323	34,68	9	0,2276	0,1661	0,45	0,59	250,06	47323	14,86	4	0,0665	0,0614	0,08	0,11
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAS1_MYCVP	52429.94	552,02	52430	25,00	8	0,1069	0,1243	0,15	0,19	324,58	52430	13,24	4	0,0588	0,0546	0,08	0,11
Alpha/beta hydrolase fold-3 domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T727_MYCVP	39431.29	303,11	39431	21,70	4	0,0626	0,0748	0,11	0,14	249,25	39431	12,01	3	0,0363	0,0542	0,08	0,11
Cobalamin synthesis protein, P47K precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFZ2_MYCVP	42101.57	454,58	42102	20,68	6	0,1059	0,1135	0,15	0,17	238,02	42102	14,66	3	0,0613	0,0504	0,08	0,11
Sensor protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9E3_MYCVP	58287.08	759,41	58287	26,47	10	0,0928	0,1451	0,13	0,17	235,94	58287	8,51	4	0,0325	0,0485	0,08	0,11
Monooxygenase, FAD-binding - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T290_MYCVP	46433.81	230,64	46434	15,88	4	0,0396	0,0619	0,05	0,07	202,06	46434	13,03	3	0,0420	0,0452	0,08	0,11
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha - M. ulcerans (strain Agy99)	A0PWD0_MYCUA	30804.3	173,70	30804	9,64	2	0,0285	0,0446	0,03	0,00	178,98	30804	9,64	2	0,0480	0,0451	0,08	0,00
Signal recognition particle-docking protein FtsY - M. gilvum PYR-GCK	A4TE62_9MYCO	49073.28	279,93	49073	10,31	4	0,0372	0,0581	0,05	0,02	209,55	49073	8,30	3	0,0285	0,0425	0,08	0,04
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T896_MYCVP	33062.51	184,66	33063	14,70	2	0,0590	0,0413	0,11	0,14	170,71	33063	14,70	2	0,0443	0,0418	0,08	0,11
Oxidoreductase, molybdopterin binding precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6P3_MYCVP	52992.36	157,20	52992	5,56	2	0,0160	0,0249	0,03	0,03	237,61	52992	11,43	3	0,0581	0,0392	0,08	0,11

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Signal recognition particle subunit FFH/SRP54 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T746_MYCVP	55112.93	637,77	55113	26,35	8	0,0747	0,1168	0,11	0,14	219,89	55113	7,58	3	0,0251	0,0375	0,08	0,11
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TC16_9MYCO	38668.24	448,30	38668	20,17	6	0,0808	0,1263	0,12	0,05	160,13	38668	5,52	2	0,0236	0,0353	0,08	0,11
Gluconate transporter - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THM6_MYCVP	48315.55	274,67	48316	12,07	3	0,0379	0,0428	0,09	0,12	248,44	48316	8,20	2	0,0290	0,0278	0,08	0,11
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBN9_MYCVP	74348.31	315,94	74348	8,00	5	0,0301	0,0471	0,07	0,07	233,16	74348	5,04	3	0,0249	0,0272	0,08	0,00
Glycosyl transferase, family 51 precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGB2_MYCVP	85736.25	167,90	85736	4,11	3	0,0148	0,0231	0,04	0,05	165,72	85736	4,11	3	0,0157	0,0234	0,08	0,11
ATPase AAA-2 domain protein - <i>Arthrobacter</i> sp. (strain FB24)	A0K1E5_ARTS2	95281.82	126,63	95282	2,77	2	0,0087	0,0136	0,03	0,00	187,37	95282	4,50	3	0,0140	0,0210	0,08	0,00
Chaperone ClpB containing ATPase AAA-2 domain - <i>Psychromonas ingrahamii</i> (strain 37)	A1SZN5_PSYIN	95586.46	151,17	95586	3,80	3	0,0132	0,0206	0,04	0,00	158,50	95586	3,80	3	0,0140	0,0209	0,08	0,00
Putative clpB, ATPase with chaperone activity - <i>Psychromonas</i> sp. CNPT3	Q1ZE65_9GAMM	95792.8	151,17	95793	3,79	3	0,0132	0,0206	0,04	0,02	158,50	95793	3,79	3	0,0140	0,0209	0,08	0,04
50S ribosomal protein L29 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL29_MYCVP	8715.54	301,75	8716	62,03	5	0,9593	0,9765	0,12	0,16	277,58	8716	62,03	4	0,6613	0,6240	0,07	0,09
Translation initiation factor IF-1, InfA - <i>M. ulcerans</i> (strain Agy99)	A0PMB2_MYCUA	8483.56	164,88	8484	41,56	3	0,4134	0,3840	0,08	0,10	158,45	8484	41,56	3	0,4374	0,3885	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6B9_MYCVP	14965.8	127,06	14966	16,91	2	0,1100	0,1014	0,05	0,07	238,41	14966	33,82	4	0,2511	0,2633	0,07	0,09
50S ribosomal protein L24 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL24_MYCVP	11339.13	290,97	11339	47,57	4	0,3751	0,3932	0,09	0,12	262,82	11339	39,81	3	0,2663	0,2519	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDT8_MYCVP	13182.99	151,85	13183	25,21	2	0,2009	0,1180	0,08	0,10	214,68	13183	31,93	3	0,2126	0,2060	0,07	0,09

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4K8_MYCVP	13284.34	204,44	13284	37,50	3	0,1288	0,2013	0,08	0,10	200,29	13284	37,50	3	0,1363	0,2037	0,07	0,09
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - <i>M. sp.</i> (strain KMS)	A1U8S9_MYCSK	18627.24	268,09	18627	29,59	4	0,1224	0,1913	0,08	0,03	307,65	18627	29,59	4	0,1296	0,1936	0,07	0,04
30S ribosomal protein S9 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T552_MYCVP	18789.15	170,37	18789	30,00	3	0,0818	0,1278	0,04	0,05	181,58	18789	29,41	4	0,1275	0,1905	0,07	0,09
TrkA-N domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7Y6_MYCVP	23736.35	153,38	23736	9,77	2	0,0381	0,0596	0,04	0,05	402,08	23736	32,09	5	0,1274	0,1904	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T119_MYCVP	15098.18	128,85	15098	14,60	2	0,0637	0,0996	0,05	0,07	197,33	15098	21,17	3	0,1142	0,1706	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9Z0_MYCVP	15392.01	272,38	15392	35,71	4	0,1596	0,2494	0,05	0,07	226,69	15392	25,90	3	0,1120	0,1674	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAY3_MYCVP	15679.16	129,37	15679	14,79	2	0,0611	0,0955	0,05	0,07	170,14	15679	22,54	3	0,1090	0,1628	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T728_MYCVP	27225.87	407,35	27226	39,69	6	0,1610	0,2009	0,11	0,07	397,65	27226	34,24	5	0,1057	0,1579	0,07	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE21_MYCVP	27948.44	200,93	27948	12,17	3	0,0509	0,0795	0,04	0,05	371,94	27948	22,43	5	0,1024	0,1530	0,07	0,09
Two component transcriptional regulator, LuxR family - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T859_MYCVP	23425.43	175,47	23425	18,40	3	0,0624	0,0975	0,04	0,05	276,75	23425	22,64	4	0,0953	0,1424	0,07	0,05
Putative conserved transmembrane protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1I6_MYCVP	23604.4	198,09	23604	19,63	3	0,1212	0,0970	0,09	0,12	296,51	23604	35,51	4	0,1282	0,1415	0,07	0,09
SSU ribosomal protein S14P - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGG0_MYCVP	11572.4	130,58	11572	20,00	2	0,0881	0,1377	0,13	0,17	153,28	11572	20,00	2	0,0932	0,1393	0,07	0,09

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Phospholipid/glycerol acyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAY9_MYCVP	26237.96	278,95	26238	21,85	4	0,1354	0,1221	0,11	0,14	298,64	26238	27,92	4	0,1110	0,1236	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE92_MYCVP	12952.5	104,85	12953	10,26	1	0,0336	0,0525	0,11	0,14	176,45	12953	11,11	2	0,0816	0,1219	0,07	0,09
ClpP1 peptidase. Serine peptidase. MEROPS family S14 / ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCB7_MYCVP	20963.52	299,51	20964	22,11	3	0,1045	0,1121	0,05	0,07	312,74	20964	22,11	3	0,1106	0,1135	0,07	0,09
Chromosome segregation DNA-binding protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TI23_MYCVP	35728.83	407,23	35729	25,00	6	0,1102	0,1400	0,09	0,12	339,22	35729	20,37	5	0,0750	0,1120	0,07	0,07
Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8D0_MYCVP	28801.91	244,69	28802	14,76	3	0,0697	0,0766	0,08	0,10	247,33	28802	15,13	4	0,0737	0,1102	0,07	0,09
30S ribosomal protein S5 - <i>Nocardia farcinica</i>	RS5_NOCFA	22388.86	229,28	22389	16,35	3	0,0958	0,1034	0,05	0,03	224,77	22389	16,35	3	0,1380	0,1046	0,07	0,05
LSU ribosomal protein L25P - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEG0_MYCVP	22811.74	236,86	22812	20,18	3	0,0646	0,1010	0,04	0,05	234,35	22812	20,18	3	0,0684	0,1022	0,07	0,09
Carbamoyl-phosphate synthase small subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8H0_MYCVP	39787.11	502,36	39787	27,42	6	0,0780	0,1218	0,08	0,10	321,28	39787	17,17	5	0,0656	0,0981	0,07	0,09
Bacterial proteasome, beta component. Threonine peptidase. MEROPS family T01B - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAP4_MYCVP	31998.01	386,53	31998	27,24	5	0,1033	0,1268	0,09	0,12	307,47	31998	19,73	4	0,0859	0,0969	0,07	0,09
Putative tuberculin related peptide precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T322_MYCVP	15988.1	217,58	15988	28,29	3	0,1503	0,1566	0,05	0,07	185,46	15988	17,93	2	0,1060	0,0943	0,07	0,09

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	MURG_MYCVP	42074.46	274,77	42074	22,25	4	0,0444	0,0693	0,05	0,07	292,62	42074	14,92	5	0,0613	0,0916	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDK1_MYCVP	25741.97	212,88	25742	14,53	3	0,0803	0,0876	0,05	0,07	223,59	25742	14,53	3	0,1142	0,0886	0,07	0,09
Beta-lactamase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2Y5_MYCVP	26264.39	122,79	26264	7,98	2	0,0340	0,0532	0,03	0,03	202,30	26264	12,20	3	0,0578	0,0864	0,07	0,09
Periplasmic solute binding protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFZ1_MYCVP	35502.07	629,95	35502	41,25	7	0,4806	0,1737	0,32	0,41	311,45	35502	26,09	4	0,0756	0,0857	0,07	0,09
Homoserine dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD75_MYCVP	45383.68	402,78	45384	21,76	7	0,0806	0,1259	0,09	0,12	415,97	45384	15,53	5	0,0561	0,0839	0,07	0,09
Sulfate ABC transporter, periplasmic sulfate-binding protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBV6_MYCVP	36353.46	687,20	36353	46,11	8	0,1296	0,2025	0,11	0,14	356,65	36353	18,86	4	0,0733	0,0833	0,07	0,09
Anion-transporting ATPase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGA9_MYCVP	36810.5	746,84	36811	46,71	11	0,2371	0,3215	0,17	0,22	231,57	36811	15,57	4	0,0549	0,0821	0,07	0,09
Anthranilate phosphoribosyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB00_MYCVP	37248.12	354,18	37248	16,57	4	0,0512	0,0800	0,05	0,07	345,14	37248	18,05	4	0,0711	0,0809	0,07	0,09
Enoyl-CoA hydratase/isomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGS8_MYCVP	28944.72	207,03	28945	15,21	3	0,0488	0,0763	0,04	0,05	265,68	28945	15,21	3	0,0734	0,0772	0,07	0,09
ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC86_MYCVP	29199.37	250,49	29199	14,72	3	0,0482	0,0753	0,05	0,07	215,73	29199	14,72	3	0,0510	0,0762	0,07	0,09
Succinyl-CoA synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEP3_MYCVP	40947.2	980,73	40947	43,93	12	0,3264	0,3129	0,22	0,28	336,86	40947	13,71	4	0,0635	0,0726	0,07	0,09

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
O-methyltransferase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3R7_MYCVP	30828.88	137,44	30829	10,71	2	0,0454	0,0446	0,04	0,05	201,69	30829	10,71	3	0,0679	0,0718	0,07	0,09
Dyp-type peroxidase family precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEE8_MYCVP	47257.57	436,92	47258	23,08	6	0,0910	0,0985	0,11	0,14	240,87	47258	13,29	4	0,0412	0,0615	0,07	0,09
Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFB3_MYCVP	38379.81	235,34	38380	12,07	3	0,0354	0,0553	0,07	0,09	245,60	38380	11,41	3	0,0374	0,0559	0,07	0,09
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha - <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (strain NRRL 23338)	RPOA_SACEN	38669.01	306,23	38669	14,25	4	0,0808	0,0765	0,11	0,00	179,26	38669	10,54	3	0,0518	0,0554	0,07	0,00
Protein phosphatase 2C domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T128_MYCVP	53889.48	294,58	53889	13,70	5	0,0433	0,0677	0,07	0,07	205,83	53889	9,00	4	0,0355	0,0530	0,07	0,05
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6Z3_MYCVP	54330.13	439,27	54330	20,49	7	0,0643	0,1005	0,09	0,12	322,06	54330	11,07	4	0,0351	0,0525	0,07	0,05
Catalase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGG2_MYCVP	54623.57	427,73	54624	16,13	6	0,0529	0,0827	0,08	0,10	305,58	54624	12,90	4	0,0349	0,0522	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAP6_MYCVP	54878.27	308,42	54878	9,04	3	0,0238	0,0373	0,04	0,05	288,84	54878	10,64	4	0,0348	0,0519	0,07	0,09
Translation elongation factor Tu - <i>Alkaliphilus metalliredigens</i> (strain QYMF)	A6TWI4_ALKMQ	43678.2	198,04	43678	4,28	2	0,0306	0,0306	0,08	0,10	359,27	43678	8,82	3	0,0587	0,0484	0,07	0,07
Beta-lactamase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7Q2_MYCVP	59239.91	540,86	59240	19,18	8	0,0910	0,1068	0,13	0,17	283,46	59240	9,29	4	0,0412	0,0477	0,07	0,09
Glucose-6-phosphate isomerase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	G6PI_MYCVP	59558.17	220,18	59558	10,35	4	0,0300	0,0469	0,05	0,07	281,48	59558	10,54	4	0,0317	0,0474	0,07	0,09
Protein kinase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE68_MYCVP	60519.25	351,03	60519	12,55	5	0,0469	0,0593	0,08	0,10	305,02	60519	9,09	4	0,0401	0,0466	0,07	0,09
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE57_MYCVP	62381.04	232,84	62381	6,88	3	0,0208	0,0325	0,05	0,07	277,27	62381	11,82	4	0,0388	0,0451	0,07	0,09

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T394_MYCVP	49741.16	444,44	49741	24,56	7	0,0850	0,1120	0,11	0,12	231,02	49741	6,86	3	0,0281	0,0419	0,07	0,09
ABC-3 protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFZ6_MYCVP	68170.52	341,55	68171	10,85	4	0,0258	0,0404	0,07	0,09	227,43	68171	11,45	4	0,0273	0,0408	0,07	0,09
TAP domain protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T801_MYCVP	53402.72	701,87	53403	34,23	8	0,0777	0,1214	0,13	0,17	266,21	53403	9,48	3	0,0358	0,0388	0,07	0,09
Glutamine synthetase - Rhodococcus sp. (strain RHA1)	Q0SHK2_RHOSR	53450.42	291,67	53450	11,34	4	0,0338	0,0529	0,08	0,02	146,95	53450	8,04	3	0,0358	0,0388	0,07	0,02
Malate synthase G - M. gilvum PYR-GCK	A4TAC4_9MYCO	79995.21	280,05	79995	7,02	5	0,0278	0,0434	0,08	0,02	284,04	79995	6,33	4	0,0230	0,0344	0,07	0,02
MMPL domain protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDU8_MYCVP	81628.22	382,10	81628	7,95	5	0,0272	0,0424	0,11	0,14	265,88	81628	6,40	4	0,0225	0,0336	0,07	0,09
Aspartyl-tRNA synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8C3_MYCVP	65388.01	107,71	65388	2,02	1	0,0062	0,0097	0,01	0,02	185,13	65388	6,90	3	0,0209	0,0312	0,07	0,09
Acetyl-coenzyme A synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG95_MYCVP	72845.3	148,25	72845	5,89	3	0,0176	0,0275	0,04	0,05	220,13	72845	7,70	3	0,0254	0,0278	0,07	0,09
Lipopolysaccharide biosynthesis precursor - M. sp. (strain JLS)	A3PV38_MYCSJ	49680.6	157,20	49681	5,76	2	0,0367	0,0267	0,07	0,05	125,73	49681	5,76	2	0,0504	0,0270	0,07	0,09
Sulfatase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE04_MYCVP	55838.17	268,53	55838	9,86	4	0,0322	0,0503	0,05	0,05	150,08	55838	4,54	2	0,0247	0,0239	0,07	0,09
FHA domain containing protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFR2_MYCVP	28533.32	103,09	28533	8,11	1	0,0310	0,0228	0,04	0,05	104,86	28533	8,11	1	0,0328	0,0230	0,07	0,09
Phosphoenolpyruvate carboxylase - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	CAPP_MYCS2	103287.61	150,54	103288	2,24	2	0,0080	0,0125	0,03	0,00	173,28	103288	3,41	3	0,0129	0,0193	0,07	0,00
50S ribosomal protein L20 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL20_MYCVP	14441.94	301,15	14442	42,75	4	0,2490	0,2719	0,11	0,14	209,45	14442	33,59	3	0,1211	0,1810	0,06	0,07

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
SSU ribosomal protein S18P - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THY5_MYCVP	9927.37	150,99	9927	27,78	2	0,1071	0,1673	0,04	0,05	128,37	9927	27,78	2	0,2050	0,1693	0,06	0,07
50S ribosomal protein L31 type B - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL31B_MYCVP	10249.15	134,16	10249	11,83	2	0,1027	0,1604	0,07	0,09	128,50	10249	11,83	2	0,1086	0,1623	0,06	0,07
30S ribosomal protein S16 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	RS16_MYCVP	16969.01	206,62	16969	22,73	2	0,0935	0,0874	0,05	0,07	326,70	16969	24,68	3	0,1474	0,1478	0,06	0,07
Tetratricopeptide TPR_2 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7N9_MYCVP	17087.25	218,63	17087	21,29	3	0,1380	0,1449	0,08	0,10	190,69	17087	21,29	3	0,1461	0,1466	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T723_MYCVP	17013.14	186,29	17013	24,68	2	0,1933	0,0868	0,07	0,09	177,80	17013	33,77	3	0,1461	0,1466	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGN6_MYCVP	24120.7	306,13	24121	29,15	4	0,0869	0,1357	0,07	0,09	304,89	24121	26,46	4	0,0919	0,1374	0,06	0,07
FHA domain containing protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T129_MYCVP	18970.44	224,96	18970	23,84	3	0,0812	0,1269	0,04	0,05	270,42	18970	23,84	3	0,0859	0,1284	0,06	0,07
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAN0_MYCVP	25897.88	278,03	25898	26,81	4	0,0794	0,1241	0,05	0,07	262,61	25898	23,40	4	0,0840	0,1256	0,06	0,07
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDA4_MYCVP	31210.07	174,91	31210	18,73	3	0,0631	0,0698	0,05	0,07	237,05	31210	18,02	4	0,0668	0,0998	0,06	0,07
Phosphoribosylformylglycinamide synthase I - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFE9_MYCVP	23389.85	163,60	23390	20,28	3	0,0628	0,0981	0,04	0,05	252,87	23390	22,17	3	0,0959	0,0993	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE44_MYCVP	23475.8	204,62	23476	19,25	3	0,0900	0,0975	0,07	0,09	196,93	23476	19,25	3	0,0953	0,0987	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAL0_MYCVP	24690.04	159,72	24690	14,47	2	0,0364	0,0569	0,03	0,03	281,90	24690	21,28	3	0,0622	0,0929	0,06	0,07

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
50S ribosomal protein L1 - <i>M. ulcerans</i> (strain Agy99)	RL1_MYCUA	24798.2	152,73	24798	10,67	2	0,0362	0,0566	0,04	0,03	204,68	24798	15,56	3	0,0618	0,0924	0,06	0,02
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8K7_MYCVP	34768.65	153,84	34769	9,49	3	0,0395	0,0617	0,04	0,05	227,51	34769	12,34	4	0,0587	0,0877	0,06	0,05
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9F5_MYCVP	26076.4	239,86	26076	18,57	3	0,0790	0,0863	0,05	0,07	272,71	26076	18,57	3	0,0836	0,0873	0,06	0,07
NusA antitermination factor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7H6_MYCVP	35949.75	167,12	35950	7,06	2	0,0242	0,0378	0,05	0,07	212,73	35950	15,34	4	0,0565	0,0845	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE64_MYCVP	17651.07	121,43	17651	13,13	2	0,0883	0,0830	0,07	0,09	122,67	17651	15,00	2	0,0935	0,0840	0,06	0,07
TspO and MBR like proteins precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAH9_MYCVP	18561.84	189,62	18562	22,62	2	0,0830	0,0784	0,05	0,07	174,03	18562	22,62	2	0,1296	0,0794	0,06	0,07
Acetolactate synthase, small subunit - <i>M. sp.</i> (strain KMS)	A1UE94_MYCSK	18653.15	160,64	18653	13,61	2	0,0499	0,0779	0,07	0,03	160,31	18653	13,61	2	0,0528	0,0788	0,06	0,04
Succinate dehydrogenase subunit B - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1T2_MYCVP	28676.02	188,53	28676	15,38	3	0,0700	0,0770	0,05	0,07	213,75	28676	15,38	3	0,0741	0,0779	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG12_MYCVP	19665.93	175,48	19666	25,28	2	0,0773	0,0734	0,08	0,10	175,84	19666	25,28	2	0,0818	0,0743	0,06	0,07
Transaldolase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8M6_MYCVP	40171.68	450,46	40172	25,75	7	0,1131	0,1474	0,11	0,14	266,03	40172	11,23	4	0,0496	0,0742	0,06	0,07
Glycosyl transferase, group 1 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFR7_MYCVP	40987.58	180,89	40988	10,47	3	0,0457	0,0513	0,07	0,09	270,72	40988	14,25	4	0,0484	0,0723	0,06	0,07
O-methyltransferase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9S0_MYCVP	31157.22	212,15	31157	10,25	2	0,0448	0,0441	0,04	0,05	242,66	31157	13,43	3	0,0671	0,0709	0,06	0,07
HAD-superfamily subfamily IB hydrolase, TIGR01490 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3D1_MYCVP	31721.56	309,99	31722	28,28	5	0,1047	0,1285	0,08	0,10	233,39	31722	18,18	3	0,0656	0,0695	0,06	0,07

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
S-adenosylmethionine synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	METK_MYCVP	42787.05	682,19	42787	37,09	10	0,1634	0,2217	0,15	0,17	279,39	42787	14,43	4	0,0461	0,0689	0,06	0,07
RNA methyltransferase, TrmH family, group 3 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG08_MYCVP	32500.22	144,31	32500	11,19	2	0,0427	0,0421	0,04	0,05	229,64	32500	12,54	3	0,0638	0,0676	0,06	0,07
Fructose-bisphosphate aldolase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAD8_MYCVP	33016.05	243,62	33016	14,67	3	0,0590	0,0655	0,05	0,07	250,88	33016	19,21	3	0,0443	0,0663	0,06	0,07
Protein translocase subunit secF - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T892_MYCVP	45156.83	416,87	45157	19,51	5	0,0533	0,0834	0,07	0,09	324,63	45157	11,71	4	0,0434	0,0648	0,06	0,07
D-amino-acid dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEF3_MYCVP	45479.86	532,77	45480	29,63	9	0,1302	0,1755	0,16	0,21	245,10	45480	8,33	4	0,0430	0,0643	0,06	0,07
Solute-binding protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFW4_MYCVP	36488.02	178,26	36488	13,60	3	0,0525	0,0585	0,05	0,07	299,18	36488	17,82	3	0,0396	0,0592	0,06	0,07
Ppx/GppA phosphatase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3C1_MYCVP	36851.17	398,11	36851	18,52	5	0,1058	0,1066	0,09	0,12	192,03	36851	8,66	3	0,0392	0,0586	0,06	0,07
Putative esterase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGW0_MYCVP	37525.6	168,22	37526	12,46	3	0,0362	0,0566	0,05	0,07	247,32	37526	11,33	3	0,0536	0,0572	0,06	0,04
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7G3_MYCVP	37552.31	358,49	37552	22,87	7	0,1237	0,1608	0,11	0,14	135,30	37552	9,97	3	0,0383	0,0572	0,06	0,07
FAD dependent oxidoreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9X2_MYCVP	52495.54	257,40	52496	13,00	4	0,0346	0,0540	0,05	0,07	263,31	52496	11,74	4	0,0366	0,0546	0,06	0,07
Adenylosuccinate lyase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFG6_MYCVP	53447.82	291,86	53448	10,72	4	0,0338	0,0529	0,05	0,07	275,13	53448	10,52	4	0,0358	0,0535	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF13_MYCVP	40625.74	202,99	40626	12,47	3	0,0332	0,0519	0,04	0,05	186,47	40626	11,92	3	0,0352	0,0525	0,06	0,07

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB27_MYCVP	27095.94	219,01	27096	16,26	3	0,1004	0,0821	0,08	0,10	125,38	27096	13,01	2	0,0556	0,0519	0,06	0,07
Triosephosphate isomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	TPIS_MYCVP	27396.01	155,73	27396	17,27	3	0,0521	0,0814	0,04	0,05	150,71	27396	12,45	2	0,0344	0,0514	0,06	0,07
Phosphoglycerate kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	PGK_MYCVP	42101.95	306,01	42102	19,41	5	0,0579	0,0905	0,07	0,09	225,55	42102	11,78	3	0,0337	0,0504	0,06	0,07
Acetyl-CoA acetyltransferases - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE52_MYCVP	42307.06	583,14	42307	33,33	9	0,1897	0,1934	0,17	0,22	196,52	42307	11,20	3	0,0335	0,0501	0,06	0,07
FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9A9_MYCVP	58458.25	252,13	58458	9,42	5	0,0395	0,0617	0,07	0,09	204,80	58458	7,34	4	0,0324	0,0484	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGZ6_MYCVP	14692.24	108,59	14692	15,79	1	0,0660	0,0457	0,07	0,09	121,25	14692	15,79	1	0,0699	0,0463	0,06	0,07
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha - M. sp. (strain KMS)	A1UL95_MYCSK	30891.01	130,83	30891	8,93	2	0,0284	0,0444	0,03	0,02	144,72	30891	8,93	2	0,0301	0,0450	0,06	0,05
Carbohydrate kinase, YjeF related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T564_MYCVP	46796.5	165,89	46797	8,32	3	0,0284	0,0443	0,07	0,09	160,90	46797	7,44	3	0,0300	0,0449	0,06	0,07
Signal peptide peptidase SppA, 67K type - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4S7_MYCVP	62674.56	972,53	62675	30,40	12	0,1630	0,1686	0,21	0,28	227,32	62675	9,31	4	0,0300	0,0448	0,06	0,07
Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha - Nocardia farcinica	Q5YPP9_NOCFa	31216.41	193,89	31216	9,89	2	0,0281	0,0439	0,03	0,00	196,24	31216	9,89	2	0,0472	0,0444	0,06	0,00
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T584_MYCVP	32380.55	322,65	32381	20,75	4	0,1019	0,0945	0,09	0,12	185,48	32381	8,50	2	0,0454	0,0428	0,06	0,07
Extracellular solute-binding protein, family 1 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T855_MYCVP	50055.73	725,75	50056	32,32	10	0,1304	0,1782	0,22	0,29	259,96	50056	8,57	3	0,0279	0,0417	0,06	0,07
Protein phosphatase 2C - M. avium (strain 104)	A0Q8T5_MYCA1	52648.06	122,40	52648	4,81	2	0,0161	0,0251	0,03	0,02	164,97	52648	6,69	3	0,0264	0,0394	0,06	0,04

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative esterase precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6C2_MYCVP	35010.2	123,41	35010	6,17	1	0,0248	0,0184	0,03	0,03	190,70	35010	10,49	2	0,0415	0,0393	0,06	0,07
Elongation factor Tu - <i>Pseudonocardia</i> sp. AL040410-06	A6N2A3_9PSEU	35076.09	125,01	35076	12,58	2	0,0548	0,0387	0,07	0,02	138,99	35076	12,58	2	0,0580	0,0391	0,06	0,02
Extracellular solute-binding protein, family 1 precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THX5_MYCVP	36821.54	606,36	36822	37,72	7	0,1771	0,1653	0,15	0,19	142,90	36822	9,94	2	0,0549	0,0372	0,06	0,07
Ferredoxin-dependent glutamate synthase precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THG2_MYCVP	58184.61	675,77	58185	27,34	12	0,1336	0,1864	0,17	0,17	165,03	58185	6,37	3	0,0237	0,0354	0,06	0,07
Probable propionyl-CoA carboxylase beta chain 5 - <i>M. leprae</i>	PCCB_MYCLE	59359.21	269,17	59359	8,91	4	0,0388	0,0471	0,07	0,03	240,68	59359	8,91	3	0,0319	0,0347	0,06	0,04
Serine/threonine protein kinase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2Z1_MYCVP	82008.88	452,10	82009	8,72	7	0,0396	0,0618	0,09	0,05	188,35	82009	4,97	4	0,0224	0,0335	0,06	0,07
FAD dependent oxidoreductase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T596_MYCVP	63059.28	633,50	63059	27,34	9	0,1194	0,1144	0,18	0,24	194,26	63059	7,96	3	0,0298	0,0324	0,06	0,07
NADH-quinone oxidoreductase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6A0_MYCVP	84389.45	273,20	84389	7,43	5	0,0262	0,0409	0,08	0,10	215,22	84389	6,13	4	0,0217	0,0324	0,06	0,07
Extracellular solute-binding protein, family 1 precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAI5_MYCVP	42304.06	736,50	42304	37,50	9	0,3069	0,1934	0,28	0,36	171,23	42304	9,90	2	0,0335	0,0320	0,06	0,07
1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	DXS_MYCVP	68008.51	186,71	68009	5,34	3	0,0189	0,0296	0,04	0,05	197,61	68009	6,96	3	0,0274	0,0299	0,06	0,07
ABC transporter domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9W5_MYCVP	70603.86	247,60	70604	8,74	4	0,0249	0,0388	0,05	0,07	160,06	70604	4,37	3	0,0192	0,0287	0,06	0,07
Serine hydroxymethyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE31_MYCVP	51510.08	360,28	51510	13,68	4	0,0352	0,0550	0,05	0,07	134,22	51510	5,13	2	0,0174	0,0260	0,06	0,07

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Cytochrome bd ubiquinol oxidase, subunit I - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Y7_MYCVP	53643.6	186,76	53644	10,06	3	0,0337	0,0382	0,08	0,10	193,81	53644	6,98	2	0,0356	0,0249	0,06	0,07
Prolipoprotein diacylglyceryl transferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8X6_MYCVP	84815.45	252,58	84815	4,44	3	0,0150	0,0234	0,05	0,07	227,27	84815	4,44	3	0,0158	0,0237	0,06	0,07
Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDQ1_MYCVP	58543.4	151,43	58543	4,14	2	0,0222	0,0225	0,04	0,05	140,79	58543	3,95	2	0,0235	0,0227	0,06	0,07
DNA polymerase I - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QYZ2_MYCS2	99836.25	247,81	99836	7,17	5	0,0218	0,0341	0,07	0,02	157,55	99836	4,19	3	0,0134	0,0200	0,06	0,02
Phosphoenolpyruvate carboxylase - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TC23_9MYCO	103365.2	246,24	103365	5,64	4	0,0165	0,0258	0,05	0,00	166,28	103365	3,41	3	0,0129	0,0192	0,06	0,00
ATPase, P-type - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF11_MYCVP	85584.61	362,53	85585	9,13	5	0,0258	0,0403	0,07	0,09	136,21	85585	3,47	2	0,0157	0,0153	0,06	0,07
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T268_MYCVP	48784.47	469,51	48784	20,75	6	0,1534	0,0947	0,28	0,36	101,09	48784	3,61	1	0,0397	0,0133	0,06	0,07
Microcompartments protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGN5_MYCVP	9248.77	131,92	9249	27,38	2	0,2149	0,1830	0,05	0,07	176,45	9249	40,48	3	0,2274	0,3398	0,04	0,05
Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related, FMN-binding - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAN1_MYCVP	14983.94	153,79	14984	17,65	2	0,0649	0,1014	0,04	0,05	224,37	14984	25,00	3	0,1164	0,1740	0,04	0,05
Ribosomal protein L24 - <i>Thermosinus carboxydivorans</i> Nor1	A1HQM2_9FIRM	11827.65	133,81	11828	10,28	2	0,0861	0,1345	0,05	0,07	173,91	11828	10,28	2	0,0911	0,1361	0,04	0,05
Putative conserved transmembrane protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3D8_MYCVP	18539.74	240,07	18540	26,79	4	0,1224	0,1913	0,05	0,07	196,03	18540	19,64	3	0,0879	0,1313	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFT2_MYCVP	19013.88	174,60	19014	20,35	3	0,0806	0,1260	0,05	0,07	197,74	19014	20,35	3	0,0853	0,1275	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD11_MYCVP	12756.88	133,92	12757	14,78	2	0,0787	0,1230	0,05	0,07	120,55	12757	14,78	2	0,0833	0,1245	0,04	0,05

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
RNA polymerase, sigma-24 subunit, ECF subfamily - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T590_MYCVP	20584.74	121,01	20585	21,93	2	0,0447	0,0698	0,03	0,03	239,22	20585	22,22	3	0,0774	0,1157	0,04	0,05
Succinate dehydrogenase, cytochrome b subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5G8_MYCVP	15969.48	126,08	15969	19,31	2	0,0601	0,0939	0,03	0,03	127,06	15969	19,31	2	0,1070	0,0950	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGN3_MYCVP	17662.6	227,25	17663	36,88	3	0,0883	0,1380	0,07	0,09	211,29	17663	20,63	2	0,0935	0,0840	0,04	0,05
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. gilvum PYR-GCK	A4TFK5_9MYCO	27307.36	210,46	27307	17,93	3	0,0742	0,0814	0,07	0,09	223,69	27307	18,73	3	0,0551	0,0823	0,04	0,05
Polyphosphate glucokinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7X5_MYCVP	27745.35	292,69	27745	28,57	4	0,0731	0,1143	0,09	0,12	230,68	27745	23,02	3	0,0543	0,0812	0,04	0,05
ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Z1_MYCVP	28008.81	160,44	28009	16,14	3	0,0506	0,0791	0,04	0,05	149,58	28009	20,08	3	0,0536	0,0800	0,04	0,05
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCH5_MYCVP	28124.81	190,51	28125	17,65	3	0,0504	0,0787	0,04	0,05	228,85	28125	17,11	3	0,0533	0,0797	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH97_MYCVP	19064.04	313,25	19064	20,81	3	0,0806	0,1260	0,04	0,05	179,27	19064	19,65	2	0,0517	0,0773	0,04	0,05
2,5-didehydrogluconate reductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T726_MYCVP	29734.17	102,94	29734	5,93	1	0,0140	0,0219	0,01	0,02	247,07	29734	15,41	3	0,0501	0,0749	0,04	0,05
Thiosulfate sulfurtransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFC2_MYCVP	30824.39	120,51	30824	8,21	2	0,0285	0,0446	0,03	0,03	170,15	30824	13,21	3	0,0480	0,0718	0,04	0,05
Transcriptional regulator, PadR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THZ2_MYCVP	20570.68	197,99	20571	14,44	2	0,0732	0,0698	0,04	0,05	172,45	20571	14,44	2	0,0473	0,0706	0,04	0,05

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
GCN5-related N-acetyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBY3_MYCVP	22322.03	106,16	22322	7,43	1	0,0407	0,0294	0,04	0,05	154,55	22322	12,38	2	0,0700	0,0643	0,04	0,05
Luciferase family protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF83_MYCVP	36381.13	246,72	36381	11,52	4	0,0527	0,0823	0,07	0,09	208,74	36381	8,79	3	0,0398	0,0594	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEL0_MYCVP	11755.04	94,02	11755	13,21	1	0,0871	0,0585	0,03	0,03	98,10	11755	13,21	1	0,0921	0,0592	0,04	0,05
Patatin - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T466_MYCVP	37100.29	222,68	37100	11,87	3	0,0367	0,0573	0,04	0,05	247,49	37100	11,87	3	0,0388	0,0580	0,04	0,05
NAD-dependent epimerase/dehydratase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCV4_MYCVP	38174.78	279,25	38175	14,70	4	0,0498	0,0778	0,05	0,07	188,89	38175	10,37	3	0,0377	0,0563	0,04	0,05
IMP dehydrogenase family protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T594_MYCVP	39386.35	216,27	39386	18,44	4	0,0480	0,0750	0,05	0,07	161,99	39386	13,69	3	0,0364	0,0544	0,04	0,05
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGR5_MYCVP	39471.7	471,78	39472	31,56	7	0,1367	0,1507	0,12	0,14	188,47	39472	10,89	3	0,0363	0,0542	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDX3_MYCVP	26123.57	118,97	26124	6,75	1	0,0342	0,0250	0,03	0,03	121,88	26124	10,13	2	0,0362	0,0541	0,04	0,05
Alcohol dehydrogenase GroES domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH77_MYCVP	40115.79	516,50	40116	24,45	7	0,1131	0,1474	0,12	0,16	155,17	40116	10,36	3	0,0356	0,0532	0,04	0,05
NAD-dependent epimerase/dehydratase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3C8_MYCVP	40120.95	318,15	40121	24,45	6	0,0772	0,1206	0,08	0,10	124,72	40121	10,99	3	0,0356	0,0532	0,04	0,05
Citrate synthase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF47_MYCVP	40324.59	128,07	40325	8,20	2	0,0213	0,0333	0,03	0,03	141,60	40325	14,75	3	0,0354	0,0529	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8L5_MYCVP	13329.06	99,58	13329	11,57	1	0,0740	0,0506	0,05	0,07	117,82	13329	11,57	1	0,0343	0,0512	0,04	0,05

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAN4_MYCVP	27774.22	372,19	27774	24,24	4	0,0973	0,1137	0,09	0,12	248,99	27774	14,39	2	0,0541	0,0505	0,04	0,05
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAC1_MYCVP	28667.0	179,59	28667	12,69	2	0,0308	0,0482	0,03	0,03	187,73	28667	14,62	2	0,0521	0,0488	0,04	0,05
M18 family aminopeptidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFE2_MYCVP	44549.45	260,08	44549	13,86	4	0,0416	0,0650	0,07	0,09	216,69	44549	7,67	3	0,0317	0,0473	0,04	0,05
Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8D1_MYCVP	31282.83	150,22	31283	7,39	2	0,0281	0,0439	0,05	0,07	142,36	31283	7,39	2	0,0297	0,0444	0,04	0,05
Putative conserved membrane protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2Z3_MYCVP	47303.83	342,27	47304	13,49	5	0,0504	0,0788	0,08	0,10	151,66	47304	7,67	3	0,0296	0,0443	0,04	0,05
Putative conserved transmembrane protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T270_MYCVP	31466.74	167,90	31467	15,38	3	0,0443	0,0692	0,05	0,07	204,78	31467	10,84	2	0,0295	0,0441	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - M. gilvum PYR-GCK	A4TBD7_9MYCO	47878.93	170,72	47879	6,90	3	0,0277	0,0432	0,04	0,02	166,91	47879	6,90	3	0,0293	0,0437	0,04	0,02
Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9P6_MYCVP	48456.45	288,28	48456	10,91	4	0,0378	0,0591	0,05	0,07	180,86	48456	7,50	3	0,0289	0,0432	0,04	0,05
Superoxide dismutase - M. austroafricanum	Q6QF34_9MYCO	16288.15	100,67	16288	19,59	1	0,0587	0,0411	0,04	0,05	124,07	16288	19,59	1	0,0278	0,0416	0,04	0,05
Aminotransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5F0_MYCVP	50427.5	135,81	50428	8,30	3	0,0261	0,0408	0,04	0,03	177,66	50428	10,04	3	0,0276	0,0413	0,04	0,05
Diacylglycerol kinase, catalytic region - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T605_MYCVP	34041.72	135,04	34042	8,74	2	0,0256	0,0400	0,04	0,05	148,31	34042	8,74	2	0,0271	0,0405	0,04	0,05
Signal transduction histidine-protein kinase/phosphatase mprB - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	MPRB_MYCVP	51928.28	376,11	51928	13,98	6	0,0681	0,0880	0,09	0,12	169,49	51928	8,05	3	0,0268	0,0401	0,04	0,05

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Phosphoesterase, PA-phosphatase related - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T278_MYCVP	52482.83	279,66	52483	12,55	4	0,0346	0,0540	0,05	0,07	133,69	52483	9,05	3	0,0265	0,0396	0,04	0,05
NAD-dependent epimerase/dehydratase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFD4_MYCVP	35464.46	288,12	35464	24,22	5	0,0903	0,1116	0,09	0,12	150,21	35464	7,45	2	0,0259	0,0387	0,04	0,05
Aldehyde dehydrogenase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGN1_MYCVP	54373.26	415,57	54373	14,31	5	0,0533	0,0671	0,13	0,17	252,08	54373	9,31	3	0,0255	0,0381	0,04	0,05
DNA-directed RNA polymerase subunit alpha - <i>Corynebacterium jeikeium</i> (strain K411)	RPOA_CORJK	36794.73	208,72	36795	11,08	3	0,0682	0,0579	0,07	0,00	124,90	36795	7,19	2	0,0392	0,0372	0,04	0,00
NUDIX hydrolase precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T873_MYCVP	37225.59	296,24	37226	18,05	4	0,0512	0,0800	0,07	0,09	154,69	37226	8,58	2	0,0387	0,0367	0,04	0,05
CHAD domain containing protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB47_MYCVP	57096.38	476,58	57096	19,27	6	0,0502	0,0785	0,08	0,10	216,64	57096	11,18	3	0,0242	0,0361	0,04	0,05
DEAD/DEAH box helicase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDJ5_MYCVP	61973.7	1104,39	61974	44,94	19	0,2358	0,3387	0,26	0,29	177,95	61974	6,04	3	0,0221	0,0331	0,04	0,05
DNA gyrase subunit B - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T107_MYCVP	74244.1	172,96	74244	3,41	2	0,0112	0,0175	0,03	0,03	209,03	74244	5,04	3	0,0183	0,0273	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4D2_MYCVP	76478.39	139,10	76478	4,46	2	0,0167	0,0170	0,04	0,05	186,11	76478	6,78	3	0,0177	0,0264	0,04	0,05
GTP-binding protein engA - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	ENGA_MYCVP	50827.64	245,01	50828	16,23	4	0,0358	0,0560	0,05	0,07	138,37	50828	7,79	2	0,0177	0,0264	0,04	0,05
Putative uncharacterized protein - <i>Corynebacterium glutamicum</i> (strain R)	A4QDW3_CORGB	54097.54	273,36	54098	8,55	4	0,0431	0,0521	0,07	0,02	136,77	54098	4,28	2	0,0256	0,0247	0,04	0,02
Serine/threonine protein kinase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T124_MYCVP	66729.15	259,15	66729	10,07	4	0,0264	0,0413	0,05	0,07	140,91	66729	6,93	2	0,0133	0,0198	0,04	0,05

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
DEAD/DEAH box helicase domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAN5_MYCVP	101987.03	440,28	101987	10,03	7	0,0309	0,0483	0,11	0,14	197,31	101987	3,45	3	0,0131	0,0195	0,04	0,05
Acyl-CoA dehydrogenase - <i>M. ulcerans</i> (strain Agy99)	A0PN85_MYCUA	71849.81	132,73	71850	3,37	2	0,0116	0,0181	0,03	0,02	143,56	71850	3,37	2	0,0189	0,0184	0,04	0,04
Malate synthase G - <i>Nocardia farcinica</i>	MASZ_NOCFA	79210.11	188,20	79210	4,03	3	0,0161	0,0252	0,05	0,02	152,69	79210	2,78	2	0,0111	0,0166	0,04	0,04
Condensin subunit Smc - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T740_MYCVP	129506.76	282,37	129507	4,14	5	0,0165	0,0258	0,07	0,09	166,99	129507	2,70	3	0,0102	0,0152	0,04	0,05
DNA-directed RNA polymerase beta subunit - <i>Flavobacteriales bacterium HTCC2170</i>	A4AT69_9FLAO	142511.7	122,80	142512	1,85	2	0,0057	0,0090	0,03	0,02	167,61	142512	1,85	3	0,0092	0,0138	0,04	0,04
Cold-shock DNA-binding protein family - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF67_MYCVP	14952.83	147,97	14953	20,74	2	0,0649	0,1014	0,04	0,05	163,99	14953	20,74	2	0,0686	0,1026	0,03	0,04
Cyclase/dehydrase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAZ2_MYCVP	16013.37	100,07	16013	9,66	1	0,0267	0,0417	0,01	0,02	120,51	16013	15,86	2	0,0631	0,0943	0,03	0,04
Redoxin domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCJ7_MYCVP	17154.88	139,45	17155	19,35	2	0,0551	0,0861	0,03	0,03	162,13	17155	19,35	2	0,0583	0,0872	0,03	0,04
Single-stranded DNA-binding protein - <i>M. ulcerans</i> (strain Agy99)	A0PKH6_MYCUA	17648.73	173,66	17649	18,75	2	0,0535	0,0836	0,04	0,05	167,18	17649	18,75	2	0,0566	0,0846	0,03	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG98_MYCVP	19251.33	147,12	19251	13,71	2	0,0482	0,0753	0,04	0,05	135,81	19251	13,71	2	0,0510	0,0762	0,03	0,04
Transcriptional regulator, TetR family - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T791_MYCVP	19574.26	131,42	19574	12,99	2	0,0473	0,0739	0,03	0,03	129,70	19574	12,99	2	0,0500	0,0748	0,03	0,04
Microcompartments protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGN2_MYCVP	21284.04	123,61	21284	11,62	2	0,0431	0,0673	0,05	0,07	136,41	21284	11,62	2	0,0456	0,0681	0,03	0,04
Putative conserved transmembrane protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7U3_MYCVP	21367.31	136,62	21367	16,49	2	0,0428	0,0669	0,03	0,03	184,15	21367	16,49	2	0,0453	0,0677	0,03	0,04

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
RNA polymerase sigma factor sigK - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	SIGK_MYCVP	21619.14	139,35	21619	13,27	2	0,0423	0,0662	0,04	0,05	137,91	21619	13,27	2	0,0448	0,0669	0,03	0,04
Beta-Ig-H3/fasciclin precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7C3_MYCVP	22395.92	240,83	22396	21,59	2	0,0407	0,0636	0,07	0,09	143,65	22396	23,44	2	0,0430	0,0643	0,03	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2R9_MYCVP	22799.87	104,01	22800	5,80	1	0,0184	0,0288	0,01	0,02	145,69	22800	11,59	2	0,0421	0,0629	0,03	0,04
Transcriptional regulator, TetR family - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAJ5_MYCVP	23268.17	122,65	23268	10,43	2	0,0631	0,0609	0,04	0,05	135,39	23268	10,43	2	0,0412	0,0616	0,03	0,04
Transcriptional regulator, TetR family - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TFH8_9MYCO	25514.21	101,47	25514	6,06	1	0,0164	0,0256	0,01	0,02	170,36	25514	9,96	2	0,0372	0,0556	0,03	0,04
FAD-binding 9, siderophore-interacting domain protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDJ3_MYCVP	26100.43	153,41	26100	8,86	2	0,0342	0,0534	0,03	0,03	162,71	26100	8,86	2	0,0362	0,0541	0,03	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDY1_MYCVP	26415.42	153,49	26415	10,42	2	0,0339	0,0529	0,03	0,03	158,65	26415	10,42	2	0,0358	0,0535	0,03	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH92_MYCVP	26615.09	168,42	26615	17,01	3	0,0539	0,0842	0,04	0,05	157,64	26615	11,62	2	0,0355	0,0531	0,03	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T885_MYCVP	13201.29	98,59	13201	11,67	1	0,0330	0,0516	0,03	0,03	94,35	13201	11,67	1	0,0349	0,0522	0,03	0,04
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T902_MYCVP	27377.4	121,65	27377	12,50	2	0,0325	0,0508	0,03	0,03	128,71	27377	9,27	2	0,0344	0,0514	0,03	0,04
Cobyrinic acid a,c-diamide synthase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T611_MYCVP	28162.93	137,88	28163	10,16	2	0,0315	0,0492	0,03	0,03	162,33	28163	8,98	2	0,0333	0,0498	0,03	0,04
ABC transporter-related protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T300_MYCVP	31880.96	219,11	31881	12,11	3	0,0436	0,0681	0,04	0,05	140,18	31881	8,30	2	0,0291	0,0434	0,03	0,04

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Metallophosphoesterase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGB3_MYCVP	34633.73	97,66	34634	7,01	1	0,0251	0,0186	0,03	0,03	135,76	34634	11,78	2	0,0265	0,0397	0,03	0,04
SMP-30/Gluconolactonase/LRE domain protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAT0_MYCVP	35077.95	379,23	35078	23,27	5	0,0914	0,1129	0,08	0,10	147,75	35078	8,18	2	0,0262	0,0391	0,03	0,04
Luciferase family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2Y6_MYCVP	37509.93	185,33	37510	10,88	3	0,0363	0,0568	0,05	0,07	149,89	37510	8,24	2	0,0244	0,0365	0,03	0,04
Phospholipid/glycerol acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3C9_MYCVP	38757.99	142,65	38758	5,68	2	0,0222	0,0347	0,04	0,05	144,40	38758	5,68	2	0,0235	0,0352	0,03	0,04
ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4I9_MYCVP	39044.07	342,33	39044	13,28	4	0,0635	0,0757	0,07	0,09	134,12	39044	6,50	2	0,0234	0,0349	0,03	0,04
Monooxygenase, FAD-binding - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC37_MYCVP	40506.33	182,94	40506	11,41	3	0,0465	0,0521	0,07	0,09	126,88	40506	7,88	2	0,0225	0,0336	0,03	0,04
Colicin V production protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGA0_MYCVP	40766.69	131,81	40767	6,49	2	0,0330	0,0329	0,04	0,05	123,97	40767	10,34	2	0,0223	0,0333	0,03	0,04
O-succinylhomoserine sulfhydrylase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2X6_MYCVP	43764.32	103,20	43764	4,28	1	0,0195	0,0147	0,03	0,03	132,35	43764	7,05	2	0,0207	0,0309	0,03	0,04
Superoxide dismutase, copper/zinc binding precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T323_MYCVP	23155.2	194,72	23155	12,38	3	0,0635	0,0992	0,04	0,05	141,11	23155	12,38	1	0,0414	0,0287	0,03	0,04
Amine oxidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T687_MYCVP	48125.63	299,58	48126	9,89	4	0,0381	0,0595	0,09	0,12	159,46	48126	4,94	2	0,0187	0,0280	0,03	0,04
Conserved hypothetical proline and alanine rich protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T181_MYCVP	49165.82	106,22	49166	3,59	1	0,0083	0,0130	0,01	0,02	135,06	49166	6,95	2	0,0183	0,0274	0,03	0,04
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1B7_MYCVP	49106.41	232,95	49106	9,19	3	0,0269	0,0420	0,04	0,02	123,23	49106	6,73	2	0,0183	0,0274	0,03	0,04

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Peptidase M1, membrane alanine aminopeptidase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG58_MYCVP	50569.67	153,80	50570	6,75	2	0,0168	0,0262	0,03	0,03	123,51	50570	4,58	2	0,0178	0,0265	0,03	0,04
Glycosyl transferase, group 1 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFS3_MYCVP	51111.74	564,22	51112	25,43	8	0,0960	0,1285	0,12	0,16	134,26	51112	5,17	2	0,0176	0,0262	0,03	0,04
Glycyl-tRNA synthetase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	SYG_MYCVP	53074.58	298,73	53075	12,45	4	0,0341	0,0532	0,05	0,07	131,97	53075	5,81	2	0,0169	0,0252	0,03	0,04
Carboxyl transferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGV4_MYCVP	55847.71	866,87	55848	35,70	11	0,1754	0,1747	0,20	0,26	134,45	55848	4,93	2	0,0160	0,0239	0,03	0,04
AMP-dependent synthetase and ligase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1N1_MYCVP	58953.94	230,91	58954	11,21	4	0,0303	0,0474	0,05	0,07	140,08	58954	5,05	2	0,0151	0,0226	0,03	0,04
Extracellular solute-binding protein, family 5 precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDF9_MYCVP	59078.79	258,39	59079	9,87	4	0,0390	0,0473	0,09	0,12	146,15	59079	5,77	2	0,0151	0,0225	0,03	0,04
Protein-export membrane protein SecD - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T891_MYCVP	61951.94	239,09	61952	7,28	3	0,0209	0,0327	0,05	0,07	176,29	61952	4,09	2	0,0143	0,0214	0,03	0,04
CTP synthase - <i>M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QYQ7_MYCS2	64218.97	150,05	64219	4,80	2	0,0131	0,0204	0,03	0,03	124,64	64219	4,46	2	0,0138	0,0206	0,03	0,04
Proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase, chain L precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T695_MYCVP	65598.49	375,19	65598	10,74	4	0,0270	0,0422	0,07	0,09	195,29	65598	6,71	2	0,0135	0,0202	0,03	0,04
AMP-dependent synthetase and ligase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGV6_MYCVP	68263.78	133,30	68264	4,84	3	0,0189	0,0295	0,04	0,02	123,37	68264	4,35	2	0,0130	0,0194	0,03	0,04
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9P3_MYCVP	37173.51	206,61	37174	13,95	3	0,0367	0,0573	0,05	0,07	112,88	37174	4,75	1	0,0247	0,0176	0,03	0,04
Alpha/beta hydrolase fold precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T567_MYCVP	39006.21	248,55	39006	12,15	3	0,0485	0,0542	0,05	0,07	92,78	39006	4,52	1	0,0234	0,0167	0,03	0,04

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
PE-PGRS family protein precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFR1_MYCVP	42924.24	632,01	42924	32,54	5	0,0710	0,0885	0,16	0,21	95,84	42924	6,15	1	0,0101	0,0152	0,03	0,04
ATP synthase F1, beta subunit - <i>Elusimicrobium minutum</i> Pei191	A9HZ27_9BACT	52636.52	98,92	52637	3,35	1	0,0078	0,0121	0,04	0,05	104,02	52637	3,35	1	0,0170	0,0123	0,03	0,04
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBN7_MYCVP	70697.6	373,60	70698	12,15	5	0,0392	0,0498	0,08	0,09	91,60	70698	2,65	1	0,0125	0,0091	0,03	0,04
Cell divisionFtsK/SpoIIIE precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T261_MYCVP	145791.36	936,87	145791	17,36	15	0,0616	0,0772	0,30	0,33	136,48	145791	2,19	2	0,0059	0,0089	0,03	0,04
Phosphoribosylformylglycinamide synthase 2 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	PURL_MYCVP	80664.58	149,92	80665	2,86	2	0,0103	0,0161	0,03	0,03	108,60	80665	1,50	1	0,0053	0,0080	0,03	0,04
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAP5_MYCVP	6970.22	171,95	6970	33,33	2	0,1728	0,2700	0,07	0,09	96,11	6970	31,75	1	0,0708	0,1057	0,01	0,02
Phosphatidyl-N-methylethanolamine N-methyltransferase / phosphatidylethanolamine N-methyltransferase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9A4_MYCVP	23797.26	116,85	23797	6,94	1	0,0379	0,0275	0,03	0,03	97,14	23797	6,94	1	0,0186	0,0278	0,01	0,02
Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3N2_MYCVP	31820.86	136,31	31821	5,88	1	0,0130	0,0204	0,03	0,03	110,88	31821	5,88	1	0,0138	0,0206	0,01	0,02
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6F9_MYCVP	32481.69	101,71	32482	5,08	1	0,0128	0,0199	0,03	0,03	108,21	32482	5,08	1	0,0135	0,0202	0,01	0,02
Sulfate ABC transporter, ATPase subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBV3_MYCVP	36495.4	224,81	36495	16,76	3	0,0374	0,0585	0,04	0,05	103,58	36495	6,18	1	0,0120	0,0179	0,01	0,02
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3C2_MYCVP	40980.89	93,29	40981	4,84	1	0,0100	0,0157	0,03	0,03	110,95	40981	4,84	1	0,0106	0,0159	0,01	0,02

Description	Accession	MW	ACETATE								2-EHN							
			score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount		score	mass	coverage	#peps	emPAI		SpCount	
							%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques					%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Aminodeoxychorismate lyase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8F0_MYCVP	45106.07	340,76	45106	16,83	5	0,0533	0,0834	0,07	0,09	96,95	45106	3,41	1	0,0096	0,0144	0,01	0,02
Putative uncharacterized protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5H2_MYCVP	46538.4	168,15	46538	5,20	2	0,0183	0,0286	0,04	0,05	97,04	46538	3,31	1	0,0093	0,0139	0,01	0,02
GAF sensor signal transduction histidine kinase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4X9_MYCVP	60624.45	383,78	60624	14,34	5	0,0378	0,0591	0,07	0,09	103,05	60624	3,45	1	0,0071	0,0106	0,01	0,02
Putative feruloyl-CoA synthetase - <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Q6N943_RHOPA	68499.87	98,34	68500	1,77	1	0,0059	0,0093	0,03	0,03	93,80	68500	1,77	1	0,0063	0,0094	0,01	0,02

Table S3 : Proteins found to be specific to 2-EHN or acetate-grown cells.

Proteins were ordered according to their relative abundance (decreasing), calculated on the basis of total spectral counts

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - <i>Frankia sp.</i> (strain Ccl3)	RPOC_FRASC	883,31	143811	9,87	13	143810,9	0,0532	0,0671	0,45	0,00
Cytochrome P450 alkane hydroxylase - <i>M. sp.</i> HXN-1500	Q65A64_9MYCO	881,79	47646	36,26	11	47645,81	0,4338	0,2207	0,34	0,44
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / short chain enoyl-CoA hydratase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF87_MYCVP	1096,51	76177	25,45	14	76176,53	0,1669	0,1616	0,30	0,31
Cytochrome P450 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGJ1_MYCVP	789,50	47228	26,34	10	47228,04	0,2162	0,1951	0,27	0,34
65 kDa heat shock protein - uncultured bacterium	A8DSN4_9BACT	507,15	12411	41,07	5	12410,62	0,6719	0,5117	0,24	0,00
65 kDa heat shock protein - <i>M. sp.</i> WR94	A8DSM0_9MYCO	503,98	12477	46,02	5	12476,5	0,6594	0,5039	0,24	0,02
Alpha-glucan phosphorylases - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TD27_MYCVP	680,32	96940	15,78	11	96939,63	0,0586	0,0876	0,24	0,31
Erythromycin esterase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4X7_MYCVP	849,08	74587	21,68	11	74586,5	0,1114	0,1212	0,22	0,29
Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCG7_MYCVP	641,30	69177	21,18	10	69176,83	0,1113	0,1178	0,22	0,29
50S ribosomal protein L3 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL3_MYCVP	444,29	23031	44,98	6	23031,15	0,3369	0,2583	0,21	0,09
30S ribosomal protein S2 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RS2_MYCVP	617,31	29855	20,66	6	29855,42	0,3079	0,1798	0,21	0,27
Non-ribosomal peptide synthetase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TG57_MYCVP	454,89	139528	7,27	8	139528,4	0,0344	0,0400	0,21	0,27
Pyruvate carboxylase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T730_MYCVP	513,69	122367	8,18	7	122367,4	0,0267	0,0399	0,21	0,27
Glutamate dehydrogenase - <i>M. sp.</i> (strain KMS)	A1UJ73_MYCSK	391,57	176501	4,18	6	176501,1	0,0180	0,0228	0,21	0,02
Dihydrolipoyl dehydrogenase - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4T2Z6_9MYCO	362,08	50233	15,79	6	50232,88	0,0890	0,0926	0,20	0,04
Aconitate hydratase 1 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8Q2_MYCVP	573,19	103098	10,12	8	103097,6	0,0487	0,0562	0,20	0,15
DNA-directed RNA polymerase - <i>Cyanothecce sp.</i> CCY 0110	A3IJL7_9CHRO	294,98	128671	3,42	4	128670,9	0,0214	0,0207	0,20	0,05

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1A7_MYCVP	683,82	29920	45,96	9	29920,33	0,3059	0,3265	0,17	0,22
<i>Metal-dependent hydrolase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1W2_MYCVP	356,87	33041	16,00	5	33040,81	0,1297	0,1234	0,17	0,13
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta - Saccharopolyspora erythraea (strain NRRL 23338)</i>	RPOB_SACEN	520,57	128603	8,13	8	128603,3	0,0377	0,0438	0,17	0,02
<i>2-oxoglutarate decarboxylase - M. leprae</i>	KGD_MYCLE	369,98	136935	5,71	6	136935,2	0,0274	0,0299	0,17	0,00
<i>Elongation factor Tu - M. saskatchewanense</i>	A1C3B7_9MYCO	490,64	23443	27,70	6	23443,21	0,4764	0,2512	0,15	0,00
<i>3-Cys thioredoxin peroxidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T504_MYCVP	383,15	26586	33,20	5	26586,21	0,2176	0,1632	0,15	0,20
<i>Metal-dependent hydrolase - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFH6_9MYCO	355,83	33248	21,52	5	33248,01	0,1285	0,1224	0,15	0,11
<i>Transcription termination factor Rho - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TD72_MYCVP	425,42	72407	12,31	7	72406,52	0,0566	0,0722	0,15	0,13
<i>Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGI9_MYCVP	342,70	41089	16,09	4	41089,42	0,1364	0,0721	0,15	0,20
<i>Heat shock protein Hsp20 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4V8_MYCVP	462,96	15639	39,44	7	15638,9	0,5571	0,6362	0,13	0,16
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCG6_MYCVP	404,94	40989	21,51	5	40988,75	0,0794	0,0945	0,13	0,16
<i>Dihydroxyacid dehydratase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1H4_MYCVP	469,20	58792	17,79	7	58792,09	0,0730	0,0924	0,13	0,16
<i>Propionyl-CoA carboxylase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCG8_MYCVP	327,96	55020	13,20	5	55019,98	0,0556	0,0669	0,13	0,16
<i>Heavy metal translocating P-type ATPase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBG2_MYCVP	282,51	69983	10,06	5	69983,46	0,0420	0,0509	0,13	0,16
<i>DNA topoisomerase I - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TG67_MYCVP	387,65	104437	8,22	6	104437,2	0,0268	0,0401	0,13	0,16
<i>ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit - marine actinobacterium PHSC20C1</i>	A4AFM5_9ACTN	250,34	91054	5,44	4	91054,14	0,0200	0,0299	0,13	0,09
<i>UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4X1_MYCVP	519,05	28129	29,81	8	28129,4	0,1993	0,2978	0,11	0,15

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Two component transcriptional regulator, LuxR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGI8_MYCVP	313,84	23513	37,16	5	23512,67	0,1291	0,1929	0,11	0,15
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFK0_9MYCO	464,61	29172	23,02	5	29172,43	0,1241	0,1448	0,11	0,15
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF54_MYCVP	353,37	40253	17,53	6	40252,56	0,1192	0,1216	0,11	0,15
<i>ABC1 family protein - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QS52_MYCS2	541,35	52314	17,89	7	52314,43	0,0844	0,1065	0,11	0,02
<i>MaoC domain protein dehydratase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1Q7_MYCVP	250,81	30852	21,43	4	30852,3	0,0902	0,1015	0,11	0,15
<i>Translation elongation factor 1A - Acidovorax sp, (strain JS42)</i>	A1W2Q5_ACISJ	475,15	43200	11,48	5	43200,16	0,1082	0,0887	0,11	0,00
<i>Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8M5_MYCVP	293,07	57255	13,08	5	57255,06	0,0530	0,0640	0,11	0,13
<i>Carbamoyl-phosphate synthase L chain, ATP-binding - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFJ0_9MYCO	505,17	70222	16,46	6	70222,09	0,0588	0,0625	0,11	0,15
<i>Heavy metal translocating P-type ATPase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4W9_MYCVP	303,16	80710	9,96	5	80709,65	0,0357	0,0435	0,11	0,15
<i>Aminotransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TH91_MYCVP	212,62	51559	7,02	3	51559,07	0,0270	0,0403	0,11	0,15
<i>Polyphosphate kinase - Nocardia farcinica</i>	Q5YRY4_NOCF A	280,87	80503	6,02	4	80502,66	0,0358	0,0341	0,11	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9B4_MYCVP	329,19	13244	45,00	4	13243,61	0,3045	0,3136	0,10	0,13
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4Y7_MYCVP	229,65	15624	28,87	4	15624,12	0,1655	0,2473	0,10	0,13
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGY8_MYCVP	199,34	14716	30,83	3	14715,56	0,2571	0,1774	0,10	0,13
<i>Elongation factor Tu - Haemophilus influenzae R3021</i>	A4N742_HAEIN	309,56	31308	19,72	4	31307,82	0,1394	0,0993	0,10	0,05
<i>Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	PSD_MYCVP	276,15	24322	28,96	3	24322,14	0,1227	0,0944	0,10	0,13
<i>50S ribosomal protein L17 rplQ - M. tuberculosis (strain F11)</i>	A1QX36_MYCTE	173,16	19463	16,48	2	19463,33	0,0829	0,0752	0,10	0,04
<i>Elongation factor Tu - Propionibacterium acnes</i>	EFTU_PROAC	315,77	44112	13,97	4	44112,37	0,0883	0,0665	0,10	0,00

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Elongation factor Tu - Nocardioïdes sp, (strain BAA-499 / JS614)</i>	EFTU_NOCSJ	276,28	43825	16,08	3	43825,33	0,0892	0,0483	0,10	0,00
<i>4Fe-4S ferredoxin, iron-sulfur binding domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF53_MYCVP	259,45	59113	9,87	4	59112,53	0,0320	0,0478	0,10	0,13
<i>O-acetylhomoserine/O-acetylserine sulfhydrylase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5D4_MYCVP	205,34	47004	11,94	3	47004,12	0,0414	0,0446	0,10	0,13
<i>Glutamine synthetase, type I - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0R079_MYCS2	191,81	53558	9,26	3	53558,34	0,0357	0,0387	0,10	0,05
<i>Carboxyl transferase - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFI9_9MYCO	182,12	57778	7,81	3	57778,48	0,0239	0,0357	0,10	0,13
<i>Aconitase - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TC60_9MYCO	383,76	102214	5,98	5	102213,9	0,0225	0,0336	0,10	0,02
<i>Leucyl-tRNA synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TI06_MYCVP	348,63	107229	6,16	5	107229,4	0,0213	0,0319	0,10	0,13
<i>Beta-ketoacyl synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9T0_MYCVP	352,68	191807	3,50	5	191807,2	0,0115	0,0173	0,10	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9Y6_MYCVP	244,06	21095	42,41	5	21095,46	0,1492	0,2230	0,08	0,11
<i>Methyltransferase type 11 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6R6_MYCVP	408,57	28092	25,49	5	28092,1	0,1014	0,1515	0,08	0,11
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2X8_MYCVP	417,10	30955	23,13	5	30955,42	0,1145	0,1342	0,08	0,11
<i>SPFH domain, Band 7 family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T409_MYCVP	309,04	32967	16,72	5	32966,67	0,1054	0,1239	0,08	0,11
<i>Phospholipid/glycerol acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGX0_MYCVP	256,93	27118	26,02	4	27118,44	0,0794	0,1186	0,08	0,11
<i>50S ribosomal protein L16 - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TEB7_9MYCO	128,11	15732	13,29	2	15731,54	0,0646	0,0966	0,08	0,11
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFI8_9MYCO	340,59	42108	16,71	5	42107,77	0,0613	0,0916	0,08	0,11
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9R9_MYCVP	188,17	25907	13,19	3	25907,28	0,0840	0,0877	0,08	0,11
<i>Adenylosuccinate synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	PURA_MYCVP	330,68	46259	16,43	5	46259,15	0,0548	0,0820	0,08	0,11

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Diacylglycerol O-acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE96_MYCVP	317,06	49643	13,91	5	49643,35	0,0504	0,0753	0,08	0,11
<i>UspA domain protein - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TDL2_9MYCO	204,21	31448	10,18	3	31448,32	0,0662	0,0700	0,08	0,04
<i>Arginine deiminase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4X5_MYCVP	272,83	45677	12,05	4	45677,39	0,0695	0,0639	0,08	0,11
<i>L-aspartate aminotransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2Q7_MYCVP	204,02	47323	13,95	4	47323,47	0,0665	0,0614	0,08	0,11
<i>FAD dependent oxidoreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBJ1_MYCVP	243,95	54109	9,78	4	54109,48	0,0353	0,0528	0,08	0,11
<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase / short chain enoyl-CoA hydratase - M. sp, (strain KMS)</i>	A1ULR2_MYCSK	282,64	76087	8,10	5	76087,38	0,0382	0,0464	0,08	0,04
<i>(P)ppGpp synthetase I, SpoT/RelA - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T895_MYCVP	321,33	87096	8,72	5	87096,4	0,0268	0,0400	0,08	0,07
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4T2A2_9MYCO	222,61	72396	5,47	3	72396,22	0,0256	0,0280	0,08	0,02
<i>Alkylglycerone-phosphate synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBJ3_MYCVP	127,67	55039	5,73	2	55039,13	0,0162	0,0243	0,08	0,11
<i>Putative uncharacterized protein - Corynebacterium glutamicum (strain R)</i>	A4QDG0_CORGB	156,94	83813	5,26	3	83812,73	0,0218	0,0240	0,08	0,04
<i>Thioredoxin - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4T4S4_9MYCO	194,29	11564	36,19	3	11563,89	0,2582	0,2451	0,07	0,04
<i>Thioredoxin - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TI20_MYCVP	194,29	11749	35,85	3	11749,05	0,2544	0,2418	0,07	0,04
<i>Redoxin domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8X0_MYCVP	270,38	16054	24,14	4	16054,16	0,1590	0,2376	0,07	0,09
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9M8_MYCVP	239,75	23199	22,86	4	23198,85	0,0970	0,1450	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T561_MYCVP	336,12	29154	25,91	5	29153,61	0,0969	0,1448	0,07	0,09
<i>Nitroreductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9R7_MYCVP	231,12	26971	20,41	4	26971,33	0,1074	0,1198	0,07	0,09
<i>ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGP2_MYCVP	248,06	28114	21,96	4	28114,11	0,1014	0,1134	0,07	0,09
<i>L-proline dehydrogenase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDQ0_MYCVP	339,58	35414	21,18	5	35414,26	0,0756	0,1129	0,07	0,09

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
Carbon monoxide dehydrogenase subunit G - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFK5_MYCVP	221,87	23742	17,47	3	23741,61	0,1274	0,0976	0,07	0,09
50S ribosomal protein L13 - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RL13_MYCVP	142,12	16254	16,33	2	16253,78	0,1042	0,0927	0,07	0,09
Male sterility C-terminal domain - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEA2_MYCVP	228,09	39165	15,45	4	39165,12	0,0670	0,0764	0,07	0,09
ABC transporter-related protein - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6V2_MYCVP	268,63	30260	15,64	3	30259,74	0,0490	0,0733	0,07	0,09
Glutamate decarboxylase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T565_MYCVP	269,97	51364	11,37	5	51363,63	0,0485	0,0725	0,07	0,09
FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TFL9_9MYCO	224,17	42755	11,51	4	42755,18	0,0601	0,0689	0,07	0,09
Lipolytic enzyme, G-D-S-L family precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TE51_MYCVP	205,46	32989	9,38	3	32988,51	0,0443	0,0663	0,07	0,09
Substrate-binding region of ABC-type glycine betaine transport system precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGR6_MYCVP	194,53	33038	13,67	3	33038,2	0,0443	0,0663	0,07	0,09
ATPase associated with various cellular activities, AAA_3 - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4T5W9_9MYCO	309,57	34334	16,35	3	34334,29	0,0786	0,0633	0,07	0,02
Ribonucleoside-diphosphate reductase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4Y2_MYCVP	360,74	75365	8,03	5	75364,63	0,0314	0,0469	0,07	0,09
Polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7T8_MYCVP	120,59	31603	10,10	2	31603,26	0,0659	0,0439	0,07	0,09
Methylmalonyl-CoA mutase - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8S0_MYCVP	308,52	80142	10,71	5	80141,73	0,0293	0,0438	0,07	0,09
von Willebrand factor, type A - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEM6_MYCVP	201,68	73635	6,58	4	73635,28	0,0251	0,0376	0,07	0,09
Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - <i>M. gilvum</i> PYR-GCK	A4T0T8_9MYCO	261,85	77867	8,35	4	77866,94	0,0303	0,0354	0,07	0,02
Cell division FtsK/SpoIIIE precursor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THQ9_MYCVP	272,99	121831	5,87	5	121831,2	0,0186	0,0278	0,07	0,09
Transcription-repair coupling factor - <i>M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEF0_MYCVP	280,05	130115	4,31	5	130114,8	0,0174	0,0259	0,07	0,05

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>ATP synthase subunit beta - Corynebacterium diphtheriae</i>	<u>ATPB_CORDI</u>	193,35	52229	6,24	2	52228,87	0,0266	0,0256	0,07	0,05
<i>Isoleucyl-tRNA synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T8S6_MYCVP</u>	180,35	122155	3,78	4	122154,5	0,0146	0,0219	0,07	0,09
<i>Phosphoenolpyruvate synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T8E0_MYCVP</u>	287,92	94299	5,37	3	94299,34	0,0193	0,0212	0,07	0,09
<i>Glutamate synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TH13_MYCVP</u>	289,53	163676	3,77	5	163676,3	0,0136	0,0204	0,07	0,09
<i>Lysyl-tRNA synthetase - M. ulcerans (strain Agy99)</i>	<u>A0PP57_MYCUA</u>	208,77	120106	3,11	3	120105,5	0,0149	0,0165	0,07	0,02
<i>ATPase - Algoriphagus sp, PR1</i>	<u>A3HZ66_9SPHI</u>	136,10	93601	1,88	2	93601,23	0,0093	0,0140	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T8W0_MYCVP</u>	319,69	13486	29,51	4	13486,49	0,2047	0,3059	0,06	0,07
<i>LSU ribosomal protein L12P - M. sp, (strain KMS)</i>	<u>A1UBJ1_MYCSK</u>	229,47	13389	27,91	3	13389,07	0,1348	0,2014	0,06	0,04
<i>SSU ribosomal protein S18P - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TGG1_MYCVP</u>	155,60	9435	30,59	2	9435,18	0,1202	0,1795	0,06	0,07
<i>Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TB77_MYCVP</u>	120,12	10645	17,71	2	10645,26	0,1043	0,1559	0,06	0,07
<i>Thiol peroxidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T9C6_MYCVP</u>	215,63	16941	46,10	3	16940,54	0,0989	0,1478	0,06	0,07
<i>Two component transcriptional regulator, LuxR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T511_MYCVP</u>	326,81	22955	23,08	4	22955,24	0,0982	0,1468	0,06	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T276_MYCVP</u>	204,28	17348	26,75	3	17348,36	0,0957	0,1430	0,06	0,07
<i>Transcriptional regulator, TetR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T1X1_MYCVP</u>	202,45	24761	26,67	4	24760,84	0,0888	0,1327	0,06	0,07
<i>Translation elongation factor Ts - M. gilvum PYR-GCK</i>	<u>A4TC66_9MYCO</u>	286,74	28972	19,77	4	28972,24	0,0730	0,1091	0,06	0,00
<i>Elongation factor Ts - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	<u>EFTS_MYCS2</u>	230,66	29388	16,85	4	29387,53	0,0720	0,1076	0,06	0,02
<i>Heat shock protein Hsp20 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TEW5_MYCVP</u>	154,11	16203	15,65	2	16203,14	0,0626	0,0935	0,06	0,07
<i>LppM precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TAY0_MYCVP</u>	157,76	24663	16,07	3	24662,83	0,0622	0,0929	0,06	0,07
<i>RNA polymerase beta-subunit - M. avium</i>	<u>O69042_MYCAV</u>	209,83	25537	18,97	3	25536,86	0,0854	0,0891	0,06	0,04

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Enoyl-CoA hydratase/isomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCG0_MYCVP	182,53	25692	14,59	3	25692,34	0,0593	0,0886	0,06	0,07
<i>LamB/YcsF family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TFZ8_MYCVP	159,54	26488	11,67	3	26487,59	0,0818	0,0856	0,06	0,07
<i>Ribosome-binding factor A - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TCF7_9MYCO	144,19	17826	16,67	2	17826,08	0,0558	0,0834	0,06	0,07
<i>Alpha/beta hydrolase fold - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7V8_MYCVP	223,99	36628	14,54	4	36627,98	0,0553	0,0827	0,06	0,07
<i>Transketolase, central region - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCG2_MYCVP	281,59	38112	15,61	4	38111,53	0,0527	0,0787	0,06	0,07
<i>UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T509_MYCVP	155,21	30991	7,46	3	30991,14	0,0673	0,0712	0,06	0,07
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDW2_MYCVP	208,83	42139	11,49	4	42139,1	0,0469	0,0701	0,06	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8Q3_MYCVP	137,43	21079	13,61	2	21078,85	0,0461	0,0689	0,06	0,07
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T341_MYCVP	236,32	32534	19,32	3	32533,94	0,0635	0,0673	0,06	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4W0_MYCVP	162,37	23296	13,27	2	23296,21	0,0668	0,0616	0,06	0,07
<i>Alcohol dehydrogenase GroES domain protein - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFL6_9MYCO	237,60	38681	16,81	3	38681,48	0,0518	0,0554	0,06	0,07
<i>Acetyl-CoA acetyltransferases - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDW4_MYCVP	236,72	39811	10,25	3	39811,23	0,0359	0,0537	0,06	0,07
<i>RNA polymerase sigma factor SigA - M. ulcerans (strain Agy99)</i>	A0PT58_MYCUA	218,42	54713	6,24	4	54713,41	0,0349	0,0522	0,06	0,07
<i>Transferase hexapeptide repeat containing protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6W0_MYCVP	166,99	27526	9,20	2	27525,61	0,0342	0,0512	0,06	0,07
<i>Elongation factor Tu - Synechococcus sp, (strain WH8102)</i>	EFTU_SYNPX	225,49	43611	7,32	3	43611,04	0,0451	0,0485	0,06	0,00
<i>Succinate dehydrogenase subunit B - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5G5_MYCVP	177,84	28862	7,63	2	28861,52	0,0734	0,0484	0,06	0,07
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6C6_MYCVP	249,48	43896	12,50	3	43895,9	0,0448	0,0481	0,06	0,07

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Putative uncharacterized protein - M. avium (strain 104)</i>	A0QF41_MYCA1	92,76	14618	11,36	1	14617,6	0,0705	0,0467	0,06	0,07
<i>FAD dependent oxidoreductase - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFJ8_9MYCO	300,92	61222	11,33	4	61221,82	0,0308	0,0460	0,06	0,07
Cytochrome P450 alkane hydroxylase - uncultured bacterium	Q33DS7_9BACT	156,40	31692	7,99	2	31692,03	0,0465	0,0438	0,06	0,05
<i>Fumarylacetoacetate - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDQ7_MYCVP	136,14	32537	12,88	2	32536,61	0,0450	0,0425	0,06	0,07
<i>Extracellular solute-binding protein, family 1 precursor - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TAC0_9MYCO	334,35	35756	11,08	2	35756,12	0,0257	0,0383	0,06	0,05
<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, NAD-binding - M. sp, (strain KMS)</i>	A1UD41_MYCSK	222,33	75455	7,59	4	75455,36	0,0245	0,0366	0,06	0,02
<i>Transcriptional regulator, LuxR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2Q9_MYCVP	266,03	87465	6,67	4	87464,91	0,0209	0,0312	0,06	0,07
<i>Elongation factor Tu - Blochmannia floridanus</i>	EFTU_BLOFL	208,31	43447	11,42	2	43447,38	0,0453	0,0311	0,06	0,02
<i>Cytochrome C oxidase - M. ulcerans (strain Agy99)</i>	A0PTM7_MYCUA	98,61	22402	6,90	1	22401,54	0,0199	0,0297	0,06	0,07
<i>Type I site-specific deoxyribonuclease, HsdR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T138_MYCVP	207,91	117716	4,39	4	117716,5	0,0152	0,0227	0,06	0,07
<i>DNA gyrase - M. ulcerans (strain Agy99)</i>	A0PKB7_MYCUA	232,27	92572	4,64	3	92571,72	0,0145	0,0216	0,06	0,00
<i>Aconitate hydratase - Bifidobacterium adolescentis (strain ATCC 15703 / DSM 20083)</i>	A1A2A0_BIFAA	224,66	97975	3,69	3	97975,33	0,0136	0,0204	0,06	0,02
<i>Phosphoenolpyruvate carboxylase - M. sp, (strain KMS)</i>	A1UFP3_MYCSK	170,87	104822	3,36	3	104822,2	0,0127	0,0190	0,06	0,00
<i>Ribonuclease, Rne/Rng family protein - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0R152_MYCS2	181,26	112695	3,42	3	112694,7	0,0118	0,0176	0,06	0,07
<i>Beta-ketoacyl synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9S7_MYCVP	258,66	191467	2,76	4	191467,5	0,0092	0,0137	0,06	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1THQ8_MYCVP	215,35	9032	47,56	3	9031,74	0,2359	0,3525	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBA8_MYCVP	178,66	9502	43,02	3	9501,79	0,2194	0,3279	0,04	0,05
<i>ATP-cone domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7V6_MYCVP	231,46	17299	26,75	3	17298,76	0,0965	0,1442	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T864_MYCVP	179,49	17726	23,60	3	17726,18	0,0935	0,1396	0,04	0,05

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6R8_MYCVP	154,74	11552	20,95	2	11552,06	0,0932	0,1393	0,04	0,05
<i>Molybdenum cofactor synthesis domain - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEL4_MYCVP	186,51	17794	21,12	3	17794,36	0,0927	0,1385	0,04	0,04
<i>Propanediol utilization: dehydratase, small subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGM7_MYCVP	146,40	12602	21,05	2	12602,49	0,0842	0,1258	0,04	0,05
<i>50S ribosomal protein L6 rplF - M. tuberculosis (strain F11)</i>	A1QPE4_MYCTF	148,49	19366	18,75	3	19365,53	0,0835	0,1248	0,04	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7D8_MYCVP	156,01	19866	18,58	3	19865,53	0,0812	0,1213	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4Y3_MYCVP	199,11	21687	11,17	3	21687,38	0,0726	0,1085	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2X4_MYCVP	142,50	15962	13,10	2	15961,84	0,0636	0,0950	0,04	0,05
<i>Phenazine biosynthesis protein PhzF family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7V7_MYCVP	245,86	24965	19,47	3	24964,54	0,0615	0,0919	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGT6_MYCVP	125,72	16712	18,54	2	16711,55	0,0601	0,0899	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4V7_MYCVP	174,84	26303	12,55	3	26302,83	0,0578	0,0864	0,04	0,05
<i>Enoyl-CoA hydratase/isomerase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF14_MYCVP	171,44	26413	15,00	3	26412,68	0,0576	0,0860	0,04	0,05
<i>Phosphoglycerate mutase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3B7_MYCVP	235,26	27391	14,06	3	27391,1	0,0551	0,0823	0,04	0,05
<i>Short chain enoyl-CoA hydratase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE56_MYCVP	139,87	27478	14,06	3	27477,87	0,0548	0,0819	0,04	0,05
<i>ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE79_MYCVP	164,18	27741	16,27	3	27740,53	0,0543	0,0812	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDL0_MYCVP	145,46	19710	13,41	2	19710,18	0,0818	0,0743	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T620_MYCVP	174,57	30903	8,21	3	30903,16	0,0478	0,0715	0,04	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFE4_9MYCO	174,57	30916	8,19	3	30916,16	0,0478	0,0715	0,04	0,02

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>UspA domain protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4Z9_MYCVP	184,52	31418	11,53	3	31418,1	0,0469	0,0700	0,04	0,05
<i>SSU ribosomal protein S3P - Salinispora tropica CNB-440</i>	A4XBP0_9ACTO	167,19	31555	9,09	3	31555,46	0,0467	0,0697	0,04	0,02
<i>Alpha/beta hydrolase fold - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDY4_MYCVP	193,29	32123	13,01	3	32123,39	0,0457	0,0684	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2V6_MYCVP	134,61	25113	9,05	2	25112,6	0,0378	0,0564	0,04	0,05
<i>LexA repressor - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QVY5_MYCS2	174,33	25762	14,10	2	25762,29	0,0590	0,0548	0,04	0,05
<i>2-nitropropane dioxygenase, NPD - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3H1_MYCVP	180,28	39218	8,67	3	39218,16	0,0365	0,0545	0,04	0,05
<i>Sugar-transport integral membrane protein ABC transporter SugB - M. ulcerans (strain Agy99)</i>	A0PVV6_MYCUA	140,34	26125	4,86	2	26125,36	0,0362	0,0541	0,04	0,05
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGN8_MYCVP	142,26	26344	11,72	2	26343,54	0,0576	0,0535	0,04	0,05
<i>DNA polymerase III, beta subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T103_MYCVP	228,01	41527	12,73	3	41526,74	0,0342	0,0511	0,04	0,05
<i>Phosphomethylpyrimidine kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T312_MYCVP	136,33	28942	6,84	2	28941,9	0,0517	0,0484	0,04	0,05
<i>Short chain dehydrogenase - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QZX9_MYCS2	124,65	31109	6,71	2	31109,3	0,0298	0,0446	0,04	0,02
<i>Putative conserved integral membrane protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T800_MYCVP	142,26	48011	6,65	3	48010,53	0,0292	0,0436	0,04	0,05
<i>ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T901_MYCVP	133,92	32034	14,78	2	32033,81	0,0459	0,0433	0,04	0,05
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6C7_MYCVP	210,64	49042	11,30	3	49042,45	0,0285	0,0426	0,04	0,05
<i>OpcA protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8M4_MYCVP	142,70	32599	8,45	2	32599,09	0,0284	0,0425	0,04	0,05
<i>ABC transporter-related protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8N7_MYCVP	156,19	33152	8,52	2	33152,14	0,0279	0,0417	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TC72_MYCVP	155,03	50124	7,25	3	50123,6	0,0279	0,0416	0,04	0,05

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Diacylglycerol O-acyltransferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TC1_MYCVP</u>	191,94	50501	10,68	3	50501,05	0,0276	0,0413	0,04	0,05
<i>GTP1/OBG sub domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TC21_MYCVP</u>	212,79	50623	8,04	3	50623,19	0,0275	0,0411	0,04	0,05
<i>Amine oxidase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T5G0_MYCVP</u>	175,99	52084	9,30	3	52084,02	0,0267	0,0399	0,04	0,04
<i>Carbohydrate kinase, FGGY - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1T8D3_MYCVP</u>	233,68	53420	8,45	3	53420,47	0,0260	0,0388	0,04	0,05
<i>Carboxylesterase, type B - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TAK4_MYCVP</u>	180,27	54934	8,22	3	54934,46	0,0252	0,0377	0,04	0,05
<i>Putative esterase precursor - M. gilvum PYR-GCK</i>	<u>A4T6E3_9MYCO</u>	184,34	37048	9,52	2	37048,3	0,0390	0,0370	0,04	0,02
<i>Elongation factor Tu - Psychromonas ingrahamii (strain 37)</i>	<u>EFTU_PSYIN</u>	199,89	43235	11,45	2	43235,27	0,0210	0,0313	0,04	0,04
<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase/D-alanyl-D-alanine-endopeptidase precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TG51_MYCVP</u>	125,88	47154	4,42	2	47154,48	0,0191	0,0286	0,04	0,05
<i>Cytochrome P450 - Rhodococcus erythropolis (strain PR4)</i>	<u>Q3L987_RHOE4</u>	152,07	48943	6,53	2	48942,92	0,0286	0,0275	0,04	0,04
<i>Adenosylhomocysteinase - Streptomyces rochei (Streptomyces parvullus)</i>	<u>Q83X57_STRRO</u>	144,03	51524	4,27	2	51524,01	0,0174	0,0260	0,04	0,02
<i>Adenosylhomocysteinase - Streptomyces avermitilis</i>	<u>SAHH_STRAW</u>	144,03	52976	4,16	2	52975,71	0,0169	0,0252	0,04	0,02
<i>D-3-phosphoglycerate dehydrogenase - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	<u>A0QUY2_MYCS2</u>	165,27	54325	6,29	2	54325,02	0,0165	0,0246	0,04	0,02
<i>Beta-carotene desaturase/methylase - Saccharopolyspora erythraea (strain NRRL 23338)</i>	<u>A4FES1_SACEN</u>	122,77	55112	5,99	2	55111,51	0,0251	0,0242	0,04	0,04
<i>Mername-AA223 peptidase, Metallo peptidase, MEROPS family M41 precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TG43_MYCVP</u>	153,97	83890	3,81	3	83889,82	0,0160	0,0240	0,04	0,04
<i>(P)ppGpp synthetase I, SpoT/RelA - M. gilvum PYR-GCK</i>	<u>A4TBS1_9MYCO</u>	227,69	87106	5,56	3	87105,53	0,0154	0,0230	0,04	0,02
<i>DNA gyrase subunit A - M. tuberculosis</i>	<u>GYRA_MYCTU</u>	216,00	92204	4,65	3	92203,67	0,0145	0,0217	0,04	0,00
<i>Response regulator receiver protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TCE2_MYCVP</u>	148,09	92303	4,05	3	92303,23	0,0145	0,0217	0,04	0,05
<i>Carbamoyl-phosphate synthase, large subunit - Salinispora arenicola CNS-205</i>	<u>A8LY17_9ACTO</u>	163,81	119100	2,59	3	119100,3	0,0111	0,0166	0,04	0,02

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Peroxidase/catalase - M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TA35_9MYCO	128,39	82227	4,28	2	82227,47	0,0164	0,0160	0,04	0,02
<i>Protein translocase subunit secA 1 - Corynebacterium jeikeium</i> (strain K411)	SECA1_CORJK	141,06	97940	1,46	2	97940,35	0,0136	0,0133	0,04	0,05
<i>AAA ATPase - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4B8_MYCVP	144,67	112118	2,36	2	112118,3	0,0078	0,0116	0,04	0,05
<i>AMP-dependent synthetase and ligase - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T4Z1_MYCVP	91,09	64923	2,37	1	64922,91	0,0067	0,0099	0,04	0,05
<i>Transcription-repair coupling factor - Propionibacterium acnes</i>	Q6AAC2_PROAC	135,70	133895	1,81	2	133895	0,0065	0,0097	0,04	0,00
<i>ATP-dependent helicase HrpA - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH81_MYCVP	126,62	144254	1,91	2	144254,1	0,0060	0,0090	0,04	0,04
<i>Fatty acid synthase, bacterial type - M. sp.</i> (strain KMS)	A1UJA7_MYCSK	126,87	326665	0,94	2	326665	0,0040	0,0039	0,04	0,02
<i>50S ribosomal protein L33 - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGF9_MYCVP	132,30	6584	33,90	2	6583,55	0,1959	0,2927	0,03	0,04
<i>SSU ribosomal protein S14P - M. gilvum</i> PYR-GCK	A4TEC4_9MYCO	126,93	6970	34,92	2	6969,72	0,1828	0,2732	0,03	0,04
<i>Cupin 2, conserved barrel domain protein - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA15_MYCVP	132,16	11994	21,10	2	11994,3	0,0890	0,1330	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T760_MYCVP	138,53	12188	22,73	2	12188,07	0,0880	0,1315	0,03	0,04
<i>Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related, FMN-binding - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAL9_MYCVP	128,23	13980	17,32	2	13980,38	0,0746	0,1114	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFT1_MYCVP	128,26	14020	23,62	2	14020,39	0,0739	0,1104	0,03	0,04
<i>Transcriptional regulator, ArsR family - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7E7_MYCVP	133,62	14319	16,92	2	14319,41	0,0718	0,1073	0,03	0,04
<i>HIT family protein - M. smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0R4K9_MYCS2	135,74	15609	15,60	2	15608,99	0,0652	0,0974	0,03	0,04
<i>3-dehydroquininate dehydratase - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T606_MYCVP	161,34	15648	20,42	2	15648,14	0,0652	0,0974	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6J6_MYCVP	120,22	16012	7,79	2	16012,3	0,0631	0,0943	0,03	0,04
<i>Possible pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase moaB2 - M. bovis</i> (strain BCG / Paris 1173P2)	A1KHC0_MYCBP	120,87	18430	11,38	2	18429,72	0,0535	0,0799	0,03	0,02

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4G7_MYCVP	155,96	19559	11,30	2	19558,8	0,0500	0,0748	0,03	0,04
<i>Adenylate kinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	KAD_MYCVP	174,47	19957	12,71	2	19957,42	0,0491	0,0733	0,03	0,04
<i>Putative conserved membrane protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TB11_MYCVP	133,09	22577	23,90	2	22577,39	0,0426	0,0636	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7D1_MYCVP	138,02	22711	20,39	2	22710,92	0,0423	0,0633	0,03	0,04
<i>Two component transcriptional regulatory protein devr - M. smegmatis (strain ATCC 70084 / mc(2)155)</i>	A0R2V2_MYCS2	162,55	22911	10,58	2	22911,11	0,0419	0,0626	0,03	0,00
<i>Anti-sigma-K factor rskA - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	RSKA_MYCVP	133,85	24407	15,13	2	24406,56	0,0391	0,0584	0,03	0,04
<i>Two component transcriptional regulator, LuxR family - M. sp. (strain KMS)</i>	A1UBU8_MYCSK	148,08	24508	9,91	2	24508,05	0,0389	0,0582	0,03	0,00
<i>Thioredoxin - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8P7_MYCVP	107,92	12906	13,68	1	12906,38	0,0816	0,0531	0,03	0,04
<i>DNA-binding response regulator PhoP - M. smegmatis (strain ATCC 70084 / mc(2)155)</i>	A0R4L1_MYCS2	140,45	26616	12,45	2	26616,04	0,0355	0,0531	0,03	0,04
<i>Undecaprenyl pyrophosphate synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBQ3_MYCVP	122,59	26827	7,82	2	26827,46	0,0352	0,0526	0,03	0,04
<i>Enoyl-CoA hydratase/isomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TFT7_MYCVP	138,64	26962	8,16	2	26961,71	0,0350	0,0523	0,03	0,04
<i>Cof-like hydrolase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGW9_MYCVP	144,23	27829	10,71	2	27829,19	0,0338	0,0505	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4W1_MYCVP	224,54	28899	6,82	2	28898,9	0,0324	0,0484	0,03	0,04
<i>UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T860_MYCVP	123,89	29014	11,03	2	29014,19	0,0322	0,0482	0,03	0,04
<i>UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5F3_MYCVP	120,06	29524	8,80	2	29524,39	0,0317	0,0474	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBT5_MYCVP	121,83	31063	13,83	2	31062,95	0,0300	0,0448	0,03	0,04
<i>UspA domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4X0_MYCVP	158,56	31108	8,56	2	31108,03	0,0298	0,0446	0,03	0,04

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Putative signal-transduction protein with CBS domains - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4Y5_MYCVP	99,75	15222	8,45	1	15221,58	0,0298	0,0445	0,03	0,04
<i>Pyrroline-5-carboxylate reductase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3C5_MYCVP	122,38	31202	8,81	2	31202,13	0,0297	0,0444	0,03	0,04
<i>Alpha/beta hydrolase fold - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFI3_9MYCO	187,99	32673	7,74	2	32673,39	0,0283	0,0423	0,03	0,04
<i>Luciferase family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1R0_MYCVP	143,84	32806	15,44	2	32805,88	0,0282	0,0421	0,03	0,04
<i>Formate/nitrite family of transporters-like protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCK0_MYCVP	173,37	33571	11,80	2	33570,74	0,0275	0,0411	0,03	0,04
<i>Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEX1_MYCVP	158,32	33724	8,17	2	33723,81	0,0274	0,0409	0,03	0,04
<i>Alcohol dehydrogenase, zinc-binding domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8N1_MYCVP	178,68	33888	14,29	2	33887,55	0,0272	0,0407	0,03	0,04
<i>Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4H4_MYCVP	133,01	34207	7,74	2	34206,82	0,0269	0,0402	0,03	0,02
<i>ABC transporter related precursor - M. sp, (strain KMS)</i>	A1UF38_MYCSK	191,90	34445	12,14	2	34444,81	0,0267	0,0399	0,03	0,02
<i>SawC - Streptomyces ansochromogenes</i>	Q6VQ15_9ACTO	125,45	34980	6,62	2	34979,64	0,0263	0,0393	0,03	0,02
<i>Putative uncharacterized protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBU2_MYCVP	156,91	35351	7,08	2	35350,96	0,0260	0,0389	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGY3_MYCVP	128,05	37372	7,08	2	37371,61	0,0245	0,0366	0,03	0,04
<i>Agmatinase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9H7_MYCVP	129,12	38591	7,14	2	38591,01	0,0237	0,0354	0,03	0,04
<i>Peptidase M50 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4Z6_MYCVP	140,18	39861	6,04	2	39861,35	0,0228	0,0341	0,03	0,04
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4TFJ1_9MYCO	141,63	41116	8,04	2	41115,96	0,0221	0,0330	0,03	0,04
<i>ParB-like partition protein - Kineococcus radiotolerans SRS30216</i>	A6WGM6_KINRA	133,33	43952	5,26	2	43951,79	0,0206	0,0308	0,03	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - Rhodococcus sp, (strain RHA1)</i>	Q0SF48_RHOSR	127,90	46920	3,70	2	46920,06	0,0192	0,0287	0,03	0,04
<i>Sensor protein - M. avium (strain 104)</i>	A0QBJ1_MYCA1	145,68	47889	5,06	2	47889,29	0,0188	0,0281	0,03	0,02

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Ab dc SpC total	%Abdc SpC unique s
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCS7_MYCVP	125,82	48247	6,85	2	48247,36	0,0187	0,0279	0,03	0,04
<i>Two component transcriptional regulator, winged helix family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF31_MYCVP	112,52	25083	7,02	1	25083,29	0,0177	0,0264	0,03	0,04
<i>NAD(P) transhydrogenase, alpha subunit - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QZQ3_MYCS2	127,22	52779	5,01	2	52778,95	0,0170	0,0254	0,03	0,02
<i>Major facilitator superfamily MFS_1 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8J8_MYCVP	125,13	54782	5,82	2	54782,1	0,0163	0,0244	0,03	0,04
<i>Sugar ABC transporter, ATP-binding protein, putative - Roseobacter denitrificans (strain ATCC 33942 / OCh 114) (Erythrobacter sp, (strain OCh 114)) (Roseobacter denitrificans)</i>	Q167P0_ROSDO	90,97	27833	5,53	1	27832,65	0,0159	0,0237	0,03	0,04
<i>AMP-dependent synthetase and ligase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6X5_MYCVP	128,13	57322	6,14	2	57321,57	0,0156	0,0232	0,03	0,04
<i>Oxidoreductase alpha - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCA9_MYCVP	125,04	83756	3,81	2	83756,42	0,0105	0,0157	0,03	0,04
<i>Catalytic domain of components of various dehydrogenase complexes - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCG1_MYCVP	98,62	41898	3,88	1	41898,04	0,0217	0,0155	0,03	0,04
<i>Sensor protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TED5_MYCVP	137,72	89961	3,06	2	89961,46	0,0097	0,0145	0,03	0,04
<i>Sugar transporter - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TAR7_MYCVP	105,03	51736	5,11	1	51736,47	0,0173	0,0125	0,03	0,04
<i>Probable acyl-CoA dehydrogenase fadE6 - M. bovis (strain BCG / Paris 1173P2)</i>	A1KF92_MYCBP	121,87	78428	2,67	1	78428,49	0,0112	0,0082	0,03	0,04
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCJ6_MYCVP	93,53	8184	17,57	1	8183,61	0,0589	0,0881	0,01	0,02
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase - Corynebacterium jeikeium (strain K411)</i>	Q4JYC5_CORJK	98,51	18813	9,94	1	18813,18	0,0239	0,0356	0,01	0,02
<i>Superoxide dismutase, copper/zinc binding precursor - M. gilvum PYR-GCK</i>	A4T2T9_9MYCO	115,18	23226	10,13	1	23226,1	0,0191	0,0285	0,01	0,02
<i>Conserved hypothetical integral membrane protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1V6_MYCVP	90,06	25185	6,58	1	25185,25	0,0176	0,0263	0,01	0,02
<i>Two component sensory transduction transcriptional regulatory protein MtrA - M. ulcerans (strain Agy99)</i>	A0PRF1_MYCUA	103,17	25221	8,73	1	25221,4	0,0175	0,0262	0,01	0,02

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC uniques
<i>Transcriptional regulator, TetR family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4Y0_MYCVP	123,35	26660	6,20	1	26659,8	0,0165	0,0247	0,01	0,02
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7E5_MYCVP	110,80	26943	6,97	1	26942,72	0,0164	0,0245	0,01	0,02
<i>Thiazole biosynthesis family protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2Z8_MYCVP	98,25	27132	6,10	1	27132,02	0,0163	0,0243	0,01	0,02
<i>Putative CoA transferase beta subunit - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TFT9_MYCVP	123,61	27253	6,07	1	27252,76	0,0162	0,0242	0,01	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2P0_MYCVP	99,46	27506	4,80	1	27505,91	0,0161	0,0240	0,01	0,02
<i>FeS assembly ATPase SufC - M. smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QX01_MYCS2	136,19	27544	6,80	1	27544,19	0,0160	0,0239	0,01	0,02
<i>Binding-protein-dependent transport systems inner membrane component - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGR3_MYCVP	103,48	27606	7,20	1	27606,05	0,0160	0,0239	0,01	0,02
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBZ6_MYCVP	90,88	28083	4,31	1	28083,28	0,0157	0,0234	0,01	0,02
<i>ABC drug efflux pump, inner membrane subunit, DrrB family - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9S3_MYCVP	95,38	29329	4,14	1	29328,74	0,0150	0,0224	0,01	0,02
<i>Copper resistance D domain protein precursor - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGZ5_MYCVP	95,99	30694	6,81	1	30693,72	0,0143	0,0214	0,01	0,02
<i>Acyl-ACP thioesterase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T388_MYCVP	93,53	31173	4,95	1	31172,69	0,0141	0,0211	0,01	0,02
<i>ABC sulfate/ thiosulfate porter, ATP-binding component - Rhodococcus sp, (strain RHA1)</i>	Q0SH92_RHOSR	103,58	36697	6,31	1	36697,3	0,0119	0,0178	0,01	0,02
<i>Phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide-transferase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	MRAY_MYCVP	92,65	37729	4,68	1	37729,27	0,0116	0,0173	0,01	0,02
<i>ABC transporter related protein - Hoeflea phototrophica DFL-43</i>	A9D7C7_9RHIZ	118,25	38348	6,03	1	38347,78	0,0114	0,0170	0,01	0,02
<i>Major facilitator superfamily MFS_1 - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDS2_MYCVP	106,89	40769	3,24	1	40769,47	0,0107	0,0160	0,01	0,02
<i>3-beta hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE10_MYCVP	96,99	40830	5,66	1	40829,76	0,0107	0,0160	0,01	0,02

2-EHN							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc notre emPAI	%Ab dc SpC total	%Abdc SpC unique s
<i>ABC transporter for sugar ATP-binding protein - Psychromonas ingrahamii (strain 37)</i>	<u>A1SW63_PSYIN</u>	97,97	40968	4,57	1	40968,17	0,0106	0,0159	0,01	0,02
<i>Major facilitator superfamily MFS_1 - M. gilvum PYR-GCK</i>	<u>A4T915_9MYCO</u>	93,49	43634	3,28	1	43634	0,0100	0,0149	0,01	0,02
<i>Methionyl-tRNA synthetase - M. vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	<u>A1TEH6_MYCVP</u>	99,98	57101	2,89	1	57100,88	0,0076	0,0113	0,01	0,02
<i>Putative short-chain dehydrogenase - Pseudomonas aeruginosa (strain UCBPP-PA14)</i>	<u>Q02QF8_PSEAB</u>	94,85	65903	2,17	1	65903,35	0,0065	0,0098	0,01	0,02
<i>Protein translocase subunit secA - Rubrobacter xylanophilus (strain DSM 9941 / NBRC 16129)</i>	<u>SECA_RUBXD</u>	99,02	102781	1,39	1	102781,4	0,0042	0,0062	0,01	0,02

Table S3 : Specific protein identified in acetate membrane protein fraction.
M. means *Mycobacterium*. Lines highlighted in pale yellow showed than bacteria do not belong to *Mycobacterium* genus.

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>ATPase, P-type - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5M7_MYCVP	1215,71	99381	23,74	15	99380.98	0,1602	0,1236	0,38	0,50
<i>DNA-binding protein - Rhodococcus sp. (strain RHA1)</i>	Q0S2G2_RHOSR	270,74	23476	15,02	4	23475.7	0,2509	0,1407	0,36	0,03
<i>Putative translation elongation factor TU - Nocardia farcinica</i>	Q5YPG4_NOCF A	487,35	45684	21,69	6	45683.51	0,2154	0,1027	0,30	0,17
<i>Elongation factor Tu - Mycobacterium ulcerans (strain Agy99)</i>	EFTU_MYCUA	611,78	43779	28,46	8	43778.59	0,1802	0,1571	0,28	0,02
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - Frankia alni (strain ACN14a)</i>	RPOC_FRAAA	963,12	143974	11,24	15	143973.85	0,0583	0,0783	0,28	0,00
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8L0_MYCVP	796,55	36827	44,80	10	36827.16	0,2371	0,2768	0,25	0,22
<i>PhoH family protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBR3_MYCVP	770,56	37783	44,61	10	37782.75	0,3343	0,2659	0,21	0,28
<i>Elongation factor Tu - Mycobacterium agri</i>	A1C3C8_MYCAG	459,28	23643	35,98	6	23643.31	0,3030	0,2449	0,18	0,02
<i>Fructose-1,6-bisphosphatase, class II - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE23_MYCVP	639,08	36011	31,04	9	36010.91	0,2456	0,2436	0,18	0,24
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit alpha - Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	RPOA_MYCS2	649,81	37896	27,91	9	37896.48	0,2260	0,2262	0,18	0,00
<i>Crp-Fnr-like transcriptional regulator - Bacillus cereus</i>	A4GFD9_BACCE	292,04	26030	25,85	4	26030.49	0,0790	0,1234	0,17	0,22
<i>Aminopeptidase Y precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T303_MYCVP	699,92	52242	24,89	9	52242.08	0,1227	0,1458	0,16	0,21

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
Aldehyde dehydrogenase - <i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4TEK1_9MYCO	546,65	54827	23,49	8	54827.49	0,1149	0,1177	0,16	0,02
30S ribosomal protein S2 - <i>Mycobacterium</i> sp. (strain JLS)	RS2_MYCSJ	498,09	31059	14,89	5	31058.97	0,1951	0,1320	0,15	0,19
Methylmalonyl-CoA mutase, beta subunit - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8R9_MYCVP	596,79	64881	26,00	9	64880.62	0,0916	0,1105	0,15	0,19
Excinuclease ABC subunit A - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAD6_MYCVP	649,02	106047	14,52	10	106046.75	0,0498	0,0695	0,15	0,17
ATP synthase subunit beta - <i>Thermobifida fusca</i> (strain YX)	ATPB_THEFY	190,26	52414	6,30	2	52414.16	0,0250	0,0252	0,15	0,05
UspA domain protein - <i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4T9T9_9MYCO	276,12	15192	37,68	4	15191.96	0,1630	0,2547	0,13	0,05
Geranylgeranyl reductase - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6S2_MYCVP	518,83	42660	22,74	7	42659.83	0,1424	0,1361	0,13	0,17
Extracellular solute-binding protein, family 1 precursor - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TH57_MYCVP	676,85	40070	41,67	7	40069.74	0,1340	0,1480	0,13	0,17
Putative uncharacterized protein - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T260_MYCVP	564,83	52597	24,00	8	52597.36	0,1066	0,1240	0,13	0,17
Putative uncharacterized protein - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBY8_MYCVP	756,52	57023	33,01	10	57023.11	0,0957	0,1495	0,13	0,10
Prolyl-tRNA synthetase - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	SYP_MYCVP	629,45	63789	21,24	9	63788.77	0,0827	0,1129	0,13	0,17
Putative ATP-dependent Clp protease - <i>Saccharopolyspora erythraea</i> (strain NRRL 23338)	A4F6T8_SACEN	487,53	94659	7,09	7	94658.67	0,0336	0,0525	0,13	0,02
Drug exporters of the RND superfamily-like protein - <i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4T3R6_9MYCO	396,09	118926	5,64	6	118926.35	0,0302	0,0344	0,13	0,02
DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - <i>Propionibacterium acnes</i>	RPOC_PROAC	427,51	143354	4,60	7	143354.35	0,0213	0,0332	0,13	0,00
ABC transporter related - <i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4TCY5_9MYCO	452,30	45336	19,17	5	45336.1	0,1127	0,0829	0,12	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Leucyl aminopeptidase - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TB19_MYCVP	517,22	52349	23,37	9	52349.22	0,0930	0,1454	0,12	0,16
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TA83_MYCVP	434,20	41980	33,86	7	41980.29	0,0889	0,1389	0,12	0,16
<i>Spfh domain/band 7 family protein, putative - Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QSL1_MYCS2	593,91	54572	23,19	8	54571.78	0,0881	0,1183	0,12	0,02
<i>NADH dehydrogenase I, D subunit - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T6A3_MYCVP	412,92	48697	22,62	7	48696.7	0,0737	0,1152	0,12	0,16
<i>HAD-superfamily hydrolase, subfamily IIB - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T507_MYCVP	244,05	59858	13,79	4	59857.93	0,0674	0,0466	0,12	0,16
<i>ATP synthase beta chain - Bifidobacterium choerinum</i>	Q6RX86_9BIFI	150,58	40721	8,11	2	40720.94	0,0211	0,0330	0,12	0,02
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - Bifidobacterium adolescentis</i> (strain ATCC 15703 / DSM 20083)	RPOC_BIFAA	448,36	148060	4,46	7	148060.09	0,0205	0,0321	0,12	0,00
<i>50S ribosomal protein L3 - Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	RL3_MYCS2	245,02	22958	17,31	3	22958.17	0,1645	0,1004	0,11	0,03
<i>Daunorubicin resistance ABC transporter ATPase subunit - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9S4_MYCVP	438,10	35929	33,74	7	35928.93	0,1318	0,1708	0,11	0,14
<i>Acyl-CoA dehydrogenase, type 2, C-terminal domain - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TFX9_MYCVP	535,05	43112	25,58	8	43111.61	0,1026	0,1604	0,11	0,14
<i>Aminotransferase - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGN0_MYCVP	497,56	47085	22,20	6	47084.89	0,0913	0,0988	0,11	0,14
<i>DEAD/DEAH box helicase domain protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T613_MYCVP	511,13	53716	30,74	8	53715.98	0,0773	0,1207	0,11	0,14
<i>Beta-N-acetylhexosaminidase precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1Q5_MYCVP	342,06	40315	19,21	5	40314.64	0,0766	0,0953	0,11	0,14

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Molybdenum cofactor synthesis domain - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TEK5_MYCVP	379,05	44544	21,04	6	44544.43	0,0677	0,1058	0,11	0,14
<i>30S ribosomal protein S1 - Mycobacterium leprae</i>	RS1_MYCLE	385,87	53246	17,15	6	53246.43	0,0660	0,0853	0,11	0,02
<i>60 kDa inner membrane insertion protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TI27_MYCVP	181,89	41196	10,16	3	41196.4	0,0594	0,0510	0,11	0,14
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - Tropheryma whipplei</i> (strain Twist) (Whipple's bacillus)	RPOC_TROWT	289,93	142489	3,78	5	142489.21	0,0149	0,0233	0,11	0,00
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit beta' - Synechocystis sp.</i> (strain PCC 6803)	RPOC2_SYNY3	272,63	144688	3,04	4	144688.01	0,0147	0,0181	0,11	0,03
<i>UbiA prenyltransferase - Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4T6E6_9MYCO	352,49	33284	19,21	5	33283.89	0,0983	0,1209	0,09	0,03
<i>Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBB2_MYCVP	448,61	40494	21,07	6	40494.28	0,0933	0,1193	0,09	0,12
<i>Beta-ketoacyl synthase precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TBI8_MYCVP	438,83	43550	23,80	6	43549.78	0,0848	0,1088	0,09	0,12
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7U4_MYCVP	428,24	50637	19,35	7	50636.7	0,0701	0,1095	0,09	0,12
<i>ABC-1 domain protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T632_MYCVP	329,68	49100	12,11	4	49100.46	0,0601	0,0581	0,09	0,12
<i>Elongation factor Tu - Brevibacterium linens</i>	EFTU_BRELN	152,65	43758	11,34	2	43758.37	0,0553	0,0305	0,09	0,05
<i>ABC transporter-related protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCE7_MYCVP	333,93	61887	12,99	5	61886.92	0,0550	0,0578	0,09	0,12
<i>60 kDa chaperonin - Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4TEN6_9MYCO	386,66	55992	18,47	6	55991.52	0,0514	0,0803	0,09	0,02
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9K0_MYCVP	358,17	70031	12,35	6	70031.28	0,0475	0,0620	0,09	0,12

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Drug exporters of the RND superfamily-like protein - Mycobacterium sp. (strain JLS)</i>	A3PSU6_MYCSJ	255,47	117203	3,76	4	117202.84	0,0224	0,0226	0,09	0,07
<i>Cell division FtsK/SpoIIIE precursor - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1U9U1_MYCSK	334,83	144977	4,94	5	144976.78	0,0210	0,0229	0,09	0,05
<i>2-oxoglutarate decarboxylase - Mycobacterium paratuberculosis</i>	KGD_MYCPA	375,44	136988	4,42	6	136988.03	0,0189	0,0295	0,09	0,00
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3V2_MYCVP	337,11	32706	25,59	5	32705.78	0,1005	0,1235	0,08	0,10
<i>ABC transporter-related protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TH54_MYCVP	343,29	35993	26,10	5	35992.97	0,0885	0,1095	0,08	0,10
<i>Dihydroorotate dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	PYRD_MYCVP	372,46	36782	22,95	5	36781.65	0,0861	0,1066	0,08	0,10
<i>TrkA-N domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T626_MYCVP	358,14	39187	23,31	6	39186.76	0,0794	0,1240	0,08	0,10
<i>NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5C9_MYCVP	390,78	43430	20,15	6	43430.28	0,0699	0,1092	0,08	0,10
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBW3_MYCVP	196,29	22724	20,39	3	22723.75	0,0650	0,1016	0,08	0,10
<i>Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDB1_MYCVP	320,47	46783	14,82	5	46782.6	0,0638	0,0799	0,08	0,10
<i>Spermidine/putrescine import ATP-binding protein potA - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	POTA_MYCVP	341,13	40686	17,07	4	40685.82	0,0604	0,0722	0,08	0,10
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6Z2_MYCVP	391,59	50017	18,06	6	50016.94	0,0588	0,0920	0,08	0,10
<i>NAD(P) transhydrogenase, alpha subunit - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1U921_MYCSK	404,52	52153	16,03	5	52152.68	0,0560	0,0704	0,08	0,02
<i>Short-chain dehydrogenase/reductase SDR - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TB20_MYCVP	337,24	56307	11,94	5	56307.11	0,0511	0,0644	0,08	0,10

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGJ8_MYCVP	257,32	48813	17,16	5	48813.02	0,0487	0,0760	0,08	0,10
<i>Polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGP1_MYCVP	326,91	53819	14,31	5	53818.51	0,0434	0,0679	0,08	0,10
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1N7_MYCVP	368,41	66704	10,80	5	66703.87	0,0420	0,0532	0,08	0,05
<i>Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit - Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QPJ3_MYCS2	339,95	70012	9,12	6	70012.24	0,0397	0,0620	0,08	0,03
<i>Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit - Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0R052_MYCS2	244,02	60171	5,85	4	60171.48	0,0296	0,0463	0,08	0,05
<i>Cytochrome-c oxidase - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGS5_MYCVP	214,13	65041	6,60	4	65040.55	0,0272	0,0426	0,08	0,03
<i>Transcription termination factor Rho - Mycobacterium sp.</i> (strain KMS)	A1UK01_MYCSK	181,97	71374	5,56	3	71374.46	0,0246	0,0281	0,08	0,10
<i>ATP synthase subunit alpha - Mycoplasma genitalium</i>	ATPA_MYCGE	128,75	57180	4,62	2	57180.02	0,0228	0,0230	0,08	0,03
<i>Ribonuclease, Rne/Rng family - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TC24_MYCVP	268,76	104856	5,56	4	104856.22	0,0163	0,0254	0,08	0,05
<i>Conserved domain protein - Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0R5E1_MYCS2	133,15	7343	25,76	2	7342.61	0,3073	0,2478	0,07	0,09
<i>Putative export or membrane protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8G9_MYCVP	183,04	18257	25,45	3	18256.87	0,1255	0,1327	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7H5_MYCVP	296,67	18818	34,50	4	18817.91	0,1205	0,1883	0,07	0,09
<i>Rieske - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5G1_MYCVP	306,51	36080	22,94	4	36079.57	0,0698	0,0829	0,07	0,09

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Putative uncharacterized protein MLCB268.12c - Mycobacterium leprae</i>	O69562_MYCLE	107,32	14605	11,36	1	14604.54	0,0666	0,0461	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TG50_MYCVP	371,82	39043	15,82	5	39043.47	0,0635	0,0992	0,07	0,09
<i>Radical SAM enzyme, Cfr family - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T787_MYCVP	304,38	39702	18,89	5	39702.49	0,0622	0,0972	0,07	0,09
<i>UspA domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5M8_MYCVP	185,16	32819	13,42	3	32818.5	0,0595	0,0660	0,07	0,09
<i>Fibronectin-attachment family protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9M7_MYCVP	198,82	34911	15,46	3	34910.8	0,0553	0,0615	0,07	0,09
<i>Histidyl-tRNA synthetase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	SYH_MYCVP	289,11	45332	16,02	5	45332.26	0,0530	0,0829	0,07	0,09
<i>CBS domain containing protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBR1_MYCVP	307,94	46747	16,67	5	46746.6	0,0511	0,0799	0,07	0,09
<i>Isocitrate lyase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T389_MYCVP	292,39	46931	17,99	5	46931.42	0,0510	0,0796	0,07	0,09
<i>LppZ precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6Y4_MYCVP	221,07	37569	13,20	3	37569.06	0,0507	0,0566	0,07	0,09
<i>PDZ/DHR/GLGF precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T635_MYCVP	222,99	37618	14,08	4	37618.39	0,0507	0,0792	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEK3_MYCVP	180,36	40291	9,56	3	40290.8	0,0468	0,0524	0,07	0,09
<i>Virulence factor Mce family protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDX5_MYCVP	322,04	40854	12,67	4	40854.18	0,0459	0,0717	0,07	0,09
<i>Luciferase family protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6E5_MYCVP	239,67	42158	13,58	4	42158.2	0,0444	0,0693	0,07	0,09
<i>Elongation factor Tu - Nitrobacter hamburgensis (strain X14 / DSM 10229)</i>	EFTU_NITHX	137,18	43154	7,14	2	43154.24	0,0432	0,0310	0,07	0,03

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Phosphopantothenoylcysteine decarboxylase / Phosphopantothenate-cysteine ligase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8H6_MYCVP	230,68	43170	11,68	4	43169.62	0,0432	0,0675	0,07	0,09
<i>Sugar transferase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T775_MYCVP	275,24	55729	11,86	5	55728.64	0,0417	0,0651	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0R101_MYCS2	378,91	59681	12,73	5	59680.65	0,0386	0,0603	0,07	0,02
<i>Virulence factor Mce family protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDX6_MYCVP	299,11	47638	12,47	4	47637.77	0,0385	0,0601	0,07	0,09
<i>Sensor protein - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4TE03_9MYCO	267,17	48743	11,29	4	48743.41	0,0375	0,0586	0,07	0,02
<i>NAD(P) transhydrogenase, beta subunit precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1C0_MYCVP	360,11	49794	14,25	4	49794.2	0,0366	0,0573	0,07	0,09
<i>Oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase subunit - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDF8_MYCVP	259,28	65614	12,58	5	65613.86	0,0346	0,0541	0,07	0,09
<i>RNA polymerase sigma factor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7X4_MYCVP	272,32	52414	10,50	4	52413.71	0,0346	0,0540	0,07	0,09
<i>Polar amino acid ABC transporter, inner membrane subunit precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE78_MYCVP	232,45	53463	12,96	4	53462.96	0,0338	0,0529	0,07	0,09
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T221_9MYCO	125,70	28072	9,41	2	28072.16	0,0317	0,0495	0,07	0,09
<i>Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4U6_MYCVP	285,78	57373	15,55	4	57373.38	0,0313	0,0489	0,07	0,09
<i>Catalase - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4TA40_9MYCO	210,67	77369	6,40	4	77369.45	0,0288	0,0352	0,07	0,00
<i>Cytochrome-c oxidase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6U7_MYCVP	249,52	64691	6,29	4	64691.34	0,0274	0,0428	0,07	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
Serine/threonine protein kinase - <i>Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4T164_MYCO	351,39	83295	6,34	5	83294.53	0,0266	0,0415	0,07	0,02
Dihydrolipoyl dehydrogenase - <i>Mycobacterium</i> sp. (strain KMS)	A1UAK2_MYCSK	186,91	49915	7,51	3	49915.48	0,0264	0,0413	0,07	0,02
Peptidase S1 and S6, chymotrypsin/Hap - <i>Mycobacterium</i> sp. (strain KMS)	A1UKA0_MYCSK	211,88	51732	9,36	3	51731.59	0,0254	0,0397	0,07	0,02
Carbamoylphosphate synthetase large chain - <i>Janibacter</i> sp. HTCC2649	A3TLQ0_9MICO	170,18	118970	2,78	3	118969.6	0,0181	0,0164	0,07	0,03
FAD dependent oxidoreductase - <i>Mycobacterium</i> sp. (strain KMS)	A1U9W8_MYCSK	135,25	53668	5,22	2	53668.04	0,0158	0,0246	0,07	0,07
Protein translocase subunit secA - <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (strain NCPPB 382)	SECA_CLAM3	147,64	104502	2,32	3	104502.3	0,0120	0,0188	0,07	0,05
30S ribosomal protein S15 - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	RS15_MYCVP	176,62	10396	55,32	4	10395.77	0,2922	0,4566	0,05	0,03
LemA family protein precursor - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T8J3_MYCVP	246,18	19448	22,16	3	19448.41	0,1150	0,1224	0,05	0,07
Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase-related, FMN-binding - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TF84_MYCVP	164,36	15565	23,40	3	15565.02	0,1039	0,1624	0,05	0,07
Putative uncharacterized protein - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDI2_MYCVP	136,91	16789	23,68	2	16788.89	0,0943	0,0881	0,05	0,07
Menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	UBIE_MYCVP	281,81	24431	21,15	4	24431.47	0,0854	0,1334	0,05	0,07
Redoxin domain protein precursor - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T3F4_MYCVP	141,31	21663	14,29	2	21662.93	0,0686	0,0658	0,05	0,03
MaoC domain protein dehydratase - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5B0_MYCVP	262,98	30225	18,98	3	30225.35	0,0656	0,0724	0,05	0,07
Transcriptional regulator, MarR family - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TI02_MYCVP	149,84	16030	14,48	2	16029.71	0,0596	0,0931	0,05	0,07

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Delta-aminolevulinic acid dehydratase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3D5_MYCVP	234,29	34914	12,30	4	34913.5	0,0553	0,0863	0,05	0,07
<i>Chromosome segregation DNA-binding protein precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T4T1_9MYCO	212,41	35515	13,98	4	35514.78	0,0542	0,0847	0,05	0,07
<i>Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEX0_MYCVP	251,06	35671	15,12	4	35670.68	0,0538	0,0841	0,05	0,07
<i>Cell division protein FtsZ - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TAW5_MYCVP	323,07	39152	16,06	4	39151.94	0,0483	0,0755	0,05	0,07
<i>Chaperone protein DnaJ - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2S5_MYCVP	313,32	41216	16,18	4	41215.79	0,0455	0,0710	0,05	0,07
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5U2_MYCVP	264,54	41520	13,95	4	41519.84	0,0450	0,0704	0,05	0,07
<i>Flavodoxin/nitric oxide synthase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6Z1_MYCVP	136,59	20900	11,58	2	20900.45	0,0439	0,0685	0,05	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T271_MYCVP	275,66	44233	13,18	4	44233.36	0,0419	0,0655	0,05	0,07
<i>Histidine kinase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5M6_MYCVP	190,03	33156	10,39	3	33155.5	0,0417	0,0652	0,05	0,07
<i>Dihydroorotase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8G8_MYCVP	272,61	46591	17,67	4	46590.75	0,0395	0,0618	0,05	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGX5_MYCVP	269,78	47791	13,59	4	47790.74	0,0384	0,0600	0,05	0,07
<i>DNA-directed RNA polymerase subunit alpha - Corynebacterium diphtheriae</i>	RPOA_CORDI	137,47	36951	6,87	2	36950.87	0,0369	0,0367	0,05	0,00
<i>Pyruvate kinase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8Y1_MYCVP	236,91	50938	12,31	4	50937.56	0,0357	0,0559	0,05	0,07
<i>LpqM precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TD26_MYCVP	150,96	50952	7,31	2	50951.55	0,0357	0,0260	0,05	0,07
<i>Virulence factor Mce family protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDX9_MYCVP	222,51	51228	15,91	4	51227.69	0,0355	0,0555	0,05	0,07

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>NAD(P) transhydrogenase, alpha subunit - Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QNN8_MYCS2	222,66	52674	8,58	3	52673.9	0,0344	0,0390	0,05	0,02
<i>Monooxygenase, FAD-binding - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T367_MYCVP	191,19	53794	10,63	4	53793.81	0,0336	0,0525	0,05	0,07
<i>RNA polymerase sigma factor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4TCR0_9MYCO	237,86	53943	8,98	4	53943.42	0,0335	0,0524	0,05	0,07
<i>Adenosylhomocysteinase - Mycobacterium leprae</i>	SAHH_MYCLE	275,40	53952	9,39	4	53952.37	0,0334	0,0523	0,05	0,02
<i>Adenosylhomocysteinase - Rhodococcus sp. (strain RHA1)</i>	Q0S2Y7_RHOSR	177,28	54077	6,72	3	54077.47	0,0334	0,0378	0,05	0,02
<i>Glutamine-hydrolyzing GMP synthase - Mycobacterium avium (strain 104)</i>	A0QKP5_MYCA1	196,93	54317	7,10	4	54317.37	0,0332	0,0519	0,05	0,07
<i>DNA-directed RNA polymerase, alpha subunit - Frankia sp. EAN1pec</i>	A8LB05_9ACTO	159,75	40815	7,01	2	40814.84	0,0330	0,0329	0,05	0,03
<i>FMN-dependent alpha-hydroxy acid dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T770_MYCVP	164,43	41239	9,92	3	41238.9	0,0326	0,0510	0,05	0,07
<i>FAD dependent oxidoreductase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T688_MYCVP	279,74	57220	11,15	4	57220.15	0,0314	0,0490	0,05	0,07
<i>Extracellular solute-binding protein, family 5 precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T893_MYCVP	222,61	57361	6,55	3	57360.72	0,0313	0,0355	0,05	0,07
<i>Uroporphyrinogen-III C-methyltransferase / uroporphyrinogen-III synthase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3D4_MYCVP	282,86	59764	13,18	4	59763.55	0,0299	0,0467	0,05	0,07
<i>Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T269_MYCVP	226,47	45267	9,25	3	45267.13	0,0295	0,0460	0,05	0,07
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TFR5_MYCVP	172,94	65099	8,97	3	65099.29	0,0272	0,0310	0,05	0,07
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T3U2_9MYCO	198,60	66617	6,94	3	66616.88	0,0265	0,0302	0,05	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Cytochrome P450 - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3E6_MYCVP	172,42	50063	6,81	3	50062.93	0,0263	0,0411	0,05	0,07
<i>PTS system, mannitol-specific IIC subunit - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGQ4_MYCVP	230,12	68429	10,93	4	68428.74	0,0257	0,0402	0,05	0,07
<i>Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8Y6_MYCVP	127,64	37768	7,29	2	37768.33	0,0229	0,0357	0,05	0,07
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium sp. (strain JLS)</i>	A3PV37_MYCSJ	191,28	62745	4,56	2	62745.2	0,0206	0,0209	0,05	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5Q9_MYCVP	191,28	65921	4,34	2	65921.4	0,0196	0,0199	0,05	0,02
<i>Putative transcriptional regulator, Crp/Fnr family - Bacillus cereus subsp. cytotoxis (strain NVH 391-98)</i>	A7GU02_BACCN	115,95	26017	4,66	1	26016.69	0,0160	0,0251	0,05	0,07
<i>ATPase, P-type - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5N0_MYCVP	196,57	152876	2,81	4	152876.04	0,0109	0,0171	0,05	0,07
<i>ATPase AAA-2 - Rubrobacter xylanophilus (strain DSM 9941 / NBRC 16129)</i>	Q1AU05_RUBXD	122,14	93792	2,70	2	93792.39	0,0088	0,0138	0,05	0,00
<i>30S ribosomal protein S15 - Mycobacterium sp. (strain JLS)</i>	RS15_MYCSJ	135,00	10384	45,74	3	10383.73	0,1817	0,2840	0,04	0,02
<i>Transcriptional repressor, CopY family - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBE1_MYCVP	162,49	18647	19,53	3	18647.35	0,0830	0,1298	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEV9_MYCVP	121,32	12546	14,04	1	12546.28	0,0796	0,0540	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEM5_MYCVP	191,24	21027	18,32	3	21026.8	0,0713	0,1114	0,04	0,05
<i>Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T356_9MYCO	146,87	21741	14,72	2	21740.91	0,0686	0,0658	0,04	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Methyltransferase type 12 - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDU6_MYCVP	188,26	23108	14,76	3	23107.88	0,0635	0,0992	0,04	0,05
<i>Putative signal-transduction protein with CBS domains - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7J4_MYCVP	136,04	16698	19,87	2	16698.49	0,0568	0,0888	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TFJ7_MYCVP	154,40	25627	13,36	3	25627.45	0,0563	0,0880	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCC6_MYCVP	242,55	27901	16,60	3	27900.56	0,0509	0,0795	0,04	0,05
<i>Succinate dehydrogenase subunit D - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5G7_MYCVP	132,11	18697	12,43	2	18697.46	0,0499	0,0779	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TC29_MYCVP	121,28	18799	15,29	2	18798.85	0,0495	0,0774	0,04	0,05
<i>Transcriptional regulator, TetR family - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5C8_MYCVP	122,97	20124	13,74	2	20124.44	0,0458	0,0716	0,04	0,05
<i>Signal peptidase I. Serine peptidase. MEROPS family S26A - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T758_MYCVP	200,51	30585	16,91	3	30585.13	0,0458	0,0715	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1E3_MYCVP	134,96	20237	13,11	2	20237.35	0,0455	0,0711	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDB3_MYCVP	228,45	31038	14,14	3	31038.08	0,0450	0,0703	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCK9_MYCVP	217,77	31792	11,76	3	31791.71	0,0437	0,0684	0,04	0,05
<i>ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit ClpP / ClpP2 peptidase. Serine peptidase. MEROPS family S14 - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCB6_MYCVP	124,69	23445	9,86	2	23445.05	0,0385	0,0602	0,04	0,05
<i>Cutinase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGV7_MYCVP	238,80	35579	17,03	3	35579.3	0,0385	0,0602	0,04	0,05

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Aspartate semialdehyde dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGG9_MYCVP	219,02	35669	12,79	3	35668.64	0,0384	0,0600	0,04	0,05
<i>Extracellular solute-binding protein, family 3 precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2Z2_MYCVP	190,51	35680	10,49	3	35679.56	0,0384	0,0600	0,04	0,05
<i>Glycerol-3-phosphate dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3T3_MYCVP	154,88	36031	14,37	3	36031.24	0,0380	0,0593	0,04	0,05
<i>Methyltransferase type 11 - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6V5_MYCVP	180,59	37654	10,23	3	37654.02	0,0361	0,0564	0,04	0,05
<i>Alcohol dehydrogenase, zinc-binding domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBJ9_MYCVP	217,05	38185	14,70	3	38185.24	0,0355	0,0555	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3F8_MYCVP	137,30	38361	8,91	3	38360.59	0,0354	0,0553	0,04	0,05
<i>Ferredoxin - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5Y9_MYCVP	168,78	40940	10,22	3	40939.96	0,0329	0,0514	0,04	0,05
<i>Acetyl-CoA acetyltransferases - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TD32_MYCVP	195,91	41162	12,30	3	41162.05	0,0327	0,0511	0,04	0,05
<i>(Uracil-5)-methyltransferase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7Y8_MYCVP	190,74	41700	10,29	3	41700.11	0,0322	0,0504	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T765_MYCVP	191,12	27844	11,86	2	27843.78	0,0319	0,0499	0,04	0,05
<i>Lycopene cyclase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1THM8_MYCVP	146,71	42586	7,77	3	42585.8	0,0315	0,0492	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2V9_MYCVP	194,28	28221	11,72	2	28220.82	0,0314	0,0490	0,04	0,05
<i>Acyl-CoA dehydrogenase domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T242_MYCVP	154,33	42977	7,44	2	42976.71	0,0311	0,0311	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T3V5_9MYCO	193,80	43354	10,41	3	43353.65	0,0309	0,0482	0,04	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGP7_MYCVP	94,10	14859	11,85	1	14859.2	0,0290	0,0454	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T5W8_9MYCO	181,22	47157	7,71	3	47156.58	0,0282	0,0440	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGC6_MYCVP	197,90	47282	8,39	3	47281.65	0,0281	0,0439	0,04	0,05
<i>Virulence factor Mce family protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDX7_MYCVP	165,49	47351	8,14	3	47350.59	0,0280	0,0438	0,04	0,05
<i>UDP-glucose 6-dehydrogenase - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1UBF4_MYCSK	130,17	47502	6,50	2	47501.66	0,0279	0,0280	0,04	0,05
<i>AcyI-CoA dehydrogenase domain protein - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1U918_MYCSK	198,39	48112	9,15	3	48112.12	0,0275	0,0430	0,04	0,02
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8N0_MYCVP	210,61	48357	9,57	3	48357.42	0,0274	0,0428	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8N0_MYCVP	210,61	48357	9,57	3	48357.42	0,0274	0,0428	0,04	0,05
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TA12_MYCVP	186,77	33040	9,67	2	33039.5	0,0265	0,0413	0,04	0,05
<i>Amidase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T777_MYCVP	206,27	50418	8,73	3	50418.1	0,0261	0,0408	0,04	0,05
<i>FHA domain containing protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T130_MYCVP	132,41	50479	5,13	2	50478.98	0,0261	0,0263	0,04	0,05
<i>FHA domain containing protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T130_MYCVP	132,41	50479	5,13	2	50478.98	0,0261	0,0263	0,04	0,05
<i>Trigger factor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	TIG_MYCVP	231,16	51623	13,01	3	51623.09	0,0255	0,0398	0,04	0,05

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>FAD linked oxidase domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGJ7_MYCVP	146,12	52460	6,09	3	52459.69	0,0250	0,0391	0,04	0,05
<i>Lipopolysaccharide biosynthesis precursor - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1UBH0_MYCSK	120,86	52984	8,11	2	52983.58	0,0248	0,0249	0,04	0,02
<i>Glutamyl-tRNA synthetase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	SYE_MYCVP	205,44	54391	9,31	3	54390.97	0,0240	0,0376	0,04	0,05
<i>Glutamyl-tRNA synthetase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	SYE_MYCVP	205,44	54391	9,31	3	54390.97	0,0240	0,0376	0,04	0,05
<i>ABC transporter branched chain amino acid transport permease - Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	A0QXC1_MYCS2	97,22	36947	4,78	1	36947.1	0,0235	0,0175	0,04	0,05
<i>FAD-dependent pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T309_MYCVP	274,58	55976	8,66	3	55976.36	0,0233	0,0365	0,04	0,05
<i>Cyclohexanone monooxygenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9Q6_MYCVP	245,99	56121	7,25	3	56121.17	0,0233	0,0364	0,04	0,05
<i>Ferredoxin-dependent glutamate synthase precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T4D0_9MYCO	162,40	57466	8,62	3	57465.65	0,0227	0,0355	0,04	0,02
<i>Ferredoxin-dependent glutamate synthase precursor - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1UP50_MYCSK	168,08	57824	6,67	3	57823.56	0,0226	0,0352	0,04	0,02
<i>Conserved hypothetical proline and threonine rich protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T2R0_MYCVP	161,26	60446	6,19	3	60445.86	0,0215	0,0336	0,04	0,05
<i>Cold-shock DEAD box protein A homolog - Mycobacterium tuberculosis</i>	DEAD_MYCTU	206,31	61415	7,35	3	61414.6	0,0211	0,0330	0,04	0,00
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4TF39_9MYCO	144,85	62167	3,72	2	62166.8	0,0208	0,0211	0,04	0,02
<i>Probable cobalamin synthesis protein - Rhodococcus sp. (strain RHA1)</i>	Q0S573_RHOSR	158,04	41586	8,20	2	41586.41	0,0207	0,0323	0,04	0,03
<i>Succinate dehydrogenase - Rhodococcus ruber</i>	Q8KLT8_9NOCA	102,22	43172	3,57	1	43171.85	0,0199	0,0149	0,04	0,05
<i>Translation elongation factor Tu - Renibacterium salmoninarum ATCC 33209</i>	A9WSW5_RENSA	128,66	43680	7,05	2	43680.28	0,0196	0,0306	0,04	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T9I8_MYCVP	198,27	66507	9,44	3	66507.33	0,0194	0,0303	0,04	0,05
<i>AAA ATPase, central domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T259_MYCVP	192,88	67480	5,87	3	67479.52	0,0191	0,0299	0,04	0,05
<i>AMP-dependent synthetase and ligase - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T6E2_9MYCO	133,30	68670	4,81	3	68670.0	0,0187	0,0293	0,04	0,02
<i>ABC-2 type transporter - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF17_MYCVP	217,07	70307	7,04	3	70306.75	0,0183	0,0285	0,04	0,05
<i>Cell envelope-related transcriptional attenuator - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TFA8_MYCVP	209,88	73462	6,60	3	73462.41	0,0174	0,0273	0,04	0,05
<i>Amidase - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1UP10_MYCSK	176,79	51489	4,91	2	51488.68	0,0165	0,0257	0,04	0,02
<i>Catalase; hydroperoxidase HPII - Frankia alni (strain ACN14a)</i>	Q0RIY3_FRAAA	152,85	78698	4,06	3	78697.63	0,0162	0,0253	0,04	0,00
<i>Putative uncharacterized protein - Corynebacterium glutamicum (strain R)</i>	A4QFS7_CORGB	139,82	53474	4,12	1	53474.32	0,0158	0,0120	0,04	0,05
<i>Aldehyde dehydrogenase - Exiguobacterium sibiricum 255-15</i>	Q41H06_9BACI	124,92	55956	3,94	2	55956.27	0,0151	0,0235	0,04	0,02
<i>Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T5B7_MYCVP	180,03	90717	4,00	3	90716.93	0,0139	0,0218	0,04	0,05
<i>Lipoprotein lpqB precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	LPQB_MYCVP	127,69	61271	3,59	2	61270.54	0,0137	0,0214	0,04	0,05
<i>Excinuclease ABC subunit A - Bifidobacterium adolescentis (strain ATCC 15703 / DSM 20083)</i>	A1A1N8_BIFAA	147,15	110784	2,38	2	110783.77	0,0113	0,0116	0,04	0,03
<i>Molybdopterin oxidoreductase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6M1_MYCVP	137,74	78480	3,23	2	78480.37	0,0106	0,0165	0,04	0,05
<i>Isocitrate dehydrogenase NADP-dependent, monomeric type - Chlorobium limicola DSM 245</i>	Q44NG0_CHLLI	131,26	80931	3,81	2	80931.27	0,0103	0,0160	0,04	0,02
<i>Isocitrate dehydrogenase - delta proteobacterium MLMS-1</i>	Q1NJW7_9DELTA	131,26	82052	3,76	2	82051.68	0,0101	0,0158	0,04	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Transcription-repair coupling factor - Mycobacterium gilvum</i> PYR-GCK	A4T6M5_MYCO	169,50	129131	2,62	3	129131.04	0,0097	0,0151	0,04	0,05
<i>Putative conserved transmembrane protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1Q2_MYCVP	155,63	147028	2,47	3	147027.86	0,0084	0,0132	0,04	0,05
<i>Glycine dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9T3_MYCVP	176,24	100496	2,73	2	100495.74	0,0082	0,0128	0,04	0,05
<i>UPF0235 protein Mvan_2846 - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	Y2846_MYCVP	120,55	7983	30,56	2	7983.39	0,1437	0,2246	0,03	0,03
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TGV2_MYCVP	142,21	13930	18,25	2	13930.43	0,0705	0,1101	0,03	0,03
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T7H4_MYCVP	123,13	17096	14,19	2	17095.81	0,0551	0,0861	0,03	0,03
<i>Membrane-flanked domain - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T5T1_MYCVP	140,57	19632	16,85	2	19632.28	0,0473	0,0739	0,03	0,03
<i>Methyltransferase type 12 - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TCF9_MYCVP	143,97	22031	11,50	2	22030.63	0,0414	0,0647	0,03	0,03
<i>Nuclear transport factor 2 - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T9Y7_MYCVP	125,12	27989	9,45	2	27989.44	0,0317	0,0495	0,03	0,03
<i>ABC transporter, permease protein SugB - Mycobacterium avium</i> (strain 104)	A0QCI2_MYCA1	125,24	28023	4,92	2	28022.7	0,0317	0,0495	0,03	0,03
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T1F9_MYCVP	103,86	13913	11,90	1	13913.11	0,0310	0,0485	0,03	0,03
<i>Peroxisomal hydratase-dehydrogenase-epimerase - Mycobacterium smegmatis</i> (strain ATCC 700084 / mc(2)155)	A0QNM4_MYCS2	185,06	29967	11,03	2	29967.21	0,0295	0,0460	0,03	0,03
<i>Putative uncharacterized protein - Peptostreptococcus micros</i> ATCC 33270	A8SND2_9FIRM	152,22	30184	5,47	2	30184.43	0,0292	0,0457	0,03	0,03
<i>Alpha/beta hydrolase fold - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T713_MYCVP	146,87	30628	11,87	2	30628.47	0,0288	0,0450	0,03	0,03
<i>ATP phosphoribosyltransferase - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TAR5_MYCVP	121,17	30740	8,60	2	30740.06	0,0287	0,0448	0,03	0,03

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>CDP-diacylglycerol--serine O-phosphatidyltransferase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T338_MYCVP	104,78	30970	4,98	1	30969.95	0,0283	0,0209	0,03	0,03
<i>Alcohol dehydrogenase, zinc-binding domain protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6C3_MYCVP	191,74	34372	7,98	2	34371.91	0,0253	0,0396	0,03	0,03
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T9H5_9MYCO	136,02	34692	6,98	2	34692.28	0,0251	0,0392	0,03	0,02
<i>3-isopropylmalate dehydrogenase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	LEU3_MYCVP	121,65	35548	12,38	2	35547.54	0,0244	0,0381	0,03	0,03
<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - Arthrobacter sp. (strain FB24)</i>	A0JWP7_ARTS2	125,98	35808	5,85	2	35807.54	0,0242	0,0379	0,03	0,02
<i>Putative phosphoserine aminotransferase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	SERC_MYCVP	196,73	39046	7,06	2	39046.15	0,0221	0,0345	0,03	0,03
<i>Putative phosphoserine aminotransferase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	SERC_MYCVP	196,73	39046	7,06	2	39046.15	0,0221	0,0345	0,03	0,03
<i>Possible osmoprotectant - Mycobacterium bovis (strain BCG / Paris 1173P2)</i>	A1KQ89_MYCBP	144,31	39546	10,31	2	39545.75	0,0218	0,0340	0,03	0,02
<i>Beta-lactamase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TH72_MYCVP	141,49	39834	7,46	2	39833.59	0,0216	0,0338	0,03	0,03
<i>Branched chain amino acid aminotransferase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TB17_MYCVP	144,63	39800	7,48	2	39800.13	0,0216	0,0338	0,03	0,03
<i>S-adenosyl-methyltransferase MraW - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TAX6_MYCVP	122,51	40518	5,71	2	40518.14	0,0212	0,0331	0,03	0,03
<i>Succinyl-CoA synthetase beta chain - Mycobacterium bovis</i>	SUCC_MYCBO	161,07	40872	8,09	2	40872.24	0,0210	0,0328	0,03	0,02
<i>Cystathionine gamma-lyase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TE45_MYCVP	179,33	40944	7,80	2	40943.81	0,0210	0,0328	0,03	0,03

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>S-adenosylmethionine synthetase - Propionibacterium acnes</i>	METK_PROAC	147,56	42224	7,57	2	42224.15	0,0203	0,0317	0,03	0,02
<i>Glycosyltransferase, MGT family - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6C5_MYCVP	144,30	42497	7,09	2	42497.29	0,0202	0,0316	0,03	0,03
<i>Signal transduction histidine kinase, LytS precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDT4_MYCVP	159,27	42822	7,20	2	42822.26	0,0200	0,0313	0,03	0,03
<i>Glucose-1-phosphate adenyltransferase - Mycobacterium avium (strain 104)</i>	A0QCG4_MYCA1	130,25	43142	7,65	2	43141.74	0,0199	0,0310	0,03	0,03
<i>Beta-lactamase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T410_MYCVP	162,16	43858	9,80	2	43857.82	0,0195	0,0304	0,03	0,03
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGI6_MYCVP	126,51	44009	6,50	2	44008.54	0,0194	0,0304	0,03	0,03
<i>Aspartokinase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TGH0_MYCVP	131,17	44361	8,44	2	44360.73	0,0193	0,0301	0,03	0,03
<i>Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3F2_MYCVP	142,37	44373	8,19	2	44373.27	0,0193	0,0301	0,03	0,03
<i>Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF32_MYCVP	173,45	47374	6,05	2	47374.09	0,0180	0,0281	0,03	0,03
<i>Fmu - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T8J5_MYCVP	128,44	47325	6,05	2	47324.88	0,0180	0,0281	0,03	0,03
<i>Integral membrane sensor signal transduction histidine kinase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T1J2_MYCVP	125,03	47884	5,98	2	47884.16	0,0178	0,0278	0,03	0,03
<i>Argininosuccinate lyase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	ARLY_MYCVP	138,45	49927	5,52	2	49926.96	0,0170	0,0266	0,03	0,03
<i>Putative magnesium chelatase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEM7_MYCVP	152,27	50050	6,81	2	50050.3	0,0170	0,0265	0,03	0,03
<i>Cytochrome P450 - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T3X6_MYCVP	128,04	50188	3,95	2	50187.61	0,0169	0,0264	0,03	0,03

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Glutamate--ammonia ligase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T7E2_MYCVP	156,51	50523	9,37	2	50523.49	0,0168	0,0262	0,03	0,03
<i>Penicillin-binding protein, transpeptidase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T126_MYCVP	164,10	51166	5,42	2	51166.17	0,0166	0,0259	0,03	0,03
<i>Virulence factor Mce family protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TDX4_MYCVP	126,33	53056	4,36	2	53056.47	0,0160	0,0249	0,03	0,03
<i>Proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase, chain N precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T693_MYCVP	126,09	54356	5,67	2	54356.43	0,0156	0,0243	0,03	0,03
<i>Virulence factor Mce family protein - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T561_9MYCO	143,46	54691	5,03	2	54691.4	0,0155	0,0241	0,03	0,03
<i>Phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase / IMP cyclohydrolase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TEM9_MYCVP	122,36	55244	9,56	2	55244.07	0,0153	0,0239	0,03	0,03
<i>HtrA - Mycobacterium leprae</i>	Q49972_MYCLE	163,29	55968	2,56	2	55967.75	0,0151	0,0235	0,03	0,03
<i>Beta-lactamase precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TF12_MYCVP	134,98	56102	3,92	1	56101.94	0,0150	0,0114	0,03	0,03
<i>Lysyl-tRNA synthetase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TG31_MYCVP	157,12	56826	4,84	2	56825.99	0,0148	0,0232	0,03	0,03
<i>Virulence factor Mce family protein precursor - Mycobacterium gilvum PYR-GCK</i>	A4T556_9MYCO	125,01	57702	5,34	2	57702.27	0,0146	0,0228	0,03	0,03
<i>Sugar ABC transporter, ATP binding protein - Fulvimarina pelagi HTCC2506</i>	Q0G4A2_9RHIZ	92,69	29031	5,32	1	29031.33	0,0143	0,0224	0,03	0,03
<i>ATP-dependent rna helicase, dead/deah box family protein - Mycobacterium avium (strain 104)</i>	A0QCK5_MYCA1	122,28	61302	5,21	2	61301.53	0,0137	0,0214	0,03	0,00
<i>Ferredoxin--nitrite reductase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TBT8_MYCVP	141,50	62410	4,23	2	62409.98	0,0134	0,0210	0,03	0,03

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
AMP-dependent synthetase and ligase - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TED8_MYCVP	172,76	67257	5,63	2	67257.22	0,0124	0,0195	0,03	0,03
ABC transporter, transmembrane region - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDG7_MYCVP	125,67	69825	5,36	2	69824.82	0,0120	0,0187	0,03	0,03
ABC transporter related precursor - <i>Mycobacterium</i> sp. (strain KMS)	A1UIN0_MYCSK	127,96	70503	4,84	2	70503.13	0,0118	0,0185	0,03	0,02
Peptidase S8 and S53, subtilisin, kexin, sedolisin precursor - <i>Mycobacterium</i> sp. (strain KMS)	A1U9U8_MYCSK	101,54	45929	4,32	1	45928.54	0,0089	0,0140	0,03	0,03
Protein translocase subunit secA - <i>Pelobacter propionicus</i> (strain DSM 2379)	SECA_PELPD	129,31	102149	2,48	2	102149.28	0,0081	0,0126	0,03	0,03
Aminotransferase - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TDY5_MYCVP	120,38	103842	3,07	2	103841.8	0,0079	0,0124	0,03	0,03
Glutamine synthetase - <i>Leptospirillum</i> sp. Group II UBA	A3ESJ8_9BACT	101,20	53541	3,29	1	53541.02	0,0076	0,0119	0,03	0,03
Putative acyl-CoA carboxylase beta subunit - <i>Nocardia farcinica</i>	Q5Z152_NOCF A	125,53	58699	3,38	1	58698.96	0,0070	0,0109	0,03	0,03
DNA-directed RNA polymerase subunit beta - <i>Propionibacterium acnes</i>	RPOB_PROAC	131,48	128350	1,97	2	128350.08	0,0064	0,0100	0,03	0,02
Heat shock protein 70 - <i>Mycobacterium asiaticum</i>	Q71MH0_MYCAS	97,83	12399	12,50	1	12399.35	0,0352	0,0551	0,01	0,02
Putative transcriptional regulator, MerR family - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1T2S6_MYCVP	103,10	14025	11,02	1	14025.49	0,0308	0,0481	0,01	0,02
Thioredoxin - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1THL9_MYCVP	107,43	15388	9,35	1	15388.16	0,0279	0,0436	0,01	0,02
UPF0082 protein Mvan_2570 - <i>Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	Y2570_MYCVP	98,56	26763	7,41	1	26763.42	0,0156	0,0243	0,01	0,02
Putative uncharacterized protein - <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (strain F11)	A1QVW1_MYCTF	99,66	27206	4,86	1	27205.6	0,0153	0,0239	0,01	0,02
Conserved ATP-binding protein ABC transporter - <i>Mycobacterium ulcerans</i> (strain Agy99)	A0PPR1_MYCUA	116,35	28013	6,69	1	28012.59	0,0149	0,0232	0,01	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TA91_MYCVP	104,34	30401	5,80	1	30400.56	0,0137	0,0214	0,01	0,02
<i>Putative uncharacterized protein precursor - Yersinia pestis (biovar Antiqua strain Antiqua)</i>	Q1C841_YERPA	105,59	33559	6,89	1	33559.11	0,0123	0,0193	0,01	0,02
<i>Ornithine carbamoyltransferase - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T4X4_MYCVP	116,35	36607	3,92	1	36607.27	0,0113	0,0176	0,01	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6G7_MYCVP	100,69	36630	4,20	1	36630.08	0,0113	0,0176	0,01	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - Janibacter sp. HTCC2649</i>	A3TLU0_9MICO	107,94	37022	3,87	1	37021.7	0,0112	0,0174	0,01	0,02
<i>Ornithine carbamoyltransferase - Nocardioides sp. (strain BAA-499 / JS614)</i>	A1SJE5_NOCSJ	90,21	37156	3,86	1	37155.79	0,0111	0,0174	0,01	0,02
<i>Putative uncharacterized protein BCG_3923 - Mycobacterium bovis (strain BCG / Paris 1173P2)</i>	A1KQJ5_MYCBP	100,58	38080	4,34	1	38079.75	0,0108	0,0169	0,01	0,02
<i>UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase - Mycobacterium smegmatis (strain ATCC 700084 / mc(2)155)</i>	MURG_MYCS2	107,10	39897	4,42	1	39897.42	0,0103	0,0161	0,01	0,02
<i>Acyl-CoA dehydrogenase - Frankia alni (strain ACN14a)</i>	Q0RQD5_FRAAA	95,28	43342	3,30	1	43342.24	0,0095	0,0148	0,01	0,02
<i>ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family protein precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1TCH9_MYCVP	101,71	43613	3,54	1	43612.59	0,0094	0,0147	0,01	0,02
<i>Pyrrolo-quinoline quinone precursor - Mycobacterium vanbaalenii (strain DSM 7251 / PYR-1)</i>	A1T6V9_MYCVP	101,18	44718	5,17	1	44718.45	0,0092	0,0144	0,01	0,02
<i>NAD(P) transhydrogenase alpha subunit - Moritella sp. PE36</i>	A6FF22_9GAMM	111,93	54573	3,63	1	54572.69	0,0075	0,0117	0,01	0,02
<i>Putative uncharacterized protein - Mycobacterium sp. (strain KMS)</i>	A1UN21_MYCSK	101,67	59219	2,60	1	59219.22	0,0069	0,0108	0,01	0,02
<i>Methylmalonyl-CoA mutase, small subunit - Mycobacterium avium (strain 104)</i>	A0QHS2_MYCA1	115,00	65585	2,18	1	65584.93	0,0062	0,0097	0,01	0,02

ACETATE							emPAI		SpCount	
Description	Accession	Score	Mass	Coverage	#peps	MW	%Abdc emPAI Mascot	%Abdc our emPAI	%Abdc SpC total	%Abdc SpC unique
<i>Elongation factor G 2 - Pelobacter carbinolicus</i> (strain DSM 2380 / Gra Bd 1)	EFG2_PELCD	90,76	75629	1,89	1	75629.22	0,0054	0,0084	0,01	0,02
<i>Integral membrane protein MviN - Mycobacterium vanbaalenii</i> (strain DSM 7251 / PYR-1)	A1TI16_MYCVP	98,36	127247	1,38	1	127246.66	0,0032	0,0050	0,01	0,02