# L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe

Nolwenn Bougon

▶ **To cite this version:**

Nolwenn Bougon. L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe. Hydrologie. Université Rennes 1, 2007. Français. ⟨NNT : ⟩. ⟨tel-00342702⟩

**HAL Id: tel-00342702**

**https://theses.hal.science/tel-00342702v1**

Submitted on 28 Nov 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.

HAL Authorization

N° ordre : 3668

**THESE**

présentée

**DEVANT L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

pour obtenir

le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE RENNES 1**

**Mention** Sciences de la Terre

**PAR**

**Nolwenn BOUGON**

Equipe d'accueil: Géosciences Rennes et EcoBio, Rennes

Ecole Doctorale Sciences de la Matière

Composante universitaire: UFR Structure et Propriétés de la Matière

# L'influence des circulations hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes à l'interface sol-nappe

Soutenue le 19 décembre 2007 devant la commission d'examen composée de

| | | |
|---|---|---|
| Rapporteurs | Georges Barbier | Université de Brest, ESMISAB |
| | Lionel Ranjard | INRA, Dijon |
| Examinateurs | Théodore Bouchez | Cémagref, Antony |
| | Pierre Marmonier | Université de Lyon 1 |
| Directeur de thèse | Luc Aquilina | Université Rennes 1 |
| Co-directeur | Philippe Vandenkoornhuyse | Université Rennes 1 |

# *Avant Propos*

Ce mémoire de thèse est le résultat d'un travail réalisé au sein de l'équipe Transferts de Géosciences Rennes (UMR CNRS 6118) et IBTM d'EcoBio Rennes (UMR CNRS 6553). Cette thèse a été encadrée par Luc Aquilina et Philippe Vandenkoornhuyse.

Cette thèse a été co-financée par le programme national coordonné CNRS-ANR "ECosphère COntinentale", par le Conseil Général de la Manche, le Conseil Régional de Basse Normandie, l'Agence de l'Eau Seine Normandie et par l'Observatoire de Recherche en Environnement 'AgrHys'.

# *Remerciements*

On y pense tout au long de la thèse et de la rédaction mais quand vient le moment de l'écriture, on se rend compte à quel point la tache est loin d'être facile. J'ai eu la chance d'effectuer cette thèse au sein de deux UMR ce qui m'a permis de côtoyer un grand nombre de gens à personnalité bien différentes, je risque d'oublier des gens mais ne m'en voulez pas siouplait ! Allez je me lance !!! Je vais essayer de ne pas trop baratiner, mais cela risque d'être difficile.

Je tiens tout d´abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de lire ce manuscrit de plus de 300 pages, d´avoir été présent en cette veille de Noël et surtout pour les conseils apportés au cours de la discussion: Georges Barbier, Lionel Ranjard, Théodore Bouchez, Pierre Marmonier.

Je tiens également à remercier Luc et Philippe qui ont cru en moi depuis le début, qui m'ont laissé une grande liberté d'épanouissement, qui m'ont recadré quand il était nécessaire (n'est pas bougon qui veut) et qui m'ont redonné la motivation dans les périodes difficiles. Il y a 4 ans, je disais non jamais de la vie je ne ferais de biologie moléculaires. J'en suis revenue et vous m'avez permis de me rendre compte de la puissance de cet outil.

Tous les résultats présentés dans ce manuscrit ne seraient pas ce qu'ils sont sans l'aide d'un grand monde de personnes que je veux remercier pour leur aide sur le terrain, les analyses d'échantillons, les coups de main en période de speed, les conseils précieux et le partage de connaissance, dans le désordre : merci à Chrys, Thierry, Odile, Patrice, Morgane, Nathalie et Nathalie, Marie Paule, Stéphane, Cécile, Emilie, Toma, Dominique Marie, Laure Guillou, Mickael, Jérôme, Pierre, Anne Catherine, Gwen, Ivan; et à Virginie pour sa disponibilité (J'ai un problème !!)… A toute l'équipe du LIGHT pour ses moments de détente du vendredi 16h30 : Jean Pierre, Annick, Thierry, Bruno…

Merci aux équipes IBTM et Transferts de m'avoir accueilli ces quelques années passées ici, et oui 5 ans déjà !!!

Merci aux permanents, thésards, post doc, ATER, DEAs, et autres de Géosciences et d'Ecobio, à tous ceux qui ont su et continue à faire vivre cette grande maison. Ca va pas être facile mais bon, merci : Ben, Chrys, Flo, Fab, Lor, Nico, Séby, Nuno, Elise, Cat, Yannick, Vincent, Céline D, Vincent, Pipo, Céline T., Charly, Rico et sa Flo, Blaise, Jo, Ju, Malvina, Grand Sarce, Ju, Caro, Fabieng, Yaoul, Gosia, Olivier, Raymi, Karen, Oskar, Tanguy, Sylvie, Jo… Et sans oublier les Gobios Girl and Boys: Cicile, Sté, Toto, Fanny, Fred, Emilie, Lisa et Cécile …

Et puis aussi aux autres : Mély, Maryam, Niniz, DD, Elo et Dave, Fisso, Boris, Mat, Pedro, Ludo, Gérome, Nico, Patron, Nico, Alex et sans oublier les capoeiristes.

Merci à vous papa et maman de m'avoir soutenu, cru en moi, de m'avoir permis de faire les études qui me plaisent, merci à toi Aude pour ton soutien. A mes deux super mamies…

Merci à msn qui m'a permis de garder contact avec tous les expats.

Merci tout particulièrement à toi Erwan d'être entré dans ma vie, pas forcément dans la période la plus sereine, d'avoir su être patient, de m'avoir permis de relativiser sur l'importance de ce manuscrit, de m'avoir soutenu cette dernière année, de m'avoir fait découvrir des endroits splendides (Vallée de la mort, Hollywood et ce n'est qu'un début), …

… Promis bientôt les vacances et du Soleil, c'est bien connu sous le pavé, la plage !

Merci à tous

Et promis je penserai bien à vous le jour du Grand Saut !!!

Merci pour la chute libre, c'est GENIAL !!!!

# Table des matières

**INTRODUCTION .....1**

**PARTIE I Contexte général .....9**

**Chapitre I – Le monde bactérien** .....11

1 – Quelques généralités .....11

2 – Concept d'espèces et microorganismes .....13

2.1– Concept d'espèce Typologique .....13

2.2– Concept d'espèces Morphologiques .....13

2.3– Concept d'espèces biologiques .....14

2.4– Concept d'espèces écologiques .....14

2.5– Concept d'espèces évolutives .....15

2.6– Concept d'espèces phylogénétiques .....15

3 – Taxonomie et Classification .....16

3.1 – Approche chimiotaxonomique .....16

3.2 – Approche moléculaire .....16

3.3 – Approche trophique .....17

3.4 – Approche systématique .....19

3.4.1 – Protéobactéries ou bactéries pourpres .....20

3.4.2 – les bactéries Gram + à fort et à faible G+C% .....21

3.4.3 – les cyanobactéries .....21

3.4.4 – les bactéries vertes soufrées .....21

3.4.5 – les spirochètes .....21

3.4.6 – les cytophaga .....22

3.4.7 – les planctomycètes .....22

3.4.8 – les chlamydiae .....22

3.4.9– les Deinococci-Thermus .....22

3.4.10 – les Bactéries vertes non soufrées .....23

3.4.11 – les thermotoga .....23

3.4.12 – les Aquifex .....23

4 – Rôle dans l'environnement .....24

5 – Cycle de l'Azote .....28

La dénitrification dans le cycle de l'azote .....29

5.1 – les organismes dénitrifiants .....30
5.2 – les enzymes dans la dénitrification .....31
5.2.1 – la nitrate réductase .....32
5.2.2 – la nitrite réductase .....32
5.2.3 – l'oxyde nitrique réductase .....33
5.2.4 – l'oxyde nitreux réductase .....33
6 – Facteurs contrôlant l'activité bactérienne .....33
6.1 – La disponibilité en nutriment .....34
6.2 – Le pH .....34
6.3 – La température .....35
6.4 – Les interactions biotiques .....36
**Chapitre II – L'interface sol - nappe** .....37
1 – L'Hydrologie .....37
1.1 – Le Sol .....39
1.2 – La Nappe .....39
1.3 – L'Interface sol-nappe .....40
1.3.1 – Zones Humides .....41
1.3.2 – Zone de battement de nappe ou continuum zone non saturé-nappe .....42
2 – Hydrologie et Communautés bactériennes .....43
3. –Sol et Communautés bactériennes .....44
4 – Nappe et Communautés bactériennes .....46
5 – Interface sol-nappe et Communautés bactériennes .....48
**Chapitre III– Diversité bactérienne** .....50
1 – Diversité bactérienne .....51
2 – Comment accéder à la diversité .....53
2.1 – Méthode cellulaire .....54
2.2– Méthode moléculaire .....55
2.2.1 – Méthodes d'estimation grossière de la diversité génétique .....55
2.2.2 – La technique de polymérisation en chaîne .....56
2.2.3 – Stratégies moléculaires dépendantes de la PCR .....58
2.2.3.1- Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomal amplifié .....58
2.2.3.2-Analyse des espaceurs ribosomaux intergénique .....58
2.2.3.3-Analyse des électrophorèses sur gel à gradient dénaturant ou thermique .....59
2.2.3.4- Analyse de SSCP .....60
2.2.3.5- Analyse de T-RFLP .....61

2.2.3.6- Analyse des séquences d'ADN....64

3 – Nouvelles approches de la compréhension des écosystèmes....65

**PARTIE II Matériel et méthodes....69**

**Chapitre I – Choix des sites expérimentaux**....71

1 – Carentan....72

2 – Bassin versant de Kerbernez....78

**Chapitre II – Analyses et mesures de la diversité bactérienne**....82

1 – Echantillonnage et extraction d'ADN....83

1.1 – Approche de la diversité bactérienne fonctionnelle en fonction des transferts horizontaux (Site de Carentan)....83

1.1.1 - Dispositif expérimental....83

1.1.2- Extraction d'ADN total....87

1.2 – Approche de la diversité bactérienne fonctionnelle en fonction des transferts verticaux (Site de Kerrien)....88

1.2.1 - Dispositif expérimental....88

1.2.2 - Extraction d'ADN total....90

1.2.3- Comptage bactérien par cytométrie de flux....90

2 – Analyse de Diversité....92

2.1 –Amplification de gènes codant....92

2.1.1 - Diversité bactérienne intégrative : Gène codant pour *ARNr16S*....92

2.1.2- Diversité bactérienne fonctionnelle : Gène *narG*....92

2.2 –Clonage....93

2.3 –Séquencage....96

2.4 – Estimation de la diversité microbienne : T-RFLP....96

2.4.1 - Choix de la méthode....96

2.4.2 - Choix des enzymes de restriction....97

2.4.3 - Protocole....98

2.4.3.1 - Amplification de l'ADN avec des amorces marquées par des flurochromes....98

2.4.3.2 - Purification des produits PCR....99

2.4.3.3 - Digestion des produits PCR purifiés....99

2.4.3.4 – Précipitation des produits de digestion....99

2.4.3.5 - Préparation des échantillons pour analyse....99

**Chapitre III – Modélisation Expérimentale -Métaprotéomique**....100

1 – Expérience#1....100

2 – Expérience#2....105

3 – Extraction et Préparation Protéique....109

4 – Expérience de faisabilité d'ICPL....110

**Chapitre IV – Traitement des données**.....112
1 – Analyse des séquences.....112
2 – Arbre phylogénétique et parcimonie maximale.....113
3 – T-RFLP.....114
**Chapitre V– Analyses statistiques**.....116
1 – Modèle linéaire généralisés.....116
2– Analyse en composante principale.....117
3– Calcul d'indice de diversité.....118
4– Calcul d'indice de similarité.....118

**PARTIE III - Circulations hydrologiques – Réactivité biotique ……...121**
**1. Résumé**.....122
**2. Introduction**.....125
**3. Material and methods**.....126
3.1 – Geological and hydrological settings of the study area.....126
3.2 – Experimental design.....127
3.3 – Statistical analysis of data.....131
**4. Results**.....131
4.1 – Field results.....131
4.2 – Batch experiments.....132
4.2.1 - Nitrate.....132
4.2.2 - Sulfate.....133
4.2.3 – Site comparison.....133
4.2.4 – Distance to the stream.....136
**5. Discussion**.....138
5.1 – Nitrate removal.....138
5.2 – Sulfate.....139
5.3 – Spatial variability.....141
**6. Conclusion**.....142
**7. References**.....144

**PARTIE IV - Circulations hydrologiques horizontales – Diversité Microbienne .....149**
**1. Résumé**.....150
**2. Introduction**.....153
**3. Material and methods**.....154
3.1 – Site description.....154
3.2 – Experimental design.....156
3.3 – DNA extraction.....158

3.4 – PCR ....158
3.5 – T-RFLP fingerprinting analysis ....159
3.6 – Data analyses ....160
**4. Results** ....162
4.1 – Biogeochemistry ....162
4.2 – Nitrate reducers' community ....162
**5. Discussion** ....168
**6. Conclusion** ....172
**7. References** ....173

**PARTIE V - Circulations hydrologiques verticales – Diversité Microbienne ....177**
**1. Résumé** ....178
**2. Introduction** ....181
**3. Material and methods** ....183
3.1 – Site description ....183
3.2 – Analytical methods ....184
3.3 – Groundwater sampling ....185
3.4 – Bacterial numeration ....185
3.5 – Extraction of DNA ....186
3.6 – Design of 16S rRNA –specific primers ....186
3.7 – Design of *narG* gene –specific primers ....186
3.8 – rRNA 16S gene and *narG* gene PCR ....186
3.9 – T-RFLP fingerprinting analysis ....187
3.10 – Clone library construction and sequencing ....188
3.11 – Sequence data analyses ....188
3.12 – Patterns of microbial community analyses ....189
3.13 – Diversity comparisons ....189
**4. Results** ....190
4.1 – Hydrology/Chemistry ....190
4.2 – Microbial analyses ....192
4.3 – 16S rRNA gene diversity ....196
4.4 – The narG gene diversity ....199
**5. Discussion** ....200
5.1 – Bacterial characterization ....200
5.2 – Environmental influence on community structure ....202
**6. Conclusion** ....206
**7. Reference** ....207

**PARTIE VI - Modélisation expérimentale – Métaprotéomique .....213**

**1. Résumé**.....214

**2. Introduction**.....215

**3. la Métaprotéomique jusqu'à aujourd'hui**.....216

**4. Comment accéder au protéome ?** .....219

4.1 –Approche classique.....219

4.1.1 – Séparation des protéines .....219

4.1.1.1 – suivant la charge .....220

4.1.1.2 – suivant la taille.....220

4.1.2 – Identification des protéines.....221

4.2 –Approche fonctionnelle .....224

4.2.1 – Differential Ingel electrophoresis 2D (2D-Dige).....224

4.2.2 – Isotope coded protein label (ICPL).....225

**5 .Procédure expérimentale**.....227

5.1 – Expérience #1 .....227

5.2 – Expérience #2 .....230

5.3– Extraction et préparation protéique .....233

5.4– Expérience de faisabilité d'ICPL.....235

**6. Résultats**.....236

6.1 – Expérience #1 .....236

6.1.1 – Concentrations protéiques .....236

6.1.2 – Gel bidimensionnel.....237

6.1.3 – Protéines identifiées et leur rôle.....238

6.1.4 – Conclusion de l'expérience#1.....239

6.2 – Expérience #2 .....240

6.2.1 – Chimie .....240

6.2.1.1 – Paramètres physico-chimiques .....240

6.2.1.2 – Composition chimique de l'eau .....241

6.2.2 – Protéomique.....244

6.2.2.1 – Concentration protéique.....244

6.2.2.2 – Gel bidimensionnel.....244

6.2.3 – Protéines identifiées et rôle.....249

6.2.3.3.1 – Conditions Acétates .....249

6.2.3.3.2 – Conditions glucose.....254

**7. Discussion**.....256

7.1 – Expérience #2 .....256

7.1.1 – Concentrations protéiques .....258

7.1.2 – Concentrations protéiques .....259

7.2 – Expérience #2 – Expression différentielle .....261
7.3 – Conclusion .....263

**CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES .....265**

**BIBLIOGRAPHIE .....275**

**Tables des figures .....304**
**Tables des tableaux .....308**
**Annexes .....311**

# INTRODUCTION

# Introduction

La diversité biologique et l'équilibre des paramètres environnementaux ont longtemps été étudiés à l'échelle macroscopique. Or on estime que l'essentiel de la diversité sur Terre réside à une échelle inférieure au millimètre (Pace, 1997), au niveau du monde bactérien. Les bactéries sont des organismes ubiquistes, elles sont présentes dans tous les types de biotopes rencontrés sur Terre : elles peuvent être extraites du sol, des eaux douces, marines ou saumâtres, de l'air, des profondeurs océaniques, de la croûte terrestre, du désert, de la peau et de l'intestin des animaux… On estime à quarante millions le nombre de cellules bactériennes dans un gramme de sol et à un million leur nombre dans un millilitre d'eau douce. La biomasse bactérienne est ainsi de l'ordre de $5.10^{30}$ bactéries. Cependant un grand nombre de bactéries n'est pas identifié et seul 1% d'entre elles peut être mis en culture au laboratoire. Les domaines de l'écologie microbienne ont été révolutionnés ces deux dernières décennies par l'application des méthodes moléculaires. Les différentes techniques de biologie moléculaire ont ainsi aidé à caractériser l'immensité de la diversité microbienne à travers l'étendue de l'écosystème Terre et ont révélé que seule une infime minorité des organismes aux fonctions microbiennes clés dans des habitats spécifiques, nous est familière. Les méthodes de biologie moléculaire permettent ainsi d'apprécier la diversité microbienne et d'identifier son rôle dans les écosystèmes.

Le rôle des microorganismes dans les cycles biogéochimiques comme celui du carbone ou de l'azote est primordial et nécessite une bonne compréhension des communautés microbiennes fonctionnelles affectées par les variations environnementales. La composition chimique des eaux pour des éléments biologiquement actifs comme les nitrates est contrôlée par des processus microbiens, qui sont eux-mêmes dépendant des conditions physico-chimiques du milieu (Fig.1). La variabilité spatiale des processus biochimiques est ainsi liée aux caractéristiques physico-chimiques hétérogènes qui gouvernent les eaux souterraines. L'influence des circulations hydrologiques sur la biomasse et la diversité microbienne est ainsi mal contrainte. Les conditions chimiques et la structuration/dynamique des communautés microbiennes sont aussi des processus en fortes interactions dont les relations sont également mal caractérisées. Dans un milieu très hétérogène, l'effet des paramètres physiques sur les processus biochimiques est délicat à apprécier. Diverses études (par exemple Haack *et al*., 2004 ; Nold and Zwart., 1998 ; Röling *et al.*, 2001) ont cependant montré que les communautés bactériennes étaient sensibles aux variations des conditions environnementales (physiques, chimiques et biotiques) à travers des taux de croissance variables et des réponses à des niveaux de faibles pollutions.

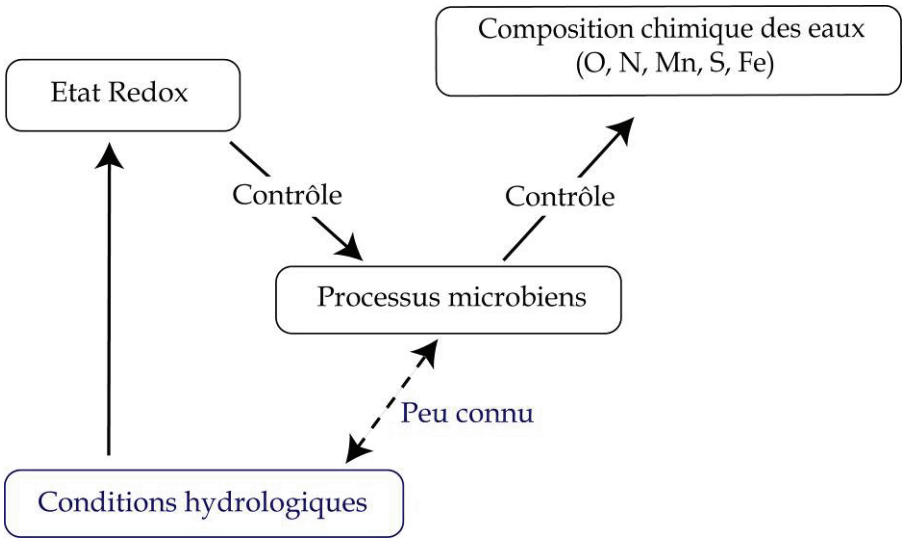



**Figure 1 : Relations existantes entre les processus chimiques, biologiques et physiques.**

Les eaux souterraines et les rivières, principaux réservoirs d'eau potable, peuvent atteindre des teneurs très élevées en nitrates ($NO_3^-$). Ces fortes teneurs peuvent poser non seulement des

problèmes d'ordres environnementaux (par la prolifération de populations algales), économiques et sociaux mais aussi des problèmes de santé publique. Les nitrates ($NO_3^-$) et leurs précurseurs, les nitrites ($NO_2^-$), sont toxiques pour les êtres vivants. Ils transforment l'hémoglobine du sang en une substance proche, la méthémoglobine qui ne joue plus son rôle dans l'oxygénation des tissus. Pour éviter les intoxications, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé la dose de nitrates journalière admissible (DJA) à 3,65 mg / kg de poids corporel. La méthémoglobinémie est rare aujourd'hui dans la plupart des pays industrialisés du fait du contrôle des nitrates dans les approvisionnements en eau, bien que des cas isolés continuent d'être signalés dans les zones rurales. Le contrôle des nitrates dans l'eau de boisson est une mesure de prévention efficace. La valeur guide de l'OMS dans cette eau est fixée à 50 mg/litre et de 3 mg/litre pour les nitrites (OMS, http://www.who.int). L'intensification des pratiques agricoles en Bretagne, notamment, et une spécialisation dans l'élevage porcin ont conduit à une pollution azotée importante dans les cours d'eau et nappes superficielles (Laperrousaz *et al.*, 1997). La qualité de l'eau est un grand défi mené par la Bretagne, 80% des captages pour l'alimentation en eau potable sont des prises d'eau superficielle. **Il est ainsi important de comprendre les mécanismes régissant la distribution et l'activité des microorganismes qui dégradent les nitrates**.

La contamination des eaux superficielles et souterraines par des agents pathogènes et, l'utilisation possible de procédés biologique de dépollution pour nettoyer des eaux souterraines ont mis en évidence la nécessité d'une meilleure compréhension du devenir et du transport des microorganismes dans les eaux. Le besoin pour la bioremédiation des eaux souterraines contaminées nécessite la compréhension des processus gouvernant le devenir et le transport des microorganismes sous des conditions physiques, biologiques et géochimiques données. Cette compréhension passe par des approches complémentaires mêlant les observations de terrain aux expériences en laboratoire, à différentes échelles et une multidisciplinarité des compétences.

Ainsi, pour avancer dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes bactériens ce travail s'est focalisé sur les liens entre la diversité microbienne et les paramètres physiques. Ces liens restent en effet très mal connus par rapport aux liens entre diversité microbienne et paramètres chimiques. Plus précisément, cette étude vise à caractériser le rôle de la vitesse **du transfert de l'eau** sur les **processus biochimiques et la structure des communautés.** La structure des **communautés microbiennes** est étudiée de manière expérimentale, couplée à

une étude sur le terrain des relations entre l'hydrogéologie et les processus biogéochimiques. La relation transfert/biogéochimie/communauté microbienne a été abordée à travers deux approches.

(1) Comment les flux horizontaux, à savoir la relation nappe superficielle/rivière, conditionnent l'activité bactérienne et la structure des communautés réduisant les nitrates?

(2) Comment une communauté bactérienne intégrative et fonctionnelle est-elle structurée dans une zone de battement de nappe ? Cette dernière question implique implicitement l'influence du gradient hydrique sur la communauté bactérienne. La profondeur induit-elle des modifications de structure de communautés et / ou une différence en fonction de la période hydrologique (hautes eaux/ basses eaux) ?

Ces approches permettent de déterminer le ou les facteur(s) structurant(s) la communauté microbienne sur les sites expérimentaux. Dans la démarche, on a cherché à isoler les paramètres physiques des paramètres chimiques pour tester les hypothèses de relation directe entre les flux et la structure des communautés.

(3) Afin de caractériser l'expression de la communauté native des eaux souterraines en réaction à des modifications environnementales pouvant être assimilées à une pollution, une étude a été menée en laboratoire. L'originalité de cette expérience réside dans son approche : la Métaprotéomique.

Le mémoire s'articule autour de six parties. Les parties III, IV et V sont présentées sous la forme d'article soumis, pour publication dans différentes revues scientifiques de rang A.

La **première partie** consiste en une synthèse bibliographique de l'état actuel des connaissances, et une définition des différents termes employés. Le monde bactérien avec ses spécificités, son rôle dans l'environnement et le fonctionnement des écosystèmes microbiens dans l'environnement et les facteurs influençant la diversité et l'activité bactérienne sont présentés. Dans un second temps, le concept de circulations hydrologiques est abordé dans le système nappe, sol et interface sol-nappe. Cet aspect est suivi de l'état actuel des connaissances sur les communautés bactériennes dans ces différents milieux. Enfin, nous présenterons les différentes méthodes permettant de décrire la diversité bactérienne.

Les différentes méthodes utilisées dans cette thèse pour étudier la réactivité biotique et de la diversité bactérienne sous l'influence de circulations hydrologiques sont présentées dans

la **seconde partie**. Cette partie présente aussi les deux sites d'études et les outils d'analyse de résultats.

La réactivité biogéochimique est présentée dans la **troisième partie**. Ce travail réalisé en laboratoire se base sur une étude réalisée dans le cadre du projet d'analyse des tourbières des marais du Cotentin et du Bessin (Auterives, 2007), pour déterminer la réactivité biogéochimique potentielle de deux sites soumis à des circulations hydrologiques distinctes. Différents paramètres ont été testés comme les conditions d'oxygénation, l'ajout de nitrate et l'influence de la distance à la rivière pour voir l'influence sur les concentrations en anions majeurs ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$ et $Cl^-$).

La diversité microbienne a été abordée suivant deux directions de flux : les flux horizontaux (partie IV) et les flux verticaux (partie V). Le travail réalisé sur l'incidence des transferts horizontaux sur la communauté bactérienne est développé dans la **quatrième partie**. L'étude est la continuité du travail présenté dans la partie précédente et s'est focalisée sur les bactéries réduisant les nitrates (analyse du gène narG) par une analyse de polymorphisme de fragment de restriction (T-RFLP).

La **cinquième partie** a pour but de présenter l'influence des circulations hydrologiques verticales sur les communautés bactériennes (analyse du gène ARNr 16S) et sur les communautés de bactéries réduisant les nitrates (analyse du gène narG) par une analyse de T-RFLP. Cette étude a consisté à suivre les changements de structure de communautés dans le temps (suivant les périodes de hautes et de basses eaux) et suivant la profondeur. L'analyse de T-RFLP a été complétée par une analyse phylogénétique sur le gène de ARNr16S.

La **sixième et dernière partie** est consacrée à la tentative d'une modélisation expérimentale consistant à étudier l'influence de paramètres de forçages sur l'expression protéique d'une communauté microbienne. Cette étude passe par une approche Métaprotéomique. L'incidence de différents paramètres (source de carbone et ajout de nitrate) est discutée.

Une synthèse générale de connaissances acquises sur les sites expérimentaux ainsi que les perspectives de recherche et de développement concluent cette étude.

# PARTIE I

# Contexte Général

# I

# LE MONDE BACTERIEN

Les bactéries (Fig I-1) sont des organismes vivants unicellulaires prokaryotes à structure simple, caractérisées par une absence de noyau et d'organites[1]. De petite taille (<2-3µm), elles ont été mises en évidence à la fin XVIIème siècle par Anthonie van Leeuwenhoeck.

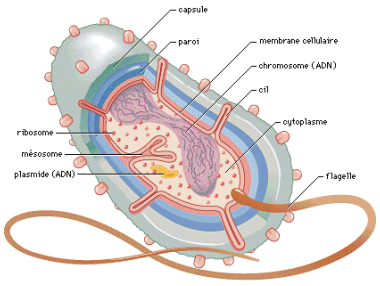



**Figure I-1. Schéma d'une bactérie** (d'après http://croissbact.free.fr/bacterie.php, 2007)

## 1 - QUELQUES GENERALITES

Une caractéristique importante des bactéries est la paroi cellulaire. La structure de cette paroi permet de diviser les bactéries en deux groupes : Gram négatives et Gram positives. Cette division est basée sur la différence de la structure et de la composition chimique de la paroi cellulaire mise en évidence grâce à la coloration de Gram. Les bactéries **positives** à la coloration de Gram possèdent une paroi cellulaire contenant un **peptidoglycane[2] épais** et des **acides teichoïques[3] ;** alors que les bactéries **Gram négatives** présentent un **peptidoglycane fin** et localisé entre la membrane cytoplasmique et la membrane cellulaire externe. C'est la paroi qui donne à la bactérie sa forme[4] et qui la protège contre l'éclatement sous l'effet de la pression osmotique du cytoplasme.

[1] Les organites désignent les différentes structures spécialisées contenues dans le cytoplasme des cellules eukaryotes et délimités par une membrane, comme par exemple les mitochondries ou l'appareil de Golgi
[2] Le peptidoglycane assure la forme de la bactérie ainsi que sa protection mécanique et physique.
[3] C'est un acide qui permet au peptidoglycane de s'attacher à la membrane des bactéries.
[4] On peut distinguer les bactéries suivant leur forme : sphériques ou coccus ; en bâtonnet ou bacillus ; ovoïde ou coccobacillus ; spiralée rigide ou spirillum, flexible ou spirochaetes ; et fongique ou actinomycètes.

La **mobilité** des cellules est assurée par des structures extra-cellulaires comme des **flagelles**. Cette structure peut être utilisée par les bactéries hétérotrophes pour se diriger vers des zones riches en substances organiques (chimiotactisme). Certaines bactéries peuvent parcourir plus de 10 fois leur taille en moins de 1seconde (*Bacillus*).

Certaines bactéries peuvent fabriquer des couches externes à la paroi cellulaire, généralement constituées d'**exopolysaccharides**. Cette substance permet aux bactéries d'**adhérer** à un **support**, de former des **bio films** et une **protection physique** externe.

Le **support de l'hérédité** est localisé au niveau intracellulaire sous forme d'**ADN** circulaire. L'absence de noyau fait que l'ADN est ainsi libre dans le cytoplasme. En plus de cet ADN génomique, les bactéries peuvent contenir des molécules d'ADN extra chromosomique appelées **plasmides**. Ces unités participent aux transferts horizontaux de gènes entre les populations bactériennes, et donc à la dissémination des gènes conférant des avantages sélectifs. Stahl et Tiedje (2002) ont mis en avant l'importance des plasmides dans le transfert d'informations génétiques pour l'utilisation de différents accepteurs d'électron par les bactéries. Trois types d'**ARN** (Acides Ribonucléiques) assurent chacun une fonction particulière dans la messagerie de l'information génétique : (1) l'**ARN message**r (ARNm) qui va copier un brin d'ADN pour créer un message lors de la synthèse des protéines ; (2) l'**ARN de transfert** (ARNt) constitue de petites molécules d'ARN qui, portent les acides aminés au ribosome pour la synthèse protéique ; et (3) l'**ARN ribosomal**[5] (ARNr) qui représente 80% de l'ARN total d'une cellule. L'ARNr est une molécule qui associée à des protéines forme le ribosome qui décode l'information génétique transcrite par les ARNm.

Les ribosomes sont composés d'ARNr et de protéines ribosomales qui sont communes à tous les organismes vivant sur Terre, et présentes en très grande quantité. Les mutations (variations de séquences) entraînent des changements dans la structure des ribosomes qui sont souvent létales pour les bactéries. Les structures des ribosomes évoluent ainsi assez lentement. Ce caractère conservatif est la raison pour laquelle l'ARNr est généralement choisi comme marqueur taxonomique bactérien. Dès 1987, Woese a montré que le gène codant pour l'ARNr est particulièrement adapté pour établir la taxonomie et la phylogénie bactérienne. D'autres gènes cibles sont aussi utilisés dans l'objectif similaire comme le gène codant pour le facteur d'élongation EF1α et d'autres encore.

[5] On définit un ARNr par une grande sous unité (catalyseur direct de la synthèse protéique) et une petite sous unité (contrôleur de la fidélité de la traduction du message génétique en protéine). Chez les prokaryotes, la grande sous-unité du ribosome (50S) est constitué de ARNr 23S (~ 2900 nucléotides) et de l'ARNr 5S (~120 nucléotides) et la petite sous-unité du ribosome (30S), de l'ARNr 16S (~ 1500 nucléotides).

## 2 – CONCEPT D'ESPECES ET MICROORGANISMES

Trouver une définition universelle de l'espèce, notion nécessaire pour déterminer une diversité d'organismes et distinguer des organismes dissemblables, est sujette à controverse. De fait, différents concepts d'espèce ont été introduits pour pouvoir représenter la diversité du vivant.

### 2.1-Concept d'espèce Typologique (ou type)

Ce concept propose une vision invariable et statique de l'espèce, où l'espèce correspond à un ensemble d'organismes tous conformes d'un point de vue morphologique. C'est la notion d''archétype' définit par Platon & Aristote. Cela se traduit aujourd'hui dans le domaine de la microbiologie par la notion de 'spécimen type' des collections comme l'ATCC (American Type Culture Collection)[6].

Ce concept peut certes se défendre mais il comporte une très grande contrainte : l'interdiction des variations. Hors, les variations et l'adaptation sont l'essence même de la spéciation. De plus, il n'intègre pas la notion évolutive, donnant une vision de fait taxonomique et non systématique du vivant. Un autre problème important dans l'application de ce concept d'espèce consiste en la définition même de l'espèce. Selon quels critères se définit un 'type' caractéristique? Où trouve t on la vérité de l'espèce? Quel est le véritable archétype?

### 2.2-Concept d'espèce Morphologique

Une espèce est ici considérée comme un groupe d'organismes avec des caractéristiques anatomiques similaires. C'est un concept communément choisi par des taxonomistes des plantes et aussi pour des organismes à reproduction asexuée. Certains critères morphologiques sont encore utilisés dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Ce concept se révèle très utile pour les espèces fossiles. Néanmoins plusieurs problèmes dans l'application de ce concept doivent être soulignés. La définition des critères morphologiques qui définissent l'espèce est arbitraire. L'utilisation de ce concept d'espèce morphologique est reliée à l'opinion de certains 'experts' (par exemple les champignons…). Les espèces sympatriques, morphologiquement non distinguables, peuvent appartenir à des lignées évolutives différentes. Par exemple, des *Bacillus* parfaitement identiques en terme de colonie,

[6] L'ATCC est un centre de ressource biologique privé, à but non lucrative dont la mission se concentre sur l'acquisition, l'authentification, la production, la préservation, le développement et la distribution des standards de référence des microorganismes, des lignées cellulaires et autres matériels pour la recherche dans les sciences de la vie.

provenant d'un même environnement, peuvent être distinct d'un point de vue évolutif (espèces cryptomorphes). Un autre exemple soulignant la limite de ce concept est le dimorphisme sexuel.

**2.3-Concept d'espèces biologiques**

Mayr (1963) définit les espèces comme "des groupes d'organismes pouvant se reproduire dans les populations naturelles mais isolées d'un point de vue reproductif des autres groupes". Donc, une espèce biologique est une population dont les membres peuvent se reproduire librement en conditions naturelles.

Chercher une issue conceptuelle de compromis, c'est trouver des processus partagés par une large fraction d'individus. Le concept d'espèces biologique a donc été adopté et les concepts précédemment énoncés sont devenus très peu utilisés. Néanmoins le concept d'espèce biologique souffre d'un vrai dilemme, celui de la reproduction asexuée. Il faut par ailleurs, tester jusqu'à quel point les organismes sont asexués. Les microorganismes sont capables de capter de façon assez commune du matériel génétique libre dans l'environnement (plasmides, virus, bactéries…). La barrière d'espèce biologique ne s'applique pas aux microorganismes. Donc, le concept d'espèce biologique ne convient pas pour les prokaryotes.

De fait, et pour se soustraire à l'arbitraire, il faut intégrer la dimension évolutive dans le concept d'espèce en particulier pour les microorganismes, et aussi, intégrer la dimension environnementale qui contribue dans une certaine mesure à l'évolution des espèces.

**2.4-Concept d'espèce écologique**

Une espèce est un groupe d'organismes occupant la même niche écologique. Cette niche écologique pour un organisme donné ne dépend pas seulement du lieu où vit l'organisme mais aussi de sa fonction dans l'environnement. Par analogie, il peut être proposé que l'habitat corresponde à l'adresse de l'organisme et la niche est sa profession biologiquement parlant (Odum, 1959). Grinnell (1917) définit la niche comme tous les sites ou tous les organismes d'une espèce peuvent vivre.

Le concept d'espèce écologique capture l'essence du phénotype postulant que l'expression génétique est reliée à l'environnement. Si l'idée est séduisante, elle est difficile à appliquer. Il n'est pas aisé de reconnaître une espèce alors que de nombreux organismes occupent la même niche en raison d'adaptations. Selon Beijerinck parlant des microorganismes *'tout est*

*partout',* il définit ainsi le concept d'ubiquité microbienne. Le concept d'espèce écologique est-il suffisamment résolutif pour les microorganismes ?

De fait comme alternative non arbitraire il reste l'utilisation de la dimension évolutive comme principe gouvernant le concept d'espèce pour les microorganismes.

**2.5-Concept d'espèce évolutive**

Une espèce est une « lignée unique de descendants conservant l'identité ancestrale, et ayant sa propre tendance évolutive, sa propre destinée ». L'évolution est un processus historique et les espèces sont le résultat de l'éclatement d'espèces qui les ont précédées (spéciation). Tous les critères précédents se doivent d'être corrélés avec les relations généalogiques. C'est donc un concept utilisé pour les données fossiles et uniquement ce type de données. Il est appliqué pour la compréhension de la lignée des hominidés et n'est pas applicable *sensus stricto* aux microorganismes car il est nécessaire que l'espèce soit prédéfinie.

**2.6-Concept d'espèce phylogénétique**

Ici, une espèce est un groupe monophylétique descendant d'un ancêtre unique déduit d'une analyse phylogénétique (Mishler & Brandon, 1987). Ce concept utilise des données génétiques codées dans des matrices permettant de comparer le ou les organismes étudiés à d'autres sources de données génétiques pour construire des phylogénies moléculaires.

Une contrainte évidente de ce concept est la difficulté de prendre en compte les génomes hybrides susceptibles de produire des phylogénies peu résolues. L'analyse de génomes complets de bactéries a montré que le phénomène est fréquent : 5 à 15% des génomes de bactéries provient d'autres 'espèces'. Il est ainsi difficile d'appliquer ce concept. La solution réside dans le choix des informations génétiques codées, comme l'utilisation de gènes universels ayant des taux de mutation par unité de temps relativement faibles, des gènes hautement conservés où l'information phylogénétique est peu bruitée. Ces gènes de choix rendent applicable le concept phylogénétique : le gène codant pour l'ARN de la petite sous unité ribosomique (ARNr 16S ou 18S), le gène codant pour le facteur d'élongation EF1$\alpha$, les gènes RPB 1 & RPB 2.

Ce concept phylogénétique d'espèce est le seul 'valide' pour l'analyse de l'écrasante majorité des microorganismes non cultivables. Dans ce travail c'est donc ce concept qui est implicitement et délibérément choisi. Les espèces aussi appelées 'phylotypes' sont définies par leur monophylie et le taux d'homologie entre séquences d'ARNr16S (supérieur à 97%).

## 3 – TAXONOMIE, SYSTEMATIQUE ET CLASSIFICATION

La taxonomie est la science qui étudie les relations entre les organismes. Elle englobe la classification, la nomenclature et l'identification. Le système classique de taxonomie associe les bactéries en genres et en espèces selon des caractères phénotypiques arbitraires, sans faire intervenir directement leurs relations phylogéniques. La systématique bactérienne moderne quant à elle se base sur plusieurs techniques moléculaires, chacune puisant l'information à des niveaux cellulaires différents (protéines, acides gras, ADN…). Les résultats obtenus de différents niveaux cellulaires permettent une classification « consensus » du microorganisme. Avec la généralisation des techniques de caractérisation basées sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR, voir Partie I - Diversité bactérienne) la taxonomie bactérienne bouleverse la taxonomie (Zakhia and de Lajudie, 2006). En 2004, Keller et Zengler soulignent que 4 800 espèces bactériennes ont été cultivées et publiées ; mais d'un point de vue systématique, on sait que ce chiffre ne représente qu'une infime partie de la diversité des bactéries.

### 3.1-Approche chimiotaxonomique

Cette approche consiste en l'analyse **chimique** des **constituants cellulaires** ; c'est-à-dire la structure et la composition de la paroi, des membranes plasmiques, du peptidoglycane.

### 3.2-Approche moléculaire

Cette classification se fait suivant :

- l*a composition en bases de l'ADN*. Le pourcentage de guanine + cytosine varie d'un organisme à un autre, mais est relativement constant au sein d'une même espèce. Le pourcentage de G + C varie de 25 à 70% chez les prokaryotes ;

- *l'hybridation ADN – ADN*. Cette technique permet de comparer la totalité du génome bactérien et d'estimer le degré d'homologie entre deux bactéries. Cette caractéristique est importante dans la définition d'une espèce bactérienne.

- l*e séquençage des gènes codant les* ARNr. Chez les prokaryotes, la comparaison de la séquence nucléotidique du gène codant pour l'ARNr 16S permet d'évaluer le degré de parenté entre ces organismes. Ces gènes permettent la classification phylogénétique, qui est développée ci-dessous.

### 3.3-Approche trophique

On classe le plus souvent les bactéries suivant leur **métabolisme.** On les définit à partir de leur ressource trophique, c'est à dire la substance d'où elles tirent leur énergie pour la croissance et le développement. Dans tout organisme vivant, l'énergie est stockée sous forme d'ATP (Adénosine-tri-phosphate) qui, par la perte d'un groupement phosphate libère de l'énergie utilisable pour une autre réaction. La production de ces molécules d'ATP et ainsi, le stockage de cette source d'énergie est contrôlé par une chaîne de molécules de transport d'électron, le plus souvent transmembranaire, qui réalisent une succession de réaction d'oxydo-réduction. Dans ce type de réaction chimique, les électrons sont transférés d'un donneur d'électrons vers un accepteur. C'est à ce niveau que les bactéries influent le plus sur leur environnement. Elles vont en effet mobiliser ces donneurs et ces accepteurs d'électrons dans le milieu pour alimenter leur chaîne de transferts d'électron. Les donneurs et les accepteurs sont ainsi modifiés chimiquement.

Ainsi la diversité des métabolismes prokaryotes nécessite l'utilisation d'un vocabulaire spécifique pour décrire les groupes métaboliques. Ce vocabulaire est basé sur la source d'énergie (organique ou inorganique, lumineuse ou chimique) utilisée par la bactérie. Si un organisme utilise du carbone organique comme source d'énergie, il est référencé comme **hétérotrophe** ; alors que si il fixe tous les carbones à partir du $CO_2$, c'est un **autotrophe**. Comme indiqué dans le tableau I-1, au sein des autotrophes, une séparation suivant la source d'énergie lumineuse ou chimique peut être faite. On parle alors de **phototrophes** ou de **chimiotrophes**. Au sein du groupe des chimiotrophes, certaines utilisent comme source énergétique du carbone organique (**chimioorganotrophes**) et d'autres du carbone inorganique (**chimioaulithotrophe**).

Certaines bactéries peuvent alterner hétérotrophie et autotrophie, elles sont décrites comme des bactéries **mixotrophes**. Cette plasticité métabolique, une spécificité du monde bactérien, permet à ce groupe de bactérie de s'adapter aux différentes conditions environnementales (Nealson and Stahl, 1997 ; Chapelle, 2001). Elle est liée à la possibilité que possèdent les bactéries d'utiliser plusieurs accepteurs d'électrons dans leur chaîne respiratoire (chez les eukaryotes seul l'oxygène joue le rôle d'accepteur terminal d'électrons). Les groupes bactériens sont capables d'utiliser un grand nombre de couples redox environnementaux.

C'est cette spécificité métabolique qui permet la présence des bactéries dans des environnements extrêmes, leur grande faculté d'adaptation aux changements du milieu et leur caractère ubiquiste.

**Tableau I-1 : Groupes métaboliques permettant de classifier les organismes prokaryotes**

(Modifié d'après Nealson & Stahl, 1997)

| Processus | Détail des Processus | |
|---|---|---|
| Autotrophie [a] | | |
| Photo- | Oxique | |
| | Anoxique | |
| | donneur d'électron | $H_2$ |
| | | $H_2S$ , S° |
| | | C organique |
| | | $Fe^{2+}$ |
| Litho- [c] | Source d'énergie | $H_2$ |
| | | $HS^-$ , S°, $S_2O_3^{2-}$ |
| | | $NH_4^+$, $NO_3^-$ |
| | | $Fe^{2+}$ |
| | | $Mn^{2+}$ |
| Hétérotrophie [b] | Fermentation | |
| | Respiration aérobie | |
| | Respiration anaérobie | $NO_3^-$, $NO_2^-$ |
| | | S°, $S_2O_3^{2-}$, $SO_3^{2-}$, $SO_4^{2-}$ |
| | | $Fe^{3+}$, $Mn^{4+}$ |
| | | $CO_2$ |
| | | fumarate (C organique) |

[a] Autotrophie se rapporte à la capacité de se développer avec $CO_2$ comme source de carbone.
[b] Hétérotrophie se rapporte à la necessité d'avoir du carbone organique pour se développer.
[c] Lithotrophie se rapporte à la capacité d'utiliser des composés inorganiques comme source d'énergie. Ces sources d'énergie sont généralement oxydées par l'oxygène, mais il est aussi possible d'utiliser les accepteurs d'électron présentés dans la respiration anaérobie.

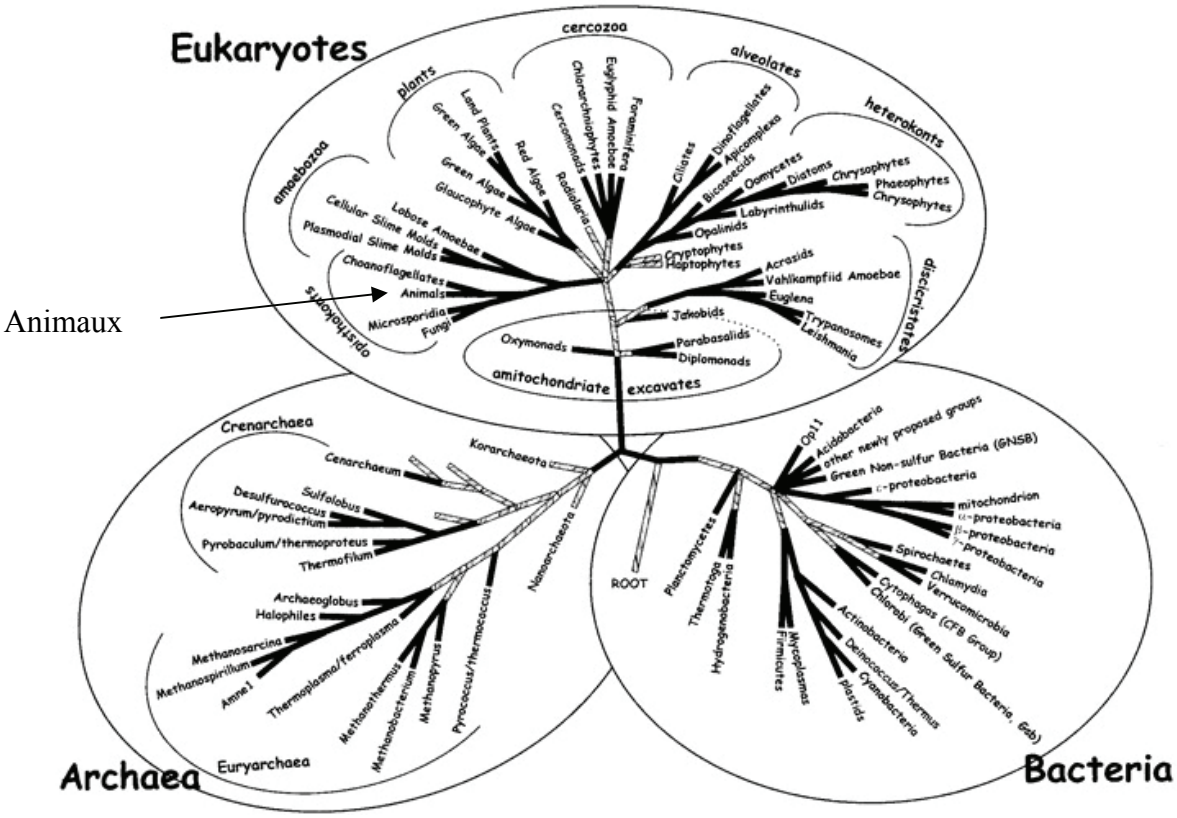



**Figure I-2 : Arbre de la vie déterminé à partir de comparaison de séquence plusieurs gènes.** Les branches pleines indiquent que les branches robustes. (D'après Baldauf *et al.*, 2004)

### 3.4-Approche systématique

Les différentes approches décrites précédemment ne permettent pas d'établir les relations évolutives existantes entre les bactéries. Les relations phylogénétiques entre les bactéries ont été difficiles à appréhender, mais les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'envisager l'évolution bactérienne donc la systématique à l'aide de gènes appropriés appelés « horloges moléculaires universelles ». Il s'agit de gènes présents partout, avec la même fonction, très conservés et qui accumulent un certains nombres de mutations (variations de séquences) par pas de temps. Cela permet d'établir la phylogénie entre des organismes éloignés. La percée dans l'étude de la phylogénie des prokaryotes a commencé dans les années 1970 (Woese et Fox 1977; Fox *et al.* 1977; Woese 1991). Ces travaux ont permis d'accéder à la diversité prokaryotique de façon plus fine, et ont catalysé les études actuelles révélant l'étendue insoupçonnée de la diversité des microorganismes. La figure I-2 présente l'arbre de la vie déterminé par Baldauf *et al.* en 2004. Il montre la part de la diversité du monde bactérien par rapport au monde eukaryote. Les prokaryotes sont séparées en deux groupes : les Archaea et les eubactéries.

Les Archaea forment un groupe particulier mis en évidence par les méthodes de phylogénie moléculaire (DeLong, 1992) comprenant de nombreux extrêmophiles (milieu acides, température élevé,…) mais il existe aussi des Archaea se développant dans le sol, associées aux racines des plantes, dans des marais ou le rumens de ruminants.
En 1987, Woese a défini à partir de l'analyse de l'ARN ribosomal 16S et 23S, 12 groupes bactériens (encart de la Fig.I-3). En 1998, Hugenholtz a défini de nouveaux groupes candidats bactériens notés OP1 à OP12 sur la figure I-3. L'espèce phylogénétique est le concept d'espèces implicites (voir Chapitre I-Concept d'espèces et Microorganismes).

Malgré la découverte de nouveaux phylums la classification du règne bactérien de Woese (Woese, 1987) est toujours utilisée. Les différents groupes présentés ici sont ceux décrits par Woese en 1987.

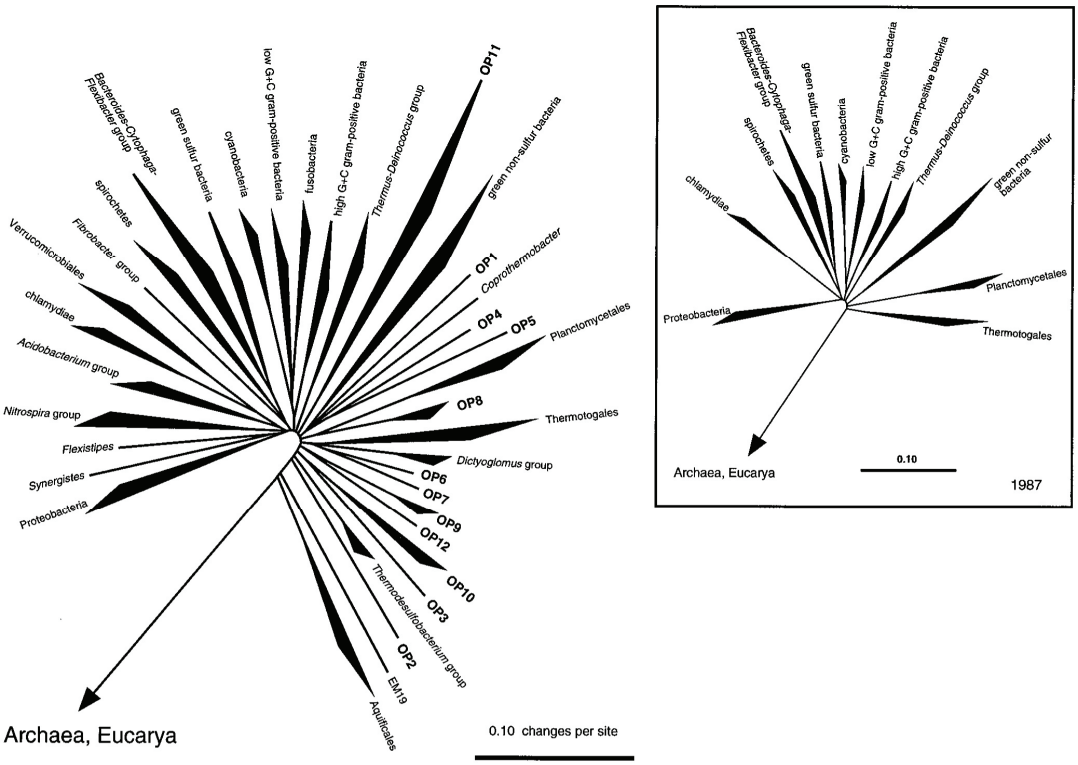



**Figure I-3 : Représentation en diagramme radial de l'étendue phylogénétique connue du règne des bactéries en 1987 (Woese, 1987) (dans l'encart) et en 1998 (Hugenholtz *et al.*, 1998).** 12 nouvelles divisions possibles ont été déterminée dans l'étude de Hugenholtz *et al.*, 1998. (Issue de Hugenholtz *et al.*, 1998).

### 3.4.1 – Protéobactéries ou bactéries pourpres

On retrouve dans cette division la quasi-totalité des bactéries Gram négatives. La plupart sont mobiles grâce à un flagelle, mais d'autres peuvent être immobiles ou se déplacent par glissement. Elles sont principalement 'anaérobies et hétérotrophes', mais les exceptions sont nombreuses. Certaines protéobactéries, les bactéries pourpres, sont 'autotrophes photosynthétiques'. Elles sont naturellement divisées en quatre sous division : α, β, γ et δ (Woese, 1987) :

**α-Protéobactéries.** Cette division regroupe des bactéries photosynthétiques et non-photosynthétiques, des espèces réduisant et oxydant les composés azotés. Le métabolisme aérobie apparaît dans un grand nombre d'espèces de ce groupe. Cette sous division comporte un intérêt biologique général de part ses membres qui interagissent avec différents eukaryotes (*Rhizobium*, *Agrobacterium*…).

**β-Protéobactéries.** La plupart des espèces de la β sous classe des Protéobactéries se divisent en 2 groupes : *Spirillum* et *Neisseria*. Cette sous division est considérée par Woese

(1987) comme un pot pourri de genre classique, car certains n'ont aucune cohérence phylogénétique.

**γ-Protéobactéries.** Les bactéries appartenant à la γ sous classe des Protéobactéries présente une large variété de métabolismes : photosynthétiques ou non- photosynthétiques ; aérobies et anaérobies ; hétérotrophes les chimio-lithotrophes, etc. On retrouve dans ce groupe les *Escherichia* et les *Pseudomonas sp*…

**δ-Protéobactéries.** Cette sous division comporte trois phénotypes distincts : les bactéries réduisant le soufre et les sulfates, les myxobactéries et les Bdellovibrio.

3.4.2 – les bactéries Gram + à fort et à faible G+C%

Cette sous classe est constituée de quatre sous divisions, dont seulement deux sont bien caractérisées (Woese, 1987). Ces deux sont facilement distinguables par leur composition en bases de leur ADN. Les espèces dont l'ADN comporte plus de 55% de guanine+cytosine sont regroupées dans la sous- division de Gram+ à fort G+C % ; celles dont le pourcentage de guanine+cytosine est inférieur à 50% sont considérées comme les Gram+ à faible G+C %. Parmi les bactéries de la sous-division Gram+ à faible G+C %, on retrouve les *Bacillus, Staphylococcus, Streptococcus, Clostridium*… ; les Gram+ à fort G+C % : Actinomycètes, Streptomycètes, Mycobacterium…

3.4.3 – les cyanobactéries

Les cyanobactéries sont des phototrophes strictes avec une photosynthèse similaire à celle des plantes supérieures. Elles étaient autrefois classées parmi les algues, et désignées comme les algues bleu-vertes. Woese (1987) les a introduites dans le domaine des bactéries ; elle constitue un groupe phylogénétiquement cohérent.

3.4.4 – les bactéries vertes soufrées

Ces bactéries sont des photolithotrophes obligatoires, anaérobie, et capables d'utiliser les sulfures et le soufre élémentaire comme donneur d'électron.

3.4.5 – les Spirochètes

Les Spirochètes sont des bactéries Gram négatives qui se distinguent par la présence de flagelles courant en longueur entre la membrane cellulaire et la paroi cellulaire, appelés *filaments axiaux*. Ils sont divisés en 3 familles. Parmi les membres importants, on retrouve les espèces du genre *Leptospira* qui provoque la leptospirose ; le genre *Borrelia,* parmi

lequel *Borrelia burgdorferi,* agent de la maladie de Lyme ; et l'espèce *Treponema pallidum*, agent de la syphilis.

3.4.6 – les Cytophaga (Flavobactéries)

Le genre *Cytophaga* rassemble des bactéries Gram négatives, aérobie strictes ou anaérobie facultatives. Les *Cytophaga* sont des bactéries communes dans le sol, les eaux douces et marines, les eaux usées, les matières organiques en décomposition, les déjections animales. Elles sont capables de dégrader un grand nombre de molécules organiques et représentent un groupe bactérien très important impliqué dans la transformation aérobie de la matière organique.

3.4.7 – les Planctomycètes

Les planctomycètes ont été identifiées dans divers environnements d'eau douce, de mer, de sol, d'invertébrés… Ils ont été isolés comme des chimiohétérotrophes à partir d'une large gamme d'habitat. Les 'anammox' sont classés dans cette division. Ces bactéries 'anammox', découvertes récemment, possèdent un métabolisme autotrophe basé sur l'oxydation anaérobie de l'ammonium (Voir Chapitre I-Cycle de l'Azote).

3.4.8 – les Chlamydiae

Les *Chlamydiae* sont toutes des parasites de cellules d'eukaryotes. Les espèces les plus connues infectent les mammifères et les oiseaux.

3.4.9 – les *Deinococci-Thermi*

Les *Deinococci-Thermi* forment un groupe de bactéries constituées de coques hautement résistantes à l'environnement. Il existe deux principaux groupes: les Deinococcales et les Thermales. Les *Deinococci* appartiennent au groupe des Deinococcales. Certaines sont hautement résistantes aux radiations, et, plus généralement c'est un groupe colonisant un certain nombre d'environnements extrêmes comme les déchets nucléaires, les matériaux toxiques, à des températures très basses ou très élevées. Les Thermales incluent différents genres se développant à température élevée. Appartient à ce groupe, *Thermus aquaticus* dont on utilise l'ADN polymérase en PCR (voir Chapitre IV - Diversité bactérienne).

3.4.10 – les Bactéries vertes non soufrées

Ce phylum est un de ceux pour lesquels peu de justification phylogénétique existe (Woese, 1987). Ce groupe comporte quatre membres identifiés : un phototrophe thermophile *Chloroflexus aurantiacus*, deux espèces mésophile du genre *Herpetosiphon* et le thermophile *Thermomicrobium roseum.*

3.4.11 – les thermotoga

Les Thermotogales sont des bactéries thermophile ou hyperthermophile, dont la température optimale de croissance est de 80°C et qui se développent préférentiellement dans une gamme de pH neutre (Huber and Hannig, 2004). Elles ont été retrouvées dans des habitats volcaniques de faible salinité ou à hautes températures comme les systèmes marins profonds et peu profonds et dans les gisements de pétrole continentaux.

3.4.12 – les Aquifex

Le phylum *Aquifex* est composé de bactéries Gram négatives qui sont chimiolithoautotrophes. Comme les bactéries hyperthermophyles, *Aquifex aeolicus* se développe à des températures extrêmes, à proximité de volcan et de sources chaudes.

## 4 – ROLE DES BACTERIES

La composition microbienne peut affecter les processus de l'écosystème, comme par exemple : la respiration du CO2 et la décomposition de la matière organique (Mc Grady *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 2005), la production autotrophe et hétérotrophe (Naeem et Li, 1997; van der Heijden *et al.*, 1998) et le cycle de l'azote (Cavigelli et Robertson, 2000; Horz *et al.*, 2004). L'importance du rôle des bactéries dans l'évolution chimiques des eaux est largement reconnue (par exemple : Thortenson *et al.*, 1979 ; Chapelle *et al.*, 1987 ; Murphy *et al.*, 1992; Murphy et Schramke, 1998, McMahon, 2001). Elles jouent un rôle primordial dans la transformation des espèces chimiques réduites en espèces oxydées produisant un changement de composition chimique des eaux souterraines.

Les réactions d'oxydo –réduction ne peuvent se produire que dans un ordre spécifique qui dépend de l'énergie libre ($\Delta G_0$) fournie par la réaction: selon les principes de la thermodynamique les réactions les plus exergoniques (produisant le plus d'énergie) sont favorisées dans le milieu. La figure I-4 représente cette affinité particulière montrant qu'un $\Delta G_0$ négatif est préférentiellement utilisé par les bactéries à la différence d'un $\Delta G_0$ positif. Par exemple dans l'eau de mer les sulfates (oxydant moyen) présents en quantité non négligeable ne sont réduits que lorsque qu'aucun oxydant plus énergétique n'est disponible (absence d'oxygène ou de nitrate).

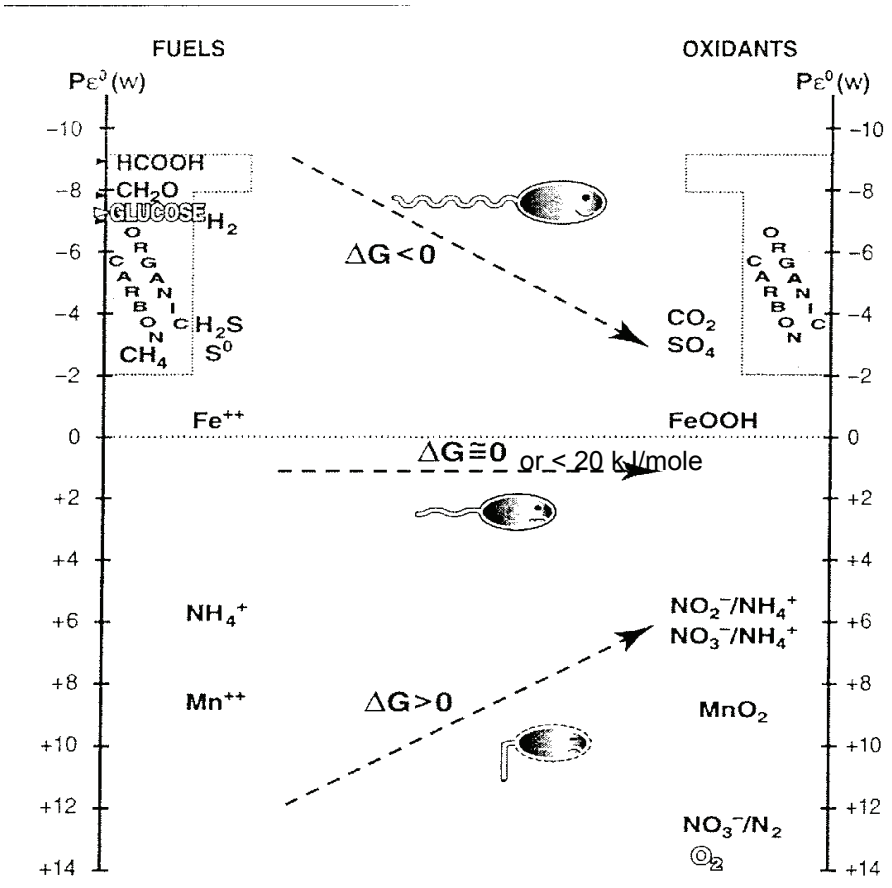
Dans les milieux naturels et les eaux souterraines, le réducteur le plus fort et disponible en quantité suffisante est la matière organique. La matière organique est ainsi réduite suivant une séquence dite diagénétique ou redox : c'est à dire que l'oxydant le plus fort réagit avec les réducteurs les plus forts, cette séquence va ainsi de la plus exergonique à la moins énergétique. Dans l'environnement, cette séquence d'oxydo-réduction (Tabl.I-2 & Fig.I-4) en cascade est constituée des oxydants suivant : $O_2$, $NO_3^-$, $Mn^{2+}$, $Fe^{2+}$, $SO_4^{2-}$et la matière organique elle –même, pour un réducteur unique : la matière organique.

Un grand nombre de bactéries est connu pour intervenir dans le recyclage de certains nutriments. Quatre exemples sont développés ici : l'utilisation du Fer, du Soufre, du Manganèse et de l'Azote par les bactéries. Une attention toute particulière sera portée au cycle de l'azote.

**Tableau I - 2 Séquence des réactions redox** [Ponnamperuma, 1972 ; Sikora and Keeney, 1983 ; Mariotti, 1994 ; Hedin *et al.*, 1998 ; Mitsch and Gosselink, 2000]

| Processus redox | Réaction chimique | $\Delta G^{o}_{W}$ (kJ)[1] | Potentiel redox (mV) |
|---|---|---|---|
| Respiration aérobie<br>Consommation d'$O_2$ | $CH_2O + O_2 \rightleftharpoons CO_2 + H_2O$ | -502.1 | + 500 à + 350 |
| Dénitrification<br>Respiration des nitrates | $CH_2O + 4/5\ NO_3^- + 4/5\ H^+ \rightleftharpoons CO_2 + 2/5\ N_2 + 7/5\ H_2O$ | -476.6 | + 350 à + 100 |
| Réduction du Manganèse<br>- Mn (IV) - | $CH_2O + 2\ MnO_2 + 4\ H^+ \rightleftharpoons CO_2 + 2\ Mn^{2+} + 3\ H_2O$ | -340.2 | < + 400 |
| Réduction du Fer<br>- Fe (III) - | $CH_2O + 4Fe(OH)_3 + 8\ H^+ \rightleftharpoons CO_2 + 4Fe^{2+} + 11\ H_2O$ | -115.9 | < + 400 |
| Réduction des Sulfates<br>- $SO_4^{2-}$ - | $CH_2O + 1/2\ SO_4^{2-} + 1/2\ H+ \rightleftharpoons CO_2 + 1/2HS^- + H_2O$ | -104.6 | 0 à - 150 |
| Fermentation méthanique | $CH_2O + 1/2\ CO_2 \rightleftharpoons CO_2 + CH^{4+}$ | -92.9 | < - 150 |

*[1] $\Delta G^{o}_{W}$ est l'énergie libre de la réaction chimique telle que $\Delta G^{o}_{W} = \Delta G^{o} - RT\ln[H^+]^c$ où $\Delta G^{o}$ est défini dans les conditions normales de températures (25°C) et de pression (pression atmosphérique) et à pH=7, c est le coefficient stoechiométrique de $H^+$, R est la constante des gaz parfaits et T est la température en Kelvin.*




*Thermodynamics: The Chemical Fuels and Oxidants of Life*

**Figure I-4 : Thermodynamiques des combustibles et oxydants chimiques de la vie.** Ce schéma est conçu pour montrer les différents couples d'états redox connus pour être utilisés par les organismes vivants. Les combustibles (fuels) sont considérés comme une source d'énergie d'origine organique ou inorganique, alors que les oxydants sont utilisés pour brûler les combustibles. Si la flèche entre la source d'énergie et l'oxydant à une pente négative, et des propriétés cinétiques le permettant, un organisme pourra récupérer l'énergie. Les prokaryotes ont colonisé la majorité des niches énergétiques Alors que les eukaryotes sont confinés à très peu de composés organiques comme combustible et à l'oxygène moléculaire comme oxydant. (Modifié d'après Nealson et Stahl, 1997)

- **Oxydation et réduction du Manganèse**

Le manganèse est un élément majeur naturellement présent dans les minéraux, sous forme oxydée (par exemple β-$MnO_2$, ou pyrolusite) ou carbonatée (par exemple $MnCO_3$, ou rhodochrosite). Les bactéries oxydant et réduisant le manganèse jouent un rôle important dans l'immobilisation et la mobilisation du manganèse dans les environnements de sol, d'eau douce et d'eau de mer (Tabl.I-3). Les bactéries oxydant le manganèse contribuent à l'accumulation d'oxyde de manganèse sur et dans les sédiments, alors que les bactéries réduisant le manganèse peuvent mobiliser le manganèse dans la colonne d'eau et l'environnement.

Il existe un grand nombre de bactéries réduisant le manganèse, elles sont principalement aérobies et sont présentes dans divers environnement (surface de roche, sols, eaux douces de lac et rivière, océan, sédiments). Les exemples les plus notables sont : *Arthrobacter spp.*, *Leptothrix spp*., *Hyphomicrobium spp*., *Oceanospirillum*, *Vibrio* et *Metallogenium.*

Les bactéries oxydant le manganèse incluent des anaérobies strictes et facultatives, des aérobies et comprennent des formes Gram + et Gram - ; par exemples : *Bacillus* spp., *Geobacter* sp., *Shewenella*, et *Acinetobacter* sp.

**Tableau I-3 : Réaction d'oxydation et réduction du manganèse**. $\Delta H°_r$ est la valeur d'enthalpie libre de la réaction à 25°C et 1bar de pression (modifié d'après Langmuir, 1997)

| Examples de minéraux | Réaction | $\Delta H°_r$ (kcal/mol) | $\Delta G°_r$ (kJ) |
|---|---|---|---|
| pyrolusite (β-$MnO_2$) | $MnO_2 + 4H^+ + 2e^- \rightleftharpoons Mn^{2+} + 2H_2O$ | -65.11 | -9.23 |
| manganite (γ-MnOOH) | $MnOOH + 3H^+ + e^- \rightleftharpoons Mn^{2+} + 2H_2O$ | - | -8.01 |
| hausmanite ($Mn_3O_4$) | $Mn_3O_4 + 8H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 3Mn^{2+} + 4\ H_2O$ | -100.64 | -10.19 |
| pyrochroite ($Mn(OH)_2$) | $Mn(OH)_2 + 2H^+ \rightleftharpoons Mn^{2+} + 2H_2O$ | - | -6.74 |

- **Oxydation et réduction du Fer**

Les réactions d'oxydation et de réduction du fer réalisées par les microorganismes jouent un rôle essentiel dans le cycle du Fer. Les microorganismes modifient sa mobilité et ainsi son accumulation. L'oxydation (Tabl.I-4) du fer se fait de façon enzymatique. Les bactéries qui oxydent le fer peuvent être : acidophiles comme *Thiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* ou *Metallogenium sp*, ou neutrophile comme *Gallionella.*

La réduction du fer peut être enzymatique ou nonenzymatique. Beaucoup de bactéries qui oxydent le fer utilisent le fer III comme accepteur final d'électron. La réduction du fer ferrique peut s'accompagner du processus de fermentations chez *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Vibrio* sp., et aussi des anaérobies comme *Clostridium* spp., *Bacteroides hypermega* et

*Desulfotomaculum nigrificans*. De plus certaines bactéries anaérobies strictes peuvent respirer du fer ferrique de façon hétérotrophe : *Geobacter* sp., un grand nombre de bactéries réduisant les sulfates, *Shewanella* sp. et *Pseudomonas* sp.

**Tableau I-4 : Réaction d'oxydation et réduction du fer**.

| Examples de minéraux | Réaction | | |
|---|---|---|---|
| Pyrite ($FeS_2$) | $2FeS_2 + {}^{15}/_{2}\, O_2 + 7\, H_2O \rightleftharpoons 2Fe(OH)_3 + 4SO_4^{2-} + 8H^+$ | milieu peu acide | (Toulhoat, 1996) |
| | $2FeS_2 + {}^{15}/_{2}\, O_2 + 3\, H_2O \rightleftharpoons 2Fe(OH)^{2+} + 4SO_4^{2-} + 4H^+$ | milieu acide | (Toulhoat, 1996) |
| | $2FeS_2 + {}^{15}/_{2}\, O_2 + 3\, H_2O \rightleftharpoons 2Fe^{3+} + 4HSO_4^- + 2OH^-$ | milieu très acide (pH<2) | (Toulhoat, 1996) |
| Fer ferreux ($Fe^{2+}$) | $2Fe^{2+} + {}^{1}/_{4}\, O_2 + H^+ \rightleftharpoons Fe^{3+} + {}^{1}/_{4}\, H_2O$ | | |
| Jarosite ($KFe_3(SO_4)_2(OH)_6$) | $3Fe^{3+} + K^+ + 2SO_4^{2-} + 6H_2O \rightleftharpoons KFe_3(SO_4)_2(OH)_6 + 6H^+$ | | (Hudson-Edwards *et al.*, 1999) |

- **Oxydation et réduction du Soufre**

Le soufre apparaît dans la nature sous forme organique et inorganique et différents organismes peuvent l'assimiler sous une forme et/ou une autre. Les microorganismes jouent un rôle très important dans la minéralisation des composés soufrés organiques dans les environnements de sol et d'eau. Le soufre inorganique peut exister sous différents états d'oxydation (sulfure, soufre et sulfate), contrôlés par les bactéries (et Archaea).

Les bactéries oxydant le soufre sont le plus souvent chemolithotrophes, photolithotrophes anoxygéniques et oxygenique, mixotrophes et hétérotrophes ; quelques exemples : groupe *Thiobacillaceae*, *Beggiatoaceae, Thiobacillus denitrificans, Thermotrix thiopara* (bactéries anaérobies facultatives*),* des bactéries photosynthétiques pourpres (*Chromatiaceae*) et vertes (*Chlorobiaceae*). (Tabl.I-4)

La plupart des bactéries réduisant le sulfate sont des bactéries Gram négative et peuvent utiliser $H_2$ comme source d'énergie. Cependant beaucoup requièrent une source de carbone organique. Les bactéries réduisant les sulfates peuvent être : des genres *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfotobacterium ;* réduisant les sulfures *: Clostridia spp ;* et les composés soufrés partiellement oxidés : *Shewanella putrefaciens.*

$$2\, CH_2O + SO_4^{2-} \longrightarrow 2HCO_3^- + H_2S \qquad (-77kJ/mol)$$

***Equation 1***

## 5 – CYCLE DE L'AZOTE

Le concept de cycle de l'azote (Fig.I-5) a été formulé par Lönhis dès 1913 (dans Paul et Clark, 1989). L'azote, composé essentiel à de nombreux processus biologiques, se retrouve entre autres dans les acides aminés constituant les protéines, et dans les bases azotées présentes dans l'ADN et l'ARN. Des processus sont nécessaires pour transformer l'azote atmosphérique en une forme assimilable par les organismes (Fig.I-6). L'azote atmosphérique est fixé par des bactéries du sol grâce à une enzyme, la nitrogénase. Il en résulte de l'azote ammoniacal ($NH_3$). Cette forme d'azote n'est pas très stable en présence d'oxygène et est rapidement oxydée en nitrite ($NO_2^-$) puis en nitrate ($NO_3^-$). L'azote ammoniacal et le nitrate sont des apports organiques très utilisés en agriculture pour la fertilisation des sols. Il arrive très fréquemment que le pool de fertilisant soit supérieur à la demande des cultures ou que le lessivage par les eaux de pluie se fasse plus tôt que prévu, ce qui induit un potentiel lessivage vers la nappe souterraine ou les rivières.

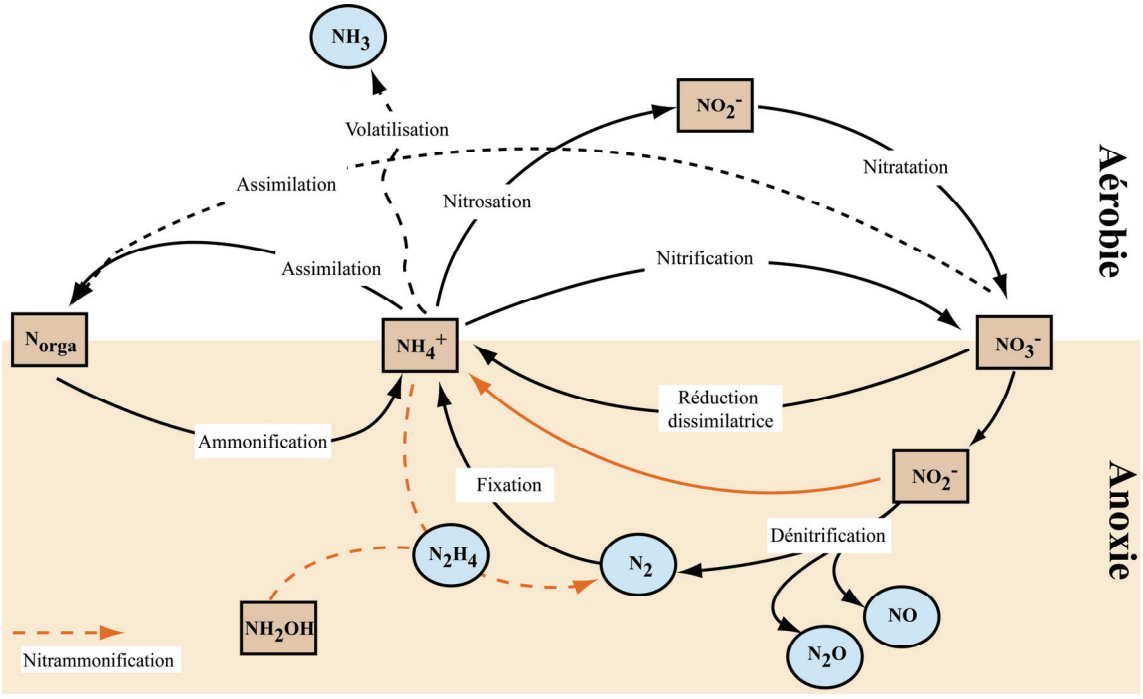



**Figure I-5 : Cycle de l'azote. En oval, sont représentées les formes gazeuses de l'azote et en carré les formes dissoute ou solide ($N_{orga}$).** Les flèches en oranges représentent le processus de nitrammonification réalisée par les bactéries Annamox.

Les nitrates peuvent être assimilés sous forme d'azote organique ou réduits en ions ammonium ($NH_4^+$) par réduction dissimilatrice de nitrate (DNRA). Le cycle de l'azote sera complété quand le nitrate sera réduit en retour en diazote ($N_2$) par un processus appelé

dénitrification. Récemment, l'oxydation anaérobie de l'ammoniac (Annamox) a été découverte (Jetten, 2001 ; Devol, 2003). L'ammonium est dans ce cas oxydé en diazote de manière anoxique, en utilisant le nitrite comme accepteur d'électron.

**La dénitrification dans le cycle de l'azote**

La dénitrification est un processus microbien dans lequel les composés azotés oxygénés sont utilisés comme des accepteurs terminaux d'électron. C'est une étape importante du cyclage de l'azote dans l'environnement.

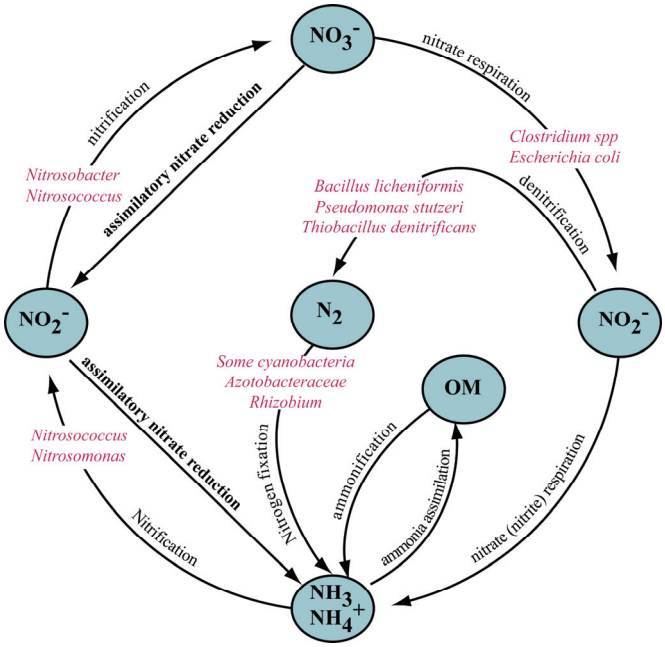



**Figure I-6 : Cycle de l'azote, du point de vue microbien.** Le schéma inclus quelques exemples d'organismes qui participent à des étapes spécifiques du cycle (d'après dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 3rd edition p522, Singleton and Sainsbury (2001))

On ne va s'intéresser ici qu'à la dénitrification au sens strict soit l'élimination totale de l'azote du système sous forme gazeuse. La réduction *sensus lato* comprend l'ensemble des réactions et processus qui permettent la réduction des nitrates dans le milieu (à l'exception de la dilution physique par une masse d'eau exempte de nitrates). La dénitrification présente un intérêt particulier. La réduction des nitrates en azote gazeux élimine les nitrates du sol et ainsi d'un nutriment essentiel pour la plante. Elle est aussi utilisée dans un rôle épurateur des eaux usées. De plus la dénitrification peut aussi contribuer à modifier la chimie atmosphérique globale, à travers l'émission de NOx qui contribuent à l'effet de serre et participent à la destruction de la couche d'ozone (Philippot, 2005). Conrad (1996) a estimé que 70% des émissions totales de NOx proviennent de la dénitrification et de la nitrification dans les sols.

### 5.1 - Les organismes dénitrifiants

Les bactéries dénitrifiantes sont un bon modèle d'étude de l'influence de la diversité microbienne sur les fonctions de l'écosystème car c'est un groupe très étudié et présente une forte diversité phylogénétique (Tab.I-5). Les espèces dénitrifiantes sont trouvées dans plus de 50 genres bactériens (Zumft, 1997), chez les Gram + et les Gram -. La plupart des études se sont développées autour des protéobactéries, particulièrement abondante dans l'environnement. Tiedje (1988) estime que 10 à 50% des bactéries présentes dans les environnements de sol sont capable de réduire les nitrates en nitrites. La dénitrification n'est de plus pas restreinte aux eubactéries, des Archaea peuvent aussi participer à la réduction des nitrates (Cabello *et al.*, 2004).

| **Archaea** | **Bacteria (gram-négative)** |
|---|---|
| Organotrophe | Diazotrophe |
| Halophile | *Aquaspirillum* |
| *Haloarcula* | *Azospirillum* |
| *Halobacterium* | *Azoarcus* |
| *Haloferax* | *Bacillus* |
| Hyperthermophile | *Bradyrhizobium* |
| *Pyrobaculum* | *Pseudomonas* |
| | *Rhodobacter* |
| **Bacteria (gram-positive)** | *Rhodopseudomonas* |
| Organotrophe | *Sinorhizobium* |
| Formant des spores | Thermophile |
| *Bacillus* | *Aquifex* |
| Non-Formant de spores | *Bacillus* |
| *Jonesia* | *Thermothrix* |
| | Psychrophile |
| **Bacteria (gram-négative)** | *Aquaspirillum* |
| ○ Phototrophe | *Halomonas* |
| *Rhodobacter* | Halophile |
| *Rhodopseudomonas* | *Halomonas* |
| *Rhodoplanes* | *Bacillus* |
| ○ Lithotrophe | Formant des piments |
| oxydant S | *Chromobacterium* |
| *Beggiatoa* | *Flavobacterium* |
| *Thiobacillus* | *Pseudomonas* |
| *Thioploca* | Bourgeonnant |
| oxydant $H_2$ | *Blastobacter* |
| *Ralstonia* | *Hyphomicrobium* |
| *Paracoccus* | Fixe |
| *Pseudomonas* | *Cytophaga* |
| oxydant $NO_2^-$ ou $NH_4^+$ | *Flexibacter* |
| *Nitrobacter* | Magnetotactique |
| *Nitrosomonas* | *Magnetospirillum* |
| ○ Organotrophe | Pathogène |
| Carboxidotrophe | *Achromobacter* |
| *Pseudomonas* | *Alcaligenes* |
| *Zavarzinia* | *Agrobacterium* |
| Oligocarbophile | *Campylobacter* |
| *Aquaspirillum* | *Eikenella* |
| *Hyphomicrobium* | *Flavobacterium* |
| Fermentatrice | *Kingella* |
| *Empedobacter* | *Moraxella* |
| *Azospirillum* | *Morococcus* |
| Anaérobie facultative | *Neisseria* |
| *Alteromonas* | *Ochrobactrum* |
| *Pseudomonas* | *Oligella* |
| Aérobie | *Pseudomonas* |
| *Paracoccus* | *Sphingobacterium* |
| *Alcaligenes* | *Tsukamurella* |

**Tableau I-5 : Les groupes trophiques des espèces dénitrifiantes**. (d'après Zumft, 1997).

### 5.2 - Les enzymes impliquées dans la dénitrification

Une dénitrification bactérienne est principalement réalisée par des bactéries aérobies hétérotrophes. Ces bactéries possèdent la capacité de transformer leur respiration aérobie en une respiration anaérobie sous condition anoxique, réduisant les nitrates en nitrites puis en NO, $N_2O$ et $N_2$ totale. Les différents oxydes d'azote servent ainsi d'accepteur d'électron à la place de l'oxygène dans les chaînes de transports d'électron au niveau cellulaire. Le processus est initié par une combinaison de signaux externes et internes dont les principaux sont la pression partielle en oxygène et la présence de nitrate et de nitrite (Throbäck, 2006).

Pour que la dénitrification soit totale, elle nécessite l'action séquentielle de 4 enzymes (Fig.I-7 _ Zumft, 1997).

L'enzyme impliquée dans la réduction de $NO_3^-$ en $NO_2^-$ est la **nitrate réductase**, la réduction de $NO_2^-$ en NO est la **nitrite réductase** ; la réduction de NO en $N_2O$ est l'**oxyde nitrique réductase** et $N_2O$ en $N_2$ est réalisée par l'**oxyde nitreux réductase**. Cavigelli et Roberston (2000) ont montré que les enzymes avaient une sensibilité différente aux variations de pH. Le rôle de ces enzymes présenté est développé ci-après.

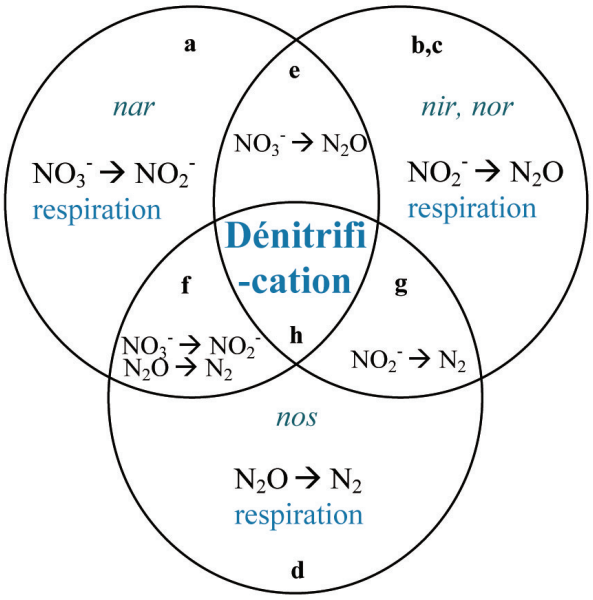



**Figure I-7 : Organisation en modulaires de la dénitrification**. Les quatre modules représentant le système respiratoire utilisant le nitrate (a), nitrite (b), NO (c), et $N_2O$ (d) constitue le processus complet. La dénitrification totale sera achevée seulement lorsque les quatre modules sont activés. Les enzymes nir et nor sont couplées par un régulateur commun. L'imbrication (e à g) des modules respiratoires individuels se produit naturellement chez les bactéries dénitrifiantes ou utilisant d'autres oxydes d'azote (d'après Zumft, 1997).

5.2.1 - La nitrate réductase (Nar)

Le gène de la nitrate réductase est largement distribuée dans l'environnement, cette enzyme est utilisée comme accepteur d'électron par de nombreuses anaérobies facultatives (Philippot *et al.*, 2002).

Il existe 2 formes distinctes de la 'dissimilatory nitrate reductase' : la nitrate réductase périplasmique (Nap) et la nitrate réductase liée a la membrane (Nar). Beaucoup d'organismes peuvent contenir les deux nitrates réductase ; mais seule la nitrate réductase membranaire est retrouvée dans tous les prokaryotes. C'est effectivement la seule enzyme impliquée dans la réduction des nitrates pouvant à la fois être présente dans les Gram + et les Gram -. La capacité à réduire les nitrates n'est pas restreinte aux bactéries dénitrifiantes et peut être aussi réalisée par les bactéries réduisant les nitrates, comme *Escherichia coli.*

Les sous unités actives pour Nar et Nap sont codées respectivement par *narG* et *napA*. Par ailleurs il existe une forte correspondance entre les arbres phylogénétiques générés par l'analyse du gène *narG* et du gène de l'ARNr 16S (Philippot, 2002). Et de ce fait l'utilisation de narG comme cible génétique revêt un intérêt particulier en terme d'évolution des processus de respiration mais aussi en terme d'études écologiques d'analyse de la diversité.

Les gènes de la nitrate réductase (*narG* et *napA*) sont utilisés comme marqueur fonctionnel dans les études des réducteurs de nitrates en nitrites dans le sol (Chèneby *et al.*, 2003 ; Roussel-Delif *et al.*,2005 ; Philippot *et al.*, 2002 ), les sédiments d'eau douce (par exemple Flanagan *et al.*,1999 ; Gregory *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2007 ).

C'est par ailleurs ce gène qui a été utilisé dans cette étude. La diversité des communautés comportant ce gène est présentée dans les parties IV et V.

5.1.2 - La nitrite réductase (Nir)

La réduction de $NO_2^-$ en NO est catalysée par la nitrite réductase. Cette étape est spécifique aux dénitrifiants et est considérée comme une étape clé car l'oxyde d'azote soluble est réduit en une molécule gazeuse. Cette réaction est catalysée par la nitrite réductase périplamisque soit cuivre (*nirK*) ou cytochrome cd1 (*nirS*). Aucune bactérie n'a été isolée contenant nirS et nirK (Thröback, 2006). De plus il n'y a pas de relation entre le type de nitrate réductase et la filiation taxonomique.

Les gènes *nirK* et *nirS* ont été utilisés pour détecter les communautés de bactéries dénitrifiantes à partir d'échantillons d'environnement d'eau douce (Braker *et al.*, 1998), de boues activées (Hallin *et al.*, 1999), de sédiments marins (Braker *et al.*, 2000) et de sol (Priemé *et al.*, 2002).

5.2.3 - L'oxyde nitrique réductase (Nor)

Cette enzyme qui catalyse la réduction de NO en $N_2O$ a été décrite comme un complexe de 2 sous unités qui sont codées par les gènes *norC* et *norB*. L'enzyme est intégralement membranaire. Pour éviter les concentrations toxiques, l'oxyde nitrique réductase a une très forte affinité avec le substrat. L'excès de NO est toxique y compris pour les dénitrifiantes ; une mutation de Nor peut d'ailleurs être létale pour ces bactéries (Zumft, 1997).

5.2.4 - L'oxyde nitreux réductase (Nos)

L'étape finale qui transforme $N_2O$ en $N_2$ est catalysée par l'oxyde nitreux réductase (Nos). Cette enzyme est une protéine homodimérique[7] périplasmique dont chaque monomère comporte 2 centres cuivre caractéristiques et dont la sous unité catalytique est codée par le gène *nosZ*. Cette enzyme n'est pas présente chez tous les dénitrifiants, leur produits final est alors le $N_2O$. Cette enzyme semble être très sensible à différentes perturbations comme le niveau d'oxygène (Firestone *et al.*, 1980) et aux fortes concentrations de métaux lourds (Holtan-Hartwig *et al.*, 2002).

Le gène nosZ a été utilisé pour détecter les communautés de bactéries dénitrifiantes à partir d'échantillons d'environnement de sol (Enwall *et al.,* 2005, Sharma *et al.,* 2005), de boues activées et de tourbe (Throback *et al.*, 2004).

[7] Le terme homodimérique est définit comme : un dimère composé de deux monomères identiques. Un monomère est une protéine composée d'une chaîne polypeptidique unique.

## 6 – FACTEURS CONTROLANT L'ACTIVITE BACTERIENNE

Après avoir abordés le rôle des bactéries dans l'environnement, différents facteurs chimiques et biologiques connus pour influencer l'activité bactérienne sont présentés ici. L'influence des facteurs physiques sur l'activité et les communautés microbiennes sera abordée dans le chapitre II. La figure I-8 présente les différentes interactions entre l'environnement, la physiologie microbienne, la composition de la communauté et les processus de l'écosystème.

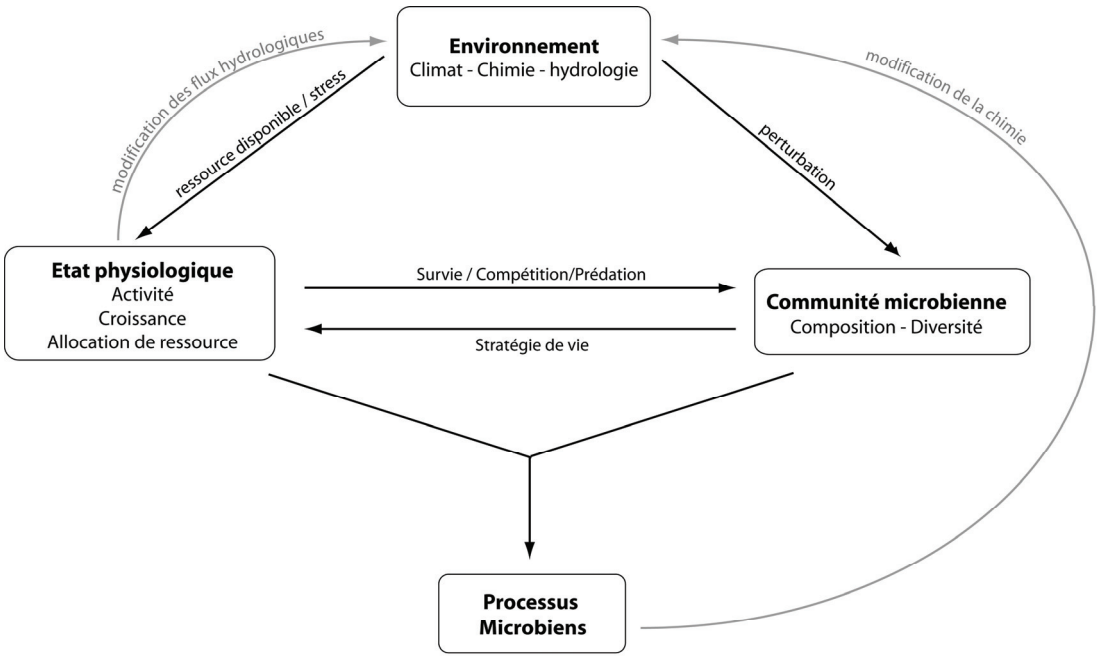



**Figure I-8 : Représentation schématique des interactions environnement/physiologie microbienne, composition de la communauté et processus de l'écosystème** (modifié d'après Schimel *et al.*, 2007).

### 6.1-La disponibilité en nutriments

L'oxygène est le paramètre clé qui contrôle la vie microbienne. Les processus métaboliques des bactéries sont en lien étroit avec les apports en nutriment et l'état d'oxydation du milieu, comme on a pu le voir précédemment. Arnon *et al.* (2005) ont montré que l'activité microbienne est amplifiée lors des contaminations de type organiques. D'autres facteurs environnementaux sont connus pour affecter la composition des communautés par phénomène de toxicité tels les métaux lourds, et les pesticides. Il a été décrit précédemment que dans le

cas des bactéries réduisant les nitrates la présence de carbone organique et de nitrates est essentielle pour une bonne activité.

### 6.2-Le pH

Le pH joue un rôle important sur la diversité des microorganismes (Fierer et Jackson, 2006) ; en revanche, il semble ne pas jouer un rôle sur la différenciation de la communauté (Fierer *et al.*, 2003). Les différences de pH peuvent provoquer le détachement de bio-films liés au substrat. La mesure de pH du sol est un critère important pour prédire la capacité des sols à pouvoir supporter des réactions microbiennes (Paul et Clark, 1989). Par exemple la transformation biologique de $NH_4^+$ en $NO_3^-$ (nitrification) est une des réactions des sols les plus sensibles au pH. Néanmoins le sol est un milieu hétérogène où des différences locales de pH à l'échelle du microsite existent. La mesure du pH d'un sol est donc délicate à extrapoler au processus. En revanche, en milieu aquatique, ces différences s'estompent, le milieu est plus homogène.

### 6.3-La température

Les bactéries peuvent vivre dans des environnements aussi divers que l'océan arctique ou les sources chaudes ('Hot Springs') (par exemple, Ferris *et al.*, 1996). Il n'est ainsi pas surprenant que leur température optimale de croissance varie. On peut classer les bactéries suivant leur préférence thermique. Les **psychrophiles** ont une température optimale de croissance de 15-20°C. Elles sont communément isolées des eaux froides et des fonds de lacs et des océans (par exemple Bowman *et al.*, 1997). Elles peuvent pousser de façon optimale à 0 – 4°C, certaines peuvent même grandir à -7°C si il y a assez de solutés pour diminuer le point de congélation. Les **mésophiles** sont caractérisées par une température optimale de croissance à 30-37°C. Les espèces saprophytes[8] ont une meilleure croissance à 30°C. Cependant chaque espèce peut grandir sur une large gamme de valeur. Les espèces saprophytes ont une gamme plus étendue que les parasites. Les **thermophiles** ont été découvertes dans les sources chaudes. Leur aire de répartition dans l'environnement est de fait assez réduite avec une croissance s'élevant à des températures de 50 et 60°C.

[8] Un organisme est dit **saprophyte** s'il est capable de se nourrir de matière organique en décomposition. Les microorganismes saprophytes vivent dans l'eau, l'air ou le sol sans dépendre d'un autre être vivant. Ils se nourrissent de matières organiques morte et la transforment en matière minérale.

### 6.4-Les interactions biotiques

Si on considère les aquifères, les interactions entre communautés microbiennes dépendent des voies métaboliques et des flux d'eau souterraine. Trois types d'interactions biotiques sont possibles : le commensalisme, le synergisme et la compétition.

Le **commensalisme** est un type d'association naturelle entre deux êtres vivants dans laquelle l'hôte fournit une partie de sa propre nourriture au commensal : la relation est à bénéfice non réciproque. Ce type d'association existe chez les bactéries aérobies. Elles peuvent créer des conditions de vie pour les bactéries anaérobies suivant un gradient descendant mais il n'y aura pas d'influence dans le direction opposée.

Le **synergisme** se rapporte à l'action de deux effets différents agissant ensemble pour créer un plus grand effet que la somme des actions produites par chacun indépendamment. On retrouve ce type d'interaction spécifique dans les biofilms microbiens.

La **compétition** désigne la rivalité entre des espèces vivantes pour l'accès aux ressources trophiques du milieu. Ce type d'interaction est supposé prédominant quand l'accès à la ressource est limité comme dans les environnements oligotrophes.

La petite taille des organismes et des communautés rend la détermination de ce paramètre particulièrement difficile. De plus seule une part infime de la diversité microbienne a été à ce jour cultivée à partir de tous les habitats étudiés (Keller and Zengler, 2004). Cependant des expériences en laboratoire ont pu mettre en évidence différentes interactions microbiennes, incluant la compétition et le synergisme.

# II

# INTERFACE SOL - NAPPE

Ce chapitre porte sur la relation hydrologie/communautés bactériennes. Avant d'aborder la spécificité des bactéries dans les milieux de sol, de nappe et d'interface sol/nappe, une description de ces milieux d'un point de physique est présenté.

## 1 - HYDROLOGIE

Les eaux souterraines sont la résultante temporaire du séjour dans le sol d'eaux en perpétuel déplacement dans l'environnement. L'étape souterraine fait ainsi partie intégrante d'un cycle en continuelle activité : le cycle hydrologique. Une des caractéristiques principales du cycle hydrologique est l'état de mouvement permanent des eaux et les échanges continuels entre les différents compartiments réservoirs. Dans le cycle hydrologique, on distingue deux grands types d'écoulement : les **écoulements rapides** et par opposition **les écoulements souterrains** qualifiés de **lents** qui représentent la part infiltrée de l'eau de pluie transitant lentement dans les nappes vers les exutoires. Les écoulements 'rapides' gagnent rapidement les exutoires (ordre de la journée) pour constituer les crues et sont définis en écoulement de surface ou ruissellement. Dans les écoulements souterrains, l'eau va transiter à travers un aquifère à une vitesse de quelques mètres par jour à quelques millimètres par an avant de rejoindre le cours d'eau. Les contraintes qui régissent la circulation de l'eau dans toute l'épaisseur de sol et de sous sol amène à distinguer l'eau du sol et l'eau des réservoirs souterrains. Ces deux compartiments sont abordés séparément.

Au dessous de la surface du sol, deux zones peuvent être définies (Fig.I-9) :

- la zone non saturée qui est définit comme la partie de la lithosphère où les interstices des roches et les pores du sol sont remplis en partie par de l'eau et en partie par de l'air. C'est ainsi un système à trois phases (solide, liquide, gaz) où seule une partie des espaces lacunaires sont remplis d'eau, le reste étant occupé par l'air du sol,
- la zone saturée qui est la partie de la formation aquifère dont tous les vides sont remplis d'eau. C'est un système à deux phases : solide et liquide.

La différence fondamentale entre la zone saturée et la zone non saturée réside dans le comportement hydrodynamique de l'eau lié à la présence d'air. Cela se traduit par une conductivité hydraulique[9] différente. Les zones saturées et non saturées ne sont pas des domaines séparés, mais font partie d'un système d'écoulement continu.

Pour faciliter l'étude de l'eau souterraine, l'eau du sol et du sous sol sont dissociées. L'**eau du sol** est assimilée à celle se trouvant dans la zone non saturée. La zone de l'eau du sol est le siège des racines des végétaux et constitue surtout une limite supérieure importante des nappes (alimentation, évaporation) ; elle est également le lieu de transit de matières et de substances. L'**eau du sous-sol** correspond à celle de la nappe. L'infiltration renouvelle l'eau du sous-sol et des réservoirs souterrains et entretient, par son circuit dans les aquifères, le débit de l'écoulement souterrain (débit de base). Celui-ci alimente les sources et les cours d'eau. Le niveau de l'eau souterraine est influencé par le régime de percolation de la pluie ou de l'eau d'irrigation à travers la zone non saturée.

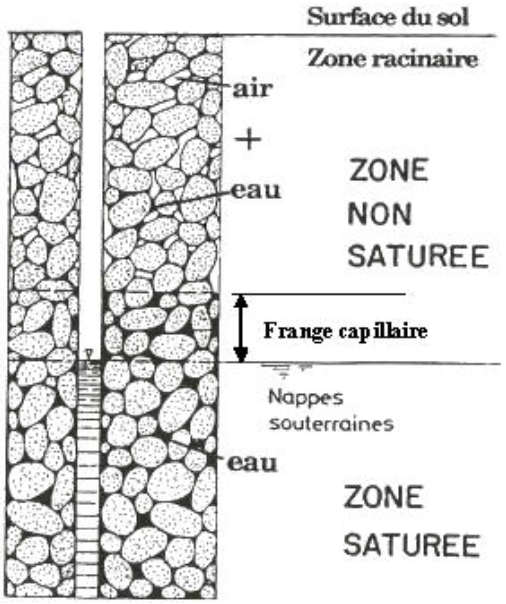



**Figure I-9 : Distinction entre la zone non saturée et la zone saturée** (issu de http://hydram.epfl.ch/e-drologie/)

[9] La conductivité hydraulique est une propriété des milieux poreux saturés qui détermine la relation, appelée Loi de Darcy, entre le débit spécifique et le gradient hydraulique qui provoque le déplacement.

### 1.1-Le Sol

Le sol représente la couche superficielle, meuble de la croûte terrestre. Il résulte de l'altération de la roche mère et des apports organiques. Le NRCS (National Ressources Conservation Service) caractérisé le sol par plusieurs horizons, ou couches, qui sont distinguables à partir du matériel initial. Ces différents horizons sont le résultat d'apports, de pertes, de transferts, et de transformations d'énergie et de matière, ou de leur capacité à supporter les plantes enracinées dans un environnement naturel.

La partie supérieure du sol est la limite entre l'air et le sol, l'eau superficielle, plantes vivantes ou matière organique qui n'ont pas commencé à se décomposer.

La frontière inférieure qui sépare le sol du sous-sol sous jacent est plus difficile à définir. Le sol se compose d'horizons qui ont été altérés par les interactions climat / relief / organismes vivants au cours du temps, à la différence du matériel parent sur lequel il repose. Généralement, le sol inférieur à proximité de la roche mère est pratiquement exempt d'animaux, de racines, ou d'autres marques d'activité biologique. Aux fins de la classification, la frontière inférieure du sol est arbitrairement placée à 200 centimètres.

L'eau qui existe dans un sol peut être définie comme mobile, adsorbée, capillaire ou immobile (Pinder and Celia, 2006). L'eau mobile bouge librement entre les grains du sol sous l'influence des forces hydrodynamiques. Au contraire l'eau adsorbée manifeste un comportement qui est largement gouverné par des forces d'attraction associée à la structure même de la molécule d'eau et aux surfaces minérales solides. L'eau capillaire présente des propriétés physiques dictées par le fait qu'elle existe dans la frange capillaire, au sein de laquelle l'eau est sous pression négative. L'eau immobile est largement déconnectée des autres eaux en terme hydrodynamique.

### 1.2-La Nappe

Une nappe est la composante souterraine du cycle hydrologique. On définit une nappe comme de l'eau souterraine remplissant entièrement les interstices d'un terrain poreux et perméable, ou **aquifère** (eau+roche), de telle sorte qu'il y ait toujours une liaison par l'eau entre les pores.

Les circulations hydrauliques dans les aquifères sont fortement dépendantes de la nature de l'encaissant et de l'hétérogénéité du milieu. Dans une roche dite sédimentaire, jusque 30% du volume peut être composé de vides où l'eau peut être stockée et circuler. Alors que dans les roches ignées comme le granite, la perméabilité matricielle est non négligeable du fait des plans de clivage des minéraux et des limites de grains mais la porosité (de 1 à 5%) ne permet

qu'un stockage limité d'eau. Cependant à cette porosité matricielle vient s'ajouter celle induite par les fissures et les fractures liées à l'histoire tectonique ou à l'altération de la roche (de Marsily, 1994 ; Mazurek *et al.*, 2000). Ces fractures représentent ainsi un espace de vide important qui peut accroître considérablement la perméabilité totale d'une roche. D'un point de vue hydrogéologique on définit ces milieux comme des milieux fracturés. Une fracture peut apparaître comme un simple 'tube de roche' au sein duquel circule l'eau sans aucun échange avec la matrice environnante. Mais la structure rugueuse des parois crée une hétérogénéité des flux au sein même de la fracture et des zones d'échanges privilégiées avec la matrice où les flux sont ralentis (Tsang and Neretnieks, 1998 ; Berkowitz, 2002). Ces zones d'échange rendent ainsi possible la diffusion de solutés de la fracture vers la matrice, ou inversement (Neretnieks, 1980 ; Polak *et al.*, 2003). Globalement les milieux fracturés hétérogènes se caractérisent au niveau hydraulique par l'existence d'une chenalisation forte des flux liée à la forte variabilité des perméabilités entre les zones plus ou moins fissurées et à la perméabilité intrinsèque variable des fractures elles-mêmes (Olsson, 1992, Tsang and Neretnieks, 1998).

Lors de son déplacement l'eau peut entraîner des éléments sous forme dissoute (par exemple, des ions) ou particulaire (par exemple, des colloïdes et des bactéries), ainsi que de l'énergie (c'est-à-dire, la chaleur). Le transport physique de ces entités avec l'eau résulte d'un ensemble de phénomènes physiques (advection, dispersion) et chimiques (adsorption, diffusion moléculaire, rétention) favorisant ou retardant le déplacement. Les principaux mécanismes qui contrôlent le transport de solutés sont l'advection, la dispersion et la diffusion. Le déplacement d'une particule dans un aquifère se fait avec le déplacement moyen de la masse d'eau ; l'eau est ainsi le vecteur de déplacement et le mécanisme dominant de la particule est l'advection. Lors de son parcours souterrain, l'eau emprunte des chemins d'écoulements différents au travers de pores de dimensions variables dans lesquelles les vitesses varient aussi. Les particules et les molécules se trouvent ainsi déplacées à des vitesses et dans des directions différentes, induisant leur dispersion dans l'aquifère. La diffusion moléculaire est le mouvement de solutés induits par un gradient de concentration (Banton and Bangoy, 1999).

### 1.3-L'interface Sol – Nappe

Deux types d'interaction sol-nappe sont abordés. Le premier se focalise sur le fonctionnement et les interactions sol-nappe dans une zone humide et présente la relation nappe souterraine - nappe superficielle – rivière ; et le second aborde l'interaction nappe souterraine - zone de battement de nappe.

### 1.3.1 – Zones Humides

Les tourbières sont des écosystèmes où l'eau est intimement mêlée au sol et à la végétation et où les quantités de biomasse végétale fabriquées sont supérieures aux quantités décomposées par l'activité bactérienne. Dans ces conditions de saturation quasi-permanente, la température et la disponibilité en oxygène deviennent des facteurs limitant l'activité des microorganismes (Francez, 2000). Quoi que réduite, cette activité joue un rôle essentiel dans les processus bio-géochimiques de transformation et de recyclage des éléments. L'interaction microorganismes / processus a été largement décrite en ce qui concerne la réduction des nitrates par la dénitrification (par exemple : Hedin *et al*., 1998 ; Bilanovic *et al*., 1999 ; Ostrom *et al*., 2002 ; Cannavo *et al*., 2004) et des sulfates (par exemple : Chapman et Davidson, 2001 ; Mandernack *et al*., 2000; Lloyd *et al*., 2004) dans les sédiments de rivière et les zones humides.

L'hydrologie est largement admis comme étant le paramètre clé du fonctionnement d'une zone humide. L'hydrologie est essentielle dans le maintien des fonctions et de la structure aussi bien que dans le contrôle des processus chimiques et biologiques qui se déroulent au sein d'une tourbière. Même légères, des variations hydrologiques dans une zone humide peuvent induire des modifications biotiques majeures dans la composition et la richesse spécifique, et dans la productivité de l'écosystème (Mitsch and Gosselink, 2000). Différents types de zones humides existent. Certaines sont isolées des compartiments d'eaux souterraines par des sols à faibles perméabilités, induisant de très faibles interactions avec l'eau souterraine. D'autres comme les zones humides de bas fonds sont liées à des zones d'exutoires de l'aquifères et sont donc connues pour être l'expression d'écoulements d'eau souterraine vers la surface du sol (Mitsch and Gosselink, 2000 ; Fraser *et al*., 2001). De travaux sur l'hydrologie dans les zones humides se sont focalisées sur les échanges verticaux entre la nappe souterraine et l'eau de surface, et ont pointé l'importance des échanges entre les tourbières et les formations géologiques sous-jacentes et environnantes (par exemple : Devito *et al.*, 1996 ; Devito *et al.*,1997 ; Clément *et al*., 2003). Auterives (2007) a mis en évidence le fonctionnement hydrologique complexe d'un marais. Dans le but de déterminer l'impact du pompage sur le fonctionnement d'un marais, deux sites localisés à l'aplomb d'un aquifère sableux ont été étudié. La présence d'un puits d'exploitation en eau potable sur l'un des sites confèrent aux deux sites des conditions hydrologiques contrastées. Les résultats ont montré une continuité hydraulique entre la nappe superficielle de la tourbe, un aquifère sableux sous-jacent et la rivière attenante à la tourbière. En période de déficit pluviométrique, des circulations verticales s'effectuent de la nappe de la tourbe vers l'aquifère sous-jacent. Un

abattement du niveau piézomètrique dans l'aquifère des sables peut ainsi modifier les conditions hydrologiques de la nappe de la tourbe. Lorsque l'abaissement piézomètrique de la nappe de la tourbe devient tel, qu'il est inférieur à celui de la rivière ; cette dernière viendra donc soutenir la nappe de la tourbe. La circulation de l'eau s'effectuant toujours suivant la charge hydraulique, le réseau de surface ne draine plus la zone humide mais l'alimente.
Cette modification des circulations hydrologiques peut avoir un impact conséquent sur le fonctionnement même d'une tourbière. L'abaissement du niveau de la nappe de la tourbe et l'alimentation par la rivière provoque une aération de celle-ci. Des conditions réductrices ne peuvent pas s'instaurer, induisant de ce fait une accumulation en nitrates et sulfates dans le milieu et une accélération des processus de minéralisation de la matière organique.

### 1.3.2 – Zone de battement de nappe ou continuum zone non saturée -nappe

L'alimentation des nappes dites libres se fait suivant un flux vertical d'origine superficiel mais aussi par des apports latéraux. La limite supérieure d'une nappe libre est fluctuante car elle est dépendante des apports. Les variations du toit de la nappe enregistrées sont particulièrement fortes à l'échelle de l'année hydrologique. Cette zone de fluctuation de nappe est généralement considérée comme une zone active de mélange entre des eaux d'origine et d'âge différents ; et où des transferts latéraux rapides peuvent se dérouler. L'activité biologique est quant à elle considérée comme restreinte. L'origine des variations de concentrations à la surface de la nappe provient de l'existence d'au moins deux types d'eau à la surface de la nappe, celle présente avant la saturation et celle qui sature le milieu. Legout (2006) a démontré que les modèles classiques de transfert (Advection-Dispersion et Mobile-Immobile) étaient inaptes pour reproduire les traits caractéristiques des variations chimiques dans cette zone. Pour expliquer les fortes variations chimiques intra annuelles, il a proposé une représentation du milieu sous forme de deux compartiments de porosité mobile, un lent et un rapide.
La zone de fluctuation de nappe apparaît donc comme une zone complexe où des variations chimiques peuvent se créer en fonction du mode et de la fréquence de saturation du milieu et donc de la structure du milieu, elle même très variable dans l'espace (Legout, 2006).

## 2 – HYDROLOGIE ET COMMUNAUTES BACTERIENNES

Le rôle des bactéries dans l'environnement et les différents facteurs chimiques et biologiques connus pour influencer le fonctionnement des communautés microbiennes a été abordé dans le chapitre I. Ici, la relation entre l'hydrologie et la communauté bactérienne est abordée.

En hydrologie différentes études essayent de déterminer le rôle des bactéries et plus spécifiquement de la croissance bactérienne sur le transport. Beaucoup de travaux ont été réalisés en milieux poreux saturés, en revanche ils ont moins en milieu poreux non saturé. Dans les milieux saturés de subsurface les paramètres physiques qui gouvernent le transport microbien sont : l'advection, la dispersion, la filtration, le piégeage des bactéries dans les pores et l'exclusion par la taille (Ginn *et al.*, 2002). Ce dernier point signifiant qu'il existe un transport préférentiel lié à la taille et la charge des microorganismes.
L'hétérogénéité dans les aquifères peut avoir un impact sur le transport bactérien (Goldscheider *et al.,* 2006). Il est considéré être plus rapide le long de flux préférentiels (Flynn, 2003 ; Li *et al.*, 1996). Le temps et la vitesse de transfert de l'eau, au sein de l'écosystème sont supposés jouer un rôle sur l'activité des microorganismes. Pour un temps de transfert lent, l'activité microbienne sera amplifiée car le temps de résidence des molécules est plus long et ainsi le contact eau/roche/bactéries augmenté. Cela a aussi été décrit par Ayraud (2006) qui propose une activité microbienne plus importante dans les petites fractures par rapport aux grandes. Les changements de propriétés physiques et hydrauliques liés à l'accumulation de biomasse microbienne par la formation de biofilms (Yarwood et al, 2006*)* peuvent altérer en retour les flux de soluté, l'échange de gaz, la distribution et la croissance microbienne ; ainsi que possiblement d'autres processus encore indéterminés (Rockhold *et al.*, 2004). Des études récentes (Hill and Sleep, 2002) ont notamment pointé que l'obstruction par accumulation de biomasse pouvait être significative en milieu fracturé.
Les circulations hydrologiques peuvent modifier l'isolement spatial des bactéries ce qui expliquerait un plus grand nombre de diversité microbienne dans le sol et les sédiments (Haack *et al.*, 2004). La dispersion des microorganismes sera plus active dans l'eau et les sols de subsurface du fait de la morphologie des bactéries (Martiny *et al.*, 2006). Des conditions stables favorisent une augmentation de la diversité spécifique alors que les environnements non prévisibles ou perturbés vont privilégier la croissance d'espèces dominantes et de

populations adaptées (Torsvik *et al*, 2002). Il s'agit d'une structure clonale de populations (Maynard-Smith *et al.*, 1993 ; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2001).

Même si on connaît les paramètres majeurs influençant l'activité des bactéries, encore peu de facteurs affectant la diversité et la composition des communautés sont décrits. Haacks *et al.* (2004) ont souligné que les variations temporelles et saisonnières des communautés microbiennes dans les aquifères contaminés sont gouvernées par des facteurs qui s'étendent au-delà des contaminations chimiques et des processus de transport d'accepteur d'électron pour inclure les variables chimiques, physiques et biologiques. Röling et al (2001) ont montré un changement des communautés de bactéries dénitrifiantes en lien avec un panache de pollution. Nold and Zwart, 1998 ont aussi montré que la composition des communautés microbiennes était influencée par des variables physiques, le niveau de salinité, le pH et des variables biologiques.

## 3 – SOL ET COMMUNAUTES BACTERIENNES

Le sol est un écosystème particulier hébergeant un grand nombre d'organismes. Torsvik *et al.* (1990) ont estimé que dans un gramme de sol il existe plus de 4000 'unité génomiques' bactériennes différentes, et que seul 1% de la population bactérienne pouvait être mis en culture en laboratoire. On ne sait pas si ces 1% sont représentatifs de l'ensemble de la population bactérienne (Torsvik et al, 1998). La connaissance de la diversité microbienne des sols est ainsi assez limitée, alors que ces microorganismes jouent un rôle pivot dans de nombreux cycles biogéochimiques (Trevors, 1998; Wall and Virginia, 1999) et qu'ils sont responsables du recyclage des composés organiques. De plus, ils influencent les écosystèmes en contribuant à la nutrition des plantes (George *et al.*, 1995), la santé des plantes (Filion *et al.*, 1999; Smith and Goodman, 1999), la structure du sol (Dodd *et al.*, 2000) et sa fertilité (Yao *et al.*, 2000). La composition microbienne peut être influencée par des paramètres physiques comme la taille des particules, la perméabilité, la porosité ; des paramètres chimiques comme la teneur en eau, la composition minérale et des paramètres biologiques comme la couverture végétale (Keller et Zengler, 2004). La disponibilité en carbone dans profil de sol influence aussi fortement la distribution des communautés microbiennes du sol (Fierer *et al.*, 2003). Les gradients de disponibilité en ressource ainsi que les stress environnementaux, comme les modifications de température et d'humidité du sol,

sont considérés comme des facteurs importants pour le contrôle de la nature et des propriétés des communautés microbiennes (Fierer *et al.*, 2003). Dans les profils de sols étudiés, il a été mis en avant que le pH du sol, la température et la texture ne semblaient pas conditionner la différenciation des communautés microbiennes (Fierer *et al.*, 2003). La variabilité de l'humidité du sol peut aussi influencer la composition des communautés bactériennes et fongiques (Schimel *et al.*, 1999 ; Wilkinson *et al*., 2002).

Des facteurs supplémentaires qui ne sont pas directement liés aux conditions environnementales trouvées spécifiquement dans les sols peuvent aussi contribuer à la différenciation des communautés microbiennes. Ces facteurs peuvent inclure : le transport de bactéries à travers un profil de sol par l'eau ou la bioturbation (Abu-Ahsour *et al.*, 1994 ; Balkwill *et al.*,1998 ; Kieft *et al.,*1998) ou la présence de bactéries dans les horizons profonds qui sont issues des environnements de dépôt originels et qui ont persisté dans le sol sur une période de temps prolongée (Kennedy *et al.*, 1994 ; Kieft *et al.,*1998). Le mouvement rapide des bactéries à travers un sol a été attribué aux flux préférentiels à travers les macropores (Kieft, 1999). Le stress hydrique et particulièrement la sécheresse joue un rôle sur la distribution du substrat en diminuant sa diffusion au sein du milieu. Il devient ainsi une ressource limitée pour les microorganismes qui peut ralentir les taux de processus biogéochimique (Stark and Firestone, 1995).

La plupart des travaux récents en écologie microbienne du sol se sont focalisés sur la détermination de la diversité des bactéries et l'identification des paramètres de l'environnement qui affectent les communautés bactériennes. Il en a résulté la découverte d'une diversité immense dans le sol et la distinction d'une large gamme de paramètres biotiques et abiotiques influençant la communauté microbienne du sol. Cependant, la majorité de ces travaux sont sites spécifiques ce qui limite la compréhension des facteurs qui gouvernent la structure des communautés bactériennes du sol à travers une région. Fierer et Jackson (2006) ont réalisé une étude à large échelle sur différents types de sol et ont mis en avant que le facteur premier qui contrôle la diversité bactérienne est le pH. Le rôle du pH sur la structure des communautés est difficile à cerner : Fierer et al. (2003b) décrivent ce facteur comme n'impactant pas sur la différenciation des communautés, mais contrôlant la diversité (Fierer and Jackson, 2006) ; alors que Nold and Swart (1998) estiment qu'il est essentiel.

## 4 – NAPPES ET COMMUNAUTES BACTERIENNES

La présence de bactéries dans les eaux souterraines avait été mise en évidence avant 1926 (Chapelle, 2001). L'étude de la diversité microbienne dans les aquifères s'est développée depuis le début des années 80. La mise en évidence du rôle des microorganismes dans la qualité des eaux souterraines et de leur potentiel de bio-remédiation a largement influencé les études pour comprendre le fonctionnement de cet écosystème. En effet, les aquifères représentent 97% des eaux non gelées sur Terre (Gibert *et al.*, 1994). Les aquifères moins hétérogènes que les sols offrent néanmoins un habitat varié (lithologique, géométrique, hydraulique et hydrogéochimique) pour les bactéries ce qui peut conduire à une distribution hétérogène des microorganismes et de leur activité (Goldscheider et al, 2006).

La plupart des études sur les aquifères ont été réalisées dans les environnements hydrogéologiques extrêmes comme les aquifères profonds (Stevens et Mc Kinley, 1995), les aquifères contaminés par les hydrocarbures (Wilson *et al.*, 1983) ou l'excès de $CO_2$ dans les milieux oligotrophes profonds (Plummer *et al.*, 1983 ; Chapelle *et al.* 1987 ; Krumholtz, 2000) ont été réalisées. Mais comme le souligne Goldscheider et al (2006), les études menées sur les aquifères peu ou non contaminés (pristine aquifers) demeurent peu nombreuses. Ces aquifères pauvres en carbone, en ressources énergétiques et nutritives induisent une activité microbienne modérée. Une modification de la composition chimique des eaux induite par l'activité humaine peut entraîner une modification de l'activité microbienne et de la composition au sein de la communauté.

En 1997, Pedersen a mis en évidence que l'eau souterraine de Stripa (Norvège), aquifère granitique à grande profondeur (1240m) pouvait contenir de $10^3$ à $10^6$ bactéries par millilitre. Par une méthode de mise en culture, il a de plus mis en avant la présence de bactéries hétérotrophes (anaérobie de type *Shewenella* et *Pseudomonas* ; anaérobie facultative : *Serratia*, *Bacillus*, *Desulfobrio*…), de protéobactéries alpha, beta, gamma, delta et epsilon. La présence des bactéries qui résident dans les milieux pauvres, oligotrophes, dépendent de la présence d'une ou plusieurs espèces chimio-autotrophes c'est-à-dire utilisant comme source d'énergie préférentielle les minéraux. Ces métabolismes chimioautotrophes peuvent se développer dans des milieux à fortes concentration en hydrogène et dioxide de carbone (Fry *et al.*, 1997).

Les microorganismes dans les aquifères peuvent être divisés en différentes catégories, les **autochtones** et les **allochtones**, ou les *planctoniques* vs les *benthiques* (Goldscheider *et al.*,

2006). Les autochtones sont originaires de l'aquifère considéré et les allochtones proviennent de l'environnement extérieur comme les environnements de sol ou les eaux de surface et ont été passivement transportés dans l'aquifère via la zone de recharge. Une partie de ces microorganismes peut s'acclimater aux conditions de vie de l'aquifère. Les bactéries planctoniques sont définies comme flottant librement dans l'aquifère ou associées à des particules en suspension à la différence des benthiques qui sont fixées aux matériels solides de l'aquifère. Les bactéries fixées à la roche semblent dominer les environnements de subsurface oligotrophes en terme de biomasse et d'activité et les cellules planctoniques semblent inactives (Harvey *et al.*, 1984). Cependant les bactéries ne sont pas en permanence benthique ou planctonique, et il existe un équilibre entre attachement et détachement bactérien (Ahn and Lee, 2003).

Dans les milieux poreux le transport microbien est contrôlé par un ensemble de processus : l'advection, la dispersion, l'exclusion de taille et de pore, la prédation, la croissance et la mort, et des interactions complexes entre les cellules bactériennes et la surface solide des grains (Ginn *et al.*, 2002) (Fig.I-10). Scheibe *et al.* (2007) ont aussi mis en évidence, par une modélisation en laboratoire couplée à une étude de terrain, une relation inverse forte existante entre le taux d'attachement des bactéries sur une surface solide et la conductivité hydraulique.

Lors du transport bactérien de subsurface, les bactéries peuvent migrer passivement avec le flux d'eau souterrain ou nager le long d'un gradient chimique, elles peuvent s'attacher ou se détacher de la matrice solide et elles peuvent croître, mourir ou être consommées (Murphy and Ginn, 2000).

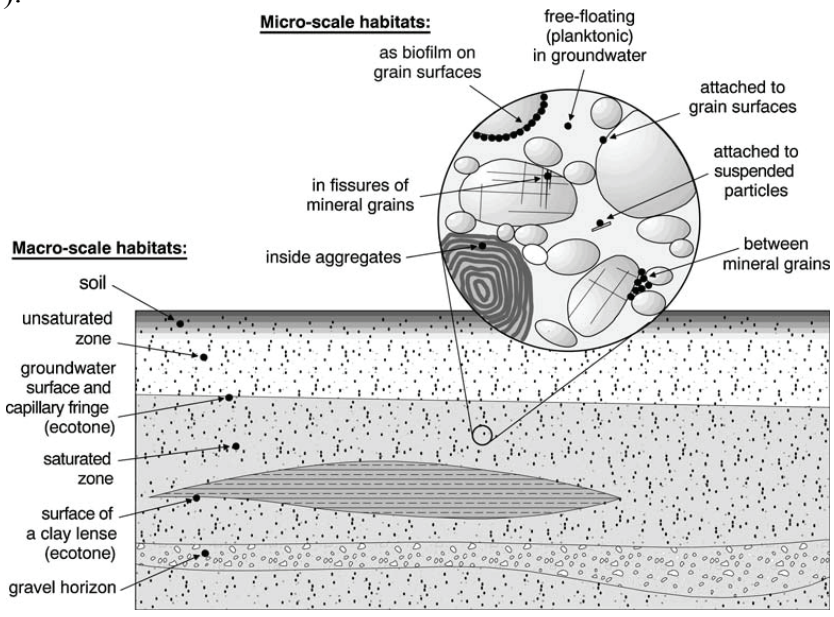



**Figure I-10 : Représentation schématique des habitats écologiques microbien à macro et à micro échelle dans un aquifère poreux hétérogène.** Les pores les plus larges sont accessibles aux petits organismes. Un transport préférentiel peut apparaître dans un horizon plus perméable, l'horizon de gravier par exemple (Issu de Goldscheider *et al.*, 2006).

## 5 – INTERFACE SOL-NAPPE ET COMMUNAUTES BACTERIENNES

En macroécologie les zones de contact entres les différents habitats et écosystèmes sont exprimés comme des écotones qui sont souvent caractérisés par une forte biodiversité et une activité biologique importante. Ce concept peut être appliqué aux structures complexes d'habitats trouvés dans les aquifères. La zone la plus importante dans un aquifère est la zone de contact entre la zone saturée et non saturée soit la zone de battement de nappe avec la frange capillaire. La plupart des études qui se sont focalisées sur cette zone se sont intéressées aux invertébrés; et les communautés microbiennes ont été très peu analysées (Berkovitch *et al.*, 2004). Dunn et al (2005) ont montré que des mouvements de convection ascendants peuvent transporter des bactéries de la nappe vers la frange capillaire. Legout (2005) a travaillé sur la zone de fluctuation de nappe et a observé un abattement des concentrations en nitrate le long d'un profil vertical qu'il traduit comme un processus de réduction des nitrates. Cette zone présente des conditions de saturation variables qui contrôlent l'accessibilité des nutriments par les communautés bactériennes, la biodisponibilité en nitrate étant un facteur déterminant de la dénitrification. Hedin et al (1998) ont définit la zone de contact entre la nappe et la rivière comme une zone de Hot spot, où l'activité microbienne est très active du fait d'un apport nutritif en provenance de la rivière.

Dans les zones de surface non saturée, le rôle des interfaces eau-air est essentiel dans le transport microbien. Les bactéries ont tendance à s'accumuler aux interfaces sol-eau, et la rétention des bactéries en milieu poreux est proportionnelle à la fraction de l'espace des pores occupés par l'air. Le piégeage des bactéries aux interfaces eau-air est un processus important qui peut contrôler le transport bactérien dans les sols non saturés (Yarwood *et al.*, 2006). Dans les milieux poreux homogènes non saturés, la croissance et l'accumulation bactérienne a un impact significatif sur la rétention de l'eau. La colonisation provoque un assèchement apparent au sein des zones colonisées pouvant provoquer un détournement des flux autour de la zone colonisée (Yarwood *et al.*, 2006). L'hydrologie et la biologie dans les systèmes non saturés sont fortement interdépendantes, montrant ainsi la complexité du système.

Cette zone de surface non saturée ou 'zone vadose' est une zone physiquement, chimiquement et biologiquement hétérogène, où quelques généralités peuvent être dressées en regard des bactéries et des processus microbiens. La décroissance de l'abondance bactérienne observée le long d'un profil vertical est largement imputée à la décroissance des concentrations de C organique avec la profondeur. Les voies de circulations préférentielles et les macropores sont des zones localisées à forte disponibilité en nutriments qui contribuent à la distribution

hétérogène des abondances et des processus microbiens dans la zone vadose. La zone vadose a souvent été traitée comme une entité statique et séparée, avec un gradient vertical de nutriment, de température et de bactéries. Cependant, la frange capillaire est un composant essentiel de la zone vadose. Les communautés microbiennes résidant dans la frange capillaire sont relativement distinctes de celles des communautés sus- et sous-jacentes car elles doivent surmonter des variations des potentiels d'oxydo-réduction et de disponibilité en nutriments. (Holden and Fierer, 2005). Cependant, l'écologie dans la zone vadose est encore mal comprise.

# III

# DIVERSITE BACTERIENNE

Lors du sommet de la Terre de Rio de Janeiro en 1992, deux conventions ont été adoptées : la convention sur les changements climatiques et la convention sur la diversité biologique. Cette dernière a notamment défini le terme de biodiversité comme :

« La variabilité des organismes vivants de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes. » *art. 2 de la Convention sur la diversité biologique, 1992*

La biodiversité, contraction de « diversité biologique » est la diversité de toutes les formes du vivant. Elle est habituellement subdivisée en trois niveaux :

- La diversité génétique, qui correspond à la diversité des **gènes** au sein d'une espèce (diversité intraspécifique) ;
- La diversité spécifique, qui correspond à la diversité des **espèces** (diversité interspécifique) ;
- La diversité écosystémique, qui correspond à la diversité des **écosystèmes** présents sur Terre, des interactions des populations naturelles et de leurs environnements physiques.

Le gène est considéré comme l'unité fondamentale de la sélection naturelle, donc de l'évolution et certains, comme Edward O. Wilson, estiment que la seule diversité biologique utile est la diversité génétique. Mais en pratique, l'étude de la biodiversité sur le terrain passe par la diversité des espèces car c'est l'unité la plus accessible.

## 1–DIVERSITE BACTERIENNE

En microbiologie le terme de 'diversité' est utilisé pour décrire la variation qualitative au sein des microorganismes. Le terme de diversité spécifique prend en compte deux composantes (Øvreås, 2000) : le nombre total d'espèces présentes, ou richesse spécifique ; et la distribution des individus au sein des espèces, ou « evenness » ou équitabilité. Ward (1998) signale la nécessité d'étudier la diversité dans un contexte environnemental naturel pour déterminer l'impact des pressions environnementales sur les processus d'évolution.

Au cours des années 1980 – 1990, la supériorité de la diversité microbienne à celle du monde macrobien a été mise en avant par les microbiologistes environnementaux. Les bactéries sont présentes sur Terre depuis plus de 3.7 milliards d'années, et certaines se sont adaptées à presque tous les milieux. Les bactéries ont colonisé différents milieux : sources chaudes (Ward *et al.*, 1985 ; Ferris *et al.*, 1996), fumeurs océaniques (Haldeman *et al.*, 1994 ; Muyzer *et al.*, 1995), glaces de l'antarctique et de la région polaire du nord (DeLong *et al.*, 1994), saumures saturées en sel (Martinez-Murcia *et al.*, 1995). Comme évoqué plus tôt, Torsvik et ses collaborateurs (1990) ont estimé que un gramme de sol peut contenir plus de $10^{10}$ micro-organismes prokaryotes, faisant ainsi du sol le plus grand réservoir de diversité de la planète (Pace, 1997). L'abondance des micro-organismes dans le sol est telle que les bactéries (prokaryotes) représentent plus de dix millions d'individus par gramme de sol, les champignons (eukaryotes) et les actinomycètes pas loin d'un million (Whitman *et al.*, 1996 ; Torsvik *et al.*, 1990). Les algues (végétaux eukaryotes chlorophylliens) et les lichens y sont moins abondants. Les espèces appartenant à la microfaune sont aussi très diversifiées et l'on peut estimer qu'une petite fraction des espèces de microorganismes sont connues (Robert, 1996). Différentes techniques permettent d'accéder à cette diversité, elles seront décrites ultérieurement.

Les études sur la diversité microbienne et ses relations avec la structure et le fonctionnement de l'écosystème se sont développées ces dernières années (Fig.I-11). En effet les microorganismes ont un rôle prépondérant dans les phénomènes de cyclage (Hunterer-Cevera, 1998). Les processus de décomposition sont dominés par les activités microbiennes et jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement à long terme dans l'écosystème. De plus les microorganismes sont les responsables primaires de la décomposition et détoxification de beaucoup de contaminants environnementaux (Lamar et Dietrich, 1990 ; Aelion and Bradley, 1991). De ce fait les changements de la composition des communautés microbiennes

induisant des modifications fonctionnelles peut avoir des effet à long terme important sur le taux et la stabilité du fonctionnement de l'écosystème (Perry *et al.*, 1989). L'analyse de la diversité (Øvreås, 2000) est ainsi importante pour :

- augmenter la connaissance de la diversité en ressource génétique dans une communauté ;
- comprendre les schémas de la distribution relative des microorganismes ;
- comprendre le rôle fonctionnel de la diversité et les conséquences de perturbations anthropiques ;
- comprendre la régulation de la biodiversité ;
- améliorer les connaissances de la biodiversité.

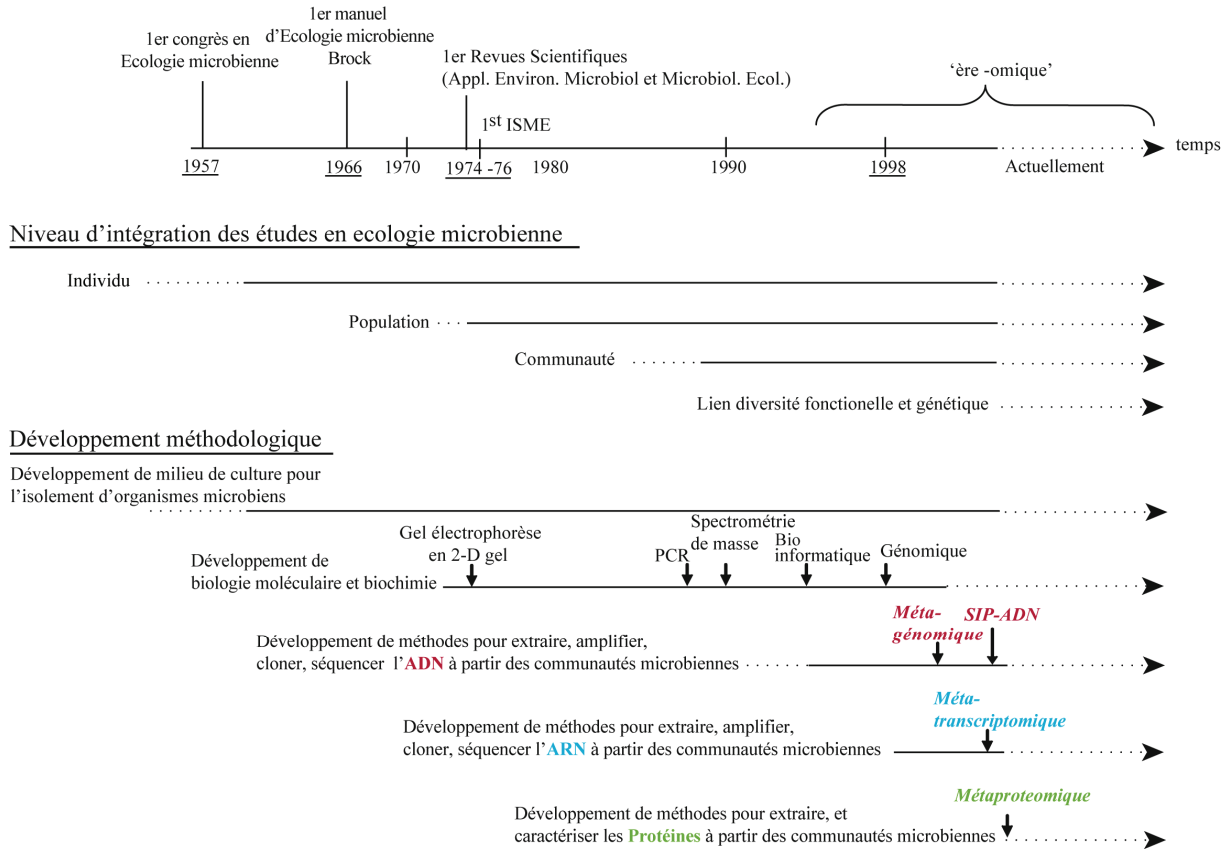



**Figure I – 11 : Historique et évolution de l'écologie microbienne (issu de Maron *et al.*, 2007)**

## 2–COMMENT ACCEDER A LA DIVERSITE

Pour étudier la diversité microbienne à partir d'échantillons environnementaux (sol, eau, sédiment), plusieurs approches sont utilisées au laboratoire :

**(1) Approche classique** qui est réalisée par isolement de souches sur milieu sélectif puis identification à l'aide de critères morphologiques et métaboliques. Cependant, plus de 90% des micro-organismes présents dans la nature sont réfractaires à la culture en milieux enrichis (Pace, 1997). Par conséquent, seule une fraction de la diversité microbienne est approchée.

**(2) Approche moléculaire** qui ne nécessite ni culture, ni isolement. Cela consiste à déterminer la composition d'une communauté par l'analyse de différents gènes ou d'un gène en particulier.

Les gènes les plus communément utilisés pour étudier les communautés issus de l'environnement sont : les gènes codant pour l'ARN de la petite sous-unité ribosomique, ARNr 16S (bactéries et Archaea) ou ARNr 18S (champignons). Ces gènes sont analysés après amplification par PCR (voir paragraphe suivant). Ces produits PCR peuvent ensuite être analysés par différentes techniques suivant le degré de résolution que l'on souhaite. L'adaptation de nouvelles méthodes basées sur l'extraction directe et l'amplification d'acides nucléiques de l'environnement fournit les bases de l'analyse de la richesse et de la structure des communautés microbiennes (Martin-Laurent *et al.*, 2003) et permet ainsi l'analyse de communautés entières cultivables ou non. Seules les approches moléculaires et cellulaires qui ne nécessitent pas de passer par une phase de mise en culture seront abordées.

### 2.1 - Méthodes cellulaires

La méthode de l'analyse des acides gras constitutifs des membranes phospholipidiques (PLFAs) ne demande pas de mise en culture des cellules. Un profil de PLFAs (Fig. I-12) très diversifié signale une communauté microbienne complexe car à un type de PLFA peut être attribué à une espèce ou à un groupe d'espèces. Cette technique permet de fournir des informations sur un ensemble de caractères microbiens, tels que la biomasse, la physiologie, l'identité taxonomique et fonctionnelle, et surtout la composition de la communauté par exemple dans les aquifères (Green and Scow, 2000) ou les sols (Hill *et al.,* 2000 ; Singh *et al.*, 2006). Cette méthode permet d'analyser la structure des communautés du sol, de l'eau par exemple et de déterminer les changements qui accompagnent des perturbations. Ainsi, Grayston *et al.* (2004) ont mis en évidence par cette technique, des changements dans la structure des communautés microbiennes en fonction de différents modes de gestion de prairies.

L'avantage majeur de la technique est qu'elle permet de comparer rapidement des communautés microbiennes. Mais elle ne renseigne que grossièrement sur la composition des communautés. En effet, on ne peut pas attribuer un profil de PLFA spécifique à la signature d'une espèce de micro-organismes particulière (Hill *et al.*, 2000).

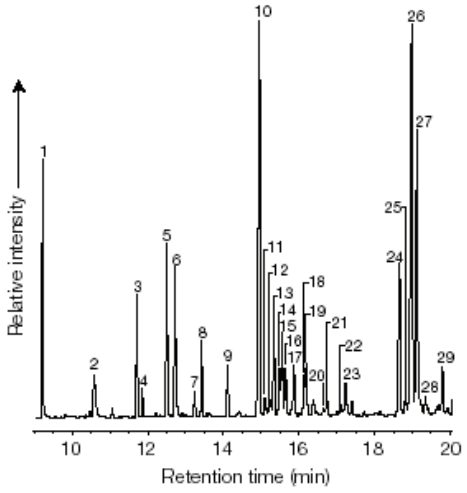



**Figure I-12 : Exemple de profil obtenu par une analyse de PLFA.**
**Plus le profil est complexe plus la communauté est complexe.**

## 2.2 - Méthodes moléculaires

L'existence d'une vaste diversité de micro-organismes non cultivables a stimulé le développement de méthodes indépendantes de la mise en culture des communautés microbiennes. Ces méthodes combinent la caractérisation des acides nucléiques, les isotopes et la microscopie. L'ensemble des techniques permettant d'accéder à la diversité microbienne dans un échantillon de sol est résumé dans la figure I-13. Les niveaux de résolution dans l'analyse de la diversité microbienne seront différents suivant le mode d'extraction de l'ADN (direct ou indirect).

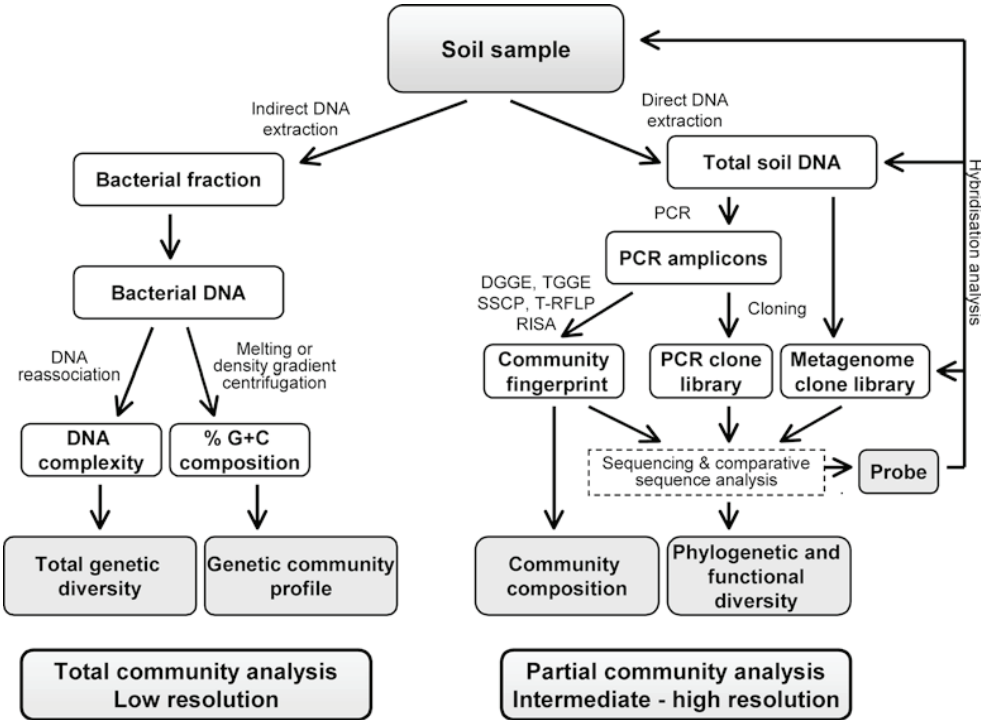



**Figure I-13: Figure résumant les méthodes moléculaires cultures indépendantes pour étudier les communautés microbiennes** Abréviations : PCR ou réaction de polymérisation en chaîne, DGGE ou gel d'électrophorèse sur gradient dénaturant, TGGE ou gel d'électrophorèse sur gradient de température, SSCP ou polymorphisme de conformation simple brin, T-RFLP ou polymorphisme des fragments terminaux de restriction, RISA ou analyse des espaces intergénique, % G+C ou % guanine +cytosine(d'après Lynch et al, 2004).

### 2.2.1 - Méthodes d'estimation grossière de la diversité génétique

Une estimation grossière de la diversité génétique des communautés microbiennes peut être effectuée soit par mesure de la composition en bases soit par l'étude de la complexité des communautés d'ADN total (Torsvik *et al.*, 1998). La mesure de la composition en bases rend possible l'analyse du contenu d'un génome ou d'un métagénome (échantillon d'ADN environnemental) en exprimant le pourcentage molaire de guanine et cytosine (% G+C).

En effet, les changements du contenu en guanine et cytosine peuvent être utilisés pour détecter des changements dans la structure des communautés microbiennes. Ils sont déterminés par l'analyse des courbes de points de fusion de l'ADN. Les profils de pourcentage en G+C obtenus par dénaturation thermique de l'ADN peuvent être utilisés pour mesurer le degré de similarité entre métagénomes (Clegg *et al.*, 2000 ; Grayston *et al.,* 2004).

La complexité des séquences de l'ADN peut être, quant à elle, déterminée en mesurant les cinétiques de réassociation d'ADN coupés ou thermiquement dénaturés. On suppose alors que les ADN complexes dénaturés se réassocient à des taux plus bas que les ADN dénaturés moins complexes. Par conséquent, les cinétiques de réassociation sont proportionnelles à la complexité des métagénomes. Torsvik *et al.* (1990) ont utilisé cette stratégie pour estimer la diversité des bactéries non cultivables du sol.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet de comparer des 'métagénomes'. Mais, elle n'est pas suffisamment sensible pour estimer les changements fins de diversité taxonomiques qui s'inscrivent dans la majorité des problématiques environnementales.
D'autres méthodes, basées notamment sur l'amplification d'un gène cible par une réaction de polymérisation en chaîne ou PCR (Polymerase Chain Reaction) mais aussi sur l'utilisation de marqueurs métaboliques permettent des analyses plus fines. C'est ce type de technique que nous avons utilisé et qui sont décrites ci-dessous.

### 2.2.2 – La technique de polymérisation en chaîne ou Polymerisation Chain Reaction (PCR)

La technique de polymérisation en chaîne (PCR) (Fig.I-14) proposée en 1986 (Mullis *et al.,* 1986) permet d'amplifier des séquences d'ADN de manière spécifique et d'augmenter de manière considérable la quantité d'ADN dont on dispose initialement. Elle permet d'accéder à la composition des communautés microbiennes.
Elle nécessite de connaître la séquence des régions qui délimitent l'ADN à amplifier. Ces séquences servent à synthétiser des amorces oligonucléotidiques complémentaires (de longueur de 20 à 25 nucléotides en général). Les amorces (sens et anti-sens) spécifiques s'hybrident à l'acide nucléique cible. En présence d'un excès de désoxynucléotides (dNTPs) et d'une Taq ADNpolymérase (ADN polymérase thermostable), la région d'ADN ciblé est synthétisée (Figure différentes étape de PCR).

Cette technique comporte *des cycles successifs*. Chaque cycle comprend une succession de trois phases *:*

- Une phase de *dénaturation* par la chaleur pour séparer les deux brins d'ADN (92-95°C) (30 secondes-1 minute) ;

- Une phase d'*hybridation* avec les deux amorces spécifiques entre 55-60°C. La première amorce se fixe sur un brin d'ADN, l'autre sur le brin complémentaire (30 secondes-1 minute).

- Une phase d'*extension* par l'ADN polymérase à partir des amorces à 70-72°C (1-2 minutes).

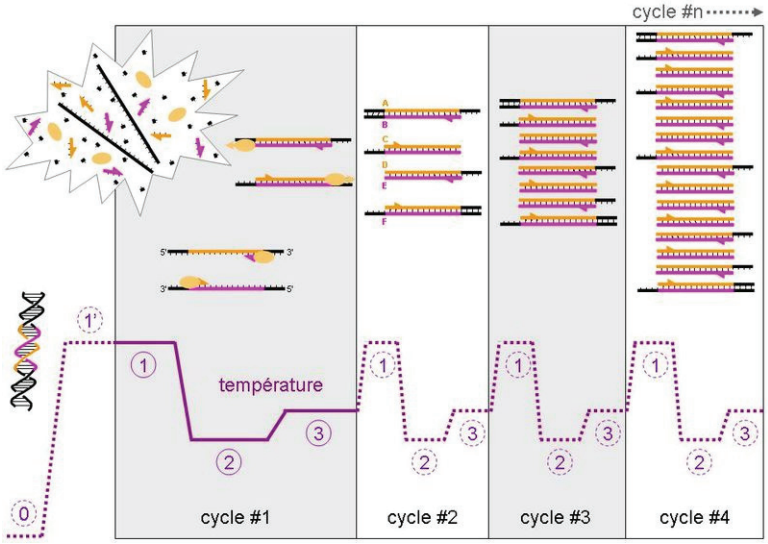



**Figure I-14: Représentation schématique de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**. La phase 1 correspond à la phase de dénaturation, la phase 2 à l'hybridation et la phase 3 à l'extension.

En théorie, n cycles permettent d'obtenir $X^n$ copies d'ADN où X est le nombre de copies d'ADN cible incorporées dans le mélange réactionnel.

Cette technique est généralement employée pour déterminer des changements de structure à l'échelle des communautés et est utilisée dans diverses stratégies d'analyse moléculaires (Torsvik *et al.*, 2002). La méthode autorise une détection et offre la possibilité de suivre une communauté microbienne fonctionnelle dans le sol par exemple en réponse à un stress environnemental. Cette technique a progressée considérablement depuis 1985 et de nouveaux types de PCR ont été introduits. Par exemple :

- La PCR dite « Multiplex » pour amplifier simultanément plusieurs fragments de gènes différents.

- La PCR dite « Nested PCR ». Elle correspond à une seconde PCR réalisée en utilisant des nouvelles amorces situées à l'intérieur du domaine défini par les amorces de la première PCR, méthode généralement utilisée pour augmenter la spécificité d'une amplification.

- La PCR quantitative. Ce type de PCR permet d'estimer le nombre de copies d'ADN ou d'ARN cibles. La proportionnalité entre le nombre d'amplifications et le nombre de copies n'est valable que pour un nombre de cycles PCR faible.

L'avantage principal de l'utilisation de la PCR est l'affranchissement des étapes de mise en culture. Elle comporte cependant des inconvénients majeurs comme : (1) la possibilité d'une préférence d'amplification et (2) la possibilité de formation de molécules chimériques pour un jeu d'amorces donné. Pour limiter ce biais possible, des réplicats vrais doivent systématiquement être effectués (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003).

### 2.2.3 - Stratégies moléculaires dépendantes de la PCR

Différentes techniques basées sur la PCR permettent d'analyser la composition des communautés microbiennes. J'aborderai de façons non exhaustives 6 techniques qui permettent d'accéder à la composition de la communauté.

#### 2.2.3.1- Analyse des fragments de restriction de l'ADN ribosomal amplifié ou ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis)

Cette technique permet après clonage (ou pas) des fragments des gènes d'ARNr 16S amplifiés par PCR et analyse par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) d'approcher la composition de micro-organismes. La RFLP est réalisée par des enzymes de restriction choisies. Les fragments générés sont analysés sur gel d'électrophorèse.

Cette technique est facile à mettre en œuvre mais peu discrimante (Liu *et al.,* 1997). Cette méthode est généralement utilisée comme étape préliminaire à des analyses de séquençage des clones analysés.

#### 2.2.3.2-Analyse des espaceurs ribosomaux intergénique ou RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Cette technique correspond à l'analyse de l'espaceur intergénique (ISR) (Fig.I-15) des gènes codant pour l'ARNr 16S et l'ARNr 23S. La région des espaceurs intergéniques (ISR) est une région de l'opéron[10] comprise entre la petite (16S) et la grande (23S) du gène de l'ARNr.

Elle est réalisée après amplification par PCR à l'aide d'amorces oligonucléotidiques spécifiques ciblées sur les régions conservées des gènes de l'ARNr 16S et 23S. Les produits

[10] Un opéron est un groupe de gène de gène comprenant un opérateur, un promoteur commun et un ou plusieurs gènes structuraux qui sont contrôlés pour produire des ARNm. C'est un élément essentiel de la régulation de la transcription. L'opéron le plus connu est l'opéron lactose. La transcription des gènes structuraux a lieu sauf si un répresseur lié à l'opérateur. Ils ont été décrits la première fois par François Jacob et Jacques Monod en 1961.

de PCR sont séparés par électrophorèse sur gel d'électrophorèse. Les bandes peuvent être excisées du gel et séquencées. Les parties intergéniques sont très polymorphes en taille en fonction des microorganismes. Mais l'analyse phylogénétique robuste est impossible compte tenu du niveau très important de mutation d'Indels (Johnsen *et al.*, 2001). Cette technique a été utilisée pour différentier les structures de communautés microbiennes dans divers environnement de sols (Ranjard *et al.*, 2000) ou encore des sols avec différents types de couverts végétal (Borneman and Triplett, 1997).

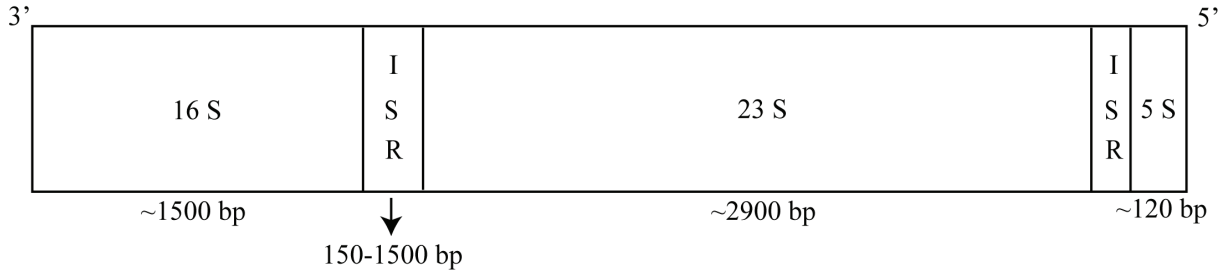



**Figure I-15: Représentation d'espaceurs intergéniques ribosomaux (ISR)**, localisés entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S et entre les gènes de l'ARNr 23S et 5S.

#### 2.2.3.3-Analyse des électrophorèses sur gel à gradient dénaturant ou thermique ou D/TGGE (Denaturing/Temperature gradient gel electrophoresis)

DGGE et TGGE reposent sur le fait que la température de fusion d'un produit PCR (ADN double brin), c'est-à-dire la température moyenne de séparation des deux brins est fonction de sa séquence. Toute mutation intervenant dans ce domaine à bas point de fusion va modifier potentiellement l'instant où la dénaturation partielle va débuter, et donc la migration de la molécule par rapport à une autre non mutée va être changée. La T/DGGE (Fig.I-16) permet potentiellement de séparer des fragments n'ayant qu'une base de différence. Cette séparation mise en évidence s'effectue par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'un gradient d'agent dénaturant (DGGE) ou d'un gradient thermique (TGGE). Les bandes individuelles peuvent être excisées, réamplifiées et séquencées, ou testées avec une série de sondes oligonucléotidiques pour donner une indication de la diversité des communautés microbiennes (Head *et al.,* 1998). La méthode a été récemment appliquée pour analyser les gènes d'ARNr 16S provenant d'échantillons environnementaux. La technique permet la migration simultanée d'un grand nombre d'échantillons. Griffiths *et al.* (2001) ont utilisé la DGGE pour examiner la relation entre la biodiversité des communautés microbiennes des sols cultivés et les fonctions du sol.

Lorsque la DGGE est combinée avec l'hybridation de sondes nucléiques puis un séquençage, il est possible d'estimer les filiations phylogénétiques des membres numériquement dominants dans une communauté (Torsvik *et al.,* 1998).

L'avantage majeur de la DGGE ou de la TGGE est sa possibilité de comparer rapidement la composition de communautés. Mais cette stratégie moléculaire comporte des limitations importantes notamment la reproductibilité (principalement pour la DGGE), mais aussi en ce qui concerne la difficulté d'affectation de bandes particulières à des groupes spécifiques d'organismes, particulièrement lorsqu'on est en présence de bandes multiples. Le nombre et l'intensité des bandes sur le gel DGGE ne donnent pas nécessairement une image précise du nombre et de l'abondance des espèces correspondantes à l'intérieur d'une communauté microbienne (Boon *et al.,* 2002). Enfin pour des mélanges complexes il est parfois difficile de discerner des bandes de bruit de fond.

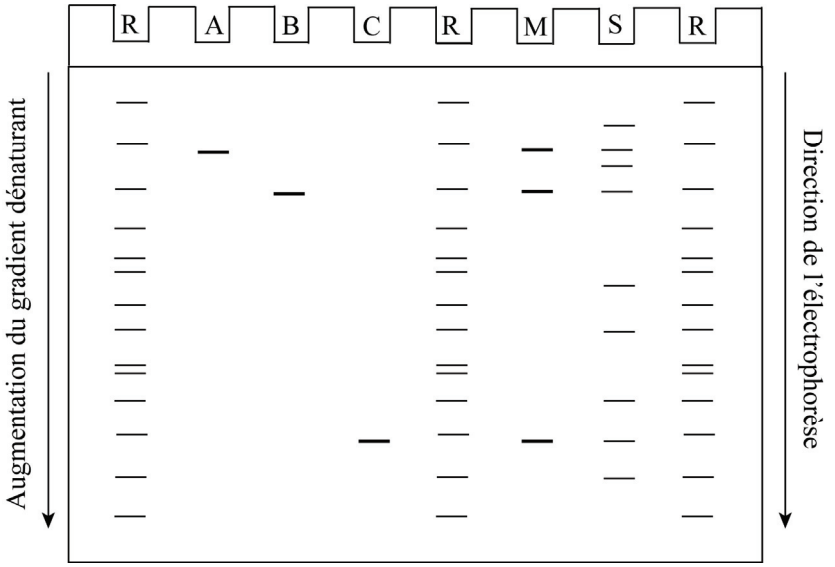



**Figure I-16 : Electrophorèses sur gel à gradient dénaturant.** Le gradient de dénaturation se fait des puits vers le bas du gel suivant la direction de l'électrophorèse. Abréviations, R : référence, A : organisme 1, B : organisme 2, C : organisme 3, M : mélange des organismes 1, 2 et 3 et S : échantillon inconnu.

#### 2.2.3.4- Analyse du polymorphisme de conformation simple brin ou SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

La technique de SSCP est basée sur l'analyse électrophorétique des produits PCR sous forme de fragments simple brin. Une mutation ponctuelle au sein d'une séquence modifie suffisamment la structure secondaire de l'ADN monobrin pour qu'il en résulte des changements de migration électrophorétique sur un gel de polyacrylamide. La mobilité d'un

ADN double brin est dépendante de la taille et de la longueur du brin mais est relativement indépendante de la séquence nucléotidique particulière. En revanche la mobilité des simples brins est affectée par des changements subtils au sein de la séquence. Les modifications sont identifiables car l'ADN simple brin est particulièrement instable, en absence de brin complémentaire, les bases du brin unique peuvent s'apparier créant ainsi des boucles et des plis qui lui confèrent une structure 3D unique, indépendamment de sa taille. La modification d'une simple base peut affecter sa mobilité en altérant l'appariement et ainsi la conformation 3D (Melcher, 2000). L'analyse des SSCP est une méthode économique, appropriée et sensible pour déterminer les variations génétiques (Sunnucks *et al.*, 2000). De façon analogue aux polymorphismes de longueur de fragment de restrictions (RFLPs), les SSCPs sont des variantes allèlique héritées, des caractéristiques génétiques qui peuvent être utilisées comme des marqueurs génétiques. A la différence de l'analyse de RFLP, l'analyse de SSCP peut détecter des polymorphismes ADN et des mutations à de multiples emplacements dans les fragments ADN (Orita *et al.*, 1989). La sensibilité de l'analyse de la SSCP est affectée par le pH. Les fragments d'ADN double brin sont généralement dénaturés en les exposant à des conditions basiques. Le tampon électrophorétique peut être modifié, diminué par ajout de glycérol, ce qui permet d'augmenter la sensibilité et d'obtenir des résultats plus nettes (Kukita *et al.*, 1997). La taille des fragments peut aussi jouer sur l'analyse. Des résultats optimaux sont obtenus pour des fragments entre 150 et 300 paires de bases (Wagner, 2002). La présence de glycérol dans le gel permet d'analyser des fragment d'ADN plus grand (Kukita *et al*., 1997). Sous les conditions optimales, 80 à 90 % des échanges de base potentiel sont détectables par SSCP (Wagner, 2002). La sensibilité de cette technique est élevée. Elle comporte l'avantage de ne pas nécessiter d'équipement ou de réactif spécifique, seule une optimisation minimale est nécessaire (Sunnucks *et al.,* 2000). Cette technique a été employée pour suivre des cultures pures de microorganismes (Schwieger and Tebbe, 1998), les communautés microbiennes de la rhizosphère (Schwieger and Tebbe, 1998), les différences entre les populations bactériennes dans un lac oligotrophe et un étang eutrophe (Lee *et al.*, 1996), la succession de communautés microbiennes durant le compostage chaud (Peters *et al.*, 2000), et les dynamiques de communautés dans un bio réacteur anaérobie (Zumstein *et al.*, 2000).

#### 2.2.3.5- Analyse du polymorphisme des fragments terminaux de restriction ou T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)

L'étude du polymorphisme des fragments terminaux de restriction est une technique moléculaire qui permet l'analyse de la diversité des communautés microbiennes présentes en environnements variables par l'utilisation d'amorces marquées par des fluorochromes (Liu *et al.,* 1997). La technique utilise une PCR dans laquelle les deux amorces sont fluorescentes à leur extrémité 5' (deux fluorochromes différents, l'un pour l'amorce sens, l'autre pour l'amorce antisens). Elle est employée pour amplifier une région particulière d'un gène (gène de l'ARNr 16S ou autre gènes) à partir de l'ADN extrait de la communauté. Les produits PCR sont digérés par des enzymes de restriction générant des fragments terminaux de restriction de tailles différentes suivant le polymorphisme des sites de coupure. La taille des fragments générés est mesurée précisément en utilisant un séquenceur d'ADN automatique (Fig.I-17).

Les profils T-RFLP génèrent une signature de diversité aisément comparable à d'autres signatures. La méthode T-RFLP a été utilisée avec succès pour analyser et comparer des communautés de bactéries (Kitts, 2001 ; Liu *et al.*, 1997 ; Marsh, 1999), de champignons ectomycorhyziens (Zhou *et al.*, 2002) et de champignons MA (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003). Récemment la T-RFLP a été largement utilisée pour étudier les communautés bactériennes sous différentes conditions (par exemple : Casamayor *et al.,* 2002 ; Dunbar *et al.,* 2000 ; Konstantinidis *et al.,* 2003 ; Mengoni *et al.,* 2005). Elle est particulièrement intéressante pour étudier des profils complexes de communautés. C'est donc un outil puissant pour comparer les communautés en revanche, il apporte peu d'information concernant l'identité des membres spécifiques de cette communauté.

L'avantage majeur de cette technique est son niveau de résolution (Clement *et al.*, 1998) et son excellente reproductibilité de signatures de diversité (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003). Elle rend compte de la signature de la diversité présente mais il est difficile d'affecter des bandes particulières à des groupes spécifiques d'organismes.

Les différentes techniques abordées donnent des informations sur la structure des communautés à différents niveaux de résolution, mais aucune information sur les organismes eux même. Pour cela, il est nécessaire de passer par une étape de séquençage.

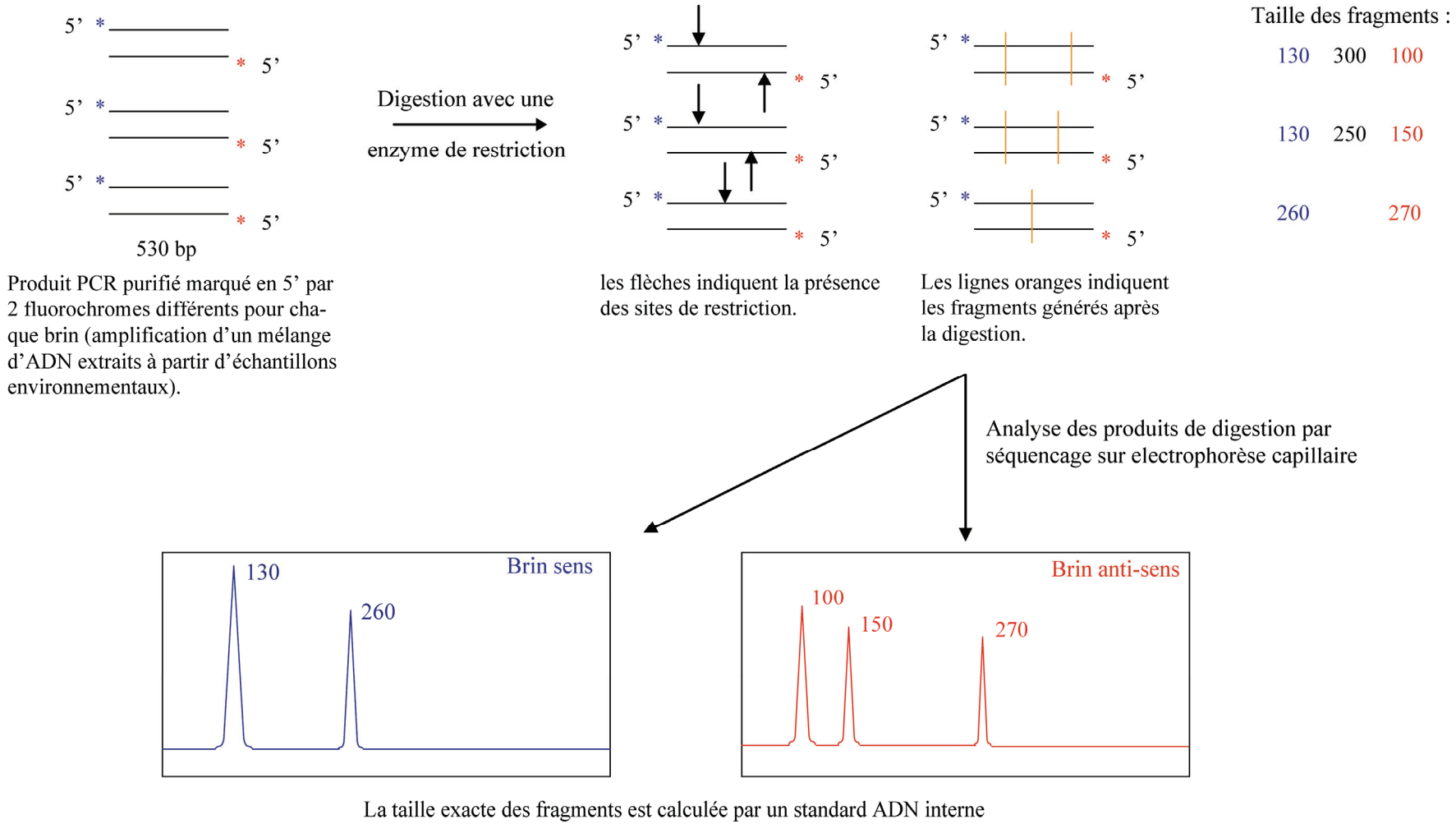



**Figure I-17: Représentation de l'analyse du polymorphisme des fragments terminaux de restriction**

*2.2.3.6- Analyse des séquences d'ADN*

L'étude des séquences d'ADN est la technique de résolution maximale de l'étude de la diversité, à la condition qu'un nombre suffisant de séquences soient analysé. Elle permet d'accéder directement à l'analyse phylogénétique de la diversité. Ces analyses de séquences sont généralement basées sur la méthode de terminaison en chaîne développée en Sanger et al (1977). Le principe utilisé consiste donc à synthétiser toutes les copies partielles intermédiaires possibles de la molécule d'ADN ciblée. Cette synthèse est réalisée à l'aide de di-déoxynucleotides tri-phosphates fluorescents qui quand ils sont incorporés interrompent la polymérisation de l'ADN. On sépare alors les copies selon leur taille par une migration électrophorétique sur séquenceur automatique qui détecte à chaque fragment interrompu le type de fluorochrome donc de nucléotide, donc permet la lecture de la séquence.

Le résultat est présenté sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en faite en terme de nucléotides (Fig.I-18).

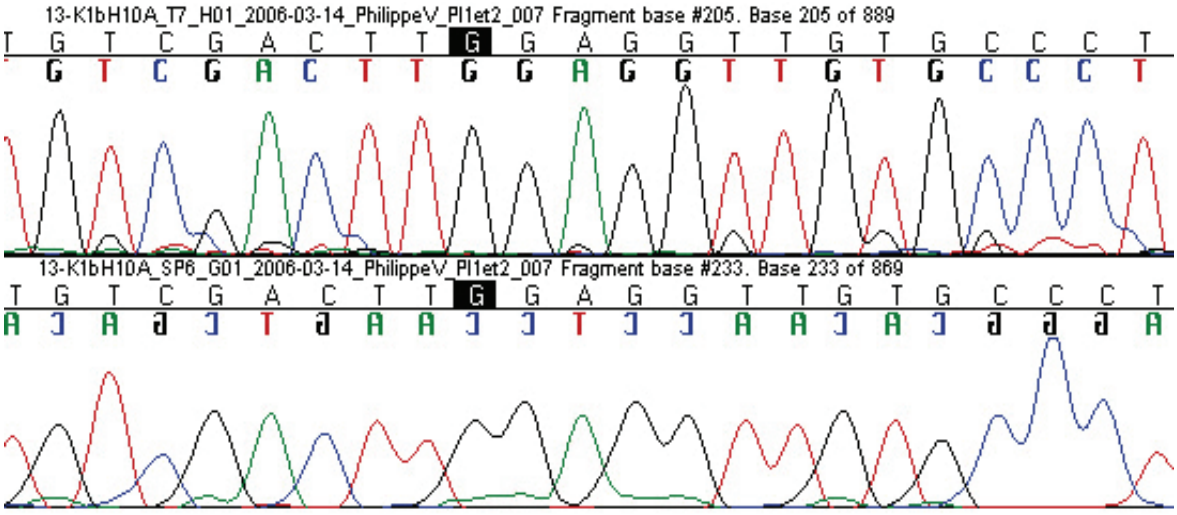



**Figure I - 18: Exemple de résultat obtenu par séquence automatique**. Les quatre courbes correspondent à la détection de la fluorescence des fragments d'ADN obtenus. Un "pic" correspond donc à la détection d'un nucléotide donné dans la séquence : l'interprétation est donnée au dessus des courbes.

*En bleu : Cytosine. En vert : Adénine. En noir : Guanine. En rouge : Thymine*

## 3–NOUVELLES APPROCHES DE LA COMPREHENSION DES ECOSYSTEMES

Les techniques citées précédemment basées sur les acides nucléiques et sur les lipides ont permis d'élucider un grand nombre de structures microbiennes dans les sols et l'eau souterraine. Ces méthodes basées en général sur l'analyse du gène de l'ARNr16S apportent un grand nombre d'informations sur les taxa et les espèces présentes dans l'environnement. Mais cette connaissance de la structure de la communauté n'apporte pas d'informations utiles sur leur fonctionnement comme les capacités métaboliques, les dynamiques de populations et les réponses physiologiques face à des conditions environnementales ou encore l'information génétique qu'elle contient. Pour pallier ce manque d'informations de nouvelles approches ont été développées ces dernières années : les approches dites 'omiques'. Le développement de ses approches en écologie microbienne n'a pu se faire que développement méthodologique préalable : instruments et concept et méthode d'analyse de données (Fig.I-10). On peut ainsi définir 3 nouvelles approches : Méta-Génomique, Méta-Transciptomique et Méta-Protéomique.

La génomique est définie comme l'étude exhaustive des nucléotides constituant un génome ce qui permet d'accéder à l'ensemble des gènes, leur disposition sur les chromosomes ? leur fonction.

La Méta-Génomique (génomique des communautés ou génomique environnementale) est ainsi décrite comme une approche nouvelle et puissante, qui permet d'analyser et de séquencer les génomes de tous les microorganismes d'un milieu (Streit et Schmitz, 2004), ce qui inclus les microorganismes non cultivable. Aussi, la métagénomique par séquençage automatique permet de prédire le rôle écologique de ces microorganismes, considéré comme une « boite noire ».

Cette approche de Méta-Génomique a été appliquée aux séquençages du milieu marin notamment dans le cadre du programme du 'Global Ocean Sequencing' (Venter *et al.*, 2004) qui, même si elle est surestimé (Koonin, 2007), a révélé un remarquable éventail de la diversité microbienne dans la mer des Sargasses. Comme l'ont souligné Streit et Schmitz (2004) cette étude a principalement permis de défricher la possibilité de nouvelles investigations du monde microbien et de son évolution. Mais elle a aussi mis en avant la nécessité de développer des outils informatiques adaptés ; les bases de données généralistes

comme Genbank[11] ou EMBL[12] ne sont pas adaptées à un apport massif de nouvelles séquences (Streit and Schmitz, 2004). D'autres travaux ont été mis en place sur le séquençage du milieu marin notamment par Delong et al (2006) et Bejà *et al.* (2000), sur le sol (Rondon *et al.*, 2000), sur le sol et l'eau de mer (Tringe *et al.*, 2005), sur les milieux acides miniers (Allen and Banfield, 2005 ; Baker *et al.*, 2006).

Le nombre de nouveaux gènes identifiés par les technologies de métagénomique peuvent excéder le nombre de gènes identifiés par séquençage microbien individuel. Il est ainsi important de comprendre la fonction de ces nouveaux gènes et protéines au sein des niches microbiennes et de leur rôle dans les cycles globaux (Streit and Schmitz, 2004). De plus la présence d'un gène au sein de populations d'une communauté fonctionnelle donnée ne va pas pour autant signifier que celui-ci est exprimé dans l'environnement (Maron *et al.*, 2007). La fonctionnalité microbienne peut ainsi être caractérisée soit au niveau de l'analyse des transcrits c'est à dire de l'ARN soit au niveau des protéines. Deux termes ont ainsi été défini : le transcriptome et le protéome. De façon similaire au génome, le transcriptome va regrouper l'ensemble des transcrits au sein d'un organisme et le protéome définit l'ensemble des protéines exprimées dans un système vivant (animal, organe) à un temps donné dans un environnement donné. Les termes de Métatranscriptome et Métaprotéome ont ainsi été proposé pour définir les mêmes notions mais pour une communauté complexe d'organisme.

L'utilisation de l'ARN pour marquer la fonctionnalité microbienne est assez délicate car elle nécessite une quantité suffisante et une bonne qualité d'ARN, ce qui n'est pas forcément facile à obtenir dans la plupart des environnements (sol, eau, sédiments, etc.) (Paro et al, 2007). Comme l'ont souligné Maron *et al.* (2007), l'utilisation de l'ARN pose aussi problème du fait d'une ½ vie courte, de la difficulté à éliminer les acides humiques durant les processus d'extraction, de la différence de cinétique de transcrits de gène similaires dans des populations distinctes et de la faible corrélation entre les niveaux d'ARN. Pour ces limitations principalement, l'étude des protéines correspondant au transcriptome, soit le protéome, semble être plus judicieuse. Le terme de Métaprotéomique a été proposé en 2004 par Wilmes et Bond comme 'the large-scale characterization of the entire protein complement of environmental microbiota at a given point in time'.

[11] Genbank est une base de donnée qui contient des séquences d'ADN disponibles. On peut y accéder via www.ncbi.nlm.nih.gov.

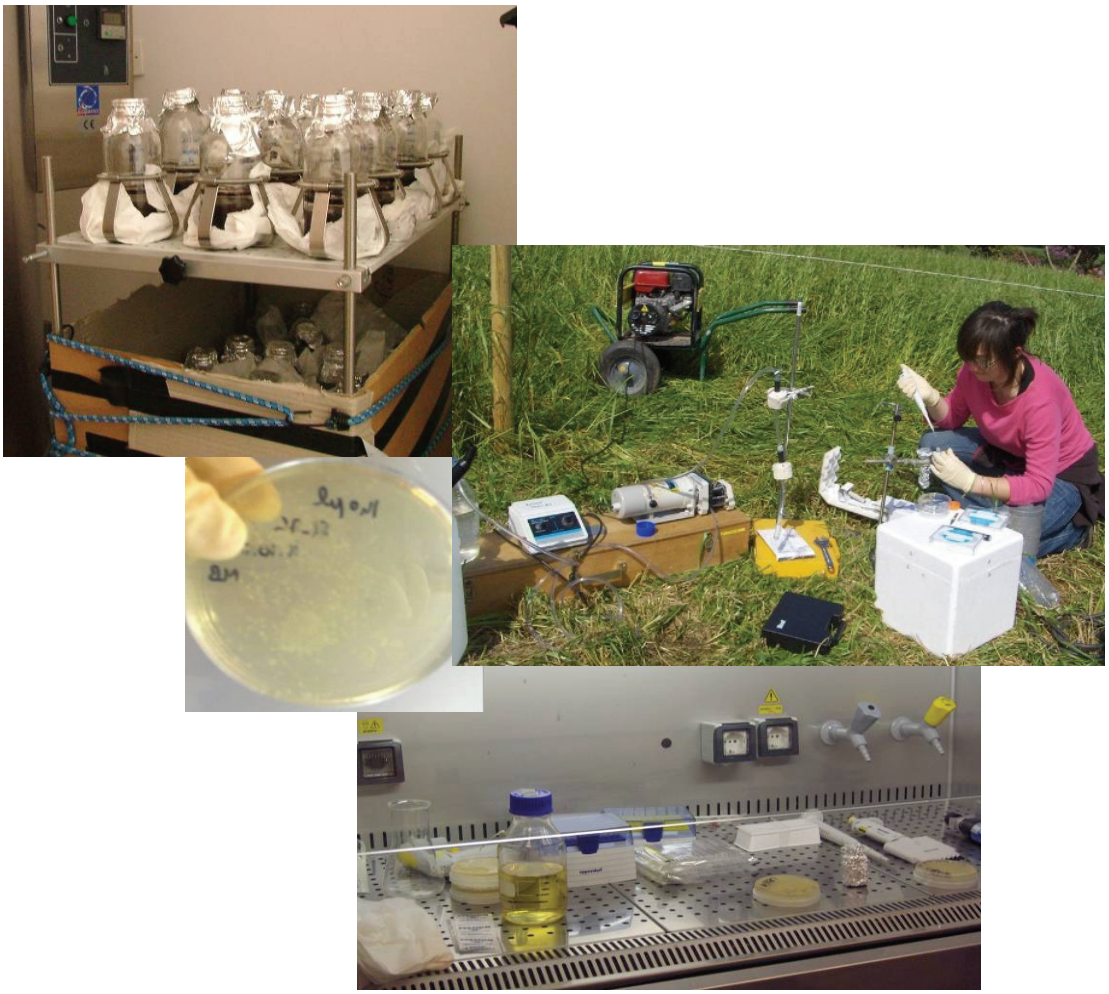
[12] EMBL est la version européenne de Genbank, elle est en collaboration avec le NCBI. On peut y accéder via http://www.ebi.ac.uk/embl/

De plus les protéines ou plus précisément les enzymes sont impliquées dans les voies métaboliques. Leur analyse permet ainsi de caractériser la dynamique des fonctions microbiennes qui est un point crucial de la compréhension de l'activité microbienne.

Cette étude se concentre essentiellement sur la Métaprotéomique, en redéfinissant certains termes, et en présentant les différents travaux réalisés à ce jour dans ce domaine ; ainsi que des techniques d'analyse du Métaprotéome.

# PARTIE II

## MATERIEL ET METHODES



# I

# CHOIX DES SITES EXPERIMENTAUX

Les travaux ont porté sur l'étude de 2 sites qui ont la particularité d'être à l'interface sol - nappe. Le site de Carentan permet d'observer une diversité spatiale horizontale et le site de Kerrien une diversité spatiale verticale. De plus ces sites ont fait l'étude d'une caractérisation chimique et hydrologique détaillée, ce qui permet une meilleure caractérisation des transferts et de la réactivité du milieu.

## 1. Carentan

Ce site a été suivi pendant 3 ans (Auterives, 2007) suite a une demande du Parc Naturel des Marais du Cotentin et du Bessin, qui s'interrogeait sur le fonctionnement, l'évolution et la vulnérabilité des zones humides des marais du Cotentin. Ce travail a été financé par le conseil Général de la Manche, le conseil Régional de la basse Normandie et l'Agence de l'eau Seine Normandie. L'exploitation pour l'alimentation en eau potable d'aquifères directement sous-jacent aux zones humides des marais du Cotentin pose le problème du fonctionnement, de l'évolution et de la vulnérabilité de ces zones humides.

Ce suivi a donc consisté à : (i) étudier le fonctionnement hydrologique de la tourbière, les interactions avec le réseau hydrographique de surface et les écoulements souterrains ; (ii) caractériser ses particularités hydrologiques et (iii) identifier et caractériser les propriétés chimiques du milieu. Ce travail a permis d'évaluer l'influence des flux hydrologiques sur les processus biogéochimiques.

Localisation géographique

Le marais de Sainteny étudié se situe sur la commune de Carentan à environ une quinzaine de kilomètres de Carentan dans le Cotentin (49°15' N, 1°20' W). Les sites d'études sont localisés à l'aplomb de l'aquifère de Sainteny Marchésieux, dans la tourbière de la vallée de la *Sèves*, au Nord de Saint Germain sur Sèves et le long de la Rivière Holerotte – Rau (FigII-1).

La présence d'un forage (débit de 300 $m^3$/h) confère aux 2 sites des conditions hydrologiques contrastées telle que :

-le site S est localisé à promixité de la station de pompage, là où l'influence du forage d'exploitation est maximale. Il occupe la rive droite et la rive gauche de la rivière Holerotte - Rau.

- le Site G est sur la rive gauche, à 1.3km en aval du site S, et est soumis à une moindre influence du puits de pompage. Il est ainsi défini comme site de référence.

Climat

La partie basse de la Normandie est caractérisée par un climat océanique avec des précipitations annuelles de l'ordre de 946 mm (données compilées sur la période 1946-2004), et une moyenne annuelle d'évapotranspiration de 650mm.

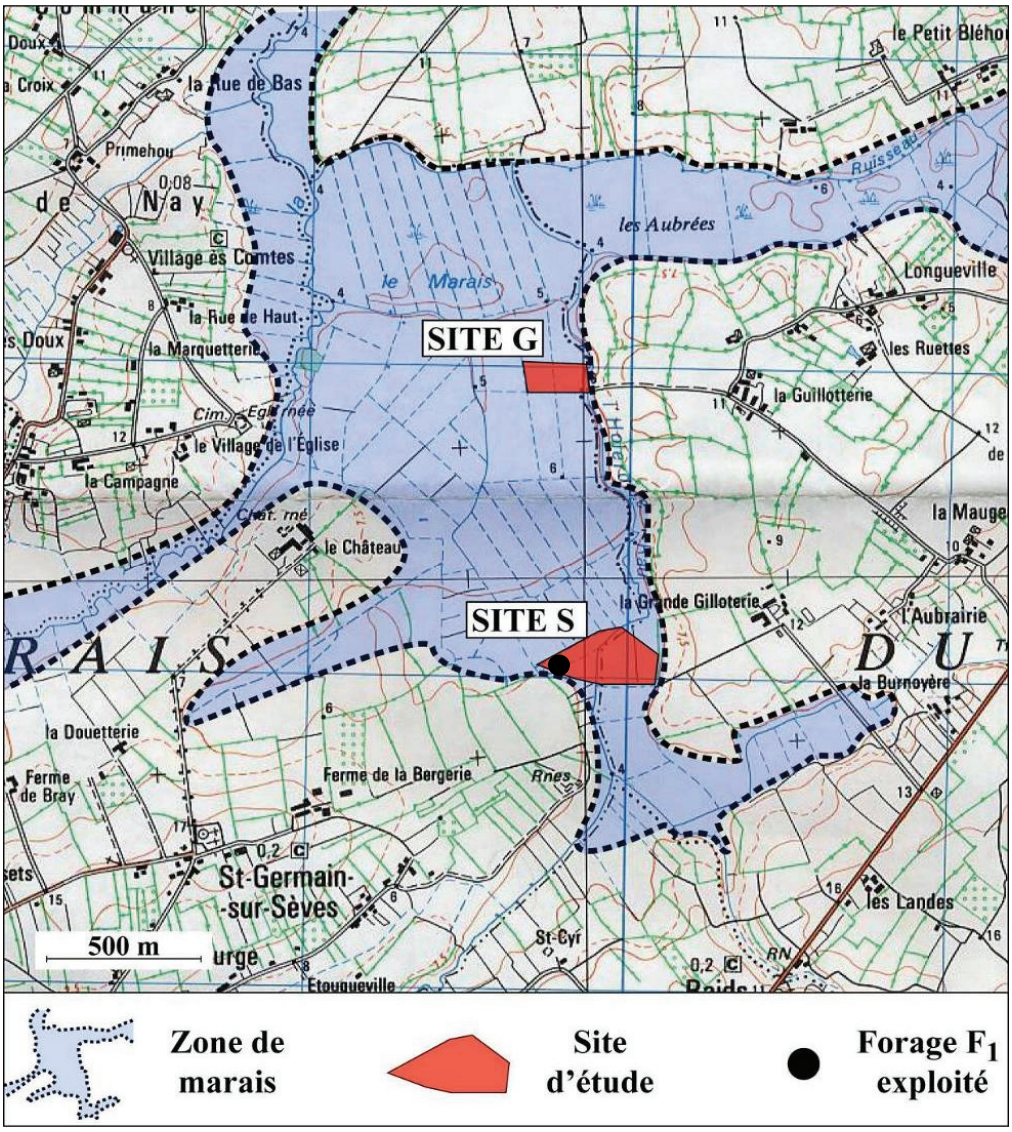



**Figure II-1 : Localisation des sites S et G le long de la rivière *Holerotte*** (issu de Auterives, 2007)

Géologie

Les tourbières de Normandie se sont développées il y a 5000 ans et ne sont plus actuellement actives du fait de l'anthropisation exception faites de quelques zones localisées. Les tourbières reposent sur (1) un niveau argileux à épaisseur variable (1.5-6m), et (2) une formation sableuse

datant du mio - pliocène épais de 80 à 100m (Fig.II-2). La formation sableuse constitue un aquifère régional à forte conductivité hydraulique ($10^{-3}$ à $10^{-4}$ $m.s^{-1}$). Cet aquifère est exploité depuis 1989 pour l'alimentation en eau potable de la région à un débit de 3 millions de $m^3$ par an.

L'épaisseur de la tourbière varie à l'échelle locale. Le niveau tourbeux sur le site de Référence G est fin en périphérie de tourbière (~60cm) et s'épaissit vers le centre de la tourbière (plus de 5 m). Le niveau de tourbe sur les sites de la station à une forme de bassin avec une épaisseur plus importante au centre. En rive droite l'épaisseur varie entre 2 et 4 m contre 1 à 6 m en rive gauche. En proximité de rivière, de chaque côté de la rive, l'épaisseur est 3.5 - 4 mètres.

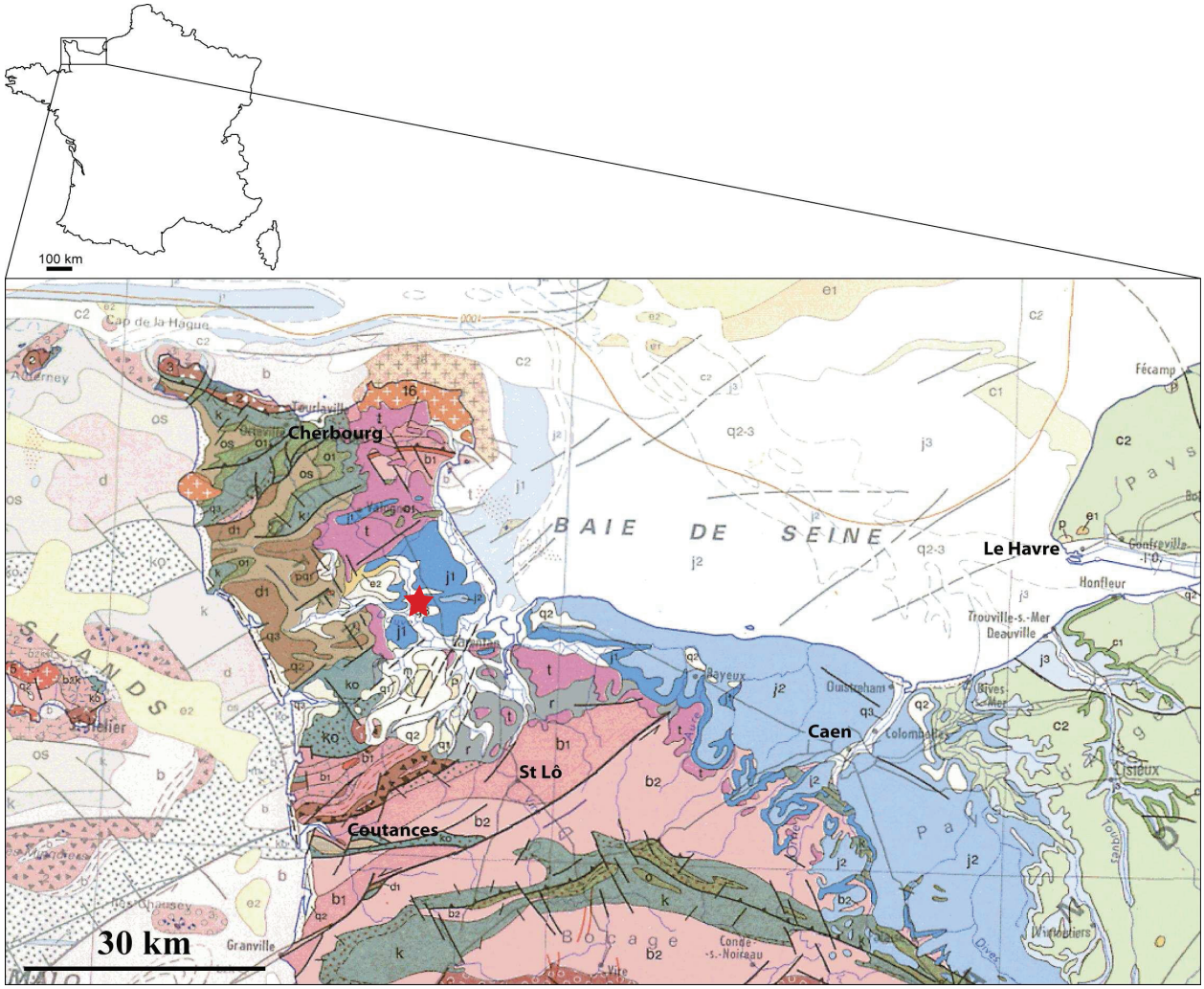



**Figure II-2 : Localisation et carte géologique du Cotentin** (d'après la carte géologique de la France au millionième, Chantraine *et al.*, 1996) (issu de Auterives, 2007). Le site d'étude est localisé par l'emplacement de l'étoile.

Matériel implanté

Le dispositif expérimental est composé de 21 piézomètres répartis sur l'ensemble des 3 sites : 18 dans la tourbe à des profondeurs variables et 3 dans le niveau argileux (Fig.II-3). Ils ont été crépinés à la base, permettant d'accéder aux eaux contenus dans les niveaux souhaités.

Sur le site S en rive droite, suivant un transept oblique à la rivière. En rive gauche, 7 piézomètres ont été implantés à proximité de la rivière et entre la rivière et la station de pompage. Sur le site G, 7 piézomètres dessinent un transept perpendiculaire à la rivière.

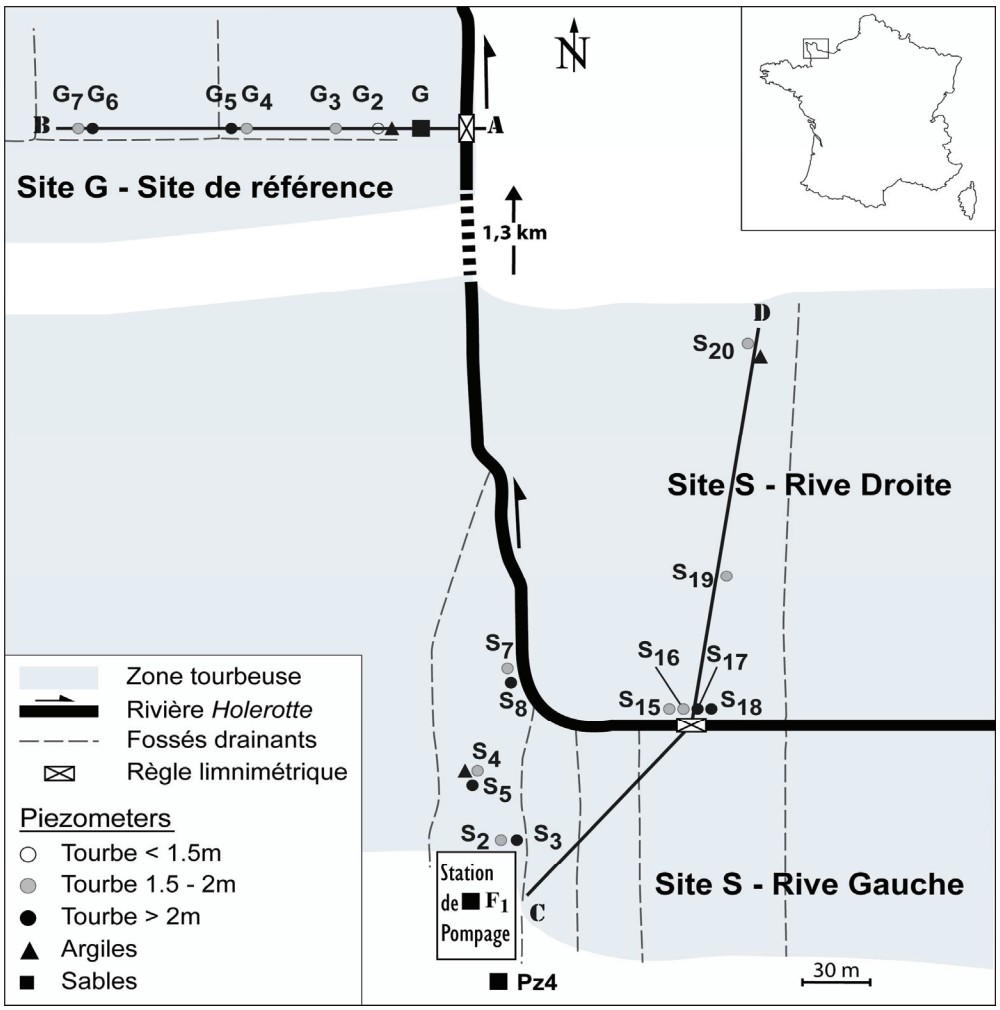



**Figure II-3 : Plan d'implantation des piézomètres dans la tourbe et les argiles, localisation du forage d'exploitation F1 et des forages d'observation des sables G et Pz4** (Auterives, 2007**)**

Caractérisation chimique et hydrologique

Les sites étudiés sont des tourbières herbeuses affleurantes exploitées pour la fauche et la pâture.
Le suivi hydrologique a mis en évidence des conditions hydrologiques distinctes entre les sites :

- Sur le site G, la rivière est connectée au marais durant la période estivale et déconnectée le reste de l'année hydrologique.
- Sur les sites S, la rivière est connectée au marais la plus grande partie de l'année. La rivière alimente la plus grande partie de l'année le marais et en période de très hautes eaux les circulations hydrologiques s'inversent et la rivière vient drainer le marais.

Le suivi hydro chimique a été effectué sur une période s'étalant d'avril 2003 à mars 2005 et révélé que :

- En basses eaux, les 2 sites montrent des conditions réductrices modérées liées à une circulation lente des eaux souterraines.
- En hautes eaux, les conditions hydrologiques se différencient entre les 2 sites ce qui influencent directement les processus biogéochimiques (Auterives, 2007).
    (1) Sur le *site G* la déconnexion hydraulique entre la rivière et la tourbe permet un maintien des conditions réductrices dans la nappe profonde avec des concentrations en nitrate qui restent faibles. Dans la partie supérieure (catotelm), les concentrations en nitrates varient saisonnièrement suivant la dynamique de la nappe libre.
    (2) Sur les sites S, la rivière est connectée à la nappe de la tourbe et l'alimente. Malgré des débits entrant lents, les conditions réductrices ne peuvent se mettrent en place et limitent ainsi la réduction des nitrates en profondeur. Les concentrations en nitrates fluctuent en surface et en profondeur.

Les concentrations en sulfates sont fortement dépendantes de la variabilité de la surface libre. L'alternance de saturation et de désaturation de la tourbe induit des pics de sulfates et une modification importante des conditions du milieu (chute de pH, chute de carbone organique dissous, pic de concentrations en cations dissous). Sur les deux sites, les pics de sulfates sont produits dans des zones où l'abaissement de la surface libre est maximum : à proximité de la rivière sur le site G et à proximité de la station de pompage sur le site S.
La figure II-4 schématise les résultats obtenus en période de hautes eaux et basses eaux et l'impact des alternances de saturation sur les conditions redox du milieu et le processus engagés.

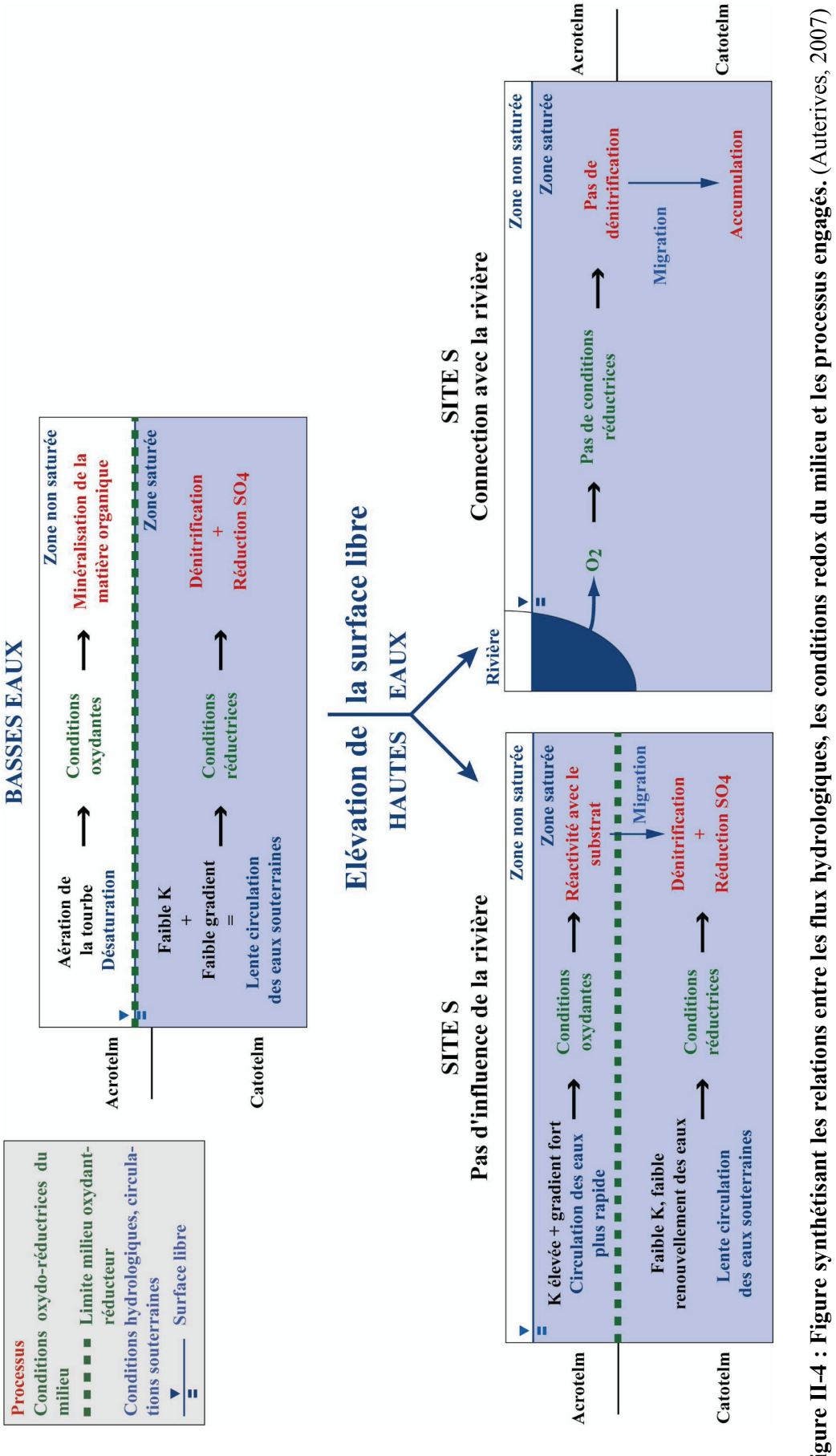



**Figure II-4 : Figure synthétisant les relations entre les flux hydrologiques, les conditions redox du milieu et les processus engagés.** (Auterives, 2007)

## 2. **Bassin Versant de Kerbernez** (Sous Bassin de Kerrien)

Le bassin versant de Kerbernez fait partie de l'observatoire de recherche en environnement AgrHys (Temps de réponse des flux hydrogéochimiques aux forçages dans les agro-hydrosystèmes;http://www.caren.univ-rennes1.fr/ORE-AgrHys/). L'objectif de l'ORE Agrhys est de suivre l'évolution de la qualité chimique des bassins versants agricoles en fonction de l'évolution des pratiques anthropique et changements climatiques. Le dispositif expérimental implanté sur le bassin versant de Kerrien a pour but de déterminer les processus chimiques et affiner la compréhension les fortes concentrations observées dans la zone de fluctuation de nappe en amont du bassin versant de Kerbernez. Cela rentre dans le cadre du projet Sonate[1] mené par l'UMR SAS de l'INRA de Rennes, dont le responsable est Jérôme Molénat. Ce projet est en cours de réalisation.

Localisation géographique

Le bassin versant de Kerbernez se situe sur la commune de Plomelin près de Quimper, à environ une dizaine de kilomètres de Quimper dans le sud du Finistère (47°57'N-4°8'W, 2347.35N – 117.5E) (Fig.II-5).

Le bassin versant de Kerbernez (12ha) est constituant avec le bassin versant de Kerrien (9.5ha) et de Gerveur, le bassin versant du Puits. L'exutoire de ce bassin versant se situe au niveau de la rivière de l'Odet, à environ 10km de son embouchure (Ruiz *et al.,* 2002a,b).

Climat

L'extrême ouest de la Bretagne se caractérise par des cumuls de pluie plus importants que dans le Grand Ouest en général avec des intensités rarement fortes et des températures douces. La zone d'étude est marquée par une forte influence de la mer du fait de sa proximité (10km). La moyenne des précipitations au cours de ces 10 dernières années est de 1167 mm (écart type $\sigma$ = 195 mm) avec une variabilité interannuelle importante pouvant aller du simple au double comme pour les années hydrologiques 1996-1997 (886 mm) et 2000-2001 (1635 mm). L'évapotranspiration moyenne calculée selon la méthode de Penman (Legout, 2005) est de 616 mm ($\sigma$ = 71 mm) et est constante entre les années. La variabilité inter annuelle de la recharge de la nappe est donc essentiellement sous le contrôle de la pluviosité.

[1] Le projet SONATE est un projet CNRS.INSU qui fait parti d'un programme ECCO. Le sigle SONATE signifie :étude du rôle de l'interface **SOl-NA**ppe sur les processus de **T**ransfert de solutés, d'**E**rosion chimique et sur la diversité bactérienne dans un bassin versant

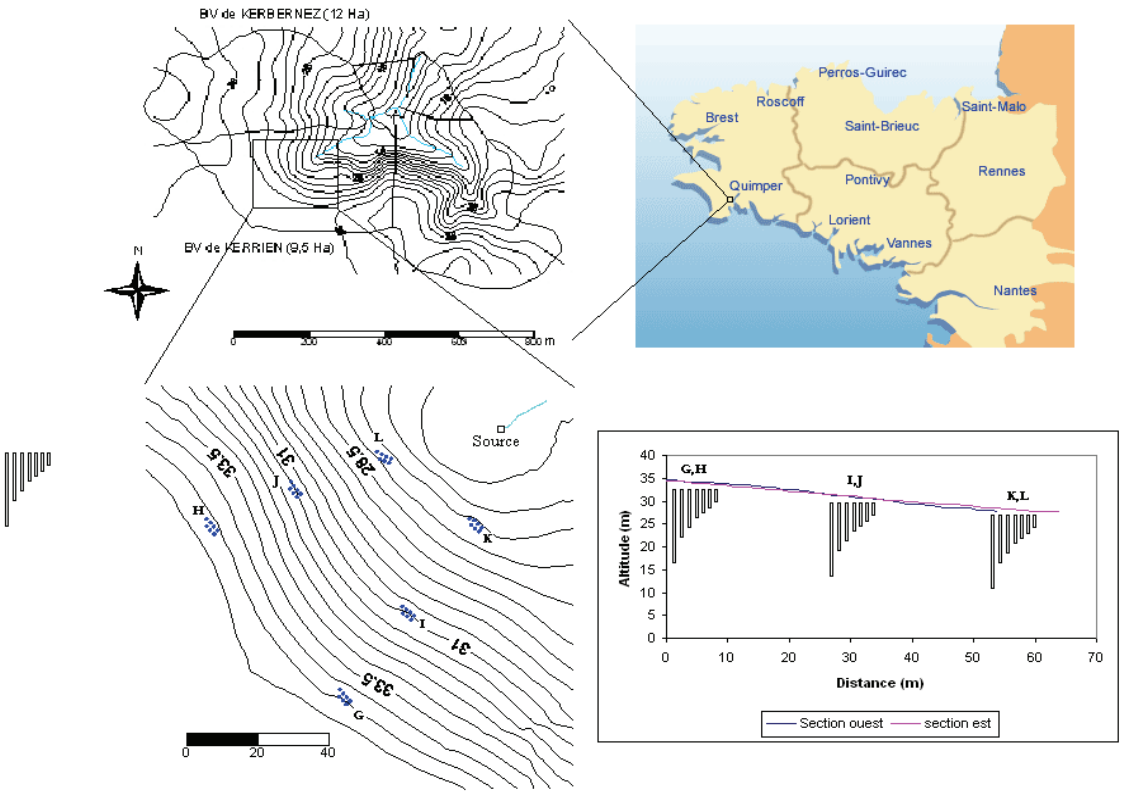



**Figure II-5 : Situation géographique du Bassin versant de Kerrien et localisation des piézomètres** (Molénat *et al.*, 2007).

Matériel implanté

Le dispositif expérimental (Fig.II-5) est constitué de 42 piézomètres le long du bassin versant, dont 21 implantés dans la partie altérée. Les piézomètres sont implantés par groupe de 7 en dispositif 'flûte de pan' : 3, 4, 5, 6, 8, 10 et 15m ; ce qui permet de suivre la composition chimique de l'eau du toit de la nappe durant la période de recharge et de décharge. Les piézomètres sont disposés en 2 groupes : 21 sur la section est du bassin versant et 21 sur la section ouest. Les piézomètres sont crépinés à la base sur 0.5 m pour les moins profonds (3, 4 et 5m) et sur 1m pour les autres.

Géologie

Le sous sol du bassin versant est composé de leucogranites. La leucogranodiorite de Plomelin forme un massif encaissé dans le granite dit de Pluguffan (Fig.II-6). L'altération des granites forme de façon générale des arènes. En région tempérée ces arènes sont caractérisées par une désagrégation physique intense et une évolution chimique modérée. Le leucogranite de Plomelin est composé à 40% de quartz, 50% de feldspath et 10% de micas. Au niveau de la zone d'étude, l'épaisseur de l'arène granitique varie de 1 à plus de 20m, reposant sur un socle fissuré et fracturé. La zone altérée apparaît entre 0.7 et 1.2 m sous la surface du sol. Les sols sont principalement des

sols marno - sableux. L'eau souterraine est localisée et fluctue essentiellement dans le granite altéré, la nappe varie entre 2 et 8 m sous la surface du sol au cours de l'année.

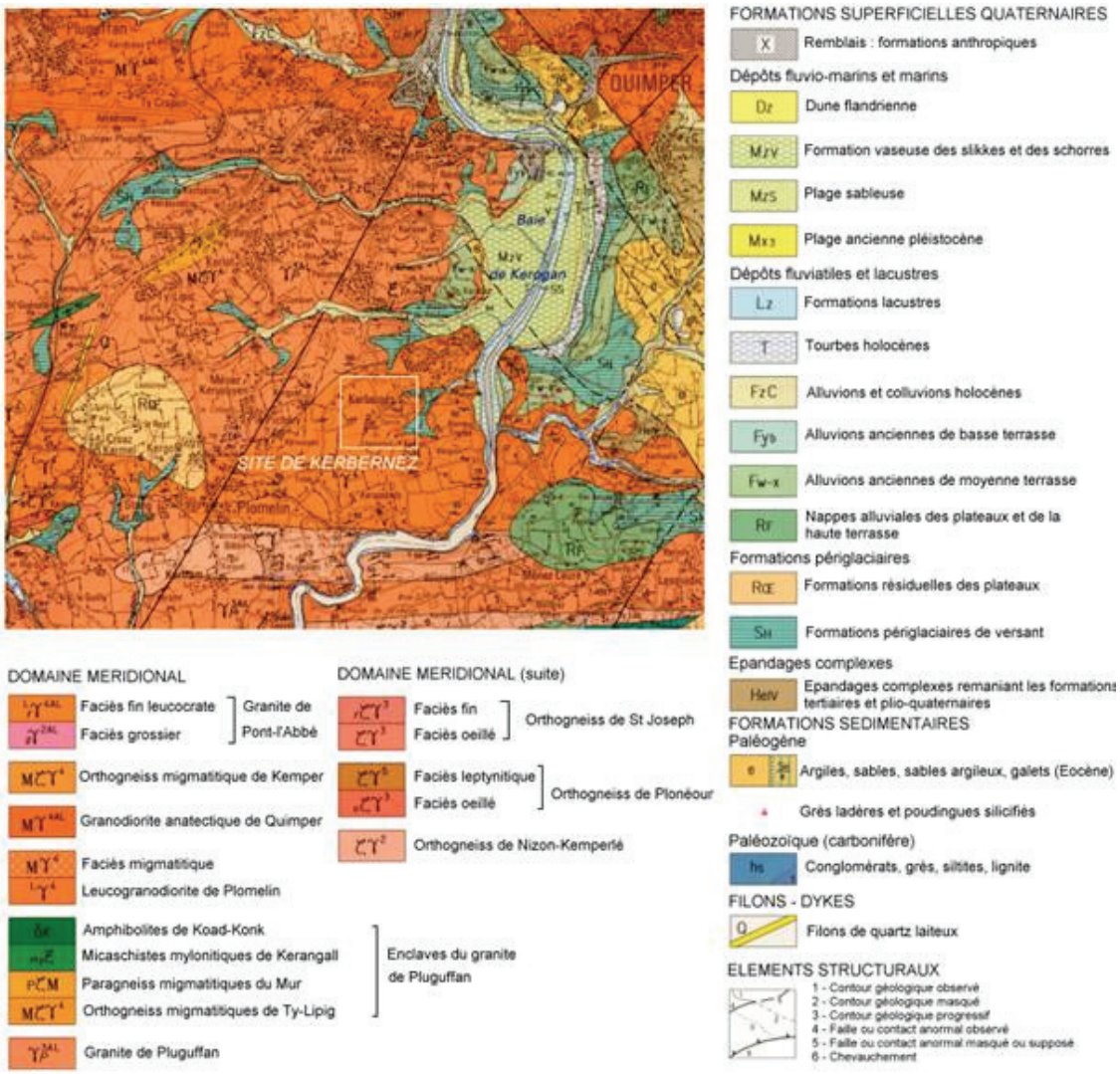



**Figure II-6 : Extrait de la carte géologique de Quimper (Feuille 1/50000) incluant la zone d'étude.**
(Dans Martin, 2003 ; d'après Béhennec et al., 1999)

Caractérisation chimique et hydrologique

Un suivi chimique est réalisé tous les 15 jours depuis décembre 2004 par l'UMR SAS de l'INRA de Rennes et périodiquement par l'UMR Géosciences Rennes. Le suivi chimique effectué par l'UMR SAS consiste en une analyse de anions majeurs et paramètres physico-chimiques. Les cations majeurs ont été analysés par ICP-MS tous les trois mois sur ce site. Depuis 2005,

prélèvements ont aussi été effectués par l'UMR Géosciences à la fréquence trimestrielle pour analyser les teneurs en CFC et SF6[2] des ces eaux dans le but d'une estimation de l'âge de l'eau.

[2] Les CFC ou chlorofluorocarbones et les SF6 ou hexafluorures de soufre sont des gaz utilisés dans la datation des eaux.). L'analyse de ces composés permet à la fois une caractérisation de la réactivité chimique et biologique (réactions de dénitrification, consommation d'oxygène, production de CO2…) et un outil de détermination des temps de résidence des eaux dans le milieu via l'analyse des composés anthropiques. Les courbes de croissance de ces composés sont effectivement bien connues et montrent une croissance relativement continue au moins jusqu'à la fin des années 1990 pour les CFC. Elles permettent donc d'associer à une concentration une année d'équilibration avec l'atmosphère de l'eau échantillonnée dans le milieu souterrain. (Ayraud, 2006)

# II

# ANALYSE ET MESURES DE LA DIVERSITE BACTERIENNE

Deux types de diversité ont été appréciées : la **diversité taxinomique** soit l'ensemble des bactéries présentes dans l'écosystème étudié et la **diversité fonctionnelle** soit l'étude des bactéries impliquée dans un processus particulier.

Pour la *diversité taxinomique*, le gène cible doit être présent dans l'intégralité de la communauté étudiée. Le gène choisi est le gène codant pour l'ARNr 16S qui est très conservé. Une mutation dans ce gène est le plus souvent contre - sélectionnée. Ainsi ce gène est un excellent marqueur taxinomique car 2 individus présentant des séquences différentes d'ARNr 16S peuvent être considérés d'espèces ou de groupes d'espèces différents.

Pour la *diversité fonctionnelle*, le gène cible qui a fait l'objet de l'étude est le gène *narG,* un des gènes clés de la réduction des nitrates en nitrites (Partie I - Chapître1).

Comme les bactéries présentes dans l'environnement sont peu connues et que seul 1% de la diversité totale est cultivable en laboratoire, les techniques choisies pour identifier la diversité au sein des 2 écosystèmes sont des techniques moléculaires par PCR - cultures indépendantes. Les approches utilisées pour l'analyse de la diversité bactérienne sur les 2 sites d'études sont différentes. Pour le site expérimental de Carentan l'analyse de diversité a été réalisée sur des échantillons de sols soumis à différents variables de forçages. Dans le cas du site de Kerrien, la diversité taxinomique et la diversité fonctionnelle ont été analysées directement à partir d'échantillons environnementaux.

# 1– ECHANTILLONNAGE ET EXTRACTION D'ADN

## 1.1 - Approche de la diversité bactérienne fonctionnelle en fonction des transferts horizontaux (Site de Carentan)

Afin d'appréhender l'impact des transferts horizontaux sur la structure des communautés microbiennes et plus spécifiquement des bactéries réduisant les nitrates, une expérimentation a été mise en place en laboratoire à partir d'échantillons de sol. D'autres paramètres comme l'oxygénation et la présence de nutriments ont aussi été appréciés.

### 1.1.1 - Dispositif expérimental

Caractéristiques des sols utilisés et choix des profondeurs

Pour les expériences en bio-réacteur, la tourbe a été prélevée sur la rive gauche pour le 'Site G', et en rive droite et rive gauche pour le site sous l'influence de la station de pompage, appelé site S. Chacun des trois sites comporte deux stations de prélèvement : à proximité de la rivière et à l'intérieur du marais. L'échantillonnage a été effectué à différentes profondeurs de 50 à 80 cm.

Le prélèvement a été effectué le 31 mars 2004, en conditions oxydantes, mais après une période de pluie. Après prélèvement, le sol a été débarrassé de ses plus grosses racines, son pH a été déterminé d'après la norme AFNOR NF X 31-103 (Tabl.II-1) sur les échantillons et conservé au réfrigérateur à 4°C, 2 jours avant le début de l'expérience.

L'eau

Deux types de solutions synthétiques ont été réalisées pour la mise en suspension de la tourbe : une eau simple et une eau enrichie en nitrates. L'eau 'simple' a été ajustée à 40 mg/L par ajout de NaCl à de l'eau milliQ 18 Mohms. L'eau nitratée est de l'eau simple additionnée de $NaNO_3$ pour obtention d'une concentration de $NO_3^-$ à 30 mg/L.

L'utilisation d'eau provenant de la rivière n'a pas pu être envisagée car la présence de bactéries dans l'eau de rivière aurait faussé l'analyse de diversité.

Système de réacteur utilisé

Les réacteurs sont des flacons à plasma de 250 mL munis d'une bague et d'un septum pour le maintien de l'anaérobiose (Fig.II-7) et d'une simple feuille d'aluminium pour l'aérobiose (Fig.II-8).

**Tableau II-1 : Caractéristique de la tourbe : profil de sol et pH**. Le point d'interrogation signifie ici que la profondeur de la tourbe n'est pas connue.

| Site de prélèvement | station | Profil de sol | pH |
|---|---|---|---|
| Site G | proximité de la rivière | 0 à 15 cm : sol<br>15 à 50 cm : remblais<br>+ 50cm : tourbe | 5,8 |
| | dans le marais | 0 à ? : tourbe | 5,2 |
| Rive droite | proximité de la rivière | 0 à 15 cm : sol<br>15 à 50 cm : remblais<br>+ 50cm : tourbe | 4,5 |
| | dans le marais | 0 à 15 cm : sol<br>15 à 50 cm : remblais<br>+ 50cm : tourbe | 5 |
| Rive Gauche | proximité de la rivière | 0 à 15 cm : sol tourbeux<br>15 à 50 cm : horizon limono argileux très oxydé<br>+ 50cm : tourbe | 4,7 |
| | dans le marais | 0 à 10 cm : sol tourbeux<br>10 à 30 cm : horizon limono argileux très oxydé<br>+ 30cm : tourbe | 4,4 |

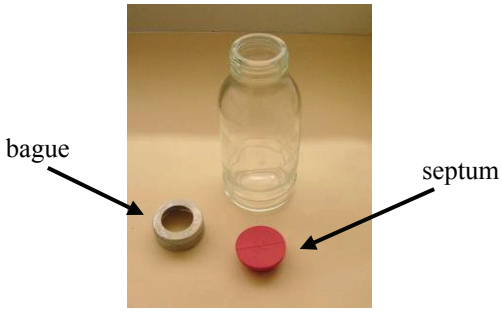



**Figure II-7 : Flacon à plasma de 250 mL avec septum et bague.** L'ensemble permet, après évacuation de l'oxygène et mise sous diazote, d'obtenir des conditions anaérobies

**Figure II-8 : Flacon à plasma de 250 mL recouvert d'une feuille d'aluminium** pour représenter une condition en présence d'oxygène ou aérobiose.

Protocole

Les différentes conditions expérimentales sont décrites dans la figure II-9.

Des échantillons de tourbe (30g) après retrait des racines sont mis en solution dans 100 mL d'eau synthétique à 40 mg/L de chlore ou 100 mL d'eau synthétique nitratée (30 mg/L) à 40 mg/L de chlore. Le ratio sol eau varie de 1/10 à 1/20 et tient compte du pourcentage d'humidité du sol. Cette condition permet une saturation totale de la tourbe.

Le prélèvement d'eau pour le suivi des teneurs en nitrates, sulfates et chlore et la diversité microbienne se fait à l'aide de seringues stériles de 20 mL.

Deux types d'incubation sont réalisées *: aérobiose* ou présence d'oxygène et *anaérobiose* ou absence d'oxygène libre. La mise en anaérobiose consiste à chasser l'air par une pompe à vide et à

le remplacer par du diazote. Ceci est répété à trois reprises, pour assurer un bon retrait de l'oxygène.

Pour maintenir les conditions d'aérobiose et ne pas créer de « micro sites» anaérobies, les flacons sont sous agitation continue durant la durée de l'expérience. Une heure avant prélèvement, l'ensemble des flacons est secoué pour homogénéiser l'eau puis laisser décanter.

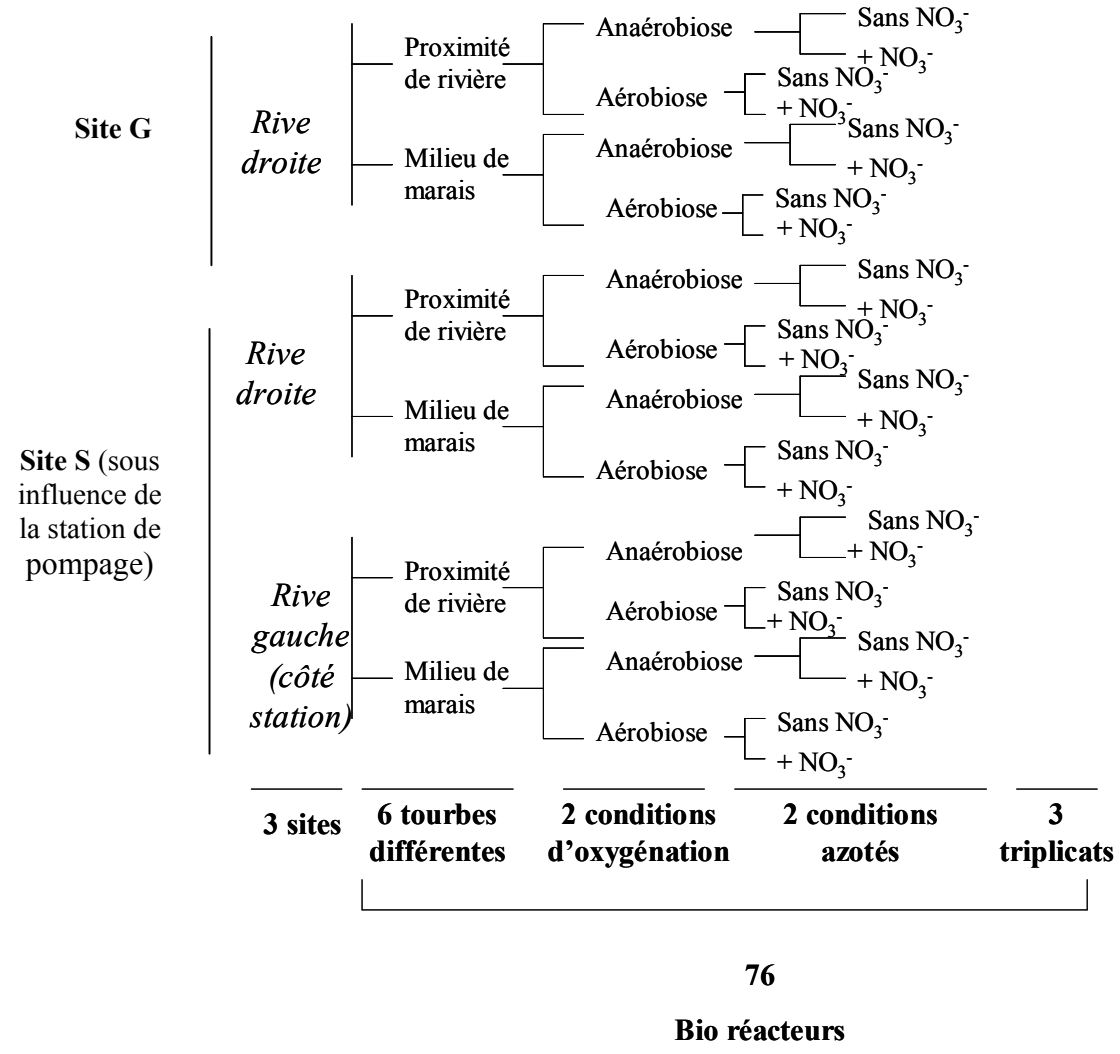



**Figure II-9 : Dispositif expérimentale**

Un test préliminaire a été réalisé sur deux tourbes prélevées du site G, à proximité et à distance de la rivière, pour quantifier l'influence d'ajouts combinés des ions nitrates et sulfates sur la réduction des nitrates. Durant cette expérience, des séries de flacons contenant de l'eau sans nitrate ni sulfate, une solution à 40 ppm de sulfate et une autre à 30 ppm de nitrate et 40 ppm de sulfate ont été suivies sur une durée de 888h. Les résultats obtenus n'ont pas montré de différence entre les

microcosmes avec ou sans ajout de sulfates. Dans la suite du travail, l'ajout de sulfate n'a pas été renouvelé.

Prélèvement et analyses

Le suivi de la cinétique des réactions en nitrate et sulfate est réalisée sur 240 heures avec des prélèvements à 1h, 8h, 24h, 76h et 240h. Le premier prélèvement a été réalisé environ une heure après la mise en contact de la tourbe avec l'eau pour laisser un temps nécessaire à l'équilibration sol/eau.

Chaque prélèvement est filtré à 0.2µm et conservé à 4°C avant analyse des anions majeurs ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$, $Cl^-$) par chromatographie ionique (Dionex©DX120) ou électrophorèse capillaire (TSP©spectraPhoresis 200©) pour les plus chargés en matière organique. Les limites de détection sont de 0,68 mg/L pour les chlorures, de 1,06 mg/L pour les sulfates et de 1,63 mg/L pour les nitrates et de quantification de 0,95 mg/L pour les chlorures, de 1,54 mg/L pour les sulfates et de 2,33 mg/L pour les nitrates (Petitjean *et al*, 2001).

Deux paramètres physico-chimiques sont mesurés en début et fin d'expérience : pH, potentiel d'oxydoréduction. Le pH est mesuré à +/- 0.05 unité avec une électrode combinée Sentix 50, après calibration avec des solutions standard WTW, de pH connu (4.01 et 7 à 25°C). Le potentiel redox est mesuré en utilisant une électrode de platine combinée (Mettler Pt 4805). Il a été corrigé du pH, de la température, et du potentiel redox standard de l'électrode Ag/AgCl par rapport à l'électrode standard d'hydrogène, selon la formule :

$$Eh\ corr = Eh\ mes + 230 - 0.76\ (T-25) + 60(pH-7) + E°Ag/AgCl$$

Ces analyses sont réalisées au sein de l'atelier Géochimie du CAREN et du laboratoire Ecobio, Rennes.

Pour l'analyse de diversité, 3 prélèvements ont été réalisés aux pas de temps 1h, 76h et 240h. Pour chaque condition expérimentales, 3 échantillons de 1.5mL d'eau de sol ont été effectués puis conservés à -20°C avant extraction pour analyse.

Traitements des résultats

Pour tenir compte des variations de concentrations liées à l'évaporation et à la diminution de volume liée à l'échantillonnage, les concentrations ont été corrigées pour les ramener au volume initial de 100mL.

Pour contrôler l'hétérogénéité locale de la tourbe, des réplicats (trois bioréacteurs en conditions expérimentales identiques) ont été mis en place pour chaque condition expérimentale, ce qui permet d'interpréter les différences entre les moyennes locales et spatiales.

### 1.1.2 - Extraction d'ADN total

Choix de l'extraction lié à la présence d'inhibiteur

La matière organique, en particulier les acides humiques, est une source d'inhibiteur majeur qui peut être co-extraite à partir d'échantillons de sol en même temps que l'ADN microbien. Ces acides humiques posent un problème considérable et peuvent interférer avec les manipulations enzymatiques d'ADN (Holben et al, 1988 ; Steffan and Atlas, 1988; Tsai and Olsen, 1992). Les matériaux humiques dans les sols ont des caractéristiques de taille et de charge similaires à l'ADN résultant de leur co-purification (Holben, 1994).

Yeates et collaborateurs (1997) ont montré que la méthode d'extraction d'ADN, à partir d'échantillons de sol, par vibrobroyage permet de récupérer un ADN peu contaminé par des composés types acides humiques.

Extraction de l'ADN total à partir des échantillons d'eau

L'extraction d'ADN s'est déroulée en différentes étapes. Une double extraction suivie d'une purification a été effectuée sur l'ensemble des échantillons. Le kit d'extraction utilisé est le kit Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit, selon le protocole proposé dans le manuel d'instruction du fabricant.

La lyse des tissus cellulaires a été réalisée en 2 étapes : une lyse mécanique par des billes de verres dans un vibrobroyeur et une lyse chimique par précipitation des déchets cellulaires. On récupère ainsi l'ADN qui est purifié sur colonne d'hydroxyapatite.

Lors de la première extraction, l'ADN a été extrait par vibrobroyage pendant 27s à 30coups/secondes. L'ADN a été élué au final dans 100µL de tampon d'élution. Sur ces 100µL une seconde extraction a été réalisée et l'ADN a été élué au final dans 70µL.

Purification de l'ADN

La double extraction effectuée, les échantillons ont été purifiés avec un kit HIGH PURE PCR PRODUCT PURIFICATION KIT CAT. N°. 1732668 – ROCHE APPLIED SCIENCE, selon le manuel d'instruction du fabricant. Le volume final est de 50µL.

## 1.2 - Approche de la diversité bactérienne taxonimique et fonctionnelle en fonction des transferts verticaux (Site de Kerrien)

### 1.2.1 - Dispositif expérimental

L'eau a été échantillonnée sur site à quatre profondeurs : 6, 8, 10 et 15m dans le système en flûte de pan (Fig.II-10) à l'aide d'un préleveur ISMA pour les campagnes de prélèvement 1 et 2, et par une pompe immergée Grundfos MP1 pour les campagnes suivantes. Le préleveur ISMA a été rincé entre chaque puits 3 fois à l'eau milliQ et 1 fois avec l'eau du puit.

Le volume prélevé à chaque profondeur est de 2 litres. L'eau a été filtrée au travers d'un dispositif de filtration en cascade à 3 seuils de coupures : 10.0µm (Isopore™ - TCTP, membrane filters), 5.µm (Isopore™ - TMTP, membrane filters) et 0.22µm (Sterivex™ -GV, Millipore), par l'utilisation d'une pompe péristaltique. La filtration en cascade a été adoptée pour récupérer le maximum de microorganismes présents dans les puits et pour éviter une saturation trop rapide des filtres à 0.22µm. Les filtres ont été placés dans des boites de pétri stériles et stockés dans un bac réfrigérant le temps de l'échantillonnage puis à -20°C, avant extraction.

Le protocole d'échantillonnage à filtration en cascade est une technique adaptée d'un échantillonnage bactérien en milieu marin (Massana *et al.*, 2004).

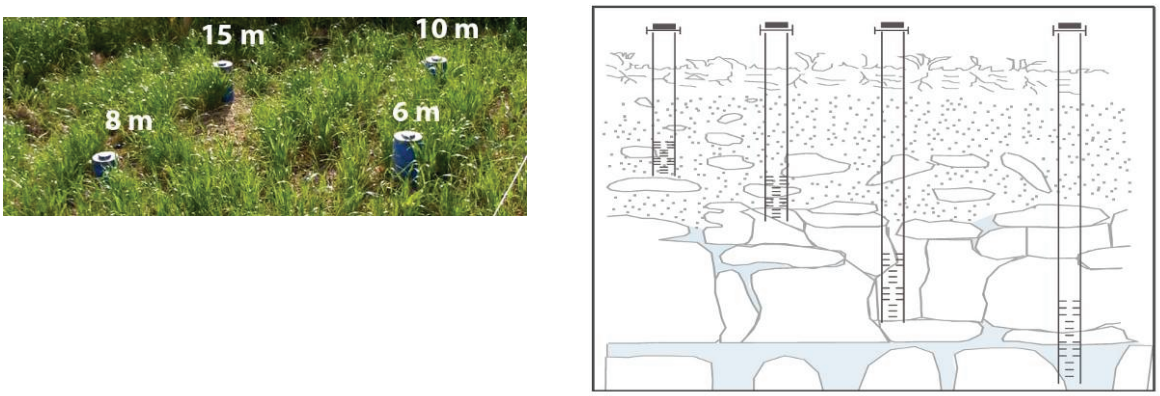



**Figure II-10 : Coupe schématique des piézomètres implantés en flûte de pan.** Chaque piézomètre est crépiné à la base sur 1m permettant ainsi de récupérer l'eau de la nappe.

Cinq échantillonnages (Fig.II-11) ont été effectués sur 2 ans suivant les cycles hydrologiques :

- 3 prélèvements en périodes de hautes eaux :

  Ker1 (25/05/05); Ker3 (13/03/06) et Ker5 (25/01/07) ;

- et 2 en périodes de basses eaux :

  Ker2 (18/01/06) et Ker4 (22/11/06).

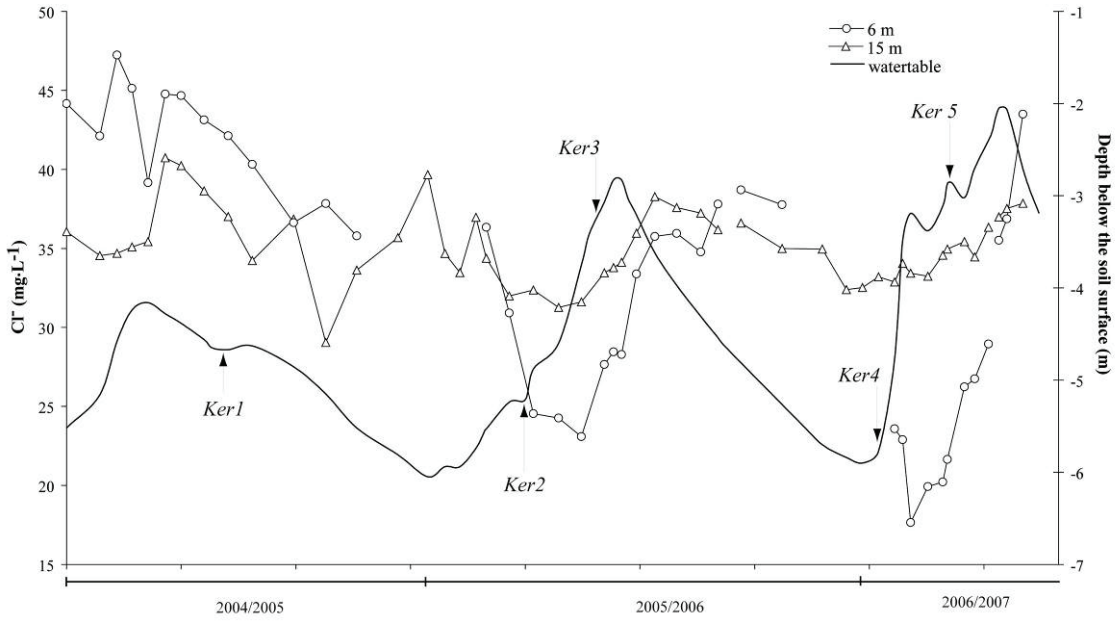



**Figure II-11 : Représentation du niveau de la nappe (watertable) avec les différentes dates d'échantillonnage et suivi des concentrations en chlorures sur le terrain dans la zone de fluctuation de nappe** (6mètres) et **dans la zone saturée** (15mètres). Ker1 a été échantillonné le 25/05/05, Ker2 le 18/01/06, Ker3 le 13/03/06, Ker4 le 22/11/06 et Ker5 le 25/01/07. Ker1, Ker3 et Ker5 ont été prélevé en hautes eaux ; et Ker2 et Ker4 en basses eaux.

Pour les quatre premiers prélèvements, la filtration en cascade a été réalisée sur le terrain. Pour le dernier, elle a été réalisée en laboratoire.

Pour estimer le biais potentiel apporté par la mise en place du piézomètre sur les communautés bactériennes, les prélèvements ont été réalisés avant et après la purge du système. La purge a consisté à vider à trois reprises le volume d'eau présent dans le puit. Cette opération a été réalisée via une pompe immergée Grundfos MP1. Cette pompe est conçue pour le prélèvement d'échantillons à des fins d'analyses dans des forages. Elle est construite en matériaux inertes ne contaminant pas le liquide pompé et n'influençant pas les résultats d'analyse.

### 1.2.2 - Extraction d'ADN total

L'extraction d'ADN s'est déroulée au laboratoire. Le kit d'extraction utilisé est le kit Qiagen, QIAamp® DNA Plant Mini Kit, selon le protocole proposé dans le manuel d'instruction du fabricant.

Ce protocole consiste en un ensemble d'action mécanique (vibrobroyage) et chimique (précipitation) pour ne récupérer que l'ADN qui ensuite est purifié sur colonne d'hydroxyapatite. Les filtres de 10.0µm et 5.0µm ont été nettoyés avec 500µL de tampon AP1 du kit d'extraction. Ce tampon est un tampon de lyse. L'action chimique de ce tampon est amplifiée en utilisant une action mécanique (vibrobroyage pendant 27s à 30coups/secondes) par l'emploi de microbilles de silice et d'une incubation à 65°C. La RNase A du tampon de lyse digère l'ARN présent dans les échantillons. Après la lyse, protéines et polysaccharides sont précipités avec l'aide de sel. Les débris cellulaires et possibles précipités prélevés, sont éliminés en une seule étape par filtration sur colonne QIAshredder, élément de filtration et d'homogénéisation. Le lysat filtré est transféré sur un nouveau tube et un tampon de fixation et de l'éthanol sont ajoutés pour favoriser la fixation de l'ADN sur la membrane DNeasy. L'échantillon est ensuite appliqué sur une colonne DNeasy Spin et centrifugé brièvement. L'ADN est lié à la membrane alors que les contaminants tels que protéines et polysaccharides sont éliminés de façon efficace par 2 étapes de lavage. L'ADN pur est élué dans un petit volume (70µL) de tampon faiblement salé ou de l'eau.

Pour récupérer les filtres à 0.22µm et l'ADN concentré sur ces derniers, un coupe-tube cuivre a été utilisé. Le coupe-tube a été rincé à l'éthanol 70% et passé 5 minutes sous UV entre chaque échantillon. Les sterivex ouverts, les filtres ont été nettoyés. Pour extraire l'ADN présent sur ces filtres, deux protocoles ont été testés : une extraction au Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) et une extraction en utilisant le kit QIAamp® DNA Plant Mini Kit en effectuant le même protocole que pour les filtres à 10.0µm et 5.0µm. L'extraction a été plus efficace avec le second protocole, l'ADN est plus facilement amplifiable du fait d'une meilleur levée des inhibiteurs. Il permet de plus une homogénéisation de l'ensemble de l'extraction. L'extraction au CTAB a été effectuée au laboratoire Adaptation et diversité en milieu marin, UMR 7144 CNRS-UPMC, à la station biologique de Roscoff.

### 1.2.3 - Comptage bactérien par cytométrie de flux

La cytométrie en flux est une technique automatisée qui a été inventée dans les années 1950. Cet outil est de plus en plus utilisé en microbiologie aquatique et environnementale (Vives-Rego *et al.*, 2000) car elle combine des analyses rapides et directes qui permettent de déterminer le nombre, la distribution de cellules bactériennes dans un échantillon d'eau et des caractéristiques biochimiques

et physiologiques additionnelles des cellules individuelles, révélant l'hétérogénéité dans une population ou une communauté. Cette technique est peu utilisée dans les écosystèmes d'eau douce mais la tendance semble évoluer (Crosbie *et al.*, 2003).

Les analyses en cytométrie en flux ont été réalisées uniquement pour le site expérimental de Kerrien. Des échantillons d'eau d'un volume de 2mL ont été fixés avec 7µL de Glutaraldéhyde (100%) sur le terrain puis stockés un bac réfrigérant durant la période d'échantillonnage. De retour au laboratoire les tubes ont été plongés dans l'azote liquide et stockés à -80°C avant analyse. La fixation par les aldéhydes et l'azote liquide permet de conserver la qualité de l'échantillon.

Les analyses ont été réalisées par *Dominique Marie* sur un cytomètre en flux FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA) au laboratoire Adaptation et diversité en milieu marin, UMR 7144 CNRS-UPMC, à la station biologique de Roscoff.

# 2 – ANALYSE DE DIVERSITE

## 2.1 - Amplification de gènes codant

### 2.1.1 - Diversité bactérienne taxonimique : Gène codant pour *ARNr16S*

Pour l'amplification spécifique de la petite sous-unité ribosomique 16S, un jeu d'amorces universelles pour les eubactéries (Orphan *et al.*, 2000, modifié par Vandenkoornhuyse *et al.*, 2007), Eub_519f : 5'-GTTTCAGCMGCCGCGGT-3' et Eub_1390r : 5'-GTTTGACGGGGTGTGT-3' (Biomers.net), a été choisi. Le terme d'amorce universel signifie qu'il peut être utilisé pour différents types de bactéries. La séquence de ces amorces n'est ainsi pas spécifique à un organisme donné.

Les réactions d'amplification du gène cible sont réalisées dans les conditions suivantes, sur un thermocycleur PTC-100.

Le mélange réactionnel d'amplification d' un volume final de 50µl contient, pour 2µL d'ADN environnemental extrait, 35.5µl d'eau ultra pure ; 5µl de tampon de PCR 10X contenant $MgCl_2$ 15mM (Applied Biosystems); 2.5µl de déxoxyribonucléotides-triphosphate (dNTP) (1,25mM) (dATP, dCTP, dGTP et dTTP); 2µL d'amorce sens (Eub519f, 1pmol/µl) ; 2µl d'amorce anti-sens (Eub1390r, 1pmol/µl) ; 1µl de *Taq*-ADN polymérase (5U/µl) (Applied Biosystems).

Le cycle d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 2min30, suivi d'un cycle de 30 sec à 94°C, 1 min à 52°C et 50s à 68°C. Ce cycle est répété 35 fois. Une étape d'élongation finale de 10min à 68°C achève l'amplification par PCR.

Les résultats de l'amplification sont révélés par électrophorèse (110V durant 20 minutes) sur un gel d'agarose (Sigma) à 1% réalisé dans du TBE 0,5 x [solution stock TBE 10x : 108 g de Tris Base (=trihydroxymethyl- amino-methane), 55g d'acide borique, 20 mL EDTA à 0.5M, pH 8.3, qsp 1 L].

Puis le gel est immergé dans un bain de bromure d'éthidium (0,5mg/L, Sigma) pour révéler les bandes de migration aux U.V.

### 2.1.2 - Diversité bactérienne fonctionnelle : Gène *narG*

Pour l'amplification spécifique du gène *narG,* un jeu d'amorces universelles pour les bactéries réduisant les nitrates (Vandenkoornhuyse, non publié), narGf : 5'-TAYGTCGGGCAGGAAAA-3' et narGr : 5'-TTTTCSTACCAGGTCGC- 3', a été choisi. Ce gène est un marqueur fonctionnel de la dénitrification. Il est impliqué dans la première étape, soit la réduction des nitrates en nitrites.

Les réactions d'amplification du gène cible sont réalisées dans les conditions suivantes, sur un thermocycleur PTC-100.

Le mélange d'amplification est différent de celui décrit précédemment. Les modifications s'opèrent au niveau de la quantité d'ADN environnemental extrait qui est dans ce cas de **1µL**, d'amorces sens (narGf, 1pmol/µl) et anti-sens (narGr, 1pmol/µl), qui est de **1µL** pour chaque, et de la *Taq*-ADN polymérase (5U/µl) (Applied Biosystems) qui est de **0.25µL**. La quantité d'eau ultra pure pour accéder à 50 µL est ainsi de **39.25 µL.**

Le cycle d'amplification consiste en :

1. une première étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1min30,
2. suivi d'un cycle de 30 sec à 94°C, 1min15 à 51°C et 1min à 72°C. Ce cycle est répété 36 fois.
3. et une étape d'élongation finale de 10min à 72°C qui achève l'amplification par PCR.

Comme pour le gène codant pour l'ARNr 16S, la révélation des résultats de l'amplification est réalisée par électrophorèse sur un gel d'agarose (Sigma) à 1% réalisé dans du TBE 0,5 x. Et le gel est immergé dans un bain de bromure d'éthidium (0,5mg/L, Sigma) pour révéler les bandes de migration aux U.V.

### 2.2 – Clonage de l'ADN de la petite sous-unité ribosomique 16S et du gène *narG*

Pour séquencer le gène d'intérêt (gène codant pour l'ARNr16S et gène *narG*) et déterminer les espèces phylogénétiques bactériennes dans les écosystèmes étudiés, un clonage de fragments amplifiés a été entrepris.

Purification

La première étape du clonage consiste à purifier l'ADN fraîchement amplifié par PCR. Cette purification est réalisée sur colonne en utilisant le kit « MinElute PCR Purification Kit » en suivant le protocole proposé par le fabricant (Roche).

Clonage

Le principe du clonage des produits PCR est basé sur le fait que la Taq-ADN polymérase a une affinité particulière pour l'adénine et par conséquent à une tendance forte à incorporer en position 3' une adénine non complémentée. On utilise donc pour faciliter le clonage un vecteur plasmidique comportant une base pyrimidique de type thymine non complémenté (plasmide pGEM®-T commercialisé par Promega) de façon à effectuer un clonage cohésif.

A-overhanging, procédure de post amplification

Pour maximiser l'insertion du gène amplifié par PCR dans le vecteur plamisdique, des bases pyrimidiques de type adénine sont ajoutées à l'extrémité 3' des fragments par la *Taq*-ADN polymérase (1U, Applied Biosystems), à 72°C pendant 20mn (5µl d'ADN purifié, 1µl de tampon *Taq*-ADN polymérase 10X (Applied Biosystems), 0,5µl de dATP (0,125mM), 0,2 µl de *Taq*-ADN polymérase (Applied Biosystems) et de l'eau ultra-pure qsp 10µl. Cette étape est effectuée quand le temps écoulé entre l'amplification et la légation est supérieur à 4heures.

Ligation

La réaction de ligation entre le plasmide et l'ADN amplifié et purifié est effectuée dans un tampon de ligation (5µL) (Invitrogen), avec 1µL de plasmide pGEM®-T (Promega), 1µL de T4 DNA ligase, 1.5µL de produit PCR purifié. Le volume total est ajusté à 10µL. Le tout est incubé pendant 18heures à 4°C.

Transformation

Aux cellules compétentes ***Escherichia coli*** DH5α (Invitrogen) (30µL), est ajouté 3µL de produit de ligation. Il est nécessaire de mélanger très délicatement pour ne pas abîmer les bactéries. Après 30 minutes d'incubation sur glace fondante, un choc thermique est réalisé en plongeant les tubes de réaction de transformation dans un bain marie à 42°C pendant 1min15.

Les tubes sont ensuite replacés pendant 2minutes dans la glace. Lors de cette étape de choc thermique, il se crée des trous pariétaux transitoires permettant la pénétration des plasmides dans les bactéries. Ces dernières sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 à 3 heures, en agitant doucement toutes les 30 minutes dans 250µL de milieu de SOC (tryptone 2.0; extraits de levure 0.5% ; NaCl 10mM ; KCl 2.5mM ; $MgCl_2$ 10mM ; $MgSO_4$ 10mM et glucose 20mM) et 1µL d'ampicilline à 50ng/mL, selon un travail d'optimisation de la transformation (Vandenkoornhuyse, non publié).

Etalement

Respectivement, 70µL et 140µL de produit issu de la transformation est étalé sur deux boites de pétri contenant du milieu de culture Luria Bertani (LB) (tryptone 1.0%; extraits de levure 0.5% ; NaCl 1% ;pH 7.0 + agar bactériologique à15g.$L^{-1}$) auquel on ajoute après autoclavage et à 55-60°C, de l'ampicilline à 50ng.$mL^{-1}$, 1ml/L de solution de X-Gal (200mg/10 ml de Di Méthyl Formamide) et 1ml/L de la solution d'IPTG (solution stock, 100mM).

L'étalement bactérien effectué les boites de pétri sont incubées 16 à 20h à 37°C, pour favoriser le développement des colonies bactériennes.

Les clones positifs se distinguent des clones négatifs grâce au gène rapporteur dans lequel se trouve le site d'insertion du fragment de gène d'intérêt. Les plasmides possèdent un gène Lac Z codant pour la β-galactosidase, qui hydrolyse le X-Gal, produisant ainsi un précipité bleu. Le fragment étant inséré dans le gène Lac Z, les colonies ayant incorporé un plasmide avec le fragment inséré sont blanches, le gène chimérique produisant une enzyme non fonctionnelle. A l'inverse si le plasmide s'est refermé sur lui-même, l'enzyme est fonctionnelle et les colonies qui se développent sont bleues, suite à l'activation du gène Lac Z par l'IPTG. L'utilisation de l'ampicilline sert à discriminer les bactéries selon qu'elles aient ou non incorporé le plasmide qui leur confèrent une résistance à cet antibiotique.

Criblage

Après l'incubation à 37°C les boîtes de pétri sont placées à 4°C pendant 2 heures pour stopper un développement optimal de la coloration bleue.

Les clones positifs, c'est à dire ayant incorporé le plasmide, sont prélevés à l'aide d'un embout de pipette et mis en suspension dans 100µl de LB + ampicilline (8g de LB Broth Base, 1ml d'ampicilline (50mg/ml) et 400ml d'eau distillée), dans une plaque de culture cellulaire (96 puits, Iwaki); une colonie par puit. La plaque est ensuite placée dans l'étuve à 37°C pendant 16-20 heures pour cultiver les clones. A la fin de cette période, les plaques sont conservées à 4°C.

Afin d'amplifier le fragment cloné, une PCR est réalisée à partir de chacune des cultures liquides et les amorces T7 (1pmol/µl, 0,6µl): 5'-TAATACGACTCACTATA-3' et SP6 (0,6µl) : 5'-TATTTAGGTGACACTATAG-3' (Operon), qui, au niveau du plasmide, flanquent le site d'insertion.

Les PCR ont été effectuées dans un volume final de 30µl contenant 0,15µl de *Taq*-ADN polymérase (5U/µl) (AppliedBiosystems), 3µl de tampon *Taq*-ADN polymérase 10X (Applied Biosystem), 1,5µl de dNTP (1,25 mM) et 23,55µl d'eau stérile.

Le cycle d'amplification utilisé est le suivant : 1min30 à 94°C, puis 37 fois la séquence complète de températures et de temps 30sec à 94°C, 1 min15 à 55°C, 1min30 à 72°C. L'amplification s'achève par une étape d'élongation finale de 10min à 72°C.

Le contrôle de taille de fragment est réalisé par dépôt de 5µl de produit PCR ajouté de 2 µl de bleu de charge (blue juice, Invitrogen) sur gel d'agarose 1% et migration par électrophorèse (110V). La taille attendue pour les Eubactéries avec les amorces T7 et SP6 est d'environ 870 paires de bases pour le gène codant pour l'ARNr 16S et d'environ 840 paires de bases pour le gène codant narG

est amplifié, la taille du vecteur plasmidique est d'environ 100pb. Les clones présentant des fragments de tailles différentes ne sont pas pris en considération.

**2.3 – Séquençage**

Les fragments ayant la taille attendue obtenus par le clonage ont été ensuite envoyés à séquencer à la plateforme de séquençage, Ouest Genopôle localisé à la Station Biologique de Roscoff, Finistère, France.

Le séquençage se fait selon « BigDye terminator V3.1 » (Applied Biosystems) en utilisant le kit de séquençage d'ADN à l'aide des amorces T7 et SP6 respectivement pour le brin sens et le brin anti-sens. Chaque réaction est effectuée dans un volume final de 5µl avec 0,5µl de mélange de séquençage dilué au 1/8ème (0,125X), 0,75µl de tampon de séquençage (400mM Tris HCl pH9 ; 5mM MgCl2) à la concentration finale de 1X, 1µl d'amorce à 5µM et entre 50 et 100 ng d'ADNr amplifié. Les réactions sont réalisées sur un Robocycleur Gradient 96 (Stratagene) selon le programme suivant : une dénaturation de 5mn à 96°C, suivie de 50 cycles de dénaturation (96°C pendant 30s), d'hybridation des amorces (54°C pendant 30secondes) et d'élongation (60°C pendant 4mn).

Enfin, le produit de réaction de séquençage est purifié dans 20 µL de solution d'injection pour éliminer les nucléotides fluorescents restants et analysés sur un séquenceur automatique 16 capillaires ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). De façon systématique, tous les fragments d'ADN étudiés sont séquencés dans les 2 sens.

**2.4 – Estimation de la diversité microbienne : T-RFLP**

2.4.1 - Choix de la méthode

L'étude du polymorphisme des fragments terminaux de restriction est une technique moléculaire semi-quantitative qui permet l'analyse de la diversité des communautés microbiennes présentes en environnements variables par l'utilisation d'amorces marquées par des fluorochromes (Liu *et al.,* 1997). La technique utilise une PCR dans laquelle les deux amorces sont fluorescentes à leur extrémité 5' (deux fluorochromes différents, l'un pour l'amorce sens, l'autre pour l'amorce antisens). Elle est employée pour amplifier une région particulière d'un gène (gène de l'ARNr 16S ou autre gènes) à partir de l'ADN extrait de la communauté. Les produits PCR sont digérés par des enzymes de restriction générant des fragments terminaux de restriction de tailles différentes suivant le polymorphisme des sites de coupure. La taille des fragments générés est mesurée précisément en utilisant un séquenceur d'ADN automatique.

Les profils T-RFLP génèrent une signature de diversité facilement comparable à d'autres signatures. La méthode T-RFLP a été utilisée avec succès pour analyser et comparer des communautés de bactéries (Kitts, 2001 ; Liu *et al.*, 1997 ; Marsh, 1999), de champignons ectomycorhyziens (Zhou *et al.*, 2002), de champignons mycorhiziens à arbuscules (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003)… Récemment la T-RFLP a été largement utilisée pour étudier les communautés bactériennes sous différentes conditions (Casamayor *et al.,* 2002 ;Dunbar *et al.,* 2000;. Fierer *et al.,* 2003 ; Konstantinidis *et al.,* 2003 ; Mengoni *et al.,* 2004, 2005 ; Richardson *et al.,* 2002) et est particulièrement recommandée pour étudier des profils complexes de communautés. C'est donc un outil puissant pour comparer les communautés.

### 2.4.2 - Choix des enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont des endonucléases utilisées pour cliver l'ADN à des positions spécifiques. La coupure de l'ADN se fait en un site particulier reconnu par l'enzyme. Le nombre d'enzymes de restriction est considérable, puisqu'il atteint plusieurs centaines actuellement, chacune ayant des propriétés de site qui leur est propre.

Les enzymes de restriction utilisées pour les analyses de T-RFLP ont été choisies à partir des séquences obtenues sur les échantillons environnementaux de Carentan. Une carte de restriction générée pour chaque séquence (Sequencher 4.5) permet par comparaisons, la sélection des enzymes les plus polymorphes pour les sites terminaux de restriction. Pour optimiser les analyses de diversité, 2 enzymes ont été choisies : *Hinf I* et *Sty I*, car elles fournissent des fragments terminaux de tailles différentes et génèrent potentiellement la meilleur discrimination.

- *Hinf I*, source *Haemophilus influenzae*, coupe :

  G▼ANTC

  CTNA▲G

- et *StyI*, source *Salmonella typhi*, coupe en :

  C▼C(A/T)(T/A)GG

  GG(T/A)(A/T)C▲C

2.4.3 - Protocole

2.4.3.1 - Amplification de l'ADN avec des amorces marquées par des fluorochromes

Diversité des communautés taxinomiques

Les amorces diffèrent à celle utilisée en PCR classique simplement par leur marquage en 5', Eub_519f* : 5'-[6Fam]GTTTCAGCMGCCGCGGT-3' et Eub_1390r* : 5'-[5Hex]GTTTGACGGGGTGTGT-3'.

Le mélange réactionnel est similaire ; soit pour un volume final de 50µl contient pour 1µL d'ADN environnemental extrait, 39.25 µl d'eau ultra pure ; 5µl de tampon de PCR 10X contenant $MgCl_2$ 15mM (Applied Biosystems); 2.5µl de déxoxyribonucléotides-triphosphate (dNTP) (1,25mM) (Promega jeu de d'ATP, dCTP, dGTP et dTTP à 40µmol chaque); 1µL d'amorce sens (narGf, 1pmol/µl) ; 1µl d'amorce anti-sens (narGr, 1pmol/µl) et 0.25µl de *Taq*-ADN polymérase (5U/µl) (Applied Biosystems).

Le cycle d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1min30, suivi d'un cycle de 30 sec à 94°C, 1'15 min à 51°C et 1min à 72°C. Ce cycle est répété 36 fois. Une étape d'élongation finale de 10min à 72°C achève l'amplification par PCR.

Les résultats de l'amplification sont révélés par électrophorèse (110V durant 20 minutes) sur un gel d'agarose (Sigma) à 1% réalisé dans du TBE 0,5 x [solution stock TBE 10x : 108 g de Tris Base (=trihydroxymethyl- amino-methane), 55g d'acide borique, 20 mL EDTA à 0.5M, pH 8.3, qsp 1 L].

Diversité des communautés fonctionnelles

Les amorces sont identiques à celles utilisées en PCR classique, elles diffèrent simplement par leur marquage en 5', narGf *: 5'-[6Fam] TAYGTCGGGCAGGAAAA-3' et narGr* : 5'- [5Hex] TTTTCSTACCAGGTCGC- 3'.

Le mélange réactionnel d'amplification d'un volume final de 50µl contient pour 1µL d'ADN environnemental extrait, 39.25 µl d'eau ultra pure ; 5µl de tampon de PCR 10X contenant $MgCl_2$ 15mM (Applied Biosystems); 2.5µl de déxoxyribonucléotides-triphosphate (dNTP) (1,25mM) (Promega jeu de d'ATP, dCTP, dGTP et dTTP à 40µmol chaque); 1µL d'amorce sens (narGf, 1pmol/µl); 1µl d'amorce anti-sens (narGr, 1pmol/µl) et 0.25µl de *Taq*-ADN polymérase (5U/µl) (Applied Biosystems).

Le cycle d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN à 94°C pendant 1min30, suivi d'un cycle de 30 sec à 94°C, 1'15 min à 51°C et 1min à 72°C. Ce cycle est répété 36 fois. Une étape d'élongation finale de 10min à 72°C achève l'amplification par PCR.
Les résultats de l'amplification sont révélés par électrophorèse (110V durant 20 minutes) sur un gel d'agarose (Sigma) à 1% réalisé dans du TBE 0,5 x [solution stock TBE 10x : 108 g de Tris Base (=trihydroxymethyl- amino-methane), 55g d'acide borique, 20 mL EDTA à 0.5M, pH 8.3, qsp 1 L].

#### 2.4.3.2 - Purification des produits PCR

Cette purification est réalisée sur colonne en utilisant le kit « MinElute PCR Purification Kit » en suivant le protocole proposé par le fabricant (Roche). Le volume final de purification est de 40µL car les amplicons sont très peu concentrés.

#### 2.4.3.3 - Digestion des produits PCR purifiés

La digestion est réalisée en suivant le protocole proposé par le fabricant (Promega). La BSA n'a été ajouté que pour l'enzyme *Hinf I*. Les digestions sont réalisées dans les microtubes spéciaux absorbant très faiblement les acides nucléiques (Axygen).

#### 2.4.3.4 - Précipitation des produits de digestion

Aux produits de digestion est ajouté 2volumes d'éthanol absolu et 1/10 de tampon acétate 3M (pH5.6). Le mélange est laissé une nuit à -20°C et ensuite centrifugé pendant 20 min, à 4°C à 16400rpm. Le culot est lavé dans 200µL d'EtOH à 70% puis centrifugé 10min à 16400rpm. Après l'élimination de tout l'éthanol, les culots sont séchés à 37°C pendant 15min. Le culot est ensuite resuspendu dans 10µL d'eau ultra-pure.

#### 2.4.3.5 - Préparation des échantillons pour analyse sur séquenceur automatique des T-RFs

Les produits de digestion sont dilués au 1/10 dans une solution de formamide/marqueur de taille (7µL de marqueur de taille GeneScan™ 400HD [ROX] pour 1mL de formamide Hi-Di™) dans un volume de 10µL. Les fragments sont dénaturés puis analysés sur séquenceur automatique ABI PRISM® 3130*xl* (Plate-forme génotypage, Ouest Génopole).

# III

# -METAPROTEOMIQUE-

Les expériences de Protéomique ont été réalisées en deux temps. Une première expérience notée dans le texte expérience#1 est une expérience de faisabilité et d'optimisation pour analyser le Métaprotéome.

## 1 - Expérience # 1.

Les communautés microbiennes

Les communautés microbiennes utilisées dans cette étude n'ont subi aucune modification avant la mise en place de l'expérimentation. L'eau a été échantillonnée sur le terrain à 10m le 18 avril 2006 à l'aide pompe immergée Grundfos MP1. Cette pompe a été rincée avant prélèvement par l'eau du puit. Le bidon de stockage a été préalablement rincé à l'acide nitrique à 0.1N. L'eau a été stockée 2 jours à 4°C avant le début de l'expérimentation.

Conditions de culture

L'eau échantillonnée a été aliquotée dans 16 flacons à plasma, qui ont été préalablement stérilisés. Le volume d'eau dans chaque flacon est de 1 litre. Quatre conditions expérimentales ont été testées (Fig. II-12): ajout de nitrate, ajout de glucose, ajout d'acétate et contrôle. Chaque modalité est doublée pour vérifier la reproductibilité des expériences. Le marquage des certaines molécules (carbone et azote) permet, d'une part d'avoir un duplicata mais aussi de pouvoir suivre le devenir de ces molécules au long de l'expérience. Le contrôle correspond à l'eau de la nappe non modifiée, pour voir les fonctions exprimées dans un système naturel.

L'utilisation de deux sources de carbone différentes est liée à la capacité des organismes à assimiler cette molécule. Le glucose est une molécule facilement, c'est une clé d'entrée du métabolisme énergétique. L'acétate est un intermédiaire clé dans la dégradation bactérienne aérobie de la matière organique (Ljungdahl, 1986), c'est un déchet métabolique utilisé par de

nombreux microorganisme. Cette molécule est souvent utilisée comme un système modèle de matière organique simple représentant la matière organique plus complexe (par exemple : Pourret et al., 2006). Les teneurs en acétate et glucose ont été ajustée à un rapport C/N=10. A cette valeur correspond le maximum de minéralisation (Curtis et al., 1990). La teneur en carbone organique totale dans la nappe à 10m est inférieure à 1mg/L, les nitrates avoisinent les 70mg/L ce qui représente : **15.75 mg.L$^{-1}$ d'azote**. Ainsi pour atteindre un rapport C/N = 10 dans un volume de 1L, il faut **157.5 mg de C**.

Le C représente 40% dans une molécule de glucose, il faut ainsi ajouter 393.75 mg de glucose dans un litre. Dans l'acétate de sodium, le carbone représente 29%, il faudra ainsi ajouter pour un litre 543 mg d'acétate de sodium. Dans le cas de l'ajout de nitrate, nous avons choisi arbitrairement un enrichissement de100mg/L.

Les expériences ont été réalisées simultanément sous condition aérobie et anaérobie, sous conditions contrôlées : dans l'obscurité, à température constante (15°C) dans une salle thermo régulée. La température de salle correspond à la température de l'eau de la nappe à la période d'échantillonnage. L'obscurité permet de simuler au mieux les conditions que rencontrent les bactéries vivant dans ce milieu. De plus, pour représenter les conditions hydrologiques, les flacons ont été mis en agitation toute la durée de l'expérimentation. Pour simuler l'anaérobie, l'atmosphère présent dans les flacons a été purgé et remplacé à trois reprises par de l'azote. L'expérience s'est déroulée sur une durée de une semaine.

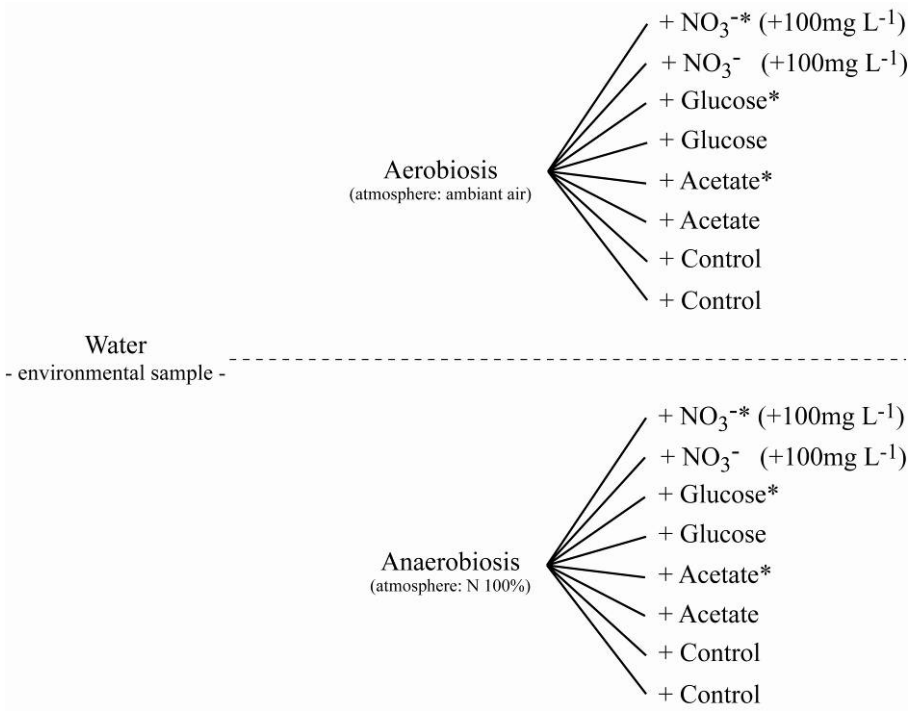



**Figure II- 12 : Protocole expérimental de l'expérience de Métaprotéomique #1**.
Le symbole * correspondant aux molécules marquées

**Suivi chimique**

Un prélèvement quotidien a été effectué pour suivre :

- les **anions majeurs** ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$ et $Cl^-$) analysés par une chromatographie ionique Dionex DX120, les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0.27 et 0.89 mg $L^{-1}$ pour les $NO_3^-$, 0.32 et 1.06 mg $L^{-1}$ pour le $Cl^-$, 0.38 et 1.25mg $L^{-1}$ pour les $SO_4^{2-}$ avec une incertitude pour ces trois espèces chimique de 5% (Martin, 2003). Les échantillons d'un volume de 5mL ont été filtrés à 0.2µm et stockés à 4°C avant analyse.
- le **pH** mesuré à l'aide d'une électrode combinée Sentix 41 qui mesure simultanément la température. Le pH est étalonné préalablement à l'aide de solutions tampons à pH=4.01 et à pH=7.
- La consommation de **glucose.** Le dosage du glucose se fait par spectrométrie UV en utilisant un kit EnzyPlus D-Glucose (Diffchamb), d'après le protocole du fabricant.
- La consommation d'**Acétate**. Les teneurs en acétate ont été obtenues en utilisant la chromatographie ionique. Lors des analyses anions majeurs un pic non négligeable en brome a été observé pour les échantillons contenant de l'acétate et seulement ces échantillons. Hors l'eau analysée sur le site de Kerrien ne contient naturellement pas de brome. Les tests et l'optimisation de cette stratégie de dosage ont été réalisés (Hénin et al., non publié).

Un prélèvement en début et en fin d'expérience a été effectué pour mesurer:

- les **teneurs en COD**. Le carbone organique dissous (COD) est mesuré par oxydation thermique avec un analyseur de carbone Shimadzu, TOC 5050A. Les limites de détection et de quantification du COD sont respectivement de 0.08 et 0.85 $mgL^{-1}$ avec une incertitude de 5% (Petitjean et al., 2004).
- les **teneurs en fer II**. Le dosage du Fe(II) à l'orthophénantroline se fait par spectrométrie UV (AFNOR, 1997). L'orthophénantroline forme avec le Fe(II) un complexe coloré qui ne permet pas une oxydation du Fe(II) en Fe(III). Les réactifs sont préparés avant le prélèvement (200µL d'acétate d'ammonium/acide acétique et 200µL de phénanthroline) dans des tubes en polypropylène auquels on ajoute environ 5mL d'échantillon.

Un prélèvement en début, milieu et fin d'expérience a été effectué pour mesurer:

- l'**alcalinité**. Le dosage a été fait en laboratoire en utilisant une micro-burette graduée par titrage à HCL à 0.1N. Cette burette a la particularité de pouvoir titrer des volumes de

l'ordre du millilitre. La mesure de l'alcalinité s'est faite suivant la méthode de Gran (1952). Cette méthode est fonction de la quantité d'ions $H^+$ ajoutés et de la quantité d'ions $H_+$ mesurés par le pH-mètre (Fig. II-13).

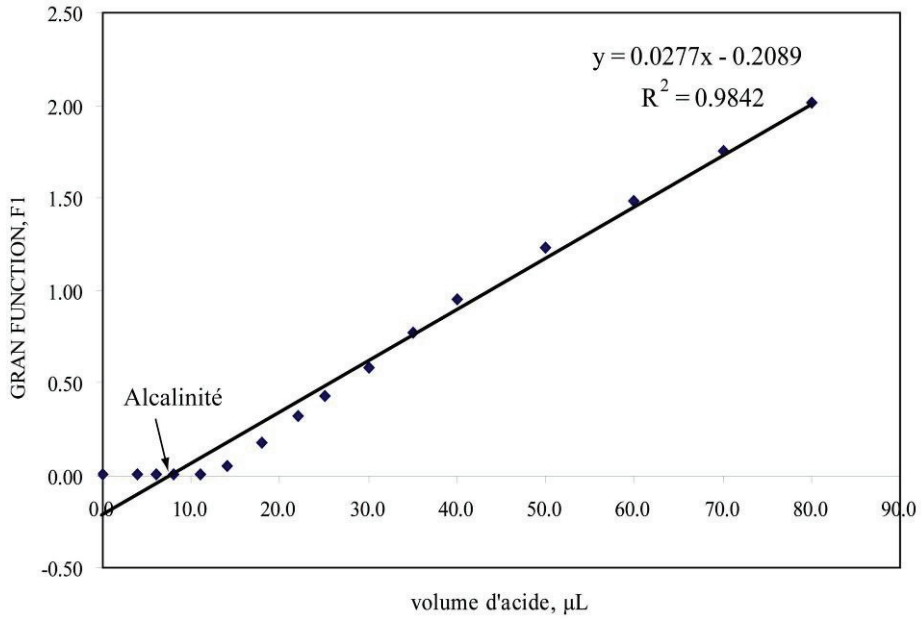



**Figure II-13 : Illustration de la mesure de l'alcalinité selon la méthode de Gran (1952)**

Concentration des protéines par nanofiltration

Au bout d'une semaine d'incubation dans l'obscurité à 15°C, l'expérience a été stoppée et l'ensemble des protéines (libres et cellulaires) exprimées ont été concentrée par filtration à flux tangentielle (Fig.II-14). Le système utilisée est un système Millipore de type Labscale™ TFF[3] avec des membrane Pellicon® XL (Pure Recovery Ultracel™ PLC) à 10kDa.

Les unité de filtration de type Pellicon® XL sont en composite de cellulose régénérée avec des structures libres vides, et sont efficaces pour une gamme de pH de 2 à 13. De plus, elles retiennent peu les protéines, résistent aux solvants et sont facile à nettoyer. Ces modules de filtrations sont ainsi particulièrement adaptés pour concentrer les protéines. En effet, le système de filtration Labscale permet de concentrer plus de 25fois le volume souhaité. La filtration à flux tangentielle a été réalisée suivant le protocole du fabricant, soit à une vitesse de flux de 15mL/min, une pression d'entrée est de 30psi et de sortie de 10psi. Le volume mort de ces unités est de 3.2mL.

[3] Le réservoir en acrylique peut contenir 500mL de liquide.

Il est extrêmement important de respecter toutes les étapes de lavages pour éviter toute contamination entre échantillons et pour conserver un maximum de temps les unités de filtrations.

Après concentration par filtration en flux tangentielle, les échantillons ont été culottés par centrifugation à 4°C pendant 20minutes à 16400rpm (Beckman Avanti® J-E). Les surnageants ont été conservé à -20°C et les culots protéiques à -80°C avant extraction.

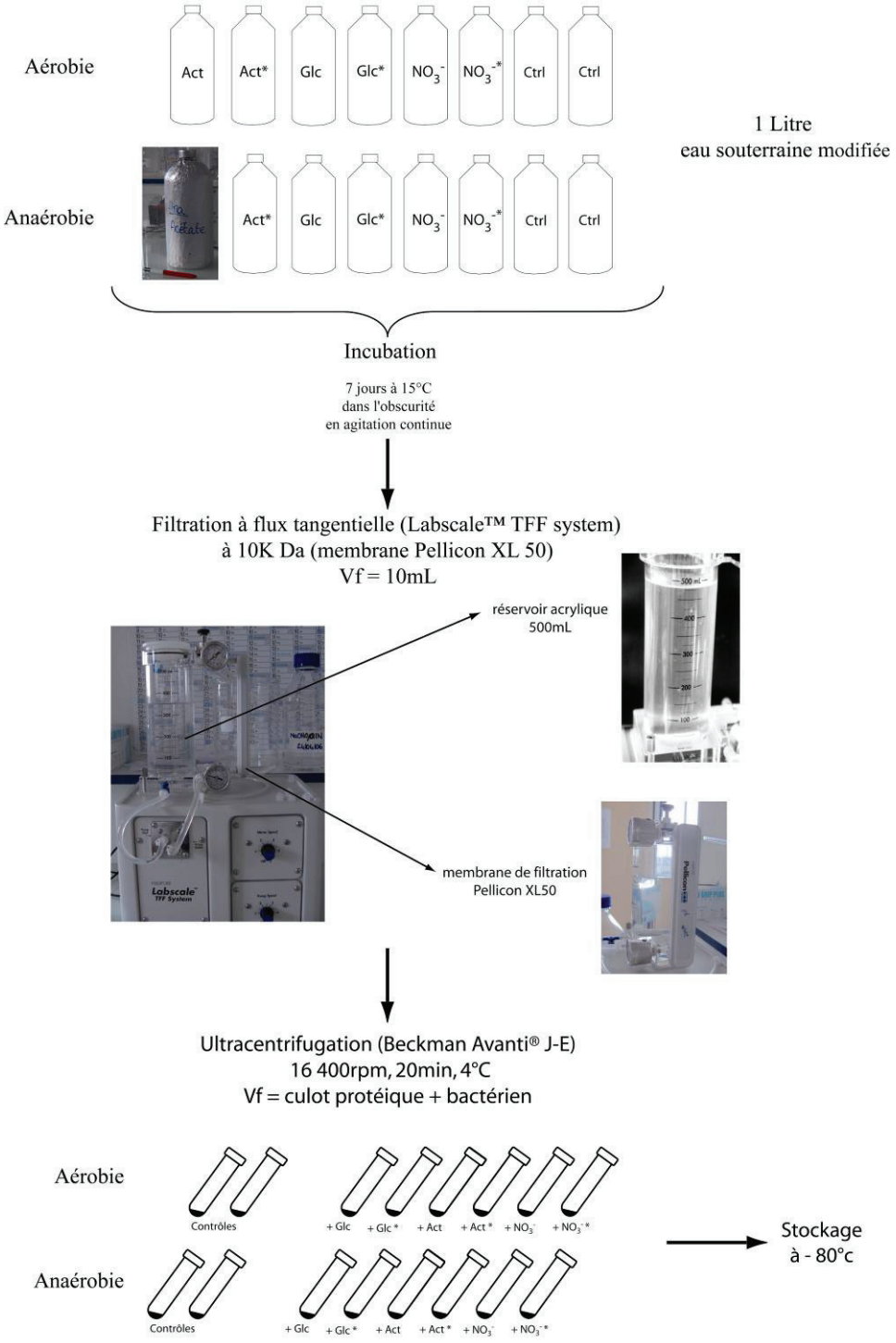



**Figure II-14 : Plan de l'expérience #1.** L'étape de stockage à -80°C est suivi par l'étape d'extraction et n'est pas nécessaire si cette dernière est réalisée directement après l'ultracentrifugation.

## 2 - Expérience # 2.

Les concentrations protéiques obtenues suite à la première expérience étaient insuffisantes pour effectuer une analyse d'expression différentielle des empreintes peptidiques. En effet, la quantité de matériel protéique optimale est de 70-100 µg pour une détermination systématique par spectrométrie de masse et de 75 µg pour une analyse d'expression différentielle. La quantité obtenue lors de la première expérience atteint dans le meilleur des cas 95µg (sous la condition anaérobie glucose) et seulement 7µg dans le cas de la condition contrôle. Les volumes d'expérimentation ont dû être revus à la hausse et ainsi le nombre de modalités a été réduit à 4 et un contrôle de 20L. L'analyse par expression différentielle consiste à mettre en évidence la différence d'expression protéique, par l'utilisation d'un standard interne suivant les conditions expérimentales. Cette analyse est réalisée par la méthode d'ICPL, cette méthode a été choisie car elle permet notamment de s'affranchir des problèmes de précipitation rencontrés sur les gels en 2 dimensions. Cette sera décrite plus spécifiquement dans la partie VI.

Différence par rapport à l'expérience #1 :

- le volume d'expérimentation : 20L pour le contrôle et de 5L pour les autres modalités
- l'eau échantillonnée : lors de l'échantillonnage fin novembre, il était impossible de récupérer le volume souhaité pour l'expérimentation (40L). L'eau a donc été prélevée dans le puit à 15m.

Les communautés microbiennes

Les communautés microbiennes utilisées dans cette étude n'ont subi aucune modification avant la mise en place de l'expérimentation. L'eau a été échantillonnée sur le terrain à 15m le 22 novembre 2007 à l'aide pompe MP1 Grundfos. Cette pompe a été rincée avant prélèvement par l'eau du puit. Le bidon de stockage a été préalablement rincé à l'acide nitrique à 0.1N et avec l'eau de la nappe à 3 reprises. L'eau a été stockée 1 jour à 4°C avant le début de l'expérimentation.

Conditions de culture

L'eau échantillonnée a été aliquotée dans 4 bidons. Ils ont été préalablement désinfectés à l'hypochlorite de sodium, rincés à 5 reprises à l'eau distillée et 2 reprises avec de l'eau échantillonnée. Le volume d'eau dans chaque flacon est de 5 litres. Le volume du contrôle est de 20litres.

Quatre conditions expérimentales (Fig.II-15) ont été testées : ajout de glucose, ajout de glucose + nitrate, ajout d'acétate et ajout d'acétate+nitrate. Les modalités n'ont pu être répliquées pour vérifier la reproductibilité des expériences. Les volumes utilisés étant importants et la vitesse de filtration à flux tangentielle longue (15mL/min, pour un liquide peu chargé), il y a un risque de modification des communautés et d'expression. Pour limiter ce risque, les expériences ont été stockées à 4°C avant filtration. L'utilisation de molécules marquées n'a pu être reconduit du fait du coup de ces molécules.

Le contrôle est l'eau de la nappe sans ajout de nutriments, pour accéder aux fonctions exprimées dans un système naturel.

Le rapport C/N correspondant à un maximum de minéralisation (Curtis et al., 1990) a été conservé. La teneur en carbone organique totale dans la nappe à 15m est inférieure à 1mg/L, les nitrates ont une concentration de 70mg/L ce qui représente : **15.75 mg.L$^{-1}$ d'azote**. Ainsi pour atteindre un rapport C/N = 10 dans un volume de 1L, il faut **157.5 mg de C**.

On a 40% de C dans une molécule de glucose :

- dans la modalité 'Glucose' il faut ajouter 1968.75 mg de glucose pour 5 litres ;
- dans la modalité 'Glucose+Nitrate' : 3937.5mg de glucose et 700mg de nitrate pour respecter le rapport C/N=10

Dans l'acétate de sodium, le carbone représente 29% :

- dans la modalité 'Acétate' il faut ajouter 2715 mg d 'acétate pour 5 litres ;
- dans la modalité 'Acétate+Nitrate' : 5430mg d 'acétate et 700mg de nitrate

Les expériences ont été réalisées sous condition aérobie, sous conditions contrôlées : dans l'obscurité, à température constante (15°C) dans une salle thermo régulée. La température de salle correspond à la température de l'eau de la nappe à la période d'échantillonnage. Pour simuler au mieux les conditions que rencontrent les bactéries vivant dans ce milieu, les flacons ont été incubés dans l'obscurité et sous agitation pendant toute la durée de l'expérimentation.

L'expérience s'est déroulée sur une durée de une semaine.

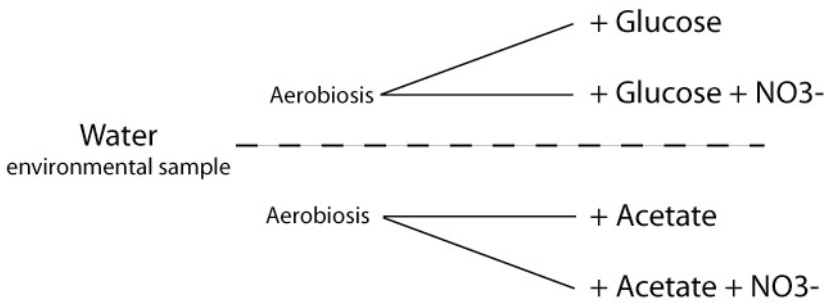



**Figure II-15 : Protocole expérimental de l'expérience de Métaprotéomique #2.**

Suivi chimique

Un prélèvement à t0h, t+2j, t+4j et t +7j a été effectué pour suivre :

- les **anions majeurs** ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$ et $Cl^-$) analysés par une chromatographie ionique Dionex DX120. (même principe que l'expérience #1, voir page 102)
- La consommation de **glucose.** Le dosage du glucose se fait par spectrométrie UV en utilisant un kit EnzyPlus D-Glucose (Diffchamb), d'après le protocole du fabricant. (même principe que l'expérience #1, voir page 102)
- La consommation d'**Acétate**. Les teneurs en acétate ont été obtenues en utilisant la chromatographie ionique. (même principe que l'expérience #1, voir page 102)

Un prélèvement en début, milieu et fin d'expérience a été effectué pour mesurer:

- les **teneurs en COD**. Le carbone organique dissous est mesuré par oxydation thermique avec un analyseur de carbone Shimadzu, TOC 5050A. (même principe que l'expérience #1, voir page 102)
- le **pH** mesuré à l'aide d'une électrode combinée Sentix 41 qui mesure simultanément la température. (même principe que l'expérience #1, voir page 102)

Un prélèvement en début et fin d'expérience a été effectué pour identifier les organismes présents. Les échantillons ont été stockés à -20°C. Le kit d'extraction utilisé est le kit Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit, selon le protocole proposé dans le manuel d'instruction du fabricant. Le protocole employé décrit précédemment. Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR suivant le protocole décrit précédemment puis purifié, cloné et séquencé. L'alignement des séquences a été réalisé en utilisant Clustal X software version V.1.8.1. Chaque séquence a été comparée aux séquences de ncbi dans 'Basic Local Alignment Search Tool' en utilisant la base de données Blastn. L'effort d'échantillonnage n'est pas assez important, les données sont représentées en Annexe II.

Concentration des protéines par nanofiltration

Le contrôle a été concentré dès le prélèvement effectué (pas d'incubation).

Après une semaine d'incubation dans l'obscurité à 15°C, l'expérience a été stoppée et l'ensemble des protéines (libres et cellulaires) a été concentré par filtration à flux tangentielle (Fig.II-16). Le système utilisé est un système Millipore de type Labscale™ TFF avec des membranes Pellicon® XL (Pure Recovery Ultracel™ PLC) à 10kDa. Le protocole employé est similaire à celui de l'expérience#1 présenté pages 104 et 105.

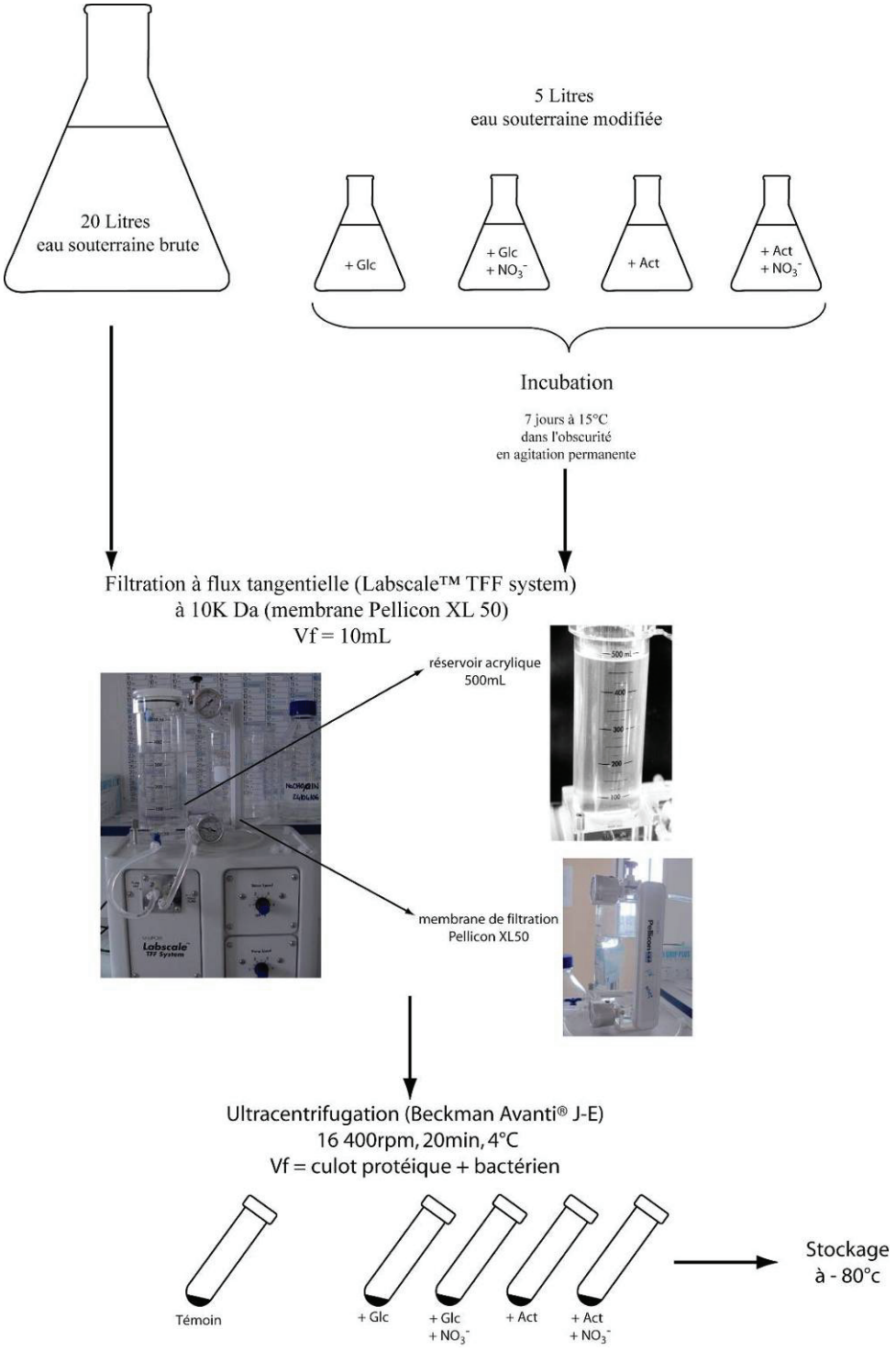



**Figure II-16. :Plan de l'expérience # 2.** L'étape de stockage à -80°C est suivi par l'étape d'extraction et n'est pas nécessaire si cette dernière est réalisée directement après l'ultracentrifugation.

## 3 - Extraction et préparation protéique.

Le protocole utilisé pour l'extraction protéique est basé sur le protocole de Wilmes et Bond (2004). L'extraction et la préparation de l'ensemble du protéome ont nécessité différents essais pour la méthode de lyse cellulaire : sonication, vibroyage ('bead beating') et la presse de French. Le meilleur rendement a été obtenu avec la presse de French.

Extraction et Purification protéique.

Toutes les solutions ont été réalisées en utilisant de l'eau ultra pure. Les échantillons stockés à -80°C ont été décongelés sur glace. Les concentrats ont été centrifugés à 4000g pendant 20min à 4°C sur une centrifugeuse Heraeus Multifuge® 1SR. Le surnageant éliminé, les culots ont été lavés dans 15mL de tampon PBS 1X, puis centrifugés comme précédemment. Cette étape a été répétée 2 fois. Les culots ont été suspendus dans 50mM de Tris-HCl, pH7. Après centrifugation à 4000g, 20min, 4°C, 10mL de tampon Urée 6M / Thio-urée 2M / CHAPS 4% a été ajouté au culot. Les culots sont resuspendus en pipettant et en vortexant, puis placés 2h sur glace en mélangeant toutes les 15 minutes. Le lysat cellulaire a été obtenu en effectuant 4 passages à la presse de French à 1200psi. Le lysat a ensuite été centrifugé 30min à 15 000g pour enlever tous les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré et contient l'extrait protéique brut. Les protéines ont été précipitées dans 10% (v/v) de TCA-Acétone ; incubées à -20°C pendant une nuit puis centrifugé à 15000g pendant 15 min à 4°C. Le culot protéique a ensuite été lavé à 2 reprises dans 90% (v/v) d'acétone glacé, à -20°C et centrifugé 15000g, 15min à 4°C. Les culots protéiques secs sont ensuite resuspendus dans un tampon Urée 6M / Thiourée 2M / CHAPS 4%. Après une heure sur vortex à température ambiante, une centrifugation à 15 000g (Heraeus, Biofuge ® Fresco), 15min à 4°C, est effectuée. Le surnageant protéique est récupéré et dosé par la méthode colorimétrique de Bradford (Biorad Protein Assay) sur un spectro photomètre (Multiskan Ascent, THERMO electron corporation).

Séparation en 2D –PAGE.

Les bandelettes à gradient de pH immobilisé (IPG) de pH 3-10 de 24cm (GE Healthcare) ont été individuellement réhydratés avec 450µL d'une solution finale de réhydratation DeStreak™ (GE Healthcare) et 80µg d'extrait protéique, et 0.5% d'IPG buffer (GE Healthcare). Le rapport à respecter est de 1 volume d'échantillon pour 4 volumes de DeStreak™ Rehydratation. Pour la séparation en 1$^{er}$ dimension, les bandelettes ont été placés dans des sarcophages individuels,

recouverts avec 'IPG cover fluid' (GE Healthcare) et ont migré sur un IPGPhor (GE Healthcare) pendant plus de 22h à un voltage total de 56412 volt heures. Si la seconde dimension n'est pas réalisée immédiatement les bandelettes peuvent être stocké à -80°C jusqu'à utilisation. La séparation en seconde dimension a été effectuée sur un gel DALT 12.5% (GE Healthcare), la migration s'est faite sur DALTsix (GE Healthcare). Deux étapes de migration existent, la première est réalisée à 2.5W par gel pendant 30minutes et la seconde à 100W par gel[4]. La durée de cette dernière est dépendante des échantillons. Pour l'analyses d'images les gels ont été colorés au nitrate d'argent ; scannés et analysés par PROTEOMWEAVER, version 1.3 (Definiens). La coloration au nitrate d'argent est compatible avec la spectrométrie de masse.

Identification protéique par spectrométrie de masse

Maldi-Tof MS.

Les spots protéiques d'intérêts sont excisés à partir des gels marqués au nitrate d'argent. Ce processus est robotisé (Ettan Spot Handling Workstation, GE Healthcare). Les spots sont digérés et analysés en MALDI-ToF MS (Ultraflex Daltonic Bruker). Les recherches d'empreinte de masse peptidiques en comparaison avec les banques de données ont été réalisées via le moteur de recherche MASCOT http://www.matrixscience.com, sur NCBInr et EST_others.

## 4 – Expérience de faisabilité d'ICPL

Le protocole présenté ici est celui réalisé pour tester la faisabilité de la technique d'ICPL sur les échantillons de l'expérience#2. Il est constitué de trois étapes :

**La première étape consiste en une séparation par une électrophorèse monodimensionnelle.** Les quatre échantillons destinés à être ultérieurement marqués par ICPL (glucose, glucose + nitrate, acétate, acétate + nitrate) sont séparés par électrophorèse monodimensionnelle. 20µg de chaque échantillon sont chargés sur un gel 1D 10% Tris-Glycine à 200V, 70mA, 100W pendant 51 min. Le gel 1D est ensuite coloré à l'EZBlue (Sigma).

[4] Les gels standards en acrylamide sont typiquement composes de deux couches : une couche supérieur décrite comme un gel d'empilement ou 'stacking gel' et une couche inférieure appelée gel de séparation ou de résolution. La couche d'empilement comporte un faible pourcentage d'acrylamide et un faible pH, alors que la concentration d'acrylamide du gel de résolution est fonction de l'échantillon et son pH est plus élevé. Les différences de pH et de concentration en acrylamide procurent une meilleure résolution et des bandes plus nettes sur le gel de séparation. La différence de voltage est ainsi due à la différence de composition du gel. La première étape correspond ainsi à la période d'empilement ou 'stacking period' et la seconde étape à la séparation.

Pour chacun des 4 échantillons, 3 à 4 bandes correspondant à des poids moléculaires différents sont prélevées sur le gel et digérées selon le protocole en vigueur sur la plate-forme Protéomique Haut-Débit Ouest Génopôle. Suite à cette digestion, les peptides sont extraits des bouts de gel de manière active et ajoutés aux digestats obtenus par extraction passive sur la nuit. Le volume final est diminué par évaporation au Speed-vac et complété à 28µL avec du TFA 0,1%.

**La seconde étape consiste en la mise au point des méthodes de chromatographie liquide à haute pression (nano-HPLC).** La mise au point des méthodes de nanoLC (Utimate 3000, Dionex[5]) a été faite sur les bandes 11, 12 et 13 (échantillon: Acétate + Nitrate). Lors de ces mises au point, aucune identification n'a été obtenue à partir de ces bandes. La bande 14 a donc été prélevée, digérée et analysée, afin de vérifier la possibilité d'obtenir des identifications pour des protéines issues de cet échantillon. Un gradient de solvant A (eau / TFA 0,04%) et de solvant B (ACN / TFA 0,04%) est appliqué pour extraire un maximum de peptide. De 0 à 30min, la teneur du solvant B passe de 2% à 35% ; de 30 à 40 min, elle passe de 35 - 60% de solvant B ; de 40 à 43 min, 60 de 90% de solvant B ; de 43 à 52 min, 90% de solvant B ; de 52 à 57 min, de 90 - 2% de solvant B et enfin de 57 à 75 min: 2% de solvant B. Le débit est de 220nL/min. La détection UV s'effectue à 214 nm. Le volume d'injection est de 22µL.
**La collecte** des échantillons est réalisée toutes les 25 secondes de 7 à 60 min. Les échantillons collectés sont ensuite **déposés** sur une cible MALDI (cible PAC, Bruker Daltonics), grâce au robot ProteineerFC (Bruker Daltonics).

**La troisième étape consiste en l'analyse des dépôts par MS/MS.** Suite au dépôt sur cible MALDI, celle-ci est lavée avec du phosphate d'ammonium monobasique 10mM afin d'éliminer les sels, et analysée de manière automatique (MS puis MS/MS sur les pics ayant une qualité suffisante). Cette étape est effectuée sur un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF Ultraflex (Bruker Daltonics).

[5] **La nanoHPLC** Ultimate 3000 (Dionex) utilisée à la plate-forme Protéomique Haut-Débit Ouest Génopôle comporte une pé-colonne : C18 PepMap300, 5µm, 300Å / 300µm id x 5mm et une colonne : C18 PepMap100, 3µm, 100Å / 75 µm id x 150mm. La température y est maintenue à 30°C.

# IV

# TRAITEMENT DES DONNEES

## 1 – Analyse de séquences

Identification et alignement

Les séquences du brin sens et anti-sens sont assemblées avec Sequencher 4.5 (GeneCodes) et vérifiées une par une. Puis, chaque séquence est comparée aux séquences contenues dans la base de donnée de la banque de gène internationales par analyse BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide) sur le site du NCBI (Altschul *et al.*, 1997). Un alignement multiple du jeu de séquence obtenu et incluant des séquences externes (meilleurs BLASTs) a été réalisé avec Clusatl X.1.81 (Thompson *et al.*, 1997) puis optimisées à l'oeil .

Structures chimériques

L'amplification par PCR peut générer des chimères, c'est-à-dire des séquences artefactuelles produites au cours de l'amplification. Ces chimères doivent être détectées et filtrées avant les analyses phylogénétiques. Le principe utilisé pour la détection de chimères est celui des plus proches voisins. Une séquence chimère correspond à la fusion de plusieurs séquences. Ainsi, lorsque l'on compare une chimère avec un ensemble de séquences, on s'attend à retrouver plusieurs *matchs*, distants phylogénétiquement, qui vont obtenir un bon score d'alignement avec différentes parties de la séquence chimère. Les séquences d'ADNr 16S ont été testées pour mettre en évidence les structures chimériques en utilisant *Chimera Check* qui est une fonction d'analyse de Ribosomal Database Project II (RDP)[6] (Maidak *et al.*, 1999).

Ce logiciel a été utilisé pour nettoyer le jeu de séquences des données de séquençage de Kerrien et de Carentan.

[6] RDP : http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU

## 2- Arbres phylogénétiques et parcimonie maximale

La phylogénie est utilisée pour caractériser la diversité ayant adopté le concept d'espèces phylogénétiques. Le concept fondamental consiste à mettre en évidence la série de transformations des caractères des taxons étudiés, de l'état initial (qualifié d'ancestral ou de plésiomorphe), à l'état dérivé (apomorphe). L'analyse de maximum de parcimonie qui exclut le plus possible tout recours à un scénario préalable, conscient ou non, et qui ne pondère pas artificiellement les états des caractères, offre une possibilité objective de résolution des liens phylogénétiques (Darlu and Tassy, 1993). Elle permet de prendre en compte les états successifs d'une Unité Evolutive ou Ecologique.
Une analyse de parcimonie maximale a pour avantage majeur de ne prendre en compte que les données informatives et de limiter le poids de l'homoplasie (similitudes non hérités) (Darlu and Tassy 1993). L'utilisation de la parcimonie maximale permet la construction de phylogénies moléculaires. C'est ce modèle, aussi appelé parcimonie de Wagner (Kluge and Farris, 1969 ; Farris, 1970) qui a été adoptée pour l'analyse des jeux de séquences.

Algorithme heuristique de calculs pour la recherche des arbres les plus courts

Les matrices de données contenant un nombre trop élevé de lignes (>30) n'a pas permis d'utiliser les d'algorithmes exacts. Ainsi l'utilisation des algorithmes approchés (heuristiques) permet l'obtention d'un résultat en un temps de calcul raisonnable. Mais la découverte de l'arbre optimal n'est pas toujours garantie si la procédure choisie n'est pas optimale.

Outgroup

Dans le cas de la parcimonie de Wagner, la longueur de l'arbre est indépendante de la position de la racine, même si l'orientation des transformations dépend du choix de cette racine, c'est-à-dire du taxon pris comme extra-groupe ou outgroup (Darlu and Tassy, 1993). Dans les analyses effectuées, l'outgroup choisi est un crenarchaeota (AJ347774). La lecture de l'arbre à partir de n'importe quel autre taxon choisi comme point de départ ne changera pas le nombre de pas mais changera le sens des transformations.

Procédure :

Pour limiter les risques d'erreurs, la procédure choisie consiste à tester de profond ré-arrangements de branche (TBR) pour 100 réplicats d'additions aléatoires de séquences (random addition). Enfin, pour tester la validité des noeuds, 250 réplicats de bootstraps (calcul d'une topologie phylogénétique à partir d'un pseudo ré échantillonnage de la matrice initiale) pour trouver le

pourcentage d'occurrences des mêmes regroupements par rapport à l'ensemble des réplicats, sont effectués.

**Script de la procédure** :

*Maximum de parcimonie*
outgroup nom entier de la séquence choisie
hsearch multrees=no addseq=random nreps=100 swap=tbr
lscore 1-N/wts=ignore nst=2 tratio=est rates=gamma
(pour N arbres sauvegardés) (Fonction qui calcul les valeurs de probabilité des arbres équiprobables dans MP pour savoir quelle est réellement la meilleure solution).→la valeur absolue la + petite correspond à la meilleure valeur de vraisemblance
savetrees file=nom de la matriceMP.tre format=nexus brlens=yes
**OPTION** : reweight basewt=100 index=RC fit=maximum (pour recalculer la MP en pondérant les caractères. Si plusieurs topologies obtenues alors recalculer le lscore)
hsearch multrees=no addseq=random nreps=15 swap=tbr
bootstrap nreps=250 treefile= nom de la matriceMPBoot.tre (attention, prévoir toute une nuit pour un calcul pour 150 terminaux)

Reconstruction phénétique

Les méthodes phénétiques sont basées sur le calcul de distances par paires, comprimant les données de séquence en une valeur unique. La longueur des branches représente ainsi la distance entre deux taxons. Ici, le modèle de distance choisi est le modèle de Kimura à 2 paramètres (K2P) qui pondère les substitutions selon qu'il s'agisse de transition ou de transversion. Les données sont alors agglomérées par Neighbor Joining (NJ) (Saitou et Nei, 1987) qui autorise un taux de mutation différent pour les différentes branches (relaxant donc l'hypothèse d'horloge moléculaire, ce qui est problématique dans le cas d'une agglomération par UPGMA). Ce mode de construction phylogénétique est réalisée dans Clustal X 1.81 (Thompson *et al.*,1997).

## 3- T-RFLP

Les données obtenues avec la T-RFLP peuvent être codées comme des variables discrètes (présence absence d'un fragment) et permettent donc un traitement statistique. En l'occurrence, des approches de type (1) ACP (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003; Quinn & Keough, 2002), (2) parcimonie maximale (Vandenkoornhuyse *et al.,* 2003), permettent une analyse fine des données (comparaison de communautés). L'utilisation combinée de ces deux approches permet d'augmenter la robustesse des interprétations (Losos, 1996; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2002).

La comparaison de la structure de communautés est achevée par une procédure de parcimonie maximale sous Paup 4.0 β 10.

Pour l'analyse de parcimonie, une recherche heuristique avec un réarrangement des branches par scissions des sous-arbres et reconnections a été utilisée pour trouver l'arbre le plus court. Les valeurs de Bootstrap (technique d'inférence statistique basée sur une succession de ré échantillonnage) ont été estimées à partir de 250 réplicats.

**Script de la procédure :**

```
hsearch multrees=no addseq=random nreps=500 swap=tbr
savetrees file=nom du fichier MP.tre format=nexus brlens=yes
hsearch multrees=no addseq=random nreps=50 swap=tbr
savetrees file= nom du fichier MP2.tre format=nexus brlens=yes
bootstrap nreps=250 treefile= nom du fichier MPBoot.tre
gettree file= nom du fichier MP.tre
contree all/strict=no majrule=yes percent=50 le50=no    (script donnant le consensus)
```

# V

# ANALYSES STATISTIQUES

## 1 – Modèle linéaire généralisé ou Generalized Linear Model (GLM)

Le modèle linéaire général permet de représenter des relations non linéaires, pourvu qu'elles soient linéaires par rapport aux paramètres ou linéarisables. Il s'agit d'une modélisation statistique des données par un modèle saturé inhérent aux mesures.
Un modèle linéaire généralisé (GLM) est défini par la donnée.

- d'un vecteur aléatoire *Y* de dimension *n* ayant des composantes indépendantes et dont la fonction de vraisemblance pour une réalisation y=(y1, …,yn) s'écrit :

$$Ly(\theta,\varphi)=\prod i=1\ n \exp yi\theta i-b(\theta i)a(\varphi)+c(yi,\varphi),$$

- où *a*, *b* et *c* sont des fonctions réelles données et θ le paramètre d'intérêt.
- d'un prédicteur linéaire η=(ηi)i=1,⋯,n relié à l'espérance mathématique E(Y)=μ par une fonction *g* : η=g(μ), la fonction *g* étant la *fonction de lien* du modèle.

Le prédicteur linéaire η est défini dans le cas d'un GLM par la donnée d'une matrice *X* de dimension n×p, de rang *p*, appelée matrice du plan d'expérience, et d'un vecteur *p*-dimensionnel β, paramètre inconnu du modèle, tel que η=Xβ.

L'erreur de nos données suit une distribution de Poisson. Le jeu de donné d'analyse chimique de l'étude de Carentan a été exécuté dans R après une transformation log comme fonction de lien. L'analyse de déviance à partir de GLM (c'est-à-dire l'effet sur le GLM quand on bouge un terme) a été réalisée pour tester (i) les différences entre sites pour chaque variable (concentration en $Cl^-$, $SO_4^{2-}$, et $NO_3^-$), (*ii*) l'effet possible de l'ajout de $NO_3^-$ sur les autres variables, et (*iii*) l'impact de l'aérobie et l'anaérobie sur les paramètres mesurés.
Les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test du chi², c'est le test le plus pertinent dans les analyses d'écart type.

Pour un terme significatif, il est possible de tester les contrastes (comparaison des moyennes), c'est-à-dire les tests de cœfficient z, de type βi et β1. Cela est permis même si, comme dans notre cas, les coefficients β suivent une distribution asymptotique. Pour limiter le risque évident d'obtenir un résultat significatif seulement par chance, une correction de Bonferroni a été implémentée à nos résultats. Toutes les analyses ont été exécutées dans R (téléchargeable à l'adresse suivant : http://www.r-project.org/).

**Script de la procédure** :

>my*nomdelamatrice*<-readtable("chemin d'accès/nom du fichier.txt ", header=T)
>dataframe=my*nomdelamatrice*
>my*nomdelamatrice*$**Sol**<-factor(my*nomdelamatrice*$Sol)
>my*nomdelamatrice*$**Trment**<-factor(my*nomdelamatrice*$Trment)
>my*nomdelamatrice*$**temps**<-factor(my*nomdelamatrice*$temps)
>summary(my*nomdelamatrice*)
>last.glm<-glm(NO3~Sol+Position+Trment+temps, family=poisson, data=my*nomdelamatrice*)
>summary(last.glm)
>anova(last.glm, test="Chisq")

Les données de chlorures ne suivent pas une loi de poisson ainsi, le script utilisé est le suivant :
>my*nomdelamatrice*<-readtable("chemin d'accès/nom du fichier.txt ", header=T)
>dataframe=my*nomdelamatrice*
>my*nomdelamatrice*$**Sol**<-factor(my*nomdelamatrice*$Sol)
>my*nomdelamatrice*$**Trment**<-factor(my*nomdelamatrice*$Trment)
>my*nomdelamatrice*$**temps**<-factor(my*nomdelamatrice*$temps)
>summary(my*nomdelamatrice*)
>last.glm<-glm(Cl~Sol+Position+Trment+temps, data=my*nomdelamatrice*)
>summary(last.glm)
>anova(last.glm, test="Chisq")

Les différents facteurs indiqués ici sont ceux qui ont été testés pour les données de concentrations en nitrates, sulfates et chlorures. On peut donc remplacer NO3 par SO42. Le facteur **sol** correspond au site de prélèvement, le facteur **trment** correspond (ajout de nitrate et aux conditions d'oxygénation) et le facteur **temps** correspond aux différentes dates de prélèvements.

## 2 – Analyse en composante principale (ACP)

Le principe de l'ACP est de réduire le nombre de caractère analyses d'une matrice de donnée pour permettre une projection géométrique dans un espace vectoriel multidimensionnel des individus et des caractères analysés. L'ACP a pour but de comprendre et de visualiser comment les

effets de phénomènes a priori isolés se combinent. C'est une méthode efficace pour analyser des données quantitatives (continues ou discrètes).

L'avantage majeur de l'ACP est qu'aucune hypothèse de base n'est nécessaire pour réaliser les calculs. Néanmoins, sur des données discrètes tels que c'est le cas ici, l'ACP n'est pas calculable à partir de matrices de corrélations. Il faut ainsi choisir des matrices de covariance. Un désavantage de ces ACPs classiquement utilisées est la triangulation qui produit le centrage de l'ACP comprimant l'effet des fréquences entre variables (fréquence d'un TRF) (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003). Ici, pour préserver cette information, nous choisissons de produire des ACPs non centrées. A partir des ACPs, nous calculons aussi les centres de gravité des variables projetées pour représentées si il en existe des effets structurant les communautés microbiennes (Sokal and Rohlf, 1995). Toutes les ACPs sont calculées dans ADE-4 (Thioulouse *et al*., 1997).

## 3 – Calcul d'indice de diversité

La diversité des données de T-RF a été estimée en utilisant la mesure informative de Shannon-Weaver (1969). La diversité générale (H') a été calculée d'après:

$$H' = -\sum_{i=1}^{n} Pi \times \log_2 Pi;$$

Où Pi est la fréquence d'un fragment de T-RF, tel que Pi=ni/N ; où ni est le nombre de fragments de restriction dans l'ensemble des échantillons, et N est le nombre total de fragments dans tous les échantillons.

## 4– Calcul d'indice de similarité

La similarité entre deux échantillons a été calculée par l'indice de Morisita-Horn. Il est considéré comme une des mesures les plus puissantes de similarité entre variables quantitatives (Magurran, 1998). L'indice de Morisita-Horn est le seul parmi un vaste ensemble d'indices à ne pas être influencé (Wolda, 1981) la richesse spécifique et la taille de l'échantillon. Il est cependant influencé par l'espèce la plus abondante et discerne d'avantage les similarités au niveau de la structure de la communauté que les subtilités de la composition en espèce.

Cet indice a été calculé pour comparer les communautés bactériennes sur le site de Carentan (suivant les sites et le temps) et le site de Kerrien (suivant la profondeur et le temps). L'indice de similarité est calculé d'après l'équation suivante:

$$CmH = 2\sum_{i=1}^{n}(ani \times bni)(da + db) \Big/ (aN \times bN)$$

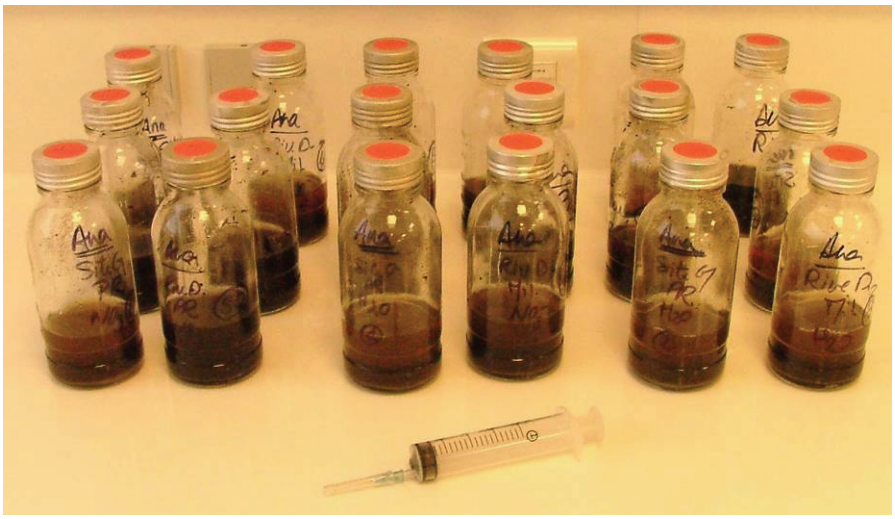
Où CmH est l'indice de similarité entre les méthodes d'échantillonnage a et b, ani: le nombre de fragments de restriction pour une taille donnée du site A, aN: le nombre total de fragments pour le site A et

$$da = \sum ani^2 / aN^2 .$$

L'indice a été calculé en utilisant le logiciel EstimateS (Colwell, 2005). L'indice de Morisita est compris entre 0 et 1, où 0 indique qu'aucune espèce n'est partagée entre les deux communautés analyses et 1 qu'il existe une similarité complète.

# PARTIE III

## INFLUENCE DES CIRCULATIONS HYDROLOGIQUES HORIZONTALES SUR LES PROCESSUS BIOGEOCHIMIQUES DANS UNE TOURBIERE



Ce chapitre porte sur l'influence des circulations hydrologiques verticales dans la zone de fluctuation de nappe. Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article et qui été soumis à Biogeochemistry.

## 1 – Résumé

Comme il a été souligné précédemment dans la partie II-1, ce travail a été réalisé sur une tourbière du Cotentin (Normandie, France). Le fonctionnement hydrologique et la caractérisation des processus chimiques sur site ont été réalisés dans le cadre de la thèse de Chrystelle Auterives. Elle a notamment mis en avant une variation spatiotemporelle des teneurs en nitrates et en sulfates ainsi que différentes conditions hydrologiques conditionnent les concentrations chimiques. Pour tester l'influence des facteurs hydrologiques sur la réactivité biogéochimiques, une étude expérimentale a été réalisée sur des sols tourbeux. L'objectif de cette expérimentation est de reproduire en bio réacteur les conditions de terrain pour estimer la réactivité potentielle et les processus géochimiques (affectant les nitrates et sulfates) se déroulant dans la tourbe soumise à différentes conditions d'oxygénation (anaérobiose/aérobiose) et de caractériser la structure des communautés bactériennes (Partie IV). Les sols testés ont été conservés en état (ni tamisés, ni séché) pour pouvoir caractériser l'activité et la structure des communautés microbiennes. Pour comprendre l'origine des processus, une comparaison entre des conditions biotiques et abiotiques a été réalisée. La stérilisation de la tourbe a été effectuée au CEA. Les concentrations en sulfates et nitrates de la solution ont été suivies par chromatographie ionique à différents pas de temps entre 0 et 240h.

Les résultats de bio-géochimie indiquent : (1) qu'en fonction des lieux de prélèvement de tourbe, l'activité biologique répond différemment face aux conditions expérimentales, (2) que la totalité des nitrates présents dans le milieu est réduite en anaérobiose et (3) que les conditions d'oxygénation imposent des conditions redox ne permettant pas la réduction des sulfates. La réduction des nitrates est reliée à une dénitrification hétérotrophe. Comme il a été observé sur les sites, la production de sulfate est essentiellement liée au relargage de l'eau porale enrichie en sulfate. L'augmentation des teneurs en sulfates est imputée à un mélange de processus chimique (une déstabilisation de la phase minérale) et biologique (minéralisation de la tourbe).

L'étude expérimentale a mis en évidence des différences nettes entre les sites, même sous des conditions expérimentales similaires. Ces différences nous permettent de conclure que des conditions hydrogéologiques distinctes ont permis le développement d'écosystèmes spécifiques. Ainsi la réponse de l'activité microbienne peut être conditionnée par les flux hydrologiques, notamment à l'interface tourbière – rivière, qui selon les sites de prélèvement

de tourbe fluctuent saisonnièrement. Cette étude met en avant la relation étroite entre la nature de la tourbe, la microbiologie et l'évolution géochimique des solutions.

# Influence of hydrological fluxes on bio-geochemical processes in a peatland

N. Bougon*, [1, 2] L. Aquilina[1], C. Auterives[1], and P. Vandenkoornhuyse[2]

[1] CAREN research federation - Geosciences Rennes department, UMR 6118 CNRS-University Rennes 1, Rennes, France

[2] CAREN research federation - department, UMR 6553 EcoBio CNRS-University Rennes 1, Rennes, France

Abstract:

A hydrological and hydrochemical survey in a peatland (Normandy, France) highlighted the presence of a major spatiotemporal variability of sulfate and nitrate concentrations (Auterives 2007). The concentration change is related to a difference in hydrologic regime, which is particularly significant at the connection of the stream and the regional aquifer with the peatland aquifer. An experimental approach was used to determine the factors influencing the dynamics of nitrate and sulfate concentrations observed in the field. We investigated the effects of redox conditions and nutrient fluxes on microbial activity, which are influenced on site by hydrologic regimes. Experiments were performed in bioreactors containing a synthetic solution similar to the field stream composition and the peat was sampled at different plots along a hydrologic flow gradient to characterize the biogeochemical processes and to estimate the potential productivity. Abiotic batches were performed in order to determine a potential abiotic process. The change of major anions ($Cl^-$, $SO_4^{2-}$ and $NO_3^-$) was monitored for 240 hours. Most of the experiments show nitrate reduction and sulfate production. Nitrate reduction was most likely due to heterotrophic denitrification and sulfate production was related to bio-geochemical production processes (sulfur oxidation and peat mineralization) and abiotic mixing processes with enriched solutions contained in the pore waters. The results demonstrate a spatial variability of the potential reactivity and a biological productivity reacting unevenly to experimental conditions. These results emphasize that the control of the temporal change of nitrate and sulfate concentrations is only partially related to redox conditions and nutrient supplies, and is mainly related to distinct hydrologic regimes that seem to have an effect on the microbial community structure.

Keywords: hydrological flowpaths – microbial activity - nitrate reduction – peat – sulfate release

## 2. Introduction

The chemical composition of biological active components (O, N, S, and Fe) in natural waters is under the control of microbial processes, which in turn depend on redox conditions (Hedin et al. 1998; Bilanovic et al. 1999; Ostrom et al. 2002; Cannavo et al. 2004). Chemical conditions and microbial communities' structuration are hence inextricably interlinked (Dassonville and Renault 2002; Stumm and Morgan 1996; Torsvik and Øvreås 2002). Microbial metabolisms are based on the use of electrons in redox reactions that provide energy (Morel and Hering 1993). Aerobic respiration (organic matter as electron donor and oxygen as acceptor) is the reaction that produces the highest amount of energy (501 kJ per mole of oxidized organic matter as compared, for example, to 102 kJ for the sulfate reduction; Hedin et al. 1998). As redox conditions become more reducing, denitrification, sulfate reduction, and methanogenesis sequentially become more energetically favorable.

Abiotic factors such as pH, organic carbon content, N-oxides, temperature, bulk density, and soil textures can affect the activity and population dynamics of microorganisms in soils (Clément et al. 2002; Cavigelli and Robertson 2000; Dommergues and Mangenot 1970; Nannipieri et al. 2003; Knowles 1982). Furthermore, metabolic capabilities of the microorganisms and interactions between microorganisms also influence biogeochemical process development. However, the interactions between the microbial population ecology and abiotic factors are complex and poorly understood.

The relationships between chemical conditions, microbial processes and physical parameters such as water fluxes have only recently been investigated (e.g. Clément et al. 2002, 2003; Ginn et al. 2002; Vidon and Hill 2004). These parameters related to the physical structure of the landscape seem to be determinant in the spatial variability of biogeochemical processes (e.g. Hedin et al. 1998; Hill et al. 2000; Clément et al. 2002, 2003; Packman et al. 2004; Sabater et al. 2003). Several models have tried to understand and to predict microbial transport in natural porous and high nutrient media (e.g. Harvey et al. 1993; Murphy and Ginn 2000; Ginn et al. 2002; Rockhold et al. 2004) but few attempts have been carried out in unsaturated or variably saturated systems. These media involve the consideration of the biological constraints in the modeling studies (Rockhold et al. 2004).

We investigated the effects of water and nutrient fluxes on the microbial activity, and more precisely on the denitrifiers' activity in peat soils. An experimental approach was used to determine the factors influencing the spatiotemporal variability and the dynamics of nitrate

and sulphate concentrations observed in field. Experiments were carried out in order to characterize the biogeochemical processes and to estimate the potential reactivity of peat samples from distinct hydrologic regimes subjected to different nitrate concentrations and redox conditions. To consider the biotic reactivity and to approach the microbial diversity, soil samples were not denatured ie no sieved and no dried.

## 3. Material and methods

### 3.1 - Geological and hydrological settings of the study area

The studied site is located in south Normandy, 49°15' N, 1°20'W. It is a peatland that belongs to the 'Marais du Cotentin et du Bessin' regional natural park. The climate is oceanic with a mean annual precipitation of 920 +/- 170 mm per year. The study area is located in a fen with mainly herbaceous plant communities. The site is under human influence, i.e. used for cattle grazing during the dry season, and drained by ditches. The peat lies on a sandy geological formation (Mio – Pliocene) that fills an eighty-meter thick graben. The high permeability of sand provides the system with high-quality aquifers and this basin is pumped for drinking water supply.

The hydrogeological and water chemistry parameters have been monitored since 2002 (Auterives, 2007). The investigated area includes two study sites (Fig.III-1). The first one corresponds to a pumping site (S site), in front of the pumping station area. The second one is located one kilometer downstream, beyond the influence of the pumping station and used as a reference site (G site). The hydrological fluxes in both sites were determined through a river level and piezometer monitoring, both in the deep sand aquifer and in the peat itself at different depths (from 1.5 to 5 m). In peat, piezometers were set up along a river-peat transect. The two areas exhibit clearly distinct hydrogeological conditions (Auterives, 2007). Pumping in the sand aquifer leads to a lowering of the water table (close to 1.5 m). This decrease leads to higher water fluxes from the peat to the sand aquifer in pumping site S, especially in the left bank. Hydrogeological monitoring allowed computing the water budget for the peat in both sites. The peatland water inflow at pumping site S is related to the precipitations and to a permanent stream inflow. By contrast, the peatland water inflow at reference site G is only controlled by precipitations. In reference site G, the stream-peat connection, i.e. water flows from the stream to the peat layer, occurs only during high-water periods.

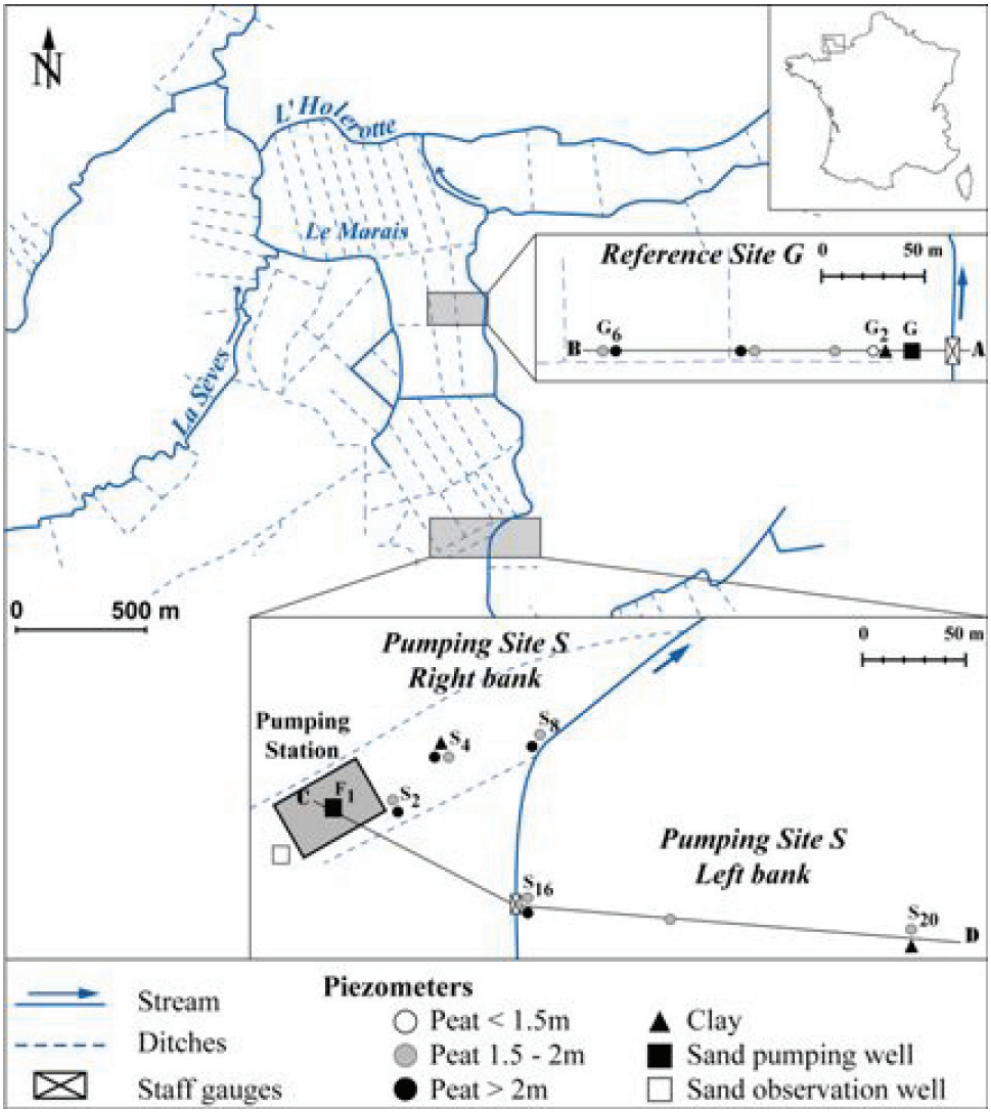



**Figure III-1 : Location and piezometer map of Carentan site** (Auterives, 2007)

### 3.2 - Experimental design

Peat samples were collected with an auger in March 2004 at the two sites, close to (i.e. a few meters) and distant from (i.e. about 100 m) the stream, respectively. At pumping site S, we collected samples from each side of the stream (left and right banks). The sampling depth varied from 50 to 80 cm. Upon sampling, soil characters indicated variable redox conditions from one station to the other (Tab.III-1). After sampling, big roots were removed and the soil was homogenized. The pH was determined using the AFNOR NF X 31-103 method (Tab.III-1) and soil was stored at 4°C for 2 days. The moisture was determined from weight loss of

30g samples after heating at 45°C for 48 h. The sulfur / carbon ratio and the total carbon content were analyzed with a CHNSO EA1108 Carlo-Erba, using the ignition loss method (Ball 1964).

**Table III-1 : Characteristics of soils and sulphur and carbon conten**t in soil extracted at the Carentan sites.

| Sites | Sampling station | Soil profil | pH | % C | % S | % N | % O |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reference site G | Close to the stream | 0 to 15 cm : soil<br>15 to 50 cm : ballast<br>+ 50 cm : peat | 5.8 | 40,14 ± 3.08 | 0,49 ± 0.08 | 1.87 ± 0.04 | 15.44 ± 1.15 |
| | Distant from the stream | 0 to ∞ cm : peat | 5.2 | 24,70 ± 1.54 | ND | 2.56 ± 0.18 | 27.61 ± 2.36 |
| Pumping site S Right Side | Close to the stream | 0 to 15 cm : soil<br>15 to 50 cm : ballast<br>+ 50 cm : peat | 4.5 | 44,91 ± 1.73 | 1,04 ± 0.03 | 2.21 ± 0.11 | 31.76 ± 0.55 |
| | Distant from the stream | 0 to 15 cm : soil<br>15 to 50 cm : ballast<br>+ 50 cm : peat | 5 | 31,33 ± 2.6 | 0,28 ± 0.05 | 2.21 ± 0.18 | 21.03 ± 1.6 |
| Pumping site S Left Side | Close to the stream | 0 to 15 cm : peaty soil<br>15 to 50 cm : clay loam horizon oxidised<br>+ 50 cm : peat | 4.7 | 26,60 ± 1.18 | 0,25 ± 0.02 | 1.86 ± 0.03 | 18.91 ± 0.15 |
| | Distant from the stream | 0 to 10 cm : peaty soil<br>10 to 30 cm : clay loam horizon oxidised<br>+ 30 cm : peat | 4.4 | 32,88 ± 0.77 | 0,49 ± 0.01 | 2.33 ± 0.04 | 22.06 ± 0,32 |

We investigated the change of anion concentrations over time under high and low nitrate concentrations (Fig. III-2). Thirty grams of wet soil were placed in 250-mL serum flasks with 100 ml of synthetic solution (40 mg/L of $Cl^-$ as NaCl). The soil-water ratio ranged from 1/10 to 1/20, taking into account the soil moisture. No nitrate was added for the low nitrate samples. In the high nitrate concentration experiments, 30 mg/L of $NO_3^-$ (as $NaNO_3$) were added. The water composition was approximately similar to the field stream composition. Stream water was not used because of its potential microbial content and the soil was not sieved in order to preserve microbial soil heterogeneity.

Two incubation conditions were tested, i.e. oxic and anoxic, the later consisting of a nitrogen atmosphere. Serum flasks were evacuated and flushed three times with nitrogen to ensure anaerobic conditions. To preserve oxic conditions and to prevent from any anoxic micro-site development, flasks were shaken continuously all along the experiment. One hour before each sampling, all flasks were stirred for water homogenization and then remained unmoved for particle deposition. Abiotic controls consisted in sterilized peat samples. Bacteria had been metabolically inhibited. To avoid alteration of the soil physical structure, gamma ray irradiation (60 kGray) was used. Ionisation was carried out at the Bureau for Atomic Energy

(CEA, Cadarache). The samples received the same treatment as the experimental flasks with nitrate addition.

Triplicates were performed under each experimental condition to take into account the potential variability related to peat heterogeneity.

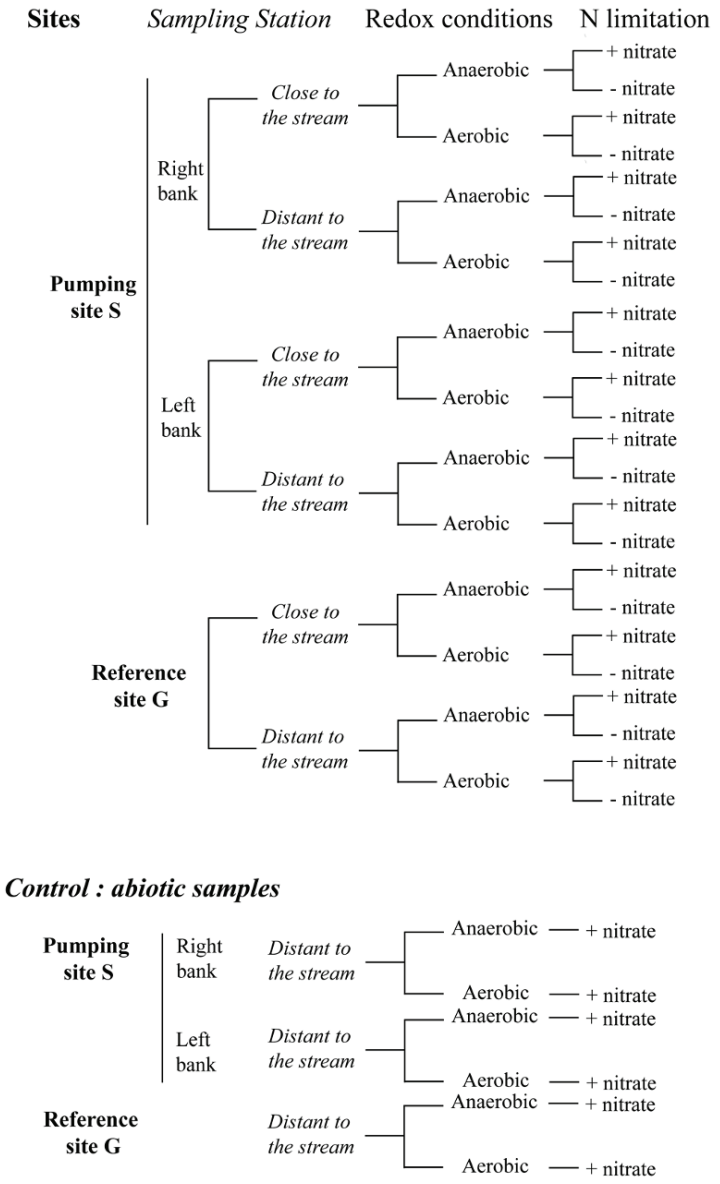



**Figure III-2 Experimental design.** 'Anaerobic condition' indicates that ambient atmosphere is changed to $N_2$. '+ nitrate' or '- nitrate' corresponds to addition or non addition, respectively, of nitrate in the flask. Control corresponds to sterilized samples. All conditions were repeated three times to allow statistical analysis.

Five milliliters of the solution contained in each flask were sampled after 1, 9, 25, 76 and 240 h of incubation. Three milliliters were filtered with sieved cellulose-acetate filters 0.22 µm (Sartorius Minisart) prior to analyze major anions ($Cl^-$, $SO_4^{2-}$ and $NO_3^-$) by ionic

chromatography (Dionex©DX120) at Geosciences Rennes. The uncertainty was less than 4%. The two other milliliters were used to determine the microbial diversity (not addressed in this paper).

Physico-chemical parameters were characterized at the end of each experiment (Tab. III-2). The pH was measured at +/- 0.05 unit with a Sentix 50 electrode, after calibration with WTW standard solutions of known pH (4.01 and 7 at 25°C). The oxido-reduction potential was determined using a platinum electrode (Mettler Pt 4805). Correction was made for pH, temperature, and standard potential redox of the Ag/AgCl electrode as a function of the standard hydrogen electrode: Eh corr = Eh meas + 230 – 0, 76 (T-25) + 60(pH–7) + E°Ag/AgCl. The pε was obtained by the Nernst equation: Eh = 2.3 RT / F * pε; with R = 80, 314 $kJ.mol^{-1}.K^{-1}$, F = 96485 C and T in Kelvin.

**Table III-2 : Physico - chemical parameters at the end of the experiment.**

| | | pH | T°C | Eh corrected (standard) | pε |
|---|---|---|---|---|---|
| **Pumping site S - Right bank** | | | | | |
| Close | | | | | |
| | Anaerobiosis | 5.1 | 25.9 | 175 | 0.306 |
| | Aerobiosis | 4.1 | 20.3 | 250 | 0.444 |
| Distant | | | | | |
| | Anaerobiosis | 5.4 | 26 | 171 | 0.299 |
| | Aerobiosis | 5.1 | 20.3 | 200 | 0.355 |
| **Pumping site S - Left bank** | | | | | |
| Close | | | | | |
| | Anaerobiosis | 5.3 | 25.8 | 171 | 0.300 |
| | Aerobiosis | 3.7 | 20.3 | 179 | 0.318 |
| Distant | | | | | |
| | Anaerobiosis | 5 | 26.9 | 126 | 0.219 |
| | Aerobiosis | 4.5 | 20.3 | 204 | 0.363 |
| **Reference site G** | | | | | |
| Close | | | | | |
| | Anaerobiosis | 6.7 | 25.6 | 113 | 0.198 |
| | Aerobiosis | 6.1 | 20.3 | 208 | 0.371 |
| Distant | | | | | |
| | Anaerobiosis | 5.6 | 25.8 | 144 | 0.252 |
| | Aerobiosis | 5.3 | 20.3 | 167 | 0.297 |

### 3.3 - Statistical analysis of data

Chloride is considered as a conservative element, but the observed variability was too high to use $Cl^-$ concentration to correct $NO_3^-$ concentrations. $SO_4^{2-}$ concentrations were corrected by chlorides variations and initial content of sulfate pore water to determine sulfate production process. The concentrations were corrected by mass fluctuation after each water sampling.

The family-wise error of our data followed a Poisson distribution. Thus, we analyzed the dataset using the Generalized Linear Model (GLM) implemented in *R* after a log

transformation as the linking function. The deviance analysis from GLM (i.e. the effect on GLM when removing a term) was performed to test (*i*) the differences among sites for each variable ($Cl^-$, $SO_4^{2-}$, and $NO_3^-$ concentrations), (*ii*) a possible effect of $NO_3^-$ addition on the others variables, and (*iii*) the incidence of oxic and anoxic on the measured parameters. Statistical analyses were performed using the chi-square test since it is the most relevant test in deviance analyses. For a significant term, it is allowed to test the contrasts (mean comparisons), i.e. interaction terms by *z* coefficient tests. This is allowed even if, as in our case, the beta coefficients are asymptotically distributed normally. To limit the obvious risks of obtaining a significant result only by chance, a Bonferroni correction was applied to the results. All these analyses were implemented using *R* (downloadable from http://www.r-project.org/).

# 4. Results

## 4.1-Fields results

Previous work determined fields results (Auterives, 2007). The peat groundwater has a conductivity ranging from 200 to 600 $\mu S.cm^{-1}$ and a slightly acid pH (5.5 – 7.5). Redox potential varies with hydrological periods. Throughout high-water periods, values exceed 400mV/ESH and indicate oxidized conditions. More important groundwater flow and water renewals favor groundwater oxygenation. Throughout low-water periods, Eh decreases below 200 – 300 mV/ESH and indicates moderately reduced conditions, a slow groundwater flow limiting oxygen renewal in the peat groundwater.

Chloride concentrations range from 15 to 40 mg/L. A concentration gradient is observed in site G as a function of the distance to the stream. $NO_3^-$ dynamics depend on the hydrological conditions: $NO_3^-$ concentrations are higher during high-water periods (from 5 to 35 $mg.L^{-1}$) than during low-water periods (0 to 10 $mg.L^{-1}$). During low-water periods, a clear $NO_3^-$ decrease is observed. Nitrates are removed by vegetation uptake and by denitrification processes related to reduced conditions.

$SO_4^{2-}$ concentrations show extremely high variations from 0 to 1200 $mg.L^{-1}$. $SO_4^{2-}$ pulses related to $H^+$ pulses (pH < 5) are observed after a desaturation / resaturation cycle. The increase in sulfate concentrations appears after the increase in peat groundwater level. Such increases are located in two areas: in site S-left bank near the pumping well and in reference

site G near the stream. These areas correspond to the maximum drying of the peat during low waters. $SO_4^{2-}$ pulses result from a drying - rewetting effect (Devito and Hill 1999; Eimers et al. 2003; Auterives, 2007).

The change of nitrate and sulfate concentrations is clearly related to the water table dynamics. Such change can be interpreted as reflecting various redox conditions related to water saturation. However, field results show an obvious variation between sites and a function of distance to the stream within each site:

- efficient nitrate removal in reference G site and pumping site S – right bank,
- more limited nitrate removal in pumping site S– left bank, above the abstraction well,
- sulfate production ($SO_4^{2-}$ > 100 mg/L) in the whole pumping site S – left bank, above the abstraction well, and in reference site G, close to the stream,
- high sulfate concentrations ($SO_4^{2-}$ = 20-50 mg/L) close to the stream in pumping site S – right bank.

### 4.2 - Batch experiments

Nitrates and sulfates concentrations kinetics show high variability at the firsts twenty fifth hours. They are considered as an equilibration phase between pore and added water. The process determination is only discussed since the 25hours after the beginning of the experiment.

#### 4.2.1 –Nitrate

In batch experiments, a systematic decrease in nitrate concentration under anoxic conditions is observed (Fig.III-3, Fig.III-4), this reduction being complete at the end of the experiments in site S. The nitrate removal rate is maximal between 25 and 76 h and reaches 70 % of initial concentration under anoxic. Under aerobic conditions, the nitrate removal is more limited in pumping site S – Left bank (i.e. the pumping site). The concentration remains almost stable in the other sites. Figure III-4 presents nitrate concentrations change measured experimentally in solutions enriched and not enriched in nitrates. Nitrate removal is more important in the nitrate-enriched solutions than in the others (from deviance analysis, $P<0.0001$). Between 25 and 76 h, the reduction in the ‘close to the stream, nitrate-enriched, under aerobic conditions’ soil is estimated at 0.61 +/- 0.02 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ and at 0.04 +/- 0.02 $mg.L^{-1}.h^{-1}$ in the same soil without nitrate enrichment.

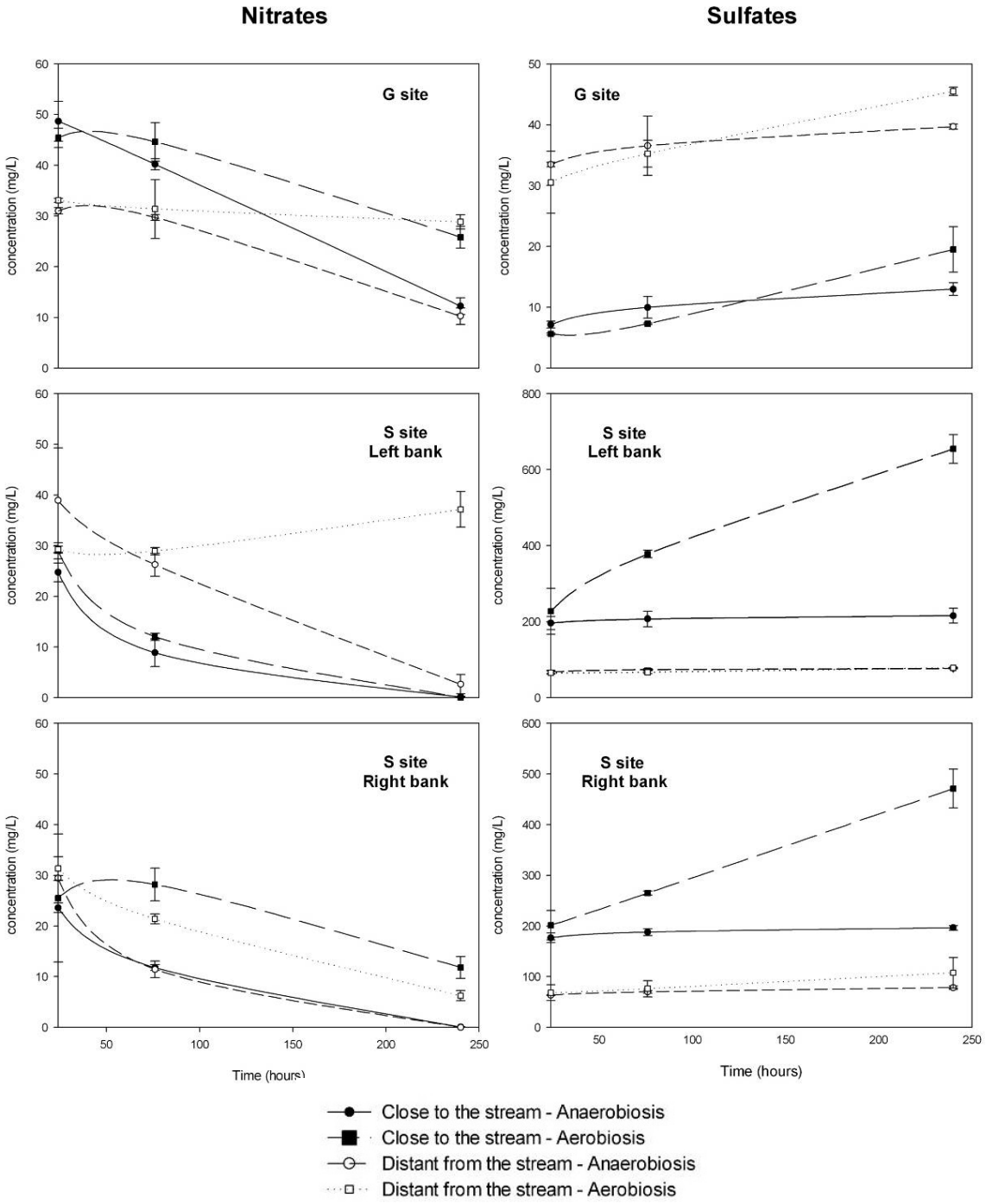



**Figure III-3 : Batch experiments: temporal variation of nitrate and sulphate concentrations in peat samples under aerobic and anaerobic conditions**. The value given for each sample corresponds to the mean of the three replicates. The bars indicate standard deviation. The experiments without nitrate addition are not represented on this graphic. The kinetic representation starts 25hours, before it is an equilibration phase.

### 4.2.2 –Sulfate

Sulfate concentrations increase in some experiments (Fig.III-3). The increase is particularly significant for the samples collected close to the stream in pumping site S, and is also more

important under aerobic conditions than under anaerobic conditions (from deviance analysis, P<0.0001) (Fig.III-5). In pumping site S - left bank, between 25 and 240 h, a net production of approximately 400 mg/L under oxic is observed, while the production is almost null during the same period under anoxic. After 240 hours of experiment, the sulfate concentration reaches 600 mg/L in the peat sampled in the most influenced area of pumping site S. Sulfate concentrations corrected from pore water sulfates content and chlorides variations (Fig.III-5) indicate no sulfates variations in reference site G and pumping site left and right bank under anaerobic conditions.

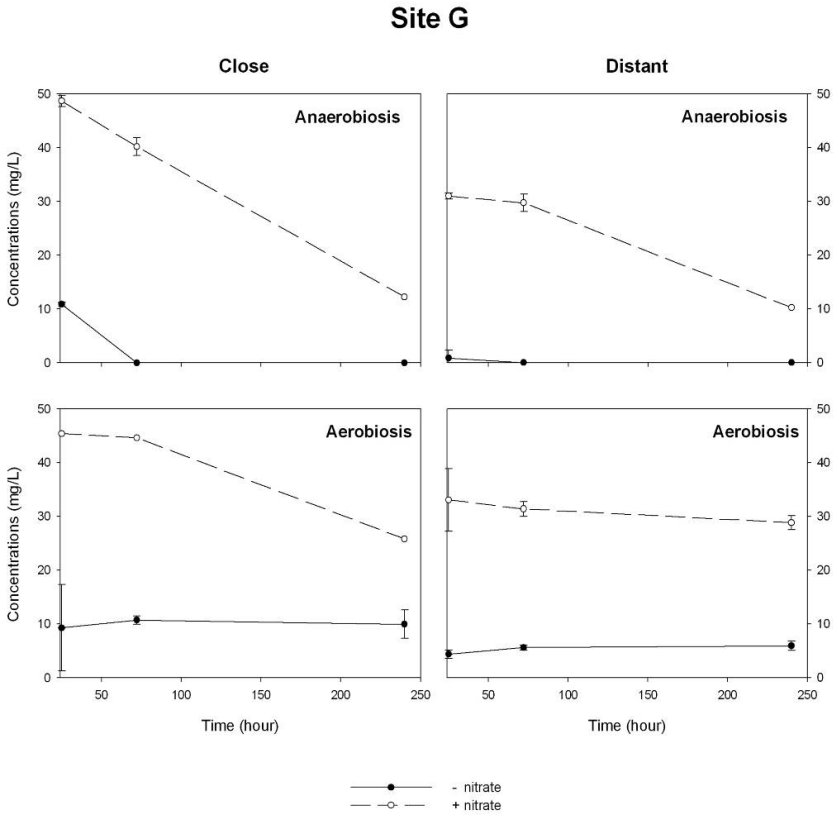



**Figure III-4 : Comparison of the experiments with and without nitrate additions**. All values correspond to the mean of the triplicates. The bars indicate standard deviation

### 4.2.3 –Site comparison

Table III-3 presents the chloride mean concentration during the experiment. Chloride change during the experiment is not similar for all sites. Reference site G shows a high increase, particularly under oxic conditions (from deviance analysis, P<0.0001), whereas the right and left banks of pumping site S exhibit a rather similar change (from z coeff, P=0.03). Although not shown in Tab.III-3, experiments without added nitrate show the same chloride change as those with nitrate addition. The difference between pumping site S and reference site G is also

observed for the change of nitrate and sulfate contents (from deviance analysis, P<0.001) (Fig.III-3). In spite of a similar soil reactivity leading to a reduction of the nitrate concentration, a difference in the bacterial reaction kinetics is observed (Fig.III-3). Without oxygen, soils sampled in the left and right banks of pumping site S react more rapidly than soils from reference site G. This difference is observed independently of the initial nitrate content in the experiment. The sulfate content also differs strongly between the sites, reference site G showing initial contents ten-fold lower than pumping site S (from deviance analysis, P<0.0001) (Fig.III-3).

**Table III- 3 : The chloride mean concentration during the experiment.**

| | t-25h mean ± std | t-76h mean ± std | t-240h mean ± std |
|---|---|---|---|
| ***Right bank*** | | | |
| **Closed** | | | |
| Anaerobiosis | 37.8 ± 1.0 | 52.2 ± 11.0 | 41.9 ± 1.6 |
| Aerobiosis | 45.6 ± 2.3 | 43.6 ± 1.1 | 43.8 ± 0.8 |
| **Distant** | | | |
| Anaerobiosis | 42.8 ± 0.4 | 47.9 ± 10.2 | 46.9 ± 0.9 |
| Aerobiosis | 45.8 ± 2.0 | 41.7 ± 0.7 | 48.5 ± 0.7 |
| ***Left bank*** | | | |
| **Closed** | | | |
| Anaerobiosis | 44.9 ± 0.8 | 42.8 ± 16 | 46.1 ± 1.7 |
| Aerobiosis | 54.6 ± 6.7 | 44.7 ± 1.2 | 52.5 ± 2.1 |
| **Distant** | | | |
| Anaerobiosis | 43.7 ± 0.7 | 38.8 ± 0.3 | 41.2 ± 1.9 |
| Aerobiosis | 46.2 ± 3.2 | 40.9 ± 0.4 | 49.2 ± 13.8 |
| ***G site*** | | | |
| **Closed** | | | |
| Anaerobiosis | 48.9 ± 0.7 | 53.3 ± 4.9 | 52.2 ± 0.6 |
| Aerobiosis | 47.4 ± 0.9 | 45.8 ± 0.5 | 64.3 ± 1.9 |
| **Distant** | | | |
| Anaerobiosis | 40.4 ± 0.3 | 42.3 ± 1.0 | 44.9 ± 0.2 |
| Aerobiosis | 39.4 ± 3.5 | 41.9 ± 1.8 | 51.7 ± 0.2 |

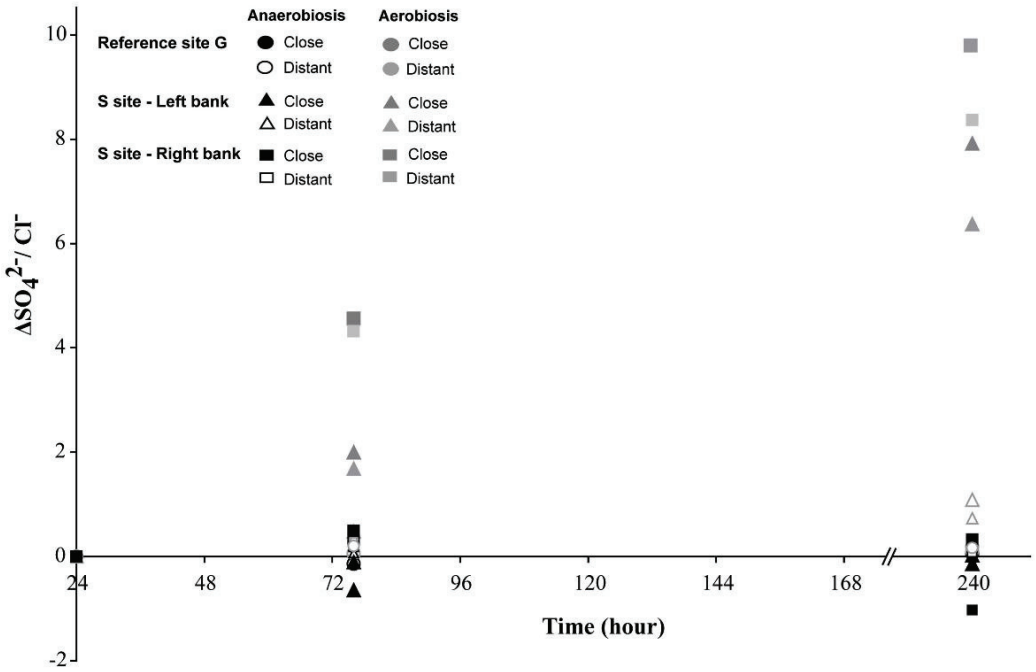



**Figure III-5 : Batch experiments: sulphate concentration normalization by chlorides concentrations**.

### 4.2.4 - Distance to the stream

The chloride difference between the peat sampled close to and distant from the stream is significant in reference site G, but a difference is also observed in pumping site S (Tab. III-3). A similar observation can be made for nitrate and sulfate contents. The sulfate content of the two series 'close to' and 'distant from' is important, with the 'distant from' samples having concentrations four times higher than the 'close to' samples at the beginning of the experiments. However, sample location has an influence mainly on the initial content rather than on the change with time, except for the samples from pumping site S taken close to the stream under oxic, which show a continuous increase among sites (from deviance analysis $P<0.05$) (Fig.III-5), conversely to treatments.

The spatial variation is emphasized considering the delta sulfate (Fig.III-5). Two groups can be distinguished: (1) reference site G, close to and distant from the stream, pumping site S, left and right banks distant from the stream and (2) pumping site S, left and right banks close to the stream. And oxygenation conditions also control sulfate changes. A clear impact is distinguished in 'close to' soils.

The batch experiment results are in good agreement with the field observations:

- Chloride variations measured are in the range of field observations.
- Nitrate removal is clearly reproduced, even under oxic.
- High sulfate concentrations are released during the experiments.

The batch experiments also reproduce the spatial variations observed in the field, partly independently of the redox conditions:

- a clear difference between reference site G and pumping site S is observed for the chloride (from deviance analysis, $P<0.05$) and sulfate concentrations and nitrate removal dynamics (from deviance analysis, $P<0.0001$).
- the reactivity differs as a function of distance to the stream, as observed in the chloride-sulfate relationship, especially in pumping site S.

Nitrate removal remains lower in site G than in site S, as is the case for sulfate concentrations, which slightly differs from the field observations if redox conditions are not taken into account. However, the main conclusion is that the laboratory experiments highlight the influence of the hydrogeological context on the biological reactivity of the soil, independently of the nutrient and redox conditions.

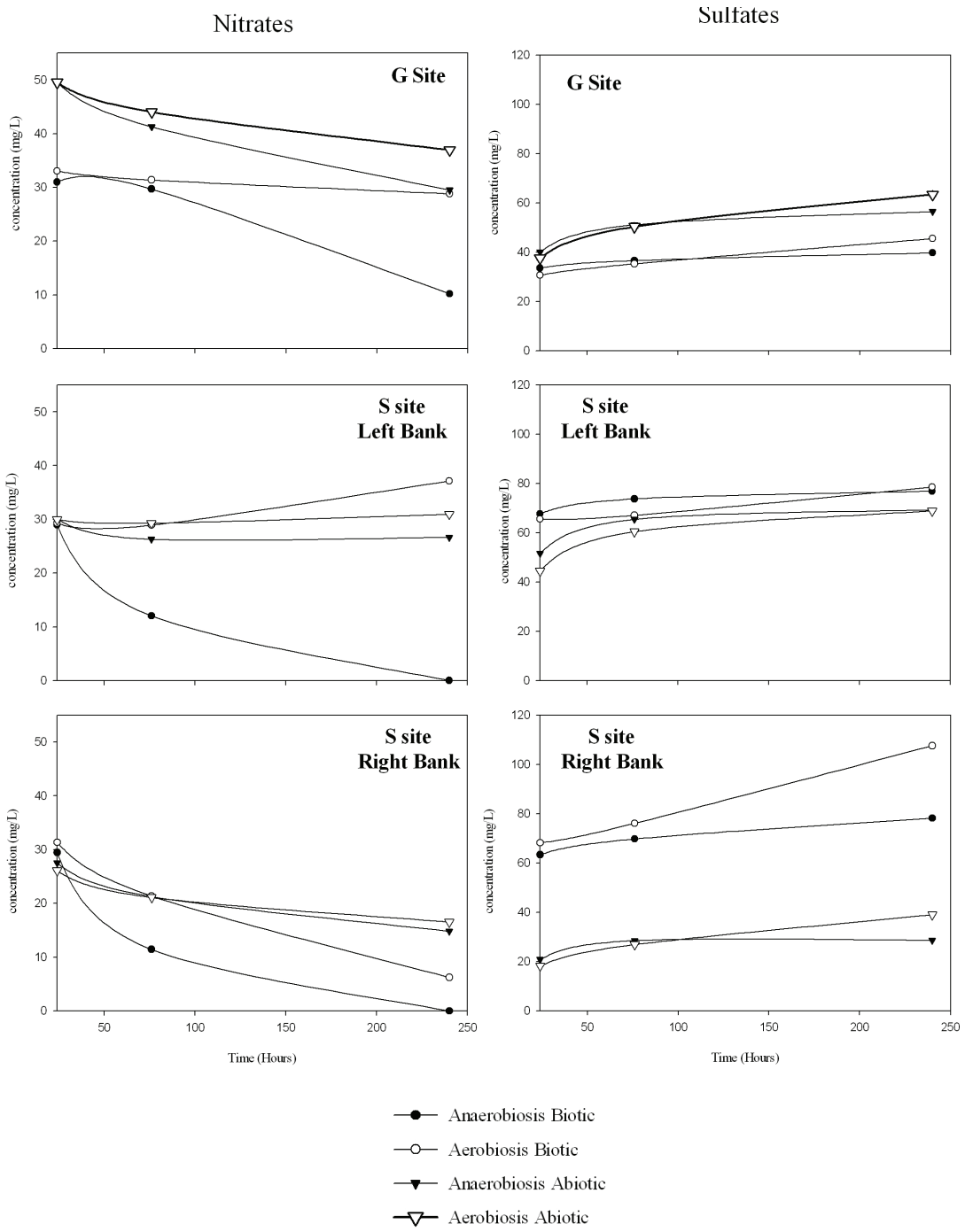



**Figure III-6 : Comparison of the change of nitrate and sulphate concentrations throughout the experiment.** The data represented correspond to the bottles with soil sampled at a distance from the stream and with nitrate added.

# 5. Discussion

## 5.1 - Nitrate removal

A net nitrate reduction was observed during the experiments. Several studies have shown such a reduction and explained the phenomenon through two major processes: plant uptake and microbiological removal (e.g. Correl 1997). The microbiological removal itself corresponds to three different processes: (1) autotrophic denitrification, (2) heterotrophic denitrification, and (3) dissimilatory reduction. The first two processes lead to a total loss of nitrogen from the soil system, the nitrates being removed as $N_2$ gas. Dissimilatory reduction corresponds to the reduction of nitrates to $NH_4^+$ and so nitrogen is not removed from the soil environment. These reactions are strongly dependent on environmental conditions such as soil moisture and temperature, soil texture, nutrients and labile C availability (Knowles 1982; Clément et al. 2002). The autotrophic denitrification results from sulfide oxidation (e.g. pyrite, $FeS_2$). Sulfur compound is oxidized to sulfate ions and iron-II is released. Bacteria using $CO_2$ as a carbon source catalyze this reaction. The heterotrophic denitrification, after oxygen removal, is the reaction generating the highest amount of free energy for microbial growth. This reaction develops in oxygen-poor environments, with the mediation of denitrifiers such as *Pseudomonas* sp., *Thiobacillus* sp., *Bacillus* sp. or Alcaligens and organic substrate easily assimilated (Chapelle 2001). The dissimilatory nitrate reduction occurs in nature under strict anaerobic conditions. The enzyme contributing to this reaction, the nitrate reductase, is inhibited by the presence of oxygen (Ostrom et al. 2002). The denitrifiers show a great plasticity to the modifications of the environment oxygenation: most denitrifers are aerobic under oxic conditions, but can use nitrate as final electron donor under anoxic conditions (Florinski et al. 2004). The results obtained during the experiments indicate that heterotrophic denitrification is the main process conditioning the nitrate removal: *(i)* No $NH_4^+$ production has been observed during the experiments and the nitrate reduction is not restricted to anaerobic conditions, which rules out the dissimilatory reduction. *(ii)* Although sulfate production is observed, it cannot be related to the nitrate reduction that should occur during autotrophic reduction. Reduction under oxic conditions can be related to the fact that denitrifers are facultative anaerobes. Moreover, the presence of available dissolved organic carbon in excess (> 30 mg/L), moderate reduced redox conditions (< 200 – 300 mV), anoxic conditions and nitrate nutrients emphasize the potential for a heterotrophic reduction process

(Ingersoll and Baker 1998; Hedin et al. 1998; Hill et al. 2000; Vidon and Hill 2004). The comparison of biotic and abiotic conditions (Fig. III-6) points out the importance of biological processes in the nitrate removal (two-way ANOVA, e.g. G site aerobic: $P<0.0001$). Even if the totality of the nitrate reduction cannot be assigned to the biological activity, the major part of this reduction is due to a heterotrophic denitrification. In a quantitative view, the peat from Carentan has a clear denitrifying activity, although this activity is less important than in a mineral soil, even in non-limiting nitrogen conditions (Hénault et al. 2001).

### 5.2 - Sulfates

The correlation with the experiment performed under abiotic conditions (Fig.III-6) seems to show an important non-biological sulfate release process. In reference site G and pumping site S – left bank, concentration change shows higher or equal variations under abiotic conditions as compared to biotic conditions. In site S – right bank, the biotic increase is higher than the abiotic one, whether under aerobic or anaerobic conditions. For site G and site S – left bank, a predominant abiotic release should be considered.

The lack of variation (Fig.III-5) for peat from reference site G and, to a lesser degree, pumping site S - close to the stream, strongly supports a mixing process. Such a mixing process can be related to the release of evaporated waters from the peat soil. The variations in chloride concentrations cannot be attributed to an evaporative process during the experiments since all the concentrations have been corrected for volume and chlorides variations. The peat constitutes a reservoir for pore waters enriched in $Cl^-$ and $SO_4^{2-}$. Precipitations enriched through evapotranspiration are at the origin of chlorides and of a primary S pool, available in the peat. The drying-rewetting effect (Devito and Hill 1999; Eimers et al. 2003) allows for the sulfur molecule oxidation and the establishment of an available sulfate pool in the peat matrix. The abiotic release of solutes from pore waters observed during the experiments is related to a chemical interaction between the NaCl + deionized water of the synthetic solution and the bulk pore water. Kaiser and Kaupenjohann (1998) emphasized the sulfate release from soil caused by addition of deionzed water + NaCl. The sulfate release is related to a drop in the ionic strength through the addition of the synthetic solution. The addition of the synthetic solution, and more particularly in presence of monovalent cations, destabilizes the ionic strength and enhances the sulfate extractability and decreases the sorption potential (Curtin and Syers 1990; Courchesne 1991; Kaiser and Kaupenjohann 1998).

The comparison between abiotic and biotic conditions has been carried out only in samples collected far from the river. However, as observed in Fig.III-5 in site S, the sulfate production is higher close to the river than far from the river. Sulfate concentrations reach extremely high values (close to 600 mg/L), in agreement with the concentrations observed on site (up to 1200 mg/L). Since the biological effect seems to occur even if it is not the major release process in the experiments far from the river. We suspect that the very intensive release close to the river cannot be completely attributed to a non biological process. The highest increase of 400 mg/L has been obtained under aerobic conditions (Fig. III-3). These results agree with the works of Fenner et al. (2005), Eimers et al. (2003) and Devito and Hill (1999), which indicated sulfate release under oxidized conditions. The presence of oxygen enhances the phenolic biodegradation by the phenol oxidase (Freeman et al. 2004). Most of the phenolic compounds are derived from the lignin accounting for than 60 % of the peat matrix (Clymo 1983). These compounds have long been admitted as inhibitors of enzymes and more generally of microorganisms. Phenolic degradation promotes peat mineralization by the β-galactosidase and the inhibitor removal enhances the hydrolasic activity. This activity enables the production of sulfate from sulfate esters existing in the peat matrix bonded to humic substance (polyphenolic and phenolic compounds) (Lou and Warman 1994; Mc Gill and Cole 1981; Chapman and Davidson 2001), which is controlled by an arylsulfatase (Whalen and Warman, 1996).

The great sulfate release described for the peat sampled in the vicinity of the stream in pumping site S might also result from the dissolution of mineral phases controlled by microorganisms. Such extremely high concentrations are more easily related to mineral sulfide oxidation than to a pure biological production. The unclear comparison between abiotic and biotic experiments far from the river and the results of site S – left and right banks close to the river indicate that sulfate release can not be attributed to a unique process. We rather think, from the sterilized experiments, that chemical and biological processes together allow such significant sulfate contents to be obtained. The difference in the net release obtained at the scale of a site and between sites highlights the control of the sulfate dynamics by hydrogeological processes. Our results are coherent with recent works (Devito 1995; Devito and Hill 1999, Warren et al., 2001; Eimers et al. 2003) that have shown that hydrologic heterogeneity must be considered in predicting the sulfate release following a drought period. The amplitude of the water table variation and the potential drying of the peat during summer are the main controls of sulfate release as observed in the field (Auterives

2007). The lowering of the water table is related (*i*) to the degree of stream-peat connectivity, and (*ii*) to the hydrogeological influence of the aquifer underlying the peat.

### 5.3 - Spatial variability

The inter- and intra-site variability observed in field has been reproduced in laboratory with different experimental conditions. The amount of sulfates released within the experiments differs in the 2 sampling sites. The statistical tests have shown a high significance of the sampling site and distance to the stream. The peat from reference site G differs from Pumping site S by a slower nitrate removal bacterial activity. The peat from reference site G also differs from Pumping site S by lower initial sulfate contents and potentially more reduced conditions (Tab.III-2) (Fig.III-5). The initial difference in sulfate contents is maintained over the whole experiment. The sulfates produced seem to have a distinct origin. The biotic/abiotic comparison has shown that abiotic factors are predominant in reference site G and Pumping site S - left bank whereas biotic processes seem to predominate in Pumping site S - right bank. Moreover, different nitrate removals and sulfate releases, notably for Pumping site S – right bank, are related to the distance to the stream.

At pumping site S, pumping in the underlying aquifer leads to a permanent flow of the stream in the peat, in the left bank of site S. The pedologic profile points out important oxidation traces at pumping site S, and a clay-loamy horizon covering the peat on the left side and close to the stream on the right side. The existence of this mineral phase is related to the stream inflow. The biological functioning of the stream-peat interface zone is related to hydrological flow paths and water exchanges between the stream and the peat groundwater. It is a major meeting point of nutrient paths between terrestrial and aquatic ecosystems (Hedin et al. 1998; Hill et al. 2000; Mc Clain et al. 2003). The difference between the sites might also be the result of the soil structure and a response of the system more or less reactive to the drying-rewetting process. The amplitude of the water table and the peat drying is in turn related to the hydrogeological influence of the underlying aquifer (Auterives 2007). Thus the difference in reactivity between sites is a mixed effect of hydrological flow paths and drying-rewetting process, both related to pumping in the underlying sand aquifer.

The permanent flow from the stream in pumping site S – left bank affects the physical and chemical mechanisms of the peat. This modification can partly explain the difference of reactivity between the sites. A permanent stream - peat connection enables a net production of available dissolved organic carbon (Hill et al. 2000; Mitchell and Branfireun 2005) and thus a

higher bacterial activity. Organic carbon presence is more important than oxygen in determining the enzymatic control of denitrification (Tiedje et al 1982). The hydrological flowpaths also influence the microbial activity in terms of substrate availability (Ostrom et al. 2002; Sabater et al. 2003; Sánchez-Pérez and Trémolières 2003). On the contrary, the temporary stream - peat connection at reference site G may explain the lower biological productivity. The significant hydrological fluxes also explain the gradient related to the distance to the stream.

This study highlights the importance of the hydrological conditions on biotic productivity. The different flowpaths affect ecosystems by creating redox conditions and supplying reactants, thus allowing Hot Spot development (Hill et al. 2000; Mc Clain et al. 2003). However, the experimental design has shown that variations in the redox conditions and nutrient supply do not completely control the differences between the sites and that reactivity is also a result of the biological structure itself. In addition to bringing stimulating physico-chemical conditions for biotic soil activity, the hydrological conditions affect the available organic matter, temperature, pH and moisture of soil. These factors are known to influence the composition and distribution of the biotic community (Beare et al. 1995; Martin et al. 1999; Stotzky 1997). The patch distribution of the different soil factors will thus reflect the heterogeneity of richness and diversity of microbial species in the ecosystem (Martin et al. 1999). The differences between sites observed in the experiments, even for similar redox and nutrient conditions, indicate that the distinct hydrological fluxes also control the structure of the associated fauna.

## 6. Conclusion

The field monitoring of a peat showing different hydrological conditions showed differing chemical concentrations. In order to test the influence of the hydrological factors on the biogeochemical reactivity, an experimental investigation of the peat soils was carried out. Various redox and nitrate concentration conditions were reproduced on hydrologically different soils.

The experimental design allowed reproducing the variations observed in the field, especially the nitrate reduction and sulfate production. In order to understand the origin of the processes, a comparison between abiotic and biotic conditions was also carried out. We conclude that nitrate reduction is related to heterotrophic denitrification. As regards some of the sites,

sulfate production is mainly related to the release of pore water enriched in sulfate through biological interactions. In some of the experiments, sulfate concentrations close to 600 mg/L were obtained and are related to mixed biological (peat mineralization) and chemical (mineral sulfur oxidation) processes. Moreover, the lab experimental results are in agreement with the drying-rewetting effects on sulfate release observed in the field.

The experimental investigation showed clear differences between the sites, even with similar experimental conditions. These differences allow us to conclude that the different hydrogeological settings have led to the development of specific ecosystems. The differences observed in the field are not only related to the variation in physico-chemical conditions, under the influence of hydrological conditions. The hydrological conditions have definitely modified the structure of the biological communities. A complementary survey by t-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) analysis of the *narG* gene is in progress and will enable to confirm the relationship between bacterial community structure and hydrological flow paths. The t-RFLP analysis is a microbiological strategy for the detection of co-amplified PCR products (known as well as unknown) and the determination of bacterial diversity signature from environmental DNA samples (e.g. Liu et al. 1997, Vandenkoornhuyse et al. 2003). The *narG* gene is a key gene of denitrification involved in the very first step, the reduction of nitrate onto nitrite, and will be used as a functional and taxonomic tag (e.g. Philippot et al. 2002) for determining the structure of denitrifiers' community.

Acknowledgments

The authors are grateful to Pierre Marmonier, André-Jean Francez and Jérome Molénat for helpful discussions; Odile Hénin for the analytical work. This work was supported by 'Marais du Cotentin et du Bessin' regional natural park and by grants from the General council of the department of the 'Manche', the Regional council of Normandy and the Water Agency of Seine Normandy and the CNRS 'programme de recherche ECCO-PNBC'.

# 7. References

Auterives C (2007) Influence des flux d'eau souterraine entre une zone humide superficielle et un aquifère profond sur le fonctionnement hydrochimique des tourbières : exemple des Marais du Cotentin, Basse-Normandie. Mémoires du Caren, Rennes I, Rennes

Ball DF (1964) Loss-on-ignition as an estimate of organic matter and organic carbon in non-calcareous soils. J Soil Sci 15: 84-92

Beare MH, Coleman DC, Crossley DA Jr, Hendrix PF and Odum EP (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. Plant Soil 170: 5–22

Bilanovic D, Battistoni P, Cecchi F, Pavan P and Mata-Alvare J (1999) Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. Water Res 3: 3311 – 3320

Cannavo P, Richaume A and Lafolie F (2004) Fate of nitrogen and carbone in the vadose zone: in situ and laboratory measurements of seasonal variations in aerobic respiratory and denitrifying activities. Soil Biol Biochem 36: 463 – 478

Cavigelli MA and Robertson GP (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. Ecology 81: 229 - 241.

Chapelle FH (2001) Ground water microbiology and geochemistry. John Wiley and sons, New York, USA

Chapman SJ and Davidson MS (2001) $^{35}$S-Sulphate reduction and transformation in peat. Soil Biol Biochem 33: 593-602

Clément JC, Pinay G and Marmonier P (2002) Seasonal dynamics of denitrification along topohydrosequences in three different riparian wetlands. J Environ Qual 31: 1025–37

Clément JC, Aquilina L, Bour O, Plaine K**,** Burt TP and Pinay G (2003) Hydrological flowpaths and nitrate removal rates within a riparian floodplain along a fourth-order stream in Brittany (France). Hydrol process 17: 1177-1195

Clymo RS (1983) Peat. In: Mires :swamp, bog, fen and moor. Ecosystems of the world, 4A. A.J. Gore, editor. Elsevier Scientific Publishing. New York. New York. USA, 159-224.

Correl DL (1997) Buffer zones and water quality protection: General principles. In: Naycock, N.E., Burt, T.P., Goulding, K.W., Pinay, G. (Eds.), Buffer Zones: Their Processes and Potential in Water Protection. Quest Environment, Hertfordshire, pp. 7–20.

Courchesne F (1991) Electrolyte concentration and composition effects on sulphate sorption by two spodosols. Soil Sci Soc Am J 55: 1576-1581

Curtin D and Syers JK (1990) Extractability and adsorption of sulphate in soils. Journal of Soil Sci 41: 305–312.

Dassonville F and Renault P (2002) Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. Agronomie 22: 51–68

Devito KJ (1995) Sulphate mass balances of Precambrian Shield wetlands: The influence of catchment hydrogeology. Can J Fish Aqua Sci 52: 1750–1760

Devito KJ and Hill AR (1999) Sulphate Mobilization and Pore Water Chemistry in Relation to Groundwater Hydrology and Summer Drought in two Conifer Swamps on the Canadian Shield. Water Air Soil Poll 113: 97-114

Dommergues Y and Mangenot F (1970) Ecologie microbienne du sol. Masson éditeur, Paris

Eimers MC, Dillon PJ, Schiff SL and Jeffries DS (2003) The effects of drying and re-wetting and increased temperature on sulphate release from upland and wetland material. Soil Biol Biochem 35: 1663-1673

Fenner N, Freeman C and Reynolds B (2005) Hydrological effects on the diversity of phenolic degrading bacteria in a peatland: implications for carbon cycling. Soil Biol Biochem 37: 1277-1287

Fisk MC, Ruether KF and Yavitt JB (2003) Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems Soil Biol Biochem 35: 591 – 602

Florinsky IV, McMahon S and Burton DL (2004) Topographic control of soil microbial activity: a case study of denitrifiers. Geoderma 119: 33 – 53

Freeman C, Ostle NJ, Fenner N and Kang H (2004) A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. Soil Biol Biochem 36: 1663-1667

Ginn TR, Wood BD, Nelson KE, Scheibe TD, Murphy E.M and Clement TP (2002) Processes in microbial transport in the natural subsurface. Adv Water Resour 25: 1017-1042

Harvey RW, Kinner NE, MacDonald D, Metge DW and Bunn A (1993) Role of physical heterogeneity in the interpretation of small-scale laboratory and field observations of bacteria, microbial-sized microsphere, and bromide transport through aquifer sediments. Adv Water Resour 29: 2713-2721

Hedin LO, von Fischer JC, Ostrom NE, Kennedy BP, Brown MG and Robertson GP (1998) Thermodynamic constraints on nitrogen transformations and other biogeochemical processes at soil – stream interfaces. Ecology 79: 684 – 703

Hénault C, Chéneby D, Heurlier K, Garrido F, Perez S and Germon JC (2001) Laboratory kinetics of soil denitrification are useful to discriminate soils with potentially high levels of N2O. Agronomie 21: 713–723

Hill AR, Devito KJ, Campagnolo S and Sanmugadas K (2000) Subsurface denitrification in a forest riparian zone: interactions between hydrology and supplies of nitrate and organic carbon. Biogeochemistry 51: 193–223.

Ingersoll TL and Baker LA (1998) Nitrate removal in wetland microcosms. Water Res 32: 677 – 684

Kaiser K and Kaupenjohann M (1998) Influence of the soil composition on retention and release of sulphate in acid forest soils. Water Air Soil Poll 101: 363-376

Knowles R (1982) Denitrification. Microbiol Mol Biol R 46: 43-70

Liu WT, Marsh TL, Cheng H and Forney LJ (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. Appl Environ Microb 63: 4516 – 4522

Lloyd JR, Klessa DA, Parry DL, Buck P and Brown NL (2004) Stimulation of microbial sulphate reduction in a constructed wetland: microbiological and geochemical analysis. Water Res 38: 1822–1830

Lou GQJ and Warman PR (1994) Characterization of ester sulphate in a gypsum-amended podzol using an immobilized sulphatase reactor. Biol Fert Soils 17: 276 - 280

Martin TL, Trevors JT and Kaushik NK (1999) Soil microbial diversity, community structure and denitrification in a temperate riparian zone. Biodivers Conserv 8: 1057 -1078

McClain ME, Boyer EW, Dent CL, Gergel SE, Grimm NB, Groffman PM, Hart SC, Harvey JW, Johnston CA, Mayorga E, McDowell WH and Pinay G (2003) Biogeochemical Hot Spots

and Hot Moments at the Interface of Terrestrial and Aquatic Ecosystems. Ecosystems 6: 301–312

McGill WB and Cole CV (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma 26: 267–286

Mitchell CPJ and Branfireun BA (2005) Hydrogeomorphic Controls on Reduction– Oxidation Conditions across Boreal Upland–Peatland Interfaces. Ecosystems 8: 731-747

Morel FMM and Hering JG (1993) Principles and applications of aquatic chemistry. John Wiley and sons, New York, USA

Murphy EM and Ginn TR (2000) Modeling microbial processes in porous media. Hydrogeol J 8: 142-158

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G and Renella G (2003) Microbial diversity and soil functions. Eur J Soil Sci 54: 655 - 670

Ostrom NE, Hedin LO, von Fischer JC and Robertson GP (2002) Nitrogen transformations and NO3- removal at a soil stream interface: A stable isotope approach. Ecol Appl 12: 1027 – 1043

Packman AI, Salehin M and Zaramella M (2004) Hyporheic exchange with gravel beds: basic hydrodynamic interactions and bedform-induced advective flows. J Hydraul Eng 130: 647–656

Philippot L, Piutti S, Martin-Laurent F, Halle S and Germon JC (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. Appl Environ Microb 68: 6121 – 6128

Rockhold ML, Yarwood RR and Selker JS (2004) Coupled microbial and transport processes in soil. Vadose Zone J 3: 368-383

Sabater S, Butturini A, Clement JC, Burt T, Dowrick D, Hefting M, Maître V, Pinay G, Postolache C, Rzepecki M and Sabater F (2003) Nitrogen Removal by Riparian Buffers along a European Climatic Gradient: Patterns and Factors of Variation. Ecosystems 6: 20–30

Sánchez-Pérez JM and Trémolières M (2003) Change in groundwater chemistry as a consequence of suppression of floods: the case of the Rhine floodplain. J Hydrol 270: 89– 104

Stotzky G (1997) Soil as an environment for microbial life. In: Modern Soil Microbiology,

eds Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H., Marcel Dekker, NY, 1-20

Stumm W and Morgan JJ (1996) Aquatic chemistry: Chemical equilibra and rates in natural waters. John Wiley and sons, New York, USA

Tiedje JM, Sexstone AJ, Myrold DD and Robinson JA (1982) Denitrification: ecological niches, competition and survival. Ant van Leeuwenhoek J Microbiol. 48: 569 - 583

Torsvik V and Øvreås L (2002) Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. Curr Opin Microbiol 5: 240–245

Vandenkoornhuyse P, Ridgeway K, Watson IJ, Fitter AH and Young JPW (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. Mol Ecol 12: 3085-3095

Vidon PGF and Hill AR (2004) Landscape controls on the hydrology of stream riparian zones. J Hydrol 292: 210–228

Warren FJ, Waddington JM, Bourbonniere RA and Day SM (2001) Effect of drought on hydrology and sulphate dynamics in a temperate swamp. Hydrol Process 15: 3133-3150

Whalen JK and Warman PR (1996) Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. Biol Fert Soils 22: 373-378

The R project for statistical computing (2003) http://www.r-project.org. Cited 01 Dec 2006

# PARTIE IV

## Influence des circulations hydrologiques horizontales sur la structure des communautés bactériennes

Ce chapitre porte sur l'influence des circulations hydrologiques horizontales à l'interface sol/nappe/rivière. Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article qui sera soumis à Microbial Ecology.

## 1 – Résumé

L'influence des circulations hydrologiques sur la biomasse et la diversité bactérienne est encore peu connue (Fisk *et al*., 2003). Il est donc intéressant d'analyser comment les circulations hydrologiques et les flux de nutriments associés peuvent avoir un impact sur la structure des communautés bactériennes. Un travail mené précédemment sur le terrain a pointé l'influence des conditions hydrologiques sur la variabilité spatio-temporelle des conditions redox du milieu et donc de réactions biogéochimiques mises en jeu dans une tourbière (Auterives, 2007). Deux sites au sein de cette tourbière (maris du Cotentin) ont été suivis durant deux années d'un point de vue hydrologique et hydro biogéochimique. Ces sites diffèrent de par l'importance de flux horizontaux depuis la rivière vers la nappe de la tourbe. Un site (site S) est influencé par des pompages dans l'aquifère sous-jacent à la tourbière qui induisent un flux continu de la rivière vers la nappe de la tourbe ; un second site (site G) constitue un témoin non influencé où les flux horizontaux sont limités à une partie de l'année seulement. Sur les bases de ces travaux, une étude expérimentale a été menée en laboratoire. L'objectif est de déterminer les facteurs influençant la variabilité et la dynamique spatio-temporelle des teneurs en nitrates et sulfates. Cette détermination passe d'une part par la compréhension des processus bio-géochimiques (Partie III) se réalisant au sein de la tourbe, et d'autre part en testant l'impact de l'apport de nitrate et des conditions d'oxygénation sur différents sols qui sont sur le terrain soumis à des conditions hydrologiques différentes. La présence de nitrates et la disponibilité en oxygène sont des facteurs connus pour influencer le processus de dénitrification mais quel rôle ont-ils exactement sur les structures des communautés de bactéries réduisant les nitrates ? En soumettant ces sols au même ensemble de conditions physico-chimiques, on souhaite tester l'effet du conditionnement hydrologique sur la réactivité biochimique. Pour répondre à ces questions la structure des communautés bactériennes dénitrifiantes a été déterminée en utilisant l'amplification spécifique du gène *narG*. Ce gène codant pour l'une des enzymes de la dénitrification est présent dans de très nombreux micro-organismes : sa diversité de forme rend donc compte de la diversité des organismes assurant cette fonction.

L'analyse de la diversité a été abordée par une approche de T-RFLP. Ainsi en comparant les signatures de diversité, le travail adresse des questions en regard *i*) à la spécificité des communautés bactériennes réduisant les nitrates lorsque ces communautés sont issues de différents sols soumis à des conditions hydrologiques différentes, et *ii*) à la stabilité

temporelle de ces mêmes communautés sous différentes concentrations en nitrates et disponibilités en oxygène.

L'analyse de structure de communauté a été réalisée sur des prélèvements effectués au cours de l'expérimentation. Une double extraction suivie d'une purification a été effectuée pour éliminer les inhibiteurs de la réaction de polymérisation de l'ADN. En effet, les sols tourbeux sont riches en molécules aromatiques de type acides humiques et acides fulviques, connus pour être des inhibiteurs de la réaction de polymérisation de l'ADN. Les matériaux humiques dans les sols ont des caractéristiques de taille et de charge similaires à l'ADN résultant de leur co-purification (Holben, 1994).

Les résultats obtenus montrent que le site d'origine de la tourbe et le temps au cours de l'expérience (t1 / t2) jouent un rôle primordial sur la structure de la communauté. Dans une moindre mesure, les conditions d'oxygénation, semblent elles aussi structurer les communautés. En revanche, l'ajout de nitrate et la distance à la rivière ne semblent pas avoir d'impact à court terme sur les structures de communautés.

Les échantillons issus des sites soumis à des conditions hydrogéologiques distinctes montrent une composition légèrement différente en début d'expérience qui est amplifiée au cours de l'expérience. Le site témoin (site G) est plus touché que le site influencé (site S). Cette différence entre les sites a été considérée comme un impact à long terme des conditions hydrologiques. Les modifications de conditions hydrologiques ont induit des caractéristiques physiques et chimiques pouvant structurer différemment les communautés. De plus nous avons montré que les facteurs qui jouent un rôle sur la diversité des bactéries dénitrifiantes et sur les fonctions de dénitrifications ne sont pas les mêmes.

# Influence of hydrological fluxes on the structure of nitrate-reducing bacteria communities in a peatland

**Bougon N.**[1&2], Aquilina L.[1], Briand M.P.[2] and Vandenkoornhuyse P.[2]

[1] IFR2116/FR 90 CAREN- UMR 6118 Géosciences, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Avenue Leclerc, F-35042 Rennes, France

[2] IFR2116/FR 90 CAREN- UMR 6553 EcoBio, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Avenue Leclerc, F-35042 Rennes, France

**Abstract**

Impact of hydrological fluxes on microbial community structure is poorly understood (Fisk *et al.*, 2003). A recent study (Bougon *et al.*, part III) has investigated through laboratory experiments different factors which influence the nitrate and sulfate concentration dynamics which have been observed in the field (Auterives 2007). Bougon *et al.* (part III) emphasized the effects of redox conditions and nutrient fluxes on microbial activity, such effects being influenced on site, by the hydrological conditions. However, the laboratory experiments indicate that peat samples from sites bearing different hydrologic regimes present different microbial activity independently of oxygenation conditions. In the present study, the effects of redox conditions and nutrient fluxes on nitrate reducer community were assessed. Analyses of nitrate reducer diversity and structure were performed using the specific *narG* gene and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) techniques. The influence of parameters such as nitrates and oxygen concentration on community structure was compared for peat samples from different hydrologic regimes. The nitrate reducer community was unexpectedly fond similar at the beginning of the experiment wathever the peatland soil analysed and although the samples came from contrasting environments in terms of hydrology and location. However, a strong structuration of the nitrate reducer community was highlighted after 76 hours of the experiment. This divergence among microbial communities appeared oriented since this structuration was site dependant. These modifications in microbial community were interpreted as a consequence of the distinct hydrologic regimes, the difference of peat saturation at the sampling sites. Among the forcing variables tested, the oxygenation condition impact on nitrate reducers' communities' composition while addition of nitrate do not have any consequence on community structure during the experiment. This

study shows that a physical constraint as the hydrologic regime might be fundamental in the microbial community composition.

Keywords : diversity, environmental legacies, hydrological flowpaths, denitrification, nitrate reducers, T-RFLP

## 2 – Introduction

Bacterial diversity and bacterial communities from soils are known to be sensitive to the environmental conditions such as stress and disturbance (Øvreås, 2000; Denaro *et al.*, 2005). Bacteria can react rapidly to perturbations because they are able to divide and grow quickly. Fierer and Jackson (2006) reported the importance of pH in the control of the microbial diversity at large scale. Among others, Wallenstein and collaborators (2006) highlighted that the nitrate reducing bacterial community is controlled by carbon availability, temperature, moisture, pH, predation and disturbance. Such parameters are described as distal controls while proximal controls such as oxygenation, carbon availability, pH and temperature affect the denitrification rates. Microbial and biogeochemical processes interaction are well documented (e.g : Hedin *et al*., 1998 ; Bilanovic *et al*., 1999 ; Ostrom *et al*., 2002 ; Cannavo *et al*., 2004) in river sediments and wetlands, especially as regards nitrate reduction through denitrification. These nitrate reducing bacteria are generally considered as good models to study the influence of microbial diversity on ecosystem functioning because they constitute a phylogenetically diverse group of soil microorganisms (Tiedje, 1994; Zumft, 1992; Zumft et al., 1997). A lot of work has been done on denitrification processes because of its importance in the N cycling (Schlesinger, 1997) and because they might both be affected by and contribute to global changes. Denitrifying enzymatic activity seems to be affected by $CO_2$ elevation (Barnard *et al.,* 1995). In the N cycling, NO and $N_2O$ emission from the ecosystems to the atmosphere impact on the global warming (Prather *et al.,* 2001). The production of NO and $N_2O$ in ecosystems is controlled by the nitrate reducing microbes, so modifications in community composition or activity might have important effects on the N turnover and ecosystem functioning (Perry *et al.,* 89; Øvreås, 2000). Different genes are involved in the processes of denitrification : *nar*, *nir*, *nos* and *nis*. The *narG* gene catalyses the reduction of nitrate to nitrite. This gene is harboured by many bacteria in the environment (Firmicutes, Actinomycetes, Proteobacteria…). It is present in Gram negative and positive bacteria and

shows a good level of congruence with 16S rDNA gene tree phylogeny (Philippot, 2002; Chèneby *et al.,* 2003). Analysing this gene allows to focus on the nitrate reducing bacteria.
Based on field study that highlighted the influence of hydrological conditions on spatiotemporal variability of redox conditions and thus on biogeochemical reactions that take place in a peatland (Auterives, 2007), we have setup a laboratory experiment to model the field conditions. The investigation of factors influencing the spatio-temporal variability and dynamic of nitrate and sulfate concentrations was investigated by testing the impact of nitrate addition and oxygenation conditions on different soils bearing different hydrological conditions on site (Bougon et al., part III). Nitrates and oxygen availability are known to affect the denitrification process. However the influence of water fluxes is less understood. The experimental results obtained (Bougon et al., part III) are in agreement with the field observations. The experimental investigation shows clear differences between the sites, even with similar experimental conditions. These differences allowed us to conclude that the different hydrogeological settings have led to the development of specific ecosystems. However, part of these parameters on nitrate reducing bacteria community remains unknown, as well as how hydrological conditions influence the community. In the present work, the structure of nitrate reducer community was determined by specific amplification of the *narG* genes. The pattern of the nitrate reducer communities was analysed by studying the T-RFLPs diversity signatures of the amplified *narG* genes. Diversity signatures generated by T-RFLP profiles can be easily compared to other signatures. By Comparing the terminal restriction fragment (T-RF) patterns, this study addressed questions regarding the specificity of the nitrate reducing community of the different hydrogeological settings and the temporal stability of nitrate reducing community under different nitrate concentrations and oxygen availability under laboratory conditions.

## 3. Material and methods

### 3.1 - Site description

The studied site is located in south Normandy, 49°15’ N, 1°20’W. The climate is oceanic with a mean annual precipitation of 920 +/- 170 mm per year. The site is a peatland that belongs to the ‘Marais du Cotentin et du Bessin’ regional natural park. The peat is a fen with mainly herbaceous plant communities. The site is under human influence, i.e. used for cattle grazing during the dry season, and drained by ditches. The peat lies on a sandy geological formation

(Mio – Pliocene) that fills an eighty-meter thick graben limited by large faults. The sand high permeability provides high aquifer quality to the geological system and this basin is pumped for drinking water supply. The hydrogeological and water chemistry parameters have been monitored from 2002 to 2005 (Auterives, 2007). The experimental area includes two studied sites (Fig.IV-1): the first one corresponds to a pumping site (S site), and the second one is located one kilometer downstream and is used as a reference site (G site). The hydrological fluxes in both sites were determined through a river level and piezometer monitoring, both in the deep sand aquifer and in the peat itself at different depths (from 1.5 to 5 m). In the peat, piezometers were set up along a river-peat transect. The two areas exhibit clearly distinct hydrogeological conditions (Auterives, 2007). Pumping in the sand aquifer leads to a lowering of the sand aquifer water table (close to 1.5 m). This decrease leads to high water fluxes from the peat downward to the sand aquifer in pumping S site, especially in the left bank. This vertical flow induces a horizontal permanent flux from the river to the peat. Hydrogeological monitoring allowed the water budget for the peat in both sites to be computed. Data indicate that the peatland water inflow at pumping S site is related to the precipitations and to the permanent stream inflow. By contrast, the peatland water inflow at reference G site is only controlled by precipitations. In reference G site, the stream-peat connection occurs only during high-water periods as water flows from the stream to the peat layer.

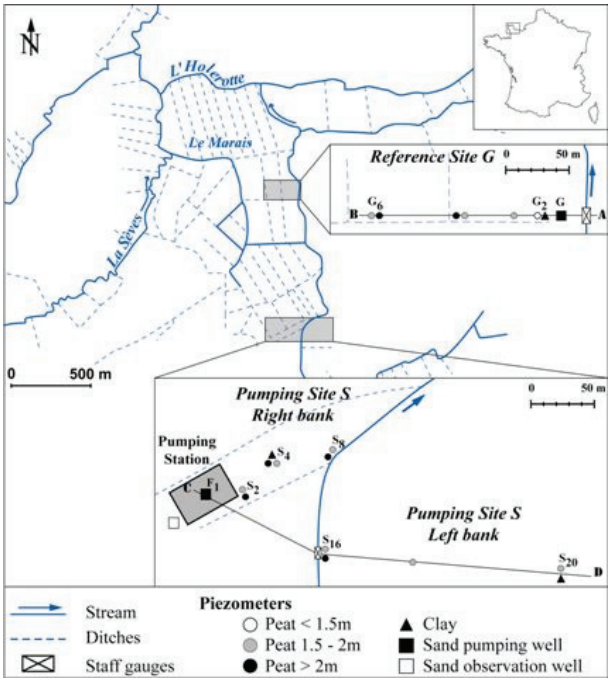



**Figure IV-1 Piezometer map. (Auterives, 2007)**

### 3.2 - Experimental design

Peat samples were collected with an auger in March 2004 at the pumping S site and the reference G site, at a horizontal distance of 1 meter (defined as 'close to') and 100 meters (defined as 'distant from') from the stream, respectively. At pumping S site, we collected samples from each side of the stream (left and right banks) (Fig.IV-2). The sampling depth varied from 50 to 80 cm. For these samples, biogeochemical characteristics indicated variable redox conditions from one station to the other (Table IV-1). After sampling, roots were removed and the soil was homogenized. The pH was determined using the AFNOR NF X 31-103 method (Table IV-1) and soil was stored at 4°C during 2 days. The moisture was determined from weight loss of 30-g samples after heating at 45°C during 48 h. The sulfur / carbon ratio and the total carbon content were analyzed with a CHNSO EA1108 Carlo-Erba, using the ignition loss method.

We investigated the evolution of anion concentrations over time under high and low nitrate concentrations (Fig.IV-2). Thirty grams of wet soil were placed in 250 mL serum flasks with 100 ml of synthetic solution (40 mg/L of $Cl^-$ as NaCl). The ionic water composition was identical to the field stream composition although we used a synthetic solution. The soil-water ratio ranged from 1/10 to 1/20, taking into account the soil moisture. No nitrate was added for the low nitrate samples. In the high nitrate concentration experiments, 30 mg/L of $NO_3^-$ (as $NaNO_3$) were added. Two incubation conditions were used, i.e. oxic and anoxic, the later consisting of a nitrogen atmosphere. The anaerobic atmosphere was prepared by flushing three times most of the bioreactors with nitrogen gas. The aerobic conditions of the other part of the bioreactors were maintained through a continuous shaking during the experiment to limit the possible development of anoxic micro-sites. One hour before each sampling, all the flasks were stirred for water homogenization and then remained unmoved for particle deposition. Five milliliters of the solution contained in each bioreactor were sampled with a syringe after 1, 9, 25, 76 and 240 h of incubation. From these 5 ml, 3 were used to analyze the concentration of major anions, $Cl^-$, $SO_4^{2-}$ and $NO_3^-$, by ionic chromatography (Dionex©DX120). Two milliliters were used to extract the DNA to analyze the nitrate reducer community (see below).

Abiotic controls consisted in sterilized peat samples. To avoid alteration of the soil physical structure, gamma ray irradiation (60 kGray) was performed at the Bureau for Atomic Energy (CEA, Cadarache, France). The sterilized peat soil samples were included in the experimental design to obtain controls for all the experimental treatments.

Triplicates were performed under each experimental condition to control the potential variability related to peat heterogeneity.

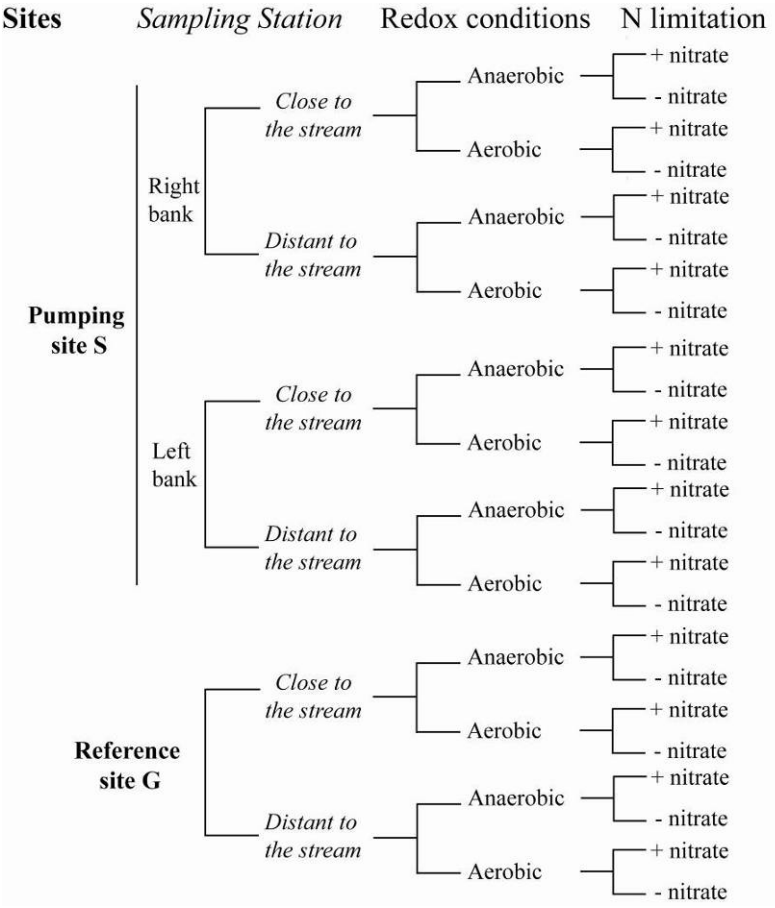



**Figure IV-2: Design of the experiment.** (Bougon *et al.*, part III) 'Anaerobic condition' indicates that the ambient atmosphere is changed to $N_2$. '+ or - nitrate' corresponds to the addition and lack of addition of nitrate in the flask. All the conditions were repeated three times to allow statistical analysis.

**Tableau IV-1: Characteristics of sulfur and carbon content in soil extracted in the Carentan sites**

| Sites | Sampling station | Soil profil | pH | % C | % S | % N | % O |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reference site G | close to the stream | 0 to 15 cm : soil<br>15 to 50 cm : ballast<br>+ 50 cm : peat | 5.8 | 40,14 ± 3.08 | 0,49 ± 0.08 | 1.87 ± 0.04 | 15.44 ± 1.15 |
| | Distant to the stream | 0 to ∞ cm : peat | 5.2 | 24,70 ± 1.54 | ND | 2.56 ± 0.18 | 27.61 ± 2.36 |
| Pumping site S Right Side | close to the stream | 0 to 15 cm : soil<br>15 to 50 cm : ballast<br>+ 50 cm : peat | 4.5 | 44,91 ± 1.73 | 1,04 ± 0.03 | 2.21 ± 0.11 | 31.76 ± 0.55 |
| | Distant to the stream | 0 to 15 cm : soil<br>15 to 50 cm : ballast<br>+ 50 cm : peat | 5 | 31,33 ± 2.6 | 0,28 ± 0.05 | 2.21 ± 0.18 | 21.03 ± 1.6 |
| Pumping site S Left Side | close to the stream | 0 to 15 cm : peaty soil<br>15 to 50 cm : clay loam horizon oxidised<br>+ 50 cm : peat | 4.7 | 26,60 ± 1.18 | 0,25 ± 0.02 | 1.86 ± 0.03 | 18.91 ± 0.15 |
| | Distant to the stream | 0 to 10 cm : peaty soil<br>10 to 30 cm : clay loam horizon oxidised<br>+ 30 cm : peat | 4.4 | 32,88 ± 0.77 | 0,49 ± 0.01 | 2.33 ± 0.04 | 22.06 ± 0,32 |

### 3.3 - DNA extraction

Environmental DNA was extracted from the 2 ml of water sampled from the bioreactors. A first step of physical disruption of cells was performed by bead beating at 30/s during 27s. A second step consisted to extract the DNAs by using the QIAamp® DNA mini kit (Qiagen) followed by an additional step using the DNeasy Plant mini kit (Qiagen) accordingly to the manufacturer's recommendations. This unusual 'double extraction' procedure was done to remove from the DNA polyphenol compounds inhibiting the PCR amplification.

### 3.4 - PCR

A representative set of *narG* sequences of bacteria and archaea available from the GenBank database were aligned and conserved regions were selected as possible primer targets. From the preliminary analyses performed, two degenerated primers narGr (5'-TTTTCSTACCAGGTCGC-3') and narGf (5'-TAYGTCGGGCAGGAAAA-3'), were selected to amplify 840bp internal section of *narG* gene. Thus, these primers allowed the amplification of only a part of the gene. In our stringent PCR conditions (see below) the primers produced a specific signal and the subsequent sequence analyses demonstrated that only bacterial *narG* genes were amplified (results not shown).

From this sequence analysis, a variety of *narG* genes were amplified from environmental DNA extracts. As far as we know, there is no primer available yet from the literature that amplified specifically the *narG* gene. Our primers overcome this methodological problem. However, due to the specificity of the primers we cannot assume that all the bacteria having the *narG* gene in their genome are amplifiable. However, we argue that this does not invalidate our data on diversity changes.

PCR amplifications of the *narG* genes from the environmental DNA was performed in a final volume of 25 µl containing 1 µl of purified DNA, 250 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Promega, Madison WI), 1 U of proof reading Taq DNA polymerase (Applied Biosystems) 1 fold concentrated *Taq* DNA polymerase buffer containing 1.25 mM of $Mg^{++}$ (Applied Biosystems) and 8 pM of each primer, narGr and narGf.

PCR amplifications were performed in a MJ Research PTC-100$^{TM}$ thermocycler using an initial step at 94°C for 1 min 30s; followed by 36 cycles of 94°C for 30 s, 51°C minus 0.1°C per cycle for 1 min 15s and 72°C for 1 min 30s. The PCR amplification ended with final

extension step at 72°C for 10 min. Amplified DNA was checked by electrophoresis of 4 µl of PCR product in 1% agarose in 0.5×TBE buffer.

**3.5 - Diversity signatures by Terminal -Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP).**

Primers narGf and narGr were labelled at their 5 ends with fluorescent dyes HEX and 6-FAM, respectively. PCR mixture and cycling regime were similar has written above. The fluorescent PCR amplicons were purified using the High Pure PCR product purification kit (Roche) according to the manufacturer's recommendations.

The restriction maps of a variety of available narG sequences were computed using Sequencher 4.7 (Genecodes) to make the best choice among over than 300 restriction enzymes to generate high polymorphism for the terminal restriction fragments (T-RFs). The sequences used were all those available in GenBank plus unpublished sequences from our own laboratory (phylogenetic analyses are available upon request) generating with the new primers set. On the basis of these known sequences and among others, two different restriction endonuclease enzymes, *Hinf*I and *Sty*I were chosen because they showed a high polymorphism of cleavage sites at the extremities of the amplicons. Each digestion was done on a sterile and low adsorbing microtube (Axygen Scientific, Inc, USA). 20 µL of the 70 µL of purified amplicons was digested with 2 U *Hinf*I and *Sty*I separately (Promega). The mixture was incubated at 37°C for 2 h in their specific one fold concentrated digestion buffer (Promega). The digested products were precipitated with 2 volume of absolute ethanol plus 1/10 volume of 3M Acetate buffer pH 5.6 and placed overnight at -20°C. After a centrifugation at 16400g for 20min at 4°C, each pellet was washed in 200µL of 70% ethanol and spun again at 16400g for 10min. The pellet was dried and resuspended in 10 µL of ultrapure water (Invitrogen).

A 1 µl aliquot of digested products was mixed with 9 µl of deionised formamide and ROX labelled Genescan-400-HD internal line size standard. Samples were altered at 94°C for approximately 1 min. Sizing of T-RFs was performed after electrophoresis on an automatic sequencer ABI 3130*xl* DNA analyser (Applied Biosystems) using Genemapper 3.7 software (Applied Biosystems). The size in basepairs, of T-RFs was estimated by reference to the internal standard. T-RFs sizing under 50bp and upper 400bp were excluded from the analyses. The sequencer detects all fluorescent DNA fragments and a background noise. The mixing samples/formamide, and partial digestions can generated signals that do not correspond to a

true T-RF. To prevent from such artefacts, two true replicates (i.e. independent PCRs and independent digestions) were performed. Besides eliminating inconsistent peaks, these true replicates led to an increase in the number of observed T-RFs per T-RFLP profile by allowing us to retain very small peaks that were present consistently. Therefore, we do not apply herein a minimal cut-off peak height. The replicated profile comparison make possible to determine background noise from the peaks (Vandenkoornhuyse et al., 2003).

### 3.6 - Data analyses

Patterns of nitrate reducing communities

We have noticed that the peak size (height) or peak area of a given T-RF was variable among true replicates. This can be due to the instrument (differences among capillaries in the signal measured), experimental bias in the volume measured and possibly among PCR amplification themselves. Thus, each T-RF was coded as a discrete character (0 for absent or 1 for present) and for all the data, an analytical data set presenting only species richness (presence/absence of a T-RF) is analysed while species evenness (T-RF peak height or surface area) is not considered. According to Vandenkoornhuyse et al. (2002), one interesting way to compare community composition and to assess the community structure is to use the Maximum parsimony procedure, a method which has the main advantage and originality in the fact that only the informative T-RFs are taken into account to compute the topology. Branches and nodes group communities in this respect. Therefore, a heuristic tree search, with tree bisection and reconnection (TBR) as swapping algorithm and 500 replicates of random addition of rows (i.e. nitrate reducing communities) was used to find the shortest tree. Bootstrap support values at the nodes were estimated from 250 replicates.

In addition, the T-RFs data were analysed by a multivariate approach based on the principal component analysis (PCA). New variables are calculated from the original data set (principal component factors). This method is based on extraction of eigenvectors and eigenvalues from matrices of associations between variables (T-RFs) and object (nitrate reducing community in the environmental soil sample). For more accurate analyses and to deal with our dataset, non-centred PCAs were calculated, as these keep the differences of means among variables (i.e. the frequency of observation of each T-RF). In these non centred PCA, the projected variance accounted for 48% of the total variance. In addition, forcing variables (i.e. sampled site, sampling time, oxygenation conditions, addition or not of nitrate) were coded as category variables. A star representation of the non-centred PCA was computed with all the points belonging to one particular forcing variable connected to their corresponding gravity centre

onto the vectorial space. All PCAs were implemented with the ADE-4 software package (Thioulouse et al. 1997).

Genetic diversity (hereafter meaning species richness) was estimated using Shannon index, calculated by the formula:

$$H' = -\sum_{i=1}^{n} Pi \times \log_2 Pi; \quad (1)$$

where Pi is the frequency of a given T-RF. This synthetic index allowed the species richness of nitrate reducing communities among the different forcing variables to be compared.
In addition, the Morisita-Horn index was computed because it is known as one of the most powerful measurement of similarity between quantitative inventories (Magurran, 1998). This index is not influenced by sample size and richness, but measures only similarity. The Morisita-Horn index was calculated as follows:

$$CmH = 2\sum_{i=1}^{n} (ani \times bni)(da + db) \Big/ (aN \times bN) \quad (2)$$

where CmH is the Morisita-Horn index of similarity, N is the total number of species for both communities, aN is the total number of individuals of all species collected at community A, bN is the total number of individuals of all species collected at community B, *ani* is the number of individuals of the $i^{th}$ species collected at community A, *bni* is the number of individuals of the $i^{th}$ species collected at community B. In the denominator, there are two terms that are defined as :

$$da = \sum ani^2 / aN^2 \quad (3)$$

This index was used to compare sample pairs where only one parameter was modified as the comparison between time t1 and t2, presence/absence of nitrates, presence/absence of oxygen, or sites S and G for example. The index was calculated using EstimateS software (Colwell, 2005). The Morisita-Horn index ranges from 0 to 1, with 0 indicating that no species are shared between the two communities and 1 indicating complete identity. Because the index takes species abundance into account, communities that contain the same species but present different specie abundance will have an index value of less than 1 (Schmitt-Wagner et al., 2003).

# 4. Results

## 4.1 - Biogeochemistry

The experiment results (Bougon et al., part III) are in agreement with the field observations : the chloride variations measured are in the range of field observations; the nitrate removal is clearly reproduced, even under oxic conditions and high sulfate concentrations are released during the experiments. Although the control of the temporal evolution of nitrate concentrations was related, in part, to redox conditions and nutrients supply, the experiments also reproduce the spatial variations observed in the field, independently of the redox conditions. A clear difference between reference site G and pumping site S is observed in nitrate removal dynamics (from deviance analysis, $P<0.0001$). Nitrate removal remains lower in site G than in site S.

The experimental investigation showed clear differences between the sites, even with similar experimental conditions. From these differences we conclude that the different hydrogeological settings have led to the development of specific ecosystems. The differences observed in the field are not only related to the variation in physico-chemical conditions under the influence of hydrological conditions. We conclude that the different nitrate reducer functionality is related to hydrological conditions.

| | H' | h Tot | J'=H'/hTot | [CmH] |
|---|---|---|---|---|
| Gt1 | 3.97 | 4.34 | 0.92 | - |
| RBt1 | 4.02 | 4.34 | 0.93 | - |
| LBt1 | 3.84 | 4.34 | 0.89 | - |
| Gt2 | 3.34 | 3.84 | 0.87 | - |
| RBt2 | 3.37 | 3.84 | 0.88 | - |
| LBt2 | 3.16 | 3.84 | 0.87 | - |
| Gt1&2 | 4.47 | 4.54 | 0.98 | 0.16 |
| RBt1&2 | 4.24 | 4.54 | 0.93 | 0.50 |
| LBt1&2 | 4.12 | 4.54 | 0.91 | 0.60 |

**Table IV-2. Shannon-Weaver index (H') calculated per time and per site** and Morisita –Horn indexes (CmH). The h Tot represents the diversity index of the 3 sites combined and J' is used to normalize the index. The Morisita Horn index compares each site per time.

## 4.2 - T-RFLP analyses of Nitrate reducers' community

Rapid changes in nitrate reducing community through time.

Nitrate reducing bacteria diversity was estimated by T-RFs richness and diversity (Table IV-2). The community diversity at the beginning of the experiment seemed higher than after 76 hours of incubation in the bioreactors (Fig. IV-4). This observation is further confirmed by communities comparisons (Fig. IV-3) where rapid changes were highlighted. More precisely, 2 clusters found at the beginning of the experiment disappeared 76 hours later (Fig. IV-4).

Furthermore and accordingly to this result, the abundance of T-RFs was more important in t1 than in t2 (Fig. IV-5). The similarity index of Morisita-Horn throws light on significant differences among communities between time t1 and t2 (Tab. IV-3): the G site showed only 16% of similarity. Changes between t1 and t2 in nitrate-reducer community structure were also shown in the right and left bank sites with 50% and 60%, of similarity respectively.

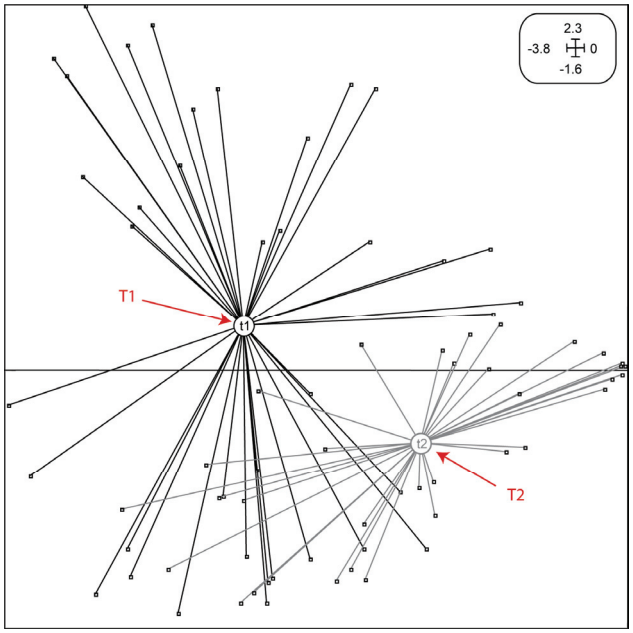



**Figure IV-3: Non Centred PCA analysis showing differentiation among nitrate-reducers' community according to the sampling time**. Samples from the time t1 are represented in black and from the time t2 in grey. Each point represents the nitrate-reducers' community in a specific experimental condition characterized by T-RFLP.

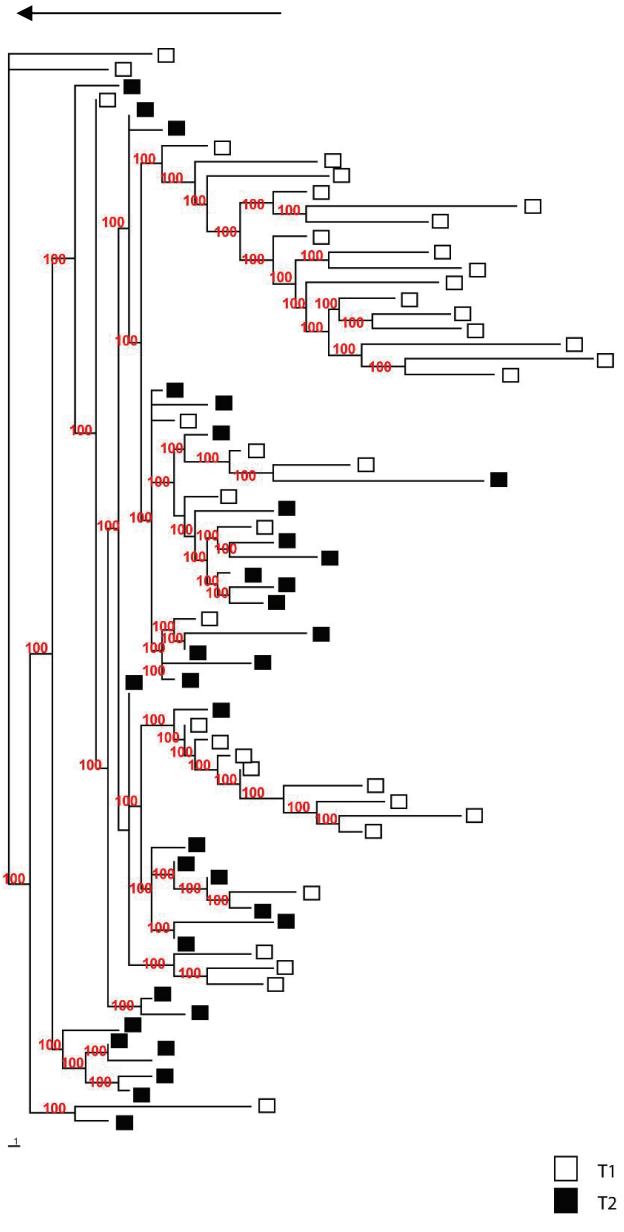



**Figure IV-4: Unrooted maximum parsimony tree showing differences in the composition of nitrate-reducers' communities associated to time 1 (white) and time 2 (black)**. Each terminal corresponds to a nitrate reducers' community for one experimental condition, the closer they are the most similar their diversity signature (T-RFs) is. Scale bar corresponds to gain/loss of one informative taxon.

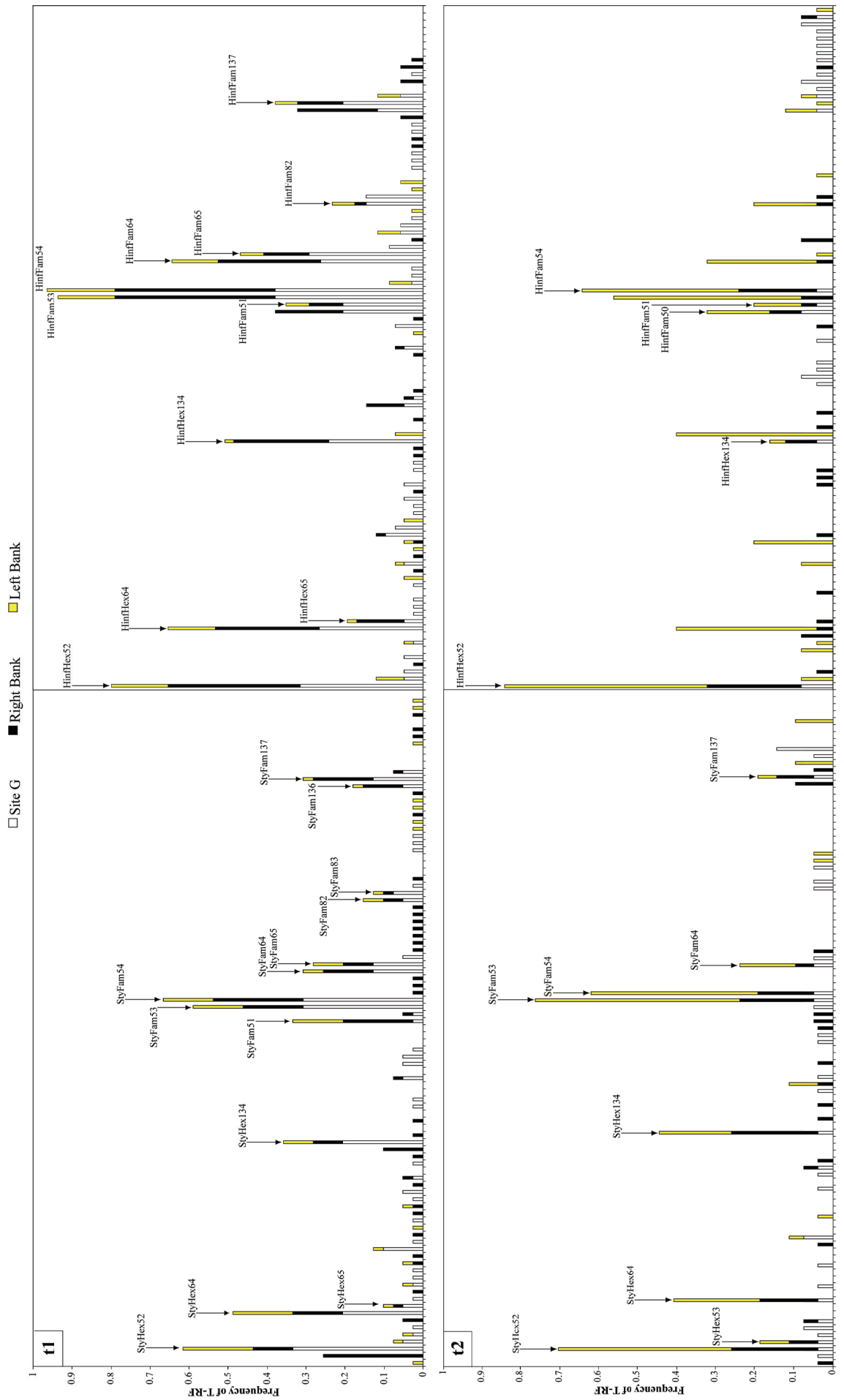



**Figure IV-5: Histogram representation of the restriction fragment in t1 and t2.** The frequency of restriction fragment was calculated from the iRF/to T-RF, where iRF = number of sample containing a specific fragment and to T-RF = total number of RF. The site G is represented in white, the right bank in black and the left bank in grey. Sty = *Sty*I and Hinf = *Hinf*I.

Divergence in the nitrate reducing community depending on soil samples.

Because the original peatland soils were sampled in different locations under different environmental pressures, our working hypothesis was to find different nitrate reducing communities at the beginning of the experiment. The choice of the 2 enzymes used to digest the PCR fragments labelled at the 2 ends to generate the T-RFLPs diversity signatures, produced 199 different T-RFs. A mean of 50 different T-RFs for a given enzyme and a given DNA strand were found across the 91 samples analysed. The resolution of the molecular tool is high as compared to other published works using T-RFLPs (e.g.; Osborn et al., 2000; Vandenkoornhuyse et al, 2003). However the data analyses showed that there was no clear spatial structuration of the nitrate reducing microbial community at the beginning of the experiment (Fig. IV-6). Strikingly, after 76 hours of incubation, we highlighted that the nitrate reducing microbial community from the G site samples diverged from the others (Fig. IV-6; Fig. IV-7)., This result was also expressed within the Morisita-Horn indexes (Tab. IV-3) which were systematically lower in site G time 2.

No clear difference was observed in community composition (Tab. IV-4) as regards the distance from the river within a site, whatever the site and time t1 and t2.

**Table IV-3: Shannon index** calculated for each site per time, with or without N and oxygen supply. The h Tot represents the diversity index of the 3sites combined and J' is used to normalize the index.

| | Nitrate | | | Water | | | without O2 | | | with O2 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | H' | h Tot | J' | H' | h Tot | J' | H' | h Tot | J' | H' | h Tot | J' |
| G t1 | 4.27 | 4.34 | 0.98 | 4.11 | 4.34 | 0.95 | 4,27 | 4,33 | 0,99 | 4,11 | 4,33 | 0,95 |
| G t2 | 2.77 | 3.84 | 0.72 | 3.56 | 3.84 | 0.93 | 3,66 | 3,85 | 0,95 | 2,68 | 3,85 | 0,7 |
| RB t1 | 3.85 | 4.05 | 0.95 | 3.70 | 4.05 | 0.91 | 4,03 | 4,05 | 0,99 | 3,54 | 4,05 | 0,87 |
| RB t2 | 3.63 | 3.78 | 0.96 | 3.22 | 3.78 | 0.85 | 3,54 | 3,78 | 0,94 | 3,31 | 3,78 | 0,87 |
| LB t1 | 3.78 | 3.86 | 0.98 | 3.09 | 3.86 | 0.8 | 3,67 | 3,86 | 0,95 | 3,44 | 3,86 | 0,89 |
| LB t2 | 3.08 | 3.22 | 0.96 | 3.12 | 3.22 | 0.97 | 3,16 | 3,18 | 0,99 | 2,97 | 3,18 | 0,93 |

**Table IV-4: Morisita-Horn index** (CmH) calculated for each site, and the 3 sites to compare samples 'close and distant' in time t1, in time t2 and samples 'time t1 and t2' close to, distant from the stream. The first and the second column compare sample close to and distant from the stream at the time t1 and the time t2. The third and the fourth compare

| | Close/Distant t1 | Close/Distant t2 | Close t1 & t2 | Distant t1 & t2 |
|---|---|---|---|---|
| G [CmH] | 0.78 | 0 | 0.04 | 0.39 |
| RB[CmH] | 0.73 | 0 | 0.86 | 0.41 |
| LB[CmH] | 0.52 | 0.79 | 0.57 | 0.49 |
| the 3 sites[CmH] | 0.88 | 0.73 | 0.71 | 0.69 |

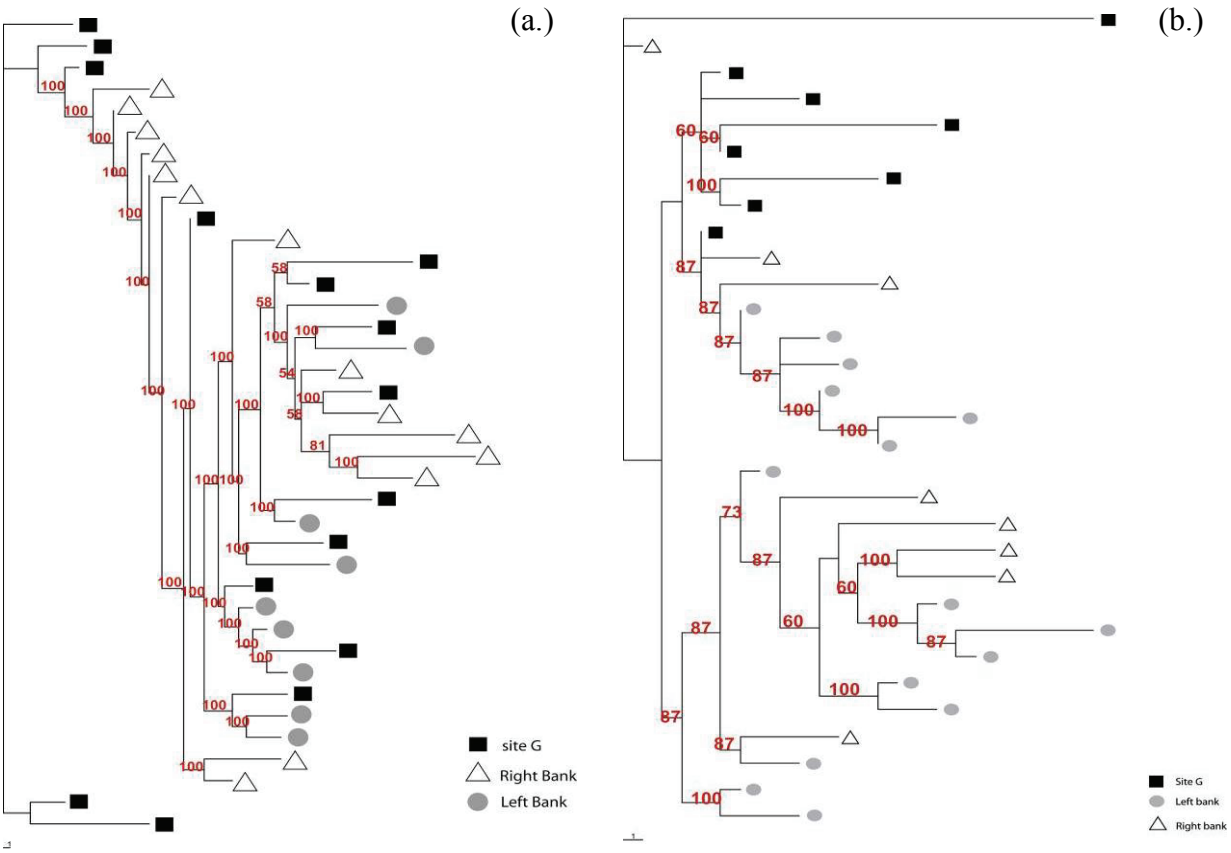



**Figure IV-6: Unrooted maximum parsimony trees showing differences in the composition of nitrate reducers communities** associated to G site (black square), Right bank (white triangle) and left bank (grey circle). a) Representation at the time t1 and b) representation at the time t2. Scale bar corresponds to gain/loss of one informative taxon**.**

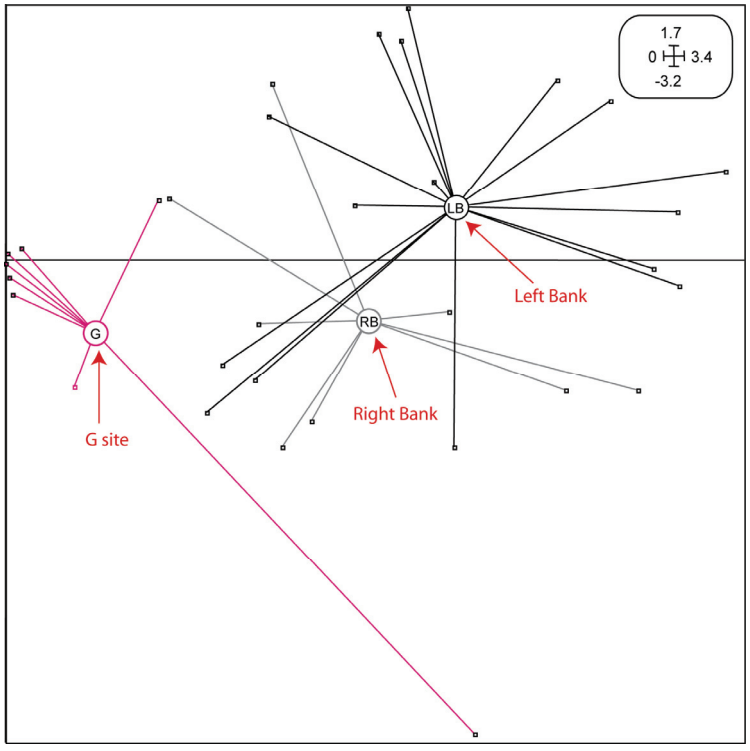



**Figure IV-7 : Non Centred PCA analysis showing differentiation among nitrate reducers' community according to the sampling site in time t2**. Samples from the G site are represented in pink, from the Right bank in grey and from the Left bank in black. Each point represents the nitrate reducers' community in a specific experimental condition characterized by T-RFLP.

Impact of Nitrate addition to the bioreactors**.**

There was no evidence for rapid changes in the nitrate reducing microbial community when nitrate was added to the bioreactors whatever the soil. This is confirmed by the Shannon diversity index and Morisita Horn similarity index which were very similar (Tab. IV-3 and Tab. IV-4).

Impact of the oxic *vs.* anoxic atmospheres.

In contrast to nitrate, the presence of oxygen seemed to impact on the community composition (Fig. IV-8). At the beginning of the experiment, a similar tendency was already visible. Morisita-Horn indexes (Tab. IV-3) show higher values at time 2 in the presence of oxygen than with other conditions at the same time, which indicates that oxygen is a factor inducing changes in the nitrate reducing community structure.

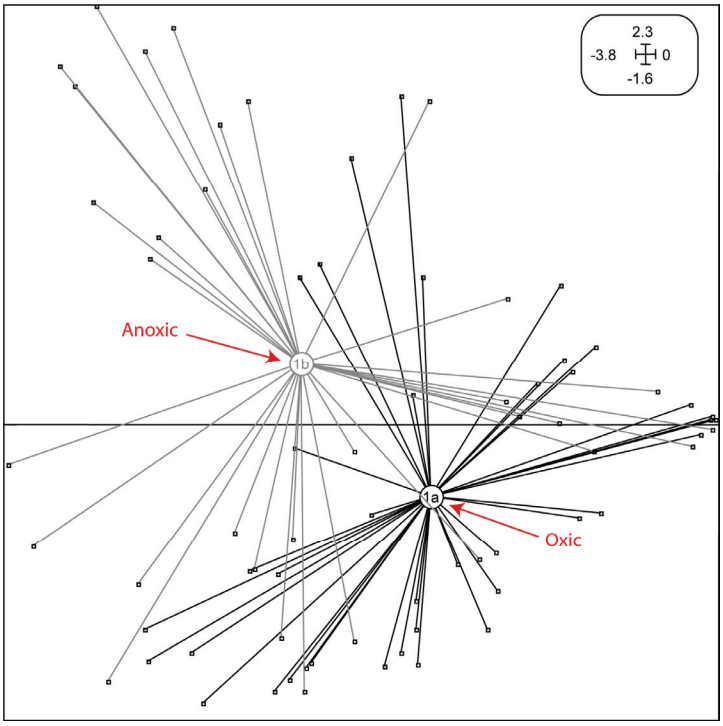



**Figure IV-8 : Non Centred PCA analysis showing differentiation among nitrate reducers' community according to the oxygenation condition** (from t1 & t2). Samples from the oxic atmosphere are represented by in black and from the anoxic atmosphere in grey. Each point represents the nitrate reducers' community in a specific experimental condition characterized by T-RFLP.

## 5. Discussion

In this study we attempted to relate the structure and activity of nitrate reducers' community measurements to chemical and physical parameters which variations were observed on field. The parameters tested were: nitrate supply, presence/absence of oxygen, distance to the stream (close and distant), and hydrological setting (the 3 sites). The working hypotheses were to find different nitrate reducing communities at the beginning of the experiment (site impact) and to determine the influence of nitrate and oxygen availability on the nitrate reducing communities.

Microbial community structures were determined by culture-independent molecular methods. T-RFLP strategy has proven to be a powerful way to compare communities (e.g. Johnson *et al*., 2004; Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003). The different steps (DNA extraction, PCR, T-RFLP analysis) have some pitfalls (Von Wintzingerode *et al.*, 1997; Röling *et al.*, 2001). One of the drawbacks is that we focused on a gene that can have one to three copies per genome (Philippot, 2002; López-Gutiérrez, 2004). However each sample has been treated in the same way and the evenness was not taken into account. We thus considered that this intrinsic problem was addressed by the way we analysed the data.We assumed that the differences observed are due to the tested parameters.

***Impact of time.*** Impact of time is clearly the parameter which has the major impact of the bacterial communities (Fig. IV-3). Parsimony trees (Fig. IV-6) and Morisita-Horn indexes indicate that during the experiments, communities have strongly changed. This fact is really striking given the short time period necessary to observe the phenomenon (i.e. 76 hours only). Shannon indexes (Tab. IV-3) indicate that the most important loss of diversity is related to time 1 *versus* time 2 whatever other conditions tested (nitrate addition or oxygen presence). However, even if for each condition (nitrate or oxygen in Tab. IV-3) a decrease of Shannon indexes is observed, the global diversity index remains similar for each site when all the conditions are grouped (Tab. IV-2). These results indicate that *i)* during all the experiments, the nitrate reducing bacterial communities have changed towards more specialized or adapted structures, relatively independently of the redox conditions, and *ii)* this modification did not however leads to more similar communities. The different communities appearing during the experiments were related to (1) oxygen conditions and (2) hydrological origin of soil sampling site, as explained below.

The effect of time, whatever other conditions are, can be related to the fact that introducing the soil into all the various experimental conditions has led to a rehumectation of the soil. Within all the experiments, synthetic water solution has been added to the soil corresponding in term of mineral concentrations to field conditions. Bacteria have a rapid growth-rate which allows them to respond to low levels of pollutions as well as physical, chemical and biological environment disturbances (Sorci *et al.*, 1999; Ford, 2000; Galloway *et al.*, 2002; Denaro *et al.*, 2005). The nitrate reducing bacterial communities have faced modifications related to the laboratory experiments. We suggest that these changes are a consequence of water additionwhich should impact on the bacterial activity by giving access to the micro-organisms of different quantity of available nutrients. This hypothesis by itself can explain the community structuration observed.

***Impact of Nitrate supply on nitrate reducers*** The role of nitrate on structure of denitrifiers is a matter of debate. Mergel et al. (2001) highlighted that the nitrate concentrations have no impact on structure and abundance of denitrifiers whilst Wolsing and Priemé (2004) had a contrary conclusion. We observed no clear community-difference related to the initial nitrate concentration variation (Tab. IV-3 and Tab. IV-4). The lack of initial nitrate impact on the community can be explained by the fact that naturally nitrogen is not a limiting factor. This might be particularly true in a relatively agricultural environment which lead to high nitrogen loads on soils. If this is true, one can expect that the nitrate enrichment would have a little impact on nitrate reducing community composition. During the experiment, the stress effect imposed by nitrate addition did not have an impact on the nitrate reducing microbial community structure for the soils analysed. This is consistent with the concept that denitrifier community structure and abundance is primarily controlled by factors other than $NO_3$ supply. Effectively, the laboratory experiments showed (Bougon *et al.*, Part III) that oxygenation conditions only slightly affect the denitrification rates. Meaning while, the results shown herein indicated that oxygen conditions and water supply modified the nitrate reducers community.

***Impact of oxic-anoxic atmosphere on nitrate reducers***. The non centred PCA calculated for all samples from the 3 sites, independently of the time (Fig. IV-8) showed a great differenciation. However, most of the described denitrifiers are facultative anaerobes and therefore can be found in oxygenated waters (Zumft, 1992) and it has been shown that many

potential denitrifiers can successfully compete with aerobic heterotrophs (Tiedje, 1988). We therefore interpret the T-RFLP difference of Fig. IV-8 as a changing inthe community composition related to changes in the competitiveness. A shift of denitrifiers' community shown by *nir*S analysis has also been described by Hannig et al. (2006) as a consequence of physico-chemical gradients and oxygen conditions.

***Impact of site***. Physical parameters such as hydraulic conductivity show similar values in the different field sites G and S (Auterives, 2007). Chemical parameters such as CHNOS, DOC concentrations and pH were measured on field and presented minor differences between sites. The pumping S site displayed less nitrate concentrations variability, and is slightly more acidic, presents C/N ratios in the same order of magnitude (Tabl. IV-1), and DOC concentrations lower than in the upper part of the G site profile (40-60 vs 60-100 mg/L). The major site distinction is related to their hydrological flowpaths. The peatland watershed at the pumping S site is related to a permanent stream inflow. A vertical flux from the peat to the underlying sand-aquifer was also observed during a large part of the hydrological cycle. By contrast, the peatland water table at reference G site was only controlled by precipitations. In the reference G site, the stream-peat connection (i.e. water flows from the stream to the peat layer) occurred only during high-water periods and no downward vertical fluxes were observed. As a whole, the hydrogeological context leads to continuous and important fluxes in the pumping S site and longer residence time in the reference G site. From the experimental results, we highlighted (Bougon *et al.,* part III) differences in denitrification rates and community structure (Fig. IV-7) among the sampling sites for similar experimental conditions. Soils from the pumping S site seem to be more reactive than soils from the reference G site, which confirms the field observations (Bougon *et al.,* part III). From the difference of activity observed both on field and during the laboratory experiments between the 2 sites we suggested a difference of nitrate reducer's communities.

Few difference were observed between sites at the beginning of the experiment (Fig. IV-6) but differences are amplified along the experiment (Fig. IV-4, Fig. IV-5, Fig. IV-7). For the soil samples from each site, nitrate reducers' community became more specialized during the experiments, although the diversity loss is more important for the reference G site. Fierer and Jackson (2006) have demonstrated, for soils from various latitudes, that the fundamental parameter controlling the microbial diversity was the pH. Our results do not agree with this conclusion. None of the parameter tested alone explained the modification observed, which

was clearly related to the constitution of different communities within all the bioreactors from each site, as a response of the water saturation at the beginning of the experiment (Fig. IV-7). Differences between sites may be due to remnant effects of historical events (Martiny *et al.,* 2006). Hydrological flowpaths can impact on the microbial activity through the modification of substrate availability (Ostrom *et al.*, 2002, Sabater *et al.*, 2003, Sanchez Perez and Tremolière, 2003). Moreover hydrological condition can affect the organic matter, pH, temperature, soil humidity; factors known to influence composition and distribution of biotic community (Beare *et al.*., 1995; Martin *et al.*, 1999; Stotzky, 1997). In the G site, chemical variations are rare but drastic and no water fluxes allow strong chemical exchanges. On the contrary, in the S site, the chemical changes are more frequent, although less important and the water fluxes are dominant which allows bacterial and chemical exchanges. Such condition variations have not led to different bacterial reducers community since no clear site difference was observed at the beginning of the experiment which was unexpected. Hydrological fluxes have induced however a different response of the communities facing the full saturation of the peat (fig. IV-8) with a differentiation of the nitrate reducers' community among sites. Furthermore it should be underlined that this community structuration is oriented similarly among soil samples of a given site (i.e. replicates of soil samplings close and distant to the stream within S site and G site). To explain this oriented structuration of the communities, we can speculate that the constant hydrological flux in the peat from pumping S site has possibly resulted in the selection of a more adapted microorganisms community to the flooding state and related chemical nutrients availability compared to the microorganisms from the G site. This difference in the hydrological regime among the sites seems to be the major driving force explaining this structuration.

**Functionality and diversity.** The interface stream – water table has been defined as a highly biological reactive zone (Hedin *et al*., 1998). The constant connection river-peatland enhances the DOC availability and thus the microbial activity (Hill *et al.*, 2000; Mitchell and Branfireun, 2005). Organic carbon is known to play an essential part in the enzymatic control of the heterotrophic denitrification (Tiedje *et al*., 1982). This is coherent with results of the investigated peat (Auterives, 2007).

We have shown during the bioreactor experiments (Bougon *et al.*, part III) that the kinetic of nitrate reduction was mainly controlled by the oxygenation conditions while the nitrate addition onto the bioreactors does not have a significant impact on the process. T-RFLP

analyses indicate no effect of nitrate addition on the nitrate reducers' community and only a slight effect of oxygenation conditions were observed. This result indicates that factors influencing functions and diversity are different. This observation has also been described by different authors (Enwall *et al.,* 2005; Wallenstein *et al.*, 2006). Cavigelli and Roberston (2001) explained that the presence of oxygen can control the induction of the *narG* gene. Nitrate addition, oxygenation condition and the quality of C available (Martino *et al.*, 1998) have been described as the essential factors controlling the nitrate reduction in soil (Kwnoles, 1982; Ingersoll Baker 1998; Clément *et al.,* 2002; Florinski, 2004; Wallenstein, 2006). The lack of agreement between the community structure and the potential activity of the denitrifying community is not surprising, since other factors, such as the density of denitrifiers are likely to influence the potential activity (Philippot and Hallin, 2005). To address the denitrification function, the quantitative measure of transcription of different genes of the denitrification pathway by RT-qPCR should provide a good solution. In any case, the analysis of the qualitative composition of the nitrate reducers could not provide informations about the functioning of these microorganisms. In addition, different denitrifying populations have contrasting physiological characteristics, such as growth kinetics or sensitivity of enzymes to oxygen, which are not taken into account when potential denitrifying activity measurements are used (Cavigelli and Robertson, 2000; Holtan –Hartwig et al., 2000).

We can conclude that that the community structure of nitrate reducers' and the function of denitrification re not controlled by the same factors. Among the parameters controlling microbial communities, physicochemical parameters (among others, redox conditions, C/N, pH) and biotic interactions are extensively documented. However, as shown herein, other parameters such as the hydrological regime and related available nutrients might be even more important. Hydrological regime control constitutes a long term parameters which plays a key role as regard to others parameters and can be consider as a long-lasting legacy in the context of our study.

## 7. References

Auterives C. (2007) Influence des flux d'eau souterraine entre une zone humide superficielle et un aquifère profond sur le fonctionnement hydrochimique des tourbières : exemple des Marais du Cotentin, Basse-Normandie. Mémoires du Caren, Rennes, 17, 261p

Barnard R., Leadley P.W. and Hungate B.A. (2005) Global change, nitrification, and denitrification: A review, Global Biogeochemical. Cycles, 19, GB1007, doi:10.1029/2004GB002282

Beare M.H., Coleman D.C., Crossley D.A. Jr, Hendrix P.F. and Odum E.P. (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. Plant and Soil, 170: 5–22

Bilanovic D., Battistoni P., Cecchi F., Pavan P., and Mata-Alvarez J. (1999) Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. Water Resource, 33: 3311 – 3320

Bougon N., Aquilina L., Auterives C. and Vandenkoornhuyse P. Influence of hydrological fluxes on bio-geochemical processes in a peatland. Submitted to biogeochemistry

Cannavo P., Richaume A. and Lafolie F. (2004) Fate of nitrogen and carbone in the vadose zone: in situ and laboratory measurements of seasonal variations in aerobic respiratory and denitrifying activities. Soil Biology and Biochemistry, 36: 463 – 478

Cavigelli M.A. and Robertson G.P. (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. Ecology, 81: 229 - 241.

Chèneby D., Hallet S., Mondon A., Martin-Laurent F., Germon J.C.and Philippot L. (2003) Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. Microbial Ecology, 46: 113-121

Clément J.C., Pinay G. and Marmonier P. (2002) Seasonal dynamics of denitrification along topohydrosequences in three different riparian wetlands. Journal of Environmental Quality, 31:1025–37

Colwell R.K. (2005) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: http://purl.oclc.org/estimates.

Denaro R., D'Auria G., Di Marco G., Genovese M., Troussellier M., Yakimov M. M. and Giuliano L. (2005) Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. Environmental Microbiology, 7: 78–87

Enwall K., Philippot L. and Hallin S. (2005) Activity and Composition of the Denitrifying Bacterial Community Respond Differently to Long-Term Fertilization. Applied and Environmental Microbiology, 71: 8335 - 8343.

Florinsky I.V., McMahon S. and Burton D.L. (2004) Topographic control of soil microbial activity: a case study of denitrifiers. Geoderma 119: 33 – 53

Fierer N. and Jackson R. B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, 103: 626–631

Ford T.E. (2000) Response of marine microbial communities to anthropogenic stress. Journal of Aquatic Ecosystem and Stress Recovery, 7: 75–89.

Galloway T.S., Sanger R.C., Smith K.L., Fillmann G., Readman J.W., Ford T.E. and Depledge M.H. (2002) Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. Environmental Science and Technology 36: 2219–2226

Hannig M., Braker G., Dippner J. and Jürgens K. (2006) Linking denitrifier community structure and prevalent biogeochemical parameters in the pelagial of the central Baltic Porpe (Baltic Sea). FEMS Microbial Ecology, 57: 260-271

Hedin L.O., von Fischer J.C., Ostrom N.E., Kennedy B.P., Brown M.G. and Robertson G.P. (1998) Thermodynamic constraints on nitrogen transformations and other biogeochemical processes at soil – stream interfaces. Ecology, 79: 684 – 703

Hill A.R., Devito K.J., Campagnolo S. and Sanmugadas K. (2000) Subsurface denitrification in a forest riparian zone: interactions between hydrology and supplies of nitrate and organic carbon. Biogeochemistry, 51:193–223.

Ingersoll T.L. and Baker L.A. (1998) Nitrate removal in wetland microcosms. Water resource 32 (3): 677 – 684

Johnson D., Vandenkoornhuyse P.J., Leake J.R., Gilbert L., Booth R.E., Grime J.P., Young J.P.W. and Read D.J. (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. New Phytologist, 161:503–515

Knowles R. (1982) Denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 46:43-70

Magurran A.E. (1998) Ecological diversity and its measurements. Princeton university press, Princeton (New Jersey)

López-Gutiérrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G. and Philippot L. (2004) Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 57: 399 - 407

Losos J.B. (1996) Phylogenetic perspectives on community ecology. Ecology, 77:1344 - 1354

Martin T.L., Trevors J.T. and Kaushik N.K. 1999. Soil microbial diversity, community structure and denitrification in a temperate riparian zone. Biodiversity and Conservation, 8: 1057 -1078

Martino D.P., Grossman E.L., Ulrich G.A., Burger,K.C., Schlichenmeyer J.L., Suflita J.M., and Ammerman J.W. (1998). Microbial abundance and activity in a low conductivity aquifer system in east-central Texas. Microbial Ecology, 35: 224-234

Mergel A., Schmitz O., Mallmann T. and Bothe H. (2001) Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. FEMS Microbiology Ecology, 36: 33-42

Mitchell C.P.J and Branfireun B.A. (2005) Hydrogeomorphic Controls on reduction– oxidation conditions across boreal upland–peatland interfaces. Ecosystems, 8: 731-747

Osborn A.M., Moore E.R.B. and Timmis K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics Environmental Microbiology, 2: 39–50

Ostrom N.E., Hedin L.O., von Fischer J.C. and Robertson G.P. (2002) Nitrogen transformations and NO3- removal at a soil stream interface: A stable isotope approach. Ecological Application, 12: 1027 – 1043

Øvreås L. (2000) Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environment. Ecology letters, 3:236-251.

Perry A.D.M., Amaranthus M.P., Borchers J.G., Borchers S.L and Brainerd R.E. (1989) Bootstrapping in ecosystems. Bioscience, 39:230-237

Philippot L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. Biochimica et Biophysica Acta, 1577:355-376

Philippot L. and Hallin S. (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. Current Opinion in Microbiology, 8: 234–239

Prather M., Ehhalt D. et al. (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. Pages 239-288 *in* J.T. Houghton, Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell and C.A. Johnson, editors. Climate change 2001 : the scientific basis. Third Assessment Report in the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, New York, USA.

Röling W.F.M, van Breukelen B.M., Braster M., Lin B. and. van Verseveld H. W. (2001) Relationship between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 67: 4619-4629

Sabater S., Butturini A., Clement J.C., Burt T., Dowrick D., Hefting M., Maître V., Pinay G., Postolache C., Rzepecki M. and Sabater F. (2003) Nitrogen Removal by Riparian Buffers along a European Climatic Gradient: Patterns and Factors of Variation. Ecosystems 6: 20–30

Sánchez-Pérez J.M. and Trémolières M. (2003) Change in groundwater chemistry as a consequence of suppression of floods: the case of the Rhine floodplain. Journal of Hydrology, 270: 89– 104

Schlesinger W.H. (1997) Biogeochemistry: an analysis of global change. Academic Press, San Diego, California, USA

Schmitt-Wagner D., Friedrich M.W., Wagner B. and Brune A. (2003) Axial Dynamics, Stability, and Interspecies Similarity of Bacterial Community Structure in the Highly Compartmentalized Gut of Soil-Feeding Termites (*Cubitermes* spp.). Applied and Environmental Microbiology, 69: 6018-6024

Sorci J., Paulauskis, J.D., and Ford, T. (1999) 16S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial diversity as a biomarker of ecological health in polluted sediments from New Bedford harbor, Massachusetts. Marine Pollution Bulletin, 38: 663–675.

Stotzky G. (1997) Soil as an environment for microbial life. In: van Elsas JD, Trevors JT and Wellington EMH (eds) Modern Soil Microbiology, pp 1–19. Marcel Dekker, New York

Thioulouse J., Chessel D., Doledec S. and Olivier J.M. (1997) ADE-4 : a multivariate analysis and graphical display software. Statitics and computing, 7:75-83

Tiedje J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In : Zhuder, A. (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms. Wiley, New York, pp. 179-244

Tiedje J.M. (1994) Denitrifiers. pp 245-267. Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America journal, Madison, Wisconsin

Tiedje J.M., Sexstone A.J., Myrold D.D. and Robinson J.A. (1982) Denitrification: ecological niches, competition and survival. Antonie van Leeuwenhoek, 48: 569 – 583

Torsvik V., Øvreås L. and Thingstad T.F. (2002) Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. Science, 296:1064-1066

Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T.J., Watson I.J., Duck J.M., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2002) Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Molecular Ecology, 11: 1555-1564

Vandenkoornhuyse P., Ridgway K., Watson I.J., Fitter A.H. and. Young J.P.W. (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. Molecular Ecology, 12: 3085-3095

von Wintzingerode F., Gobel U.B. and Stackebrandt E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 21:213-229

Wallenstein M.D., Myrold D.D., Firestone M. and Voytek M. (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. Ecological Aplications, 16:2143-2152

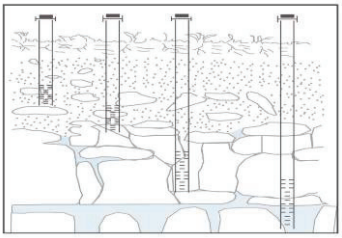
Wolsing M. and Priemé A. (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. FEMS Microbiology Ecology, 48:261-271

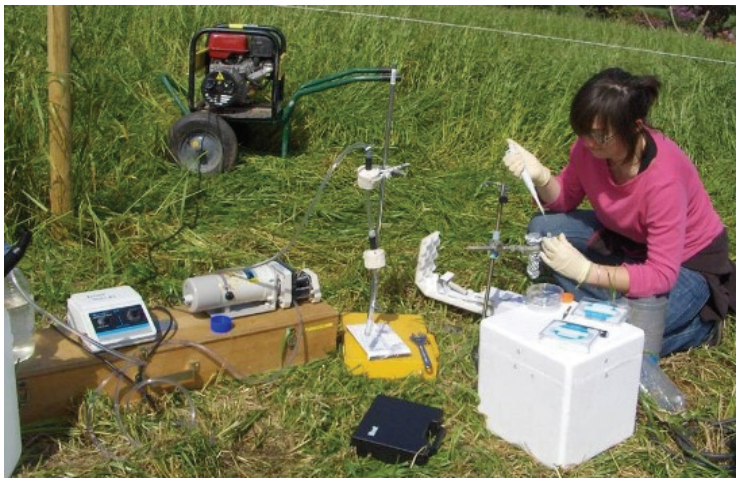
Zumft W.G. (1992) The denitrifying prokaryotes, p. 554–582. *In* A. Balows,H. G. Tru¨per, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation,identification, applications, 2nd ed., vol. 1. Springer-Verlag, NewYork, N.Y.

Zumft W.G (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61:533-552

# PARTIE V

## Influence des circulations hydrologiques verticales sur la structure des communautés bactériennes





Ce chapitre porte sur l'influence des circulations hydrologiques dans la zone de fluctuation de nappe. Ce chapitre a été rédigé sous la forme d'un article et qui sera soumis à Microbial Ecology.

# 1 – Résumé

Dans la zone à saturation variable, les conditions hydrologiques présentent un gradient vertical et temporel. Les conditions changent d'un milieu saturé en permanence en profondeur vers un milieu à saturation variable proche du sol. Ces milieux profonds décrits comme des aquifères pristine sont considérés comme oligotrophes, avec des concentrations en oxygènes et en carbone organique total faibles à la différence du sol qui est un écosystème hautement hétérotrophe, riche en matière organique. Il existe ainsi un fort contraste vertical. Durant les cycles hydrologiques, la zone de saturation temporaire évolue de la période à faible niveau de nappe à la zone de recharge où la zone non saturée devient saturée, permettant ainsi la connexion entre le sol et la zone de l'aquifère saturée en permanence. Cette zone de fluctuation de nappe est principalement décrite comme une zone de transfert. Elle présente cependant des réactions biogéochimiques comme les processus de dénitrification.

L'objectif de cette étude est de déterminer l'influence des circulations hydrologiques dans la zone de fluctuation de nappe sur la structure des communautés microbiennes. Deux analyses de diversité ont été approchées : la diversité taxonomique par l'analyse du gène de ARNr 16S et la diversité fonctionnelle par l'analyse du gène *narG*. Pour analyser la diversité, une approche T-RFLP a été optée.

Les échantillons ont été prélevés à différentes profondeurs (6, 8, 10 et 15m) dans un dispositif en flûte de pan et à différentes dates suivant le cycle hydrologique. Trois prélèvements ont été effectués en hautes eaux et deux en basses eaux. L'eau échantillonnée a été filtrée sur le terrain et les bactéries concentrées sur filtres ont été extraites en laboratoire.

Ce système est caractérisé par une diversité procaryotique faible en nombre d'espèces et le nombre de bactéries est modéré à élevé ($2.10^5$ à $2.10^6$ cellules par mL). Vingt-sept phylotypes d'eubactéries ont été mis en évidence par amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S à partir d'échantillons d'eau prélevés lors de trois campagnes différentes ce qui en dépit de l'effort de séquençage sous-estime le nombre réel de phylotypes. Néanmoins ceux obtenus correspondent aux espèces phylogénétiques les plus accessibles en utilisant les amorces nouvelles. Au moins 6 des phylotypes rencontrés appartiendraient à des classes ou phyla nouveaux de bactéries, dont 4 à l'extérieur des protéobactéries. Les autres phylotypes sont apparentés aux phyla des Actinobacteria (2 phylotypes), aux Bacteroidetes (2 phylotypes) et proteobacteria (17 phylotypes). Ces travaux de séquençage démontrent une

flore microbienne diversifiée et originale puisque approximativement 80% des phylotypes rencontrés sont d'espèce phylogénétique inconnue.

Les analyses de diversité réalisées sur les gènes de l'ARNr 16S et *narG* ont révélé des résultats cohérents avec les analyses chimiques et avec la nature et la rapidité des écoulements.

Les autres résultats majeurs qui ont été obtenus sont :

1. l'influence de la profondeur sur la structure des communautés microbiennes (différence entre 6 et 15m), c'est-à-dire une différence entre la communauté de la zone de fluctuation de nappe et la communauté de la zone à saturation permanente.
2. l'influence du temps à 2 niveaux ; sur le court terme avec une conservation des communautés entre 2 échantillonnages et sur le long terme avec des modifications dans la composition des communautés que nous relions à la contrainte hydrologique, périodes de basses eaux et de hautes eaux.

Par ce travail, nous avons ainsi pu mettre en évidence dans la zone de fluctuation de nappe que la structure des communautés est gouvernée principalement par des paramètres physiques.

# Influence of depth and time on the microbial diversity in a pristine aquifer.

**Bougon N.**[1,2], Aquilina L.[1], Molénat J.[3], Marie D[4]., Chancerelle E.[2] and Vandenkoornhuyse P.[2]

[1] IFR2116/FR 90 CAREN- UMR 6118 Géosciences, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Avenue Leclerc, F-35042 Rennes, France

[2] IFR2116/FR 90 CAREN- UMR 6553 EcoBio, Université de Rennes 1, Campus de Beaulieu, Avenue Leclerc, F-35042 Rennes, France

[3] IFR2116/FR 90 CAREN- UMR INRA 1069 SAS - ENSAR, Rennes, France

[4] Station Biologique, CNRS-INSU et Université Pierre et Marie Curie, Roscoff, France

## Abstract

The bacterial diversity was investigated through cell numeration and 16S rRNA and *narG* genes analyses (sequencing and T-RFLPs), at various depths (6, 8, 10 and 15 m) in a pristine aquifer in Brittany (France). Five campaigns were carried out during three hydrological cycles, in order to investigate the bacterial communities within the variably saturated zone and the permanently saturated zone.

No clear physico-chemical variation was observed neither through time nor depth during these three hydrological cycles. Groundwaters are defined as oligotrophic environment where heterotrophic processes are dominant. Anions ($Cl^-$, $NO_3^-$, $SO_4^{2-}$) chemical concentrations showed a seasonal variation indicating that different physical processes occurred during the recharge process. At 6 m depth, both vertical transfer and horizontal diffusion arised whilst at 15 m depth, a limited vertical transfer took place during the high water table stage.

The sequence analyses highlighted an abundant and original bacterial diversity with approximately 80% of the phylotypes unknown. From the 27 phylogenetic species found, 6 should belong to new classes or phyla.

The *narG* rRNA gene analysis indicated that, although the nitrate reducers are probably an important part of the bacterial communities, no clear variation was observed. either through time or depth. This was attributable to the relatively homogeneous conditions. Oxygen, nitrate and carbon concentrations were rather similar in all the samples. On the other hand, the 16S rRNA gene analyses indicated that bacterial diversity was clearly under the influence of the physical water transfer processes :

(1) At 6 m depth, a specific community was defined from the diversity indexes and the phylogenetic analysis. This community showed a relatively low diversity index and rather low similarity indexes through time. The comparisons among the bacterial communities showed modifications and structuration through time. Communities are supposed to be adapted to the level of water saturation and the time-related variations were interpreted as the influence of (1) vertical solute and bacteria migration by advection and (2) dominant horizontal diffusion process.

(2) At 15 m depth, the diversity is more important and a long-term similarity evolution was observed. Environmental conditions were more constant and the bacterial communities presented a higher homogeneity than those at 6 m depth. During high water table periods, vertical transfer leads to the migration of bacteria from the 6 m depth environment. Such migration induces an enrichment of microbial diversity leading to modification of community structure..

This study demonstrates that communities were structured in the variably and permanently saturated zones. This is true although hydrological continuity allowed the community migration during the high water table periods. We can, thus, suggest that the physical water transfer processes influences the bacterial diversity.

Keywords: hydrology, microbial community, 16S rRNA gene, T-RFLP, water table fluctuation zone

## 2. Introduction

Shallow groundwaters are a key component of the hydrological cycle and the solutes transfer within the watershed. Water table variation is related to transfer from the soil to the groundwater during the recharge period, implying relatively slow water table reactivity to rainfall. The recharge process has been largely investigated, however only few studies focused on the processes governing water flow and solutes transfer in the water table fluctuation zone. Recent studies have identified different processes occurring in the fluctuation zone : rapid vertical fluxes from soil to water table (Legout et al. 2007), lateral fluxes along the hillslope below the soil (Berkovitz, 2002; Derby and Knighton, 2001; Haria and Shand, 2004; Rawlins et al. 1997) and cyclic chemistry control by groundwater fluctuations (Fretwell et al. 2005). Understanding the physical processes in the fluctuation zone is also important to understand the biological and biochemical processes. The water

table fluctuation zone is a unique zone with highly variable saturation conditions controlling the nutrients access to microbial organisms (Legout et al, 2007). Mainly considered as a transfer zone, it presents however biogeochemical reactions such as denitrification processes (Dunn et al. 2005; Legout et al. 2005).

The hydrological conditions influence on bulk and microbial diversity is poorly known (Fisk et al. 2003). The relationships between chemical conditions, microbial processes and physical parameters such as water fluxes have only recently been investigated (e.g. Clément et al. 2002, 2003; Ginn et al. 2002; Vidon and Hill 2004). The water fluxes, related to the physical structure of the landscape, seem to be determinant in the spatial variability of biogeochemical processes (Hedin *et al.*, 1998; Packman *et al.*, 2004; Sabater *et al.*, 2003). At the interface between soil and water table, the factors affecting microbial physiology are similar to those affecting microbes everywhere : water, carbon, energy, terminal electron acceptor availability and environmental factors such as pH and temperature (Holden and Fierer, 2004; Haack *et al*., 2004). However, the aquifer heterogeneity (mineralogical, hydraulic and hydrogeochemical parameters) can lead to a heterogeneous distribution of microbial communities and their activity (Golscheider *et al.*, 2006).

In the variably saturated zone, the hydrological conditions present both a vertical and a time-gradient. i) Upward, the conditions change from a permanently saturated medium to a variably saturated one, close to the soil. While the pristine aquifers are considered as oligotrophic ecosystems, with low oxygen and organic matter concentrations, the soil is known as a highly heterotrophic ecosystem, organic matter rich. Thus, there is a high vertical chemical contrast. ii) During the hydrological cycle, the variably saturated zone presents an evolution from the low water table period, to the recharge period during which the unsaturated zone becomes saturated and allows the connection between the soil and the permanently saturated part of the aquifer. The recharge process induces thus a strong seasonal variation. Studies on porous media highlighted that the bacteria distribution is most affected by passive transport processes (e.g, advection, diffusion or filtration) (Huysman and Verstracte, 1993, Trevors *et al.*, 1990, Balkwill *et al.,* 1998). Several models have focused on the understanding and prediction of microbial transport in natural porous and high nutrient media (e.g. Harvey *et al*., 1993; Murphy and Ginn 2000; Ginn *et al.,* 2002; Rockhold *et al.,* 2004). Few attempts have been carried out to characterize the microbial distribution and activities in unsaturated or variably saturated systems. However, we can infer the hypothesis that from the variably saturated zone changes , the bacterial community structure and activities should be sensitive

to the vertical and the time gradient. The second working hypothesis is that in the depth permanently saturated zone, which presents stable physico-chemical parameters, the microbial community should be constant through time.

In order to understand time and depth effects on distribution and structure of microbial communities in the water table fluctuation zone, a multidisciplinary approach was carried out. Chemical and hydrological characterizations were performed in parallel to bacterial sampling over a 2.4 yr monitoring in an agricultural field site. The water was sampled within a pan-flute device designed to investigate the unsaturated zone from 5 to 15 m depth. We explored the microbial community structure of free-living bacteria. Analyses of bacterial diversity using the 16S rRNA and *narG* genes as targets were carried out. Legout *et al*. (2006) highlighted high nitrate concentrations and a denitrification potential inside the fluctuation zone of the investigated catchment. Thus functional diversity was examined through a denitrification expression gene, *narG.* This gene is involved in the nitrate reduction to nitrite, the first step in the denitrification process. Furthermore, this gene is widely distributed among the microorganisms (e.g. Firmicutes, Actinomycetes and Proteobacteria) and displayed a good level of congruence with the 16S rDNA gene tree phylogeny (Philippot, 2002; Chèneby *et al.,* 2003). Nevertheless, it can be underlined that *narG* gene accumulates more mutations than the 16S rRNA gene. The *narG* gene allowed us to characterize the nitrate reducers communities.

## 3. Material and methods

### 3.1 - Site description.

The catchments are located in South-Western Brittany, 47°57'N-4°8'W, 2347.35N – 117.5E, Kerrien (Figure V-1). The Kerrien catchment is located within an agricultural site, mainly covered with pasture and dairy cows, with an area of 0.12 km². The outlet is located at nearly 10 km from the sea (Martin, 2003; Martin et al. 2004a; Martin et al. 2004b; Martin et al. 2004c; Legout, 2006). This catchment is a national research observatory for environmental investigations. It is mainly devoted to the investigations of the hydrogeochemical reactivity of agricultural catchments. Previous research has allowed to highlight the different compartments of the aquifer and their role in their contribution to the catchment functioning (Martin, 2003; Martin et al. 2004a; Martin et al. 2004b; Martin et al. 2004c) and solute transfer in the unsaturated zone (Legout et al., 2007).

The climate is oceanic with a mean annual precipitation of 1167 +/- 195 mm per year. The bedrock is fissured and fractured granite, overlain by weathered material within which the shallow groundwater accumulates and fluctuates (Legout et al., 2007). The weathered granite lies between 0.7 and 1.2 m below the soil surface. The soils are mainly sandy loam soils. The water-table depth ranges from 2 to 8 m below the soil surface. A plot of six piezometers range from 3 to 15 m (3, 5, 6, 8, 10 and 15 m) depth in the weathered material. The piezometers are composed of PVC tubes with a 1 m thick perforated screen at their extremity, allowing the collection of water from a 1-m-thick groundwater layer.

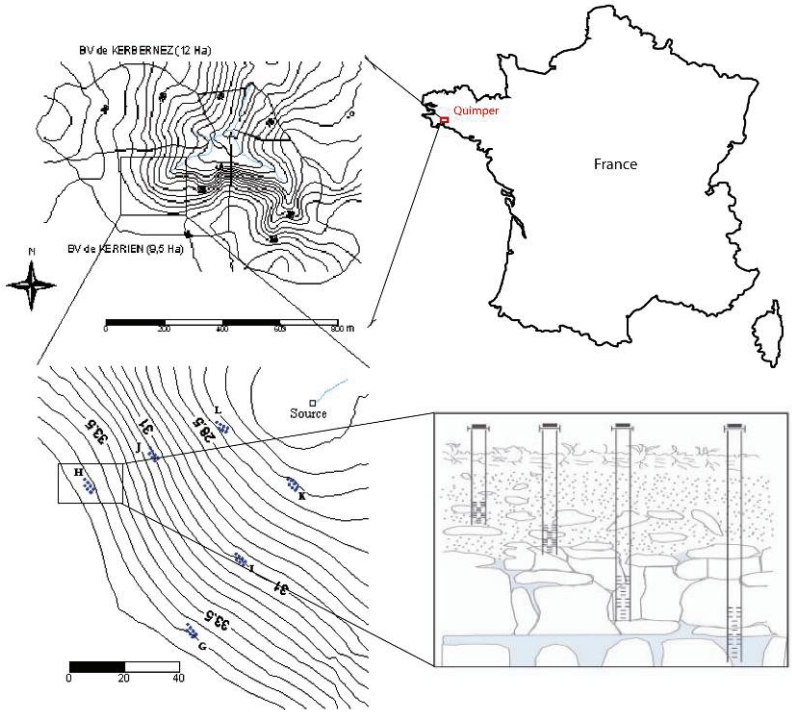



**Figure V-1 : Location map of Kerrien catchment site and representation of the pan-flute piezometers device (modified from Molénat et al., 2007)**

### 3.2 – Analytical methods

The piezometric level was continuously recorded in the piezometer plot in the Kerrien catchment between the 14th of December 2004 and the 11th of April 2007 (2.4 years). Five water chemical measurements and bacterial samplings have been carried out in the different piezometers along the vertical soil-groundwater profile during this 2.4 yr period: Three campaigns correspond to high waters (05/25/05; 03/13/06 and 01/25/07), two to low waters (01/18/06 and 11/22/06). Physico-chemical parameters such as pH, temperature, redox potential, dissolved oxygen and electric conductivity were measured during the field sampling. The water sampled were filtered in the field with cellulose-acetate filters 0.22 µm (Sartorius Minisart), and stored less than 24 h in the dark below 4°C prior to analyses of

major anions ($Cl^-$, $SO_4^{2-}$ and $NO_3^-$) by ionic chromatography (Dionex©DX120) in the CAREN-Geosciences Rennes lab. The uncertainty was less than 4 %. The total dissolved carbon (TDC) and the dissolved inorganic carbon (DIC) were analyzed with a Shimadzu TOC 5050A (quantification limits: 0.85 mg $L^{-1}$; detection limits: 0.08 mg $L^{-1}$). The dissolved organic carbon (DOC) was calculated as the difference between TDC and DIC. The organic carbon was not measured at the 3rd and 5th campaign because of technical problems.

### 3.3 - Groundwater sampling

The groundwater samples were collected in the four different piezometers of the Kerrien Site. During the two first field campaigns, an ISMA sampler was used and replaced by a Grundfos MP1 immersed pump during the next ones for a better efficiency. The ISMA sampler was rinsed three times with deionised water and once with groundwater between each well sampling. The Grundfos pump was rinsed with the groundwater. Two liters were collected from each piezometer when possible. The fourth field sampling campaign was characterized by a lack of water in the 6 m depth piezometer. A cascade filtration system with three thresholds 10µm (Isopore™ - TCTP, membrane filters), 5µm (Isopore™ - TMTP, membrane filters) and 0.22µm (Sterivex™ -GV, Millipore), *via* a peristaltic pump was used to concentrate the microbial biomass, a step required for the nucleic acid extractions. This filtration was done straight after the sampling. Filters were placed in Petri dishes and stored at 0°C within a refrigerant container, and then at -20°C at the laboratory before DNA extractions. The sampling protocol of cascade filtration was adapted from marine sampling (Massana *et al.*, 2004).

The potential effect of well implantation on water biochemistry and bacterial diversity was estimated by samplings before and after the borehole purge. The purge consisted in the water removal of 3 times the volume of the well volume with a Grundfos MP1 immersed pump. This pump is conceived with inert materials to avoid contamination of the pumped liquid.

### 3.4 - Bacterial numeration

The bacterial-count was realized by flux cytometry on a FACSort (Becton Dickinson). Two millilitres of water placed in a sterile cryovial were fixed with 7µL of glutaraldehyde on field and stored in the refrigerant container along the sampling period. Back in the laboratory, the cryovial were dipped in liquid nitrogen and stored at -80°C before analyses. This treatment warranties the quality of the samples.

### 3.5 - Extraction of DNA

Community nucleic acids concentrated on filters (10µm, 5µm and 0.22µm) were torn out using the extraction buffer. DNA was extracted by physical disruption of cells by bead-beating at 30/s during 27s and by using the DNeasy Plant miniKit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. To hit filter from the Sterivex device, a copper pipe cutter was used to strip off the plastic protection. The pipe cutter was rinsed with 70% ethanol and exposed 5 mn to UV light between each tube.

### 3.6 - Design of 16SrRNA –specific primers

The universal eubacterial primers (Orphan *et al.*, 2000, modified by Vandenkoornhuyse et al., 2007), Eub-519F (5'-GTTTCAGCMGCMGCCGCGGT) and Eub-1390R (5'-GTTTGACGGGCGGTGTGT) were used to amplify 871 bp internal section of the 16S rRNA gene.

### 3.7 - Design of narG –specific primers

A set of *narG* sequences of bacteria and archea available from GenBank database were aligned and scanned for conserved regions that could provide suitable primers targets. From the analysis, two degenerated primers narGr (5'-TTTTCSTACCAGGTCGC-3') and narGf (5'-TAYGTCGGGCAGGAAAA-3'), were designed to amplify a specific 840 bp fragment of the *narG* gene.

### 3.8 - rRNA 16S gene and *narG* gene PCR

The PCRs amplifications of the 16S rRNA gene from the environmental DNAs were performed in a total volume of 50 µl containing 2 µl of purified DNA, 250 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP;Promega, Madison WI), 1 µL of proof reading Taq DNA polymerase (5U/µl - Applied Biosystems), 5 µl buffer Taq DNA polymerase 10X with $Mg^{++}$( Applied Biosystems) and 2 µM primer of : 519F and 1390R. The cycling regime was an initial step at 94°C for 2 min 30s; followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 52°C for 1 mn and an extension step at 68°C for 50 s. The amplification ended with a final extension at 68°C for 10 mn using a MJ Research PTC-100$^{TM}$ thermocycler.

The PCRs amplifications of the *narG* gene fragment were performed in a total volume of 50 µl containing 1 µl of purified DNA, 250 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP;Promega, Madison WI), 0.25 µL of proof reading Taq DNA polymerase (5U/µl - Applied Biosystems), 5 µL buffer Taq DNA polymerase with $Mg^{++}$(

Applied Biosystems) and 1 µM primer of each primer, narGr and narGf. The cycling regime was an initial step at 94°C for 1 mn 30 s; followed by 36 cycles of 94°C for 30 s, 51°C minus 0.1°C for each cycle for 1 mn 15 s and an extension step at 72°C for 1 mn 30 s, ending by a final extension at 72°C for 10 mn. The amplicons were checked by electrophoresis (4 µl of PCR product in 1% agarose in 0.5×TBE buffer).

### 3.9 - Terminal-Restriction fragment length polymorphism diversity signatures (T-RFLPs)

Environmental DNA extracts were amplified with fluorescently labelled primers: Eub-519F (5'-[6FAM] GTTTCAGCMGCMGCCGCGGT) and Eub-1390R (5'-[5Hex] GTTTGACGGGCGGTGTGT); and narGf (5'- [6FAM] TAYGTCGGGCAGGAAAA-3') and narGr (5'-[5Hex] TTTTCSTACCAGGTCGC-3'). PCR products were purified using the High Pure PCR product purification kit (Roche) according to the manufacturer's protocol. Two aliquots of the purified amplicons were digested, one with 2 U *Hin*fI and one with *Sty*I restriction enzymes (Promega) at 37°C for 2 h onto a low adsorption microtube (Axygen) to limit the loss of T-RFs during the different steps of the protocol. The digested products were precipitated with 2 volumes of absolute alcohol and 1/10 volume of 3M Acetate buffer pH 5.4. Then the mixture was placed overnight at -20°C, and centrifuged at 16400 g for 20 min at 4°C.The pellets were washed in 200 µL of 70% alcohol, centrifuged at 16400g for 10 min, and incubated 20 min at 37°C. Dried pellets were resuspended in 10 µL of ultrapure water and placed for 2 to 4 h in darkness on melting ice.

Aliquots of digested products (1 µl) were mixed with 9 µl of deionised formamide and ROX labelled GS400HD internal size standard. TRFs were separated and sized using an automated sequencer ABI Prism® 3130*xl* DNA analyser (Applied Biosystems). The sizing of the T-RFs was estimated by reference to the internal standard (Genemapper version 3.7 software, Applied Biosystems). All the T-RFs measuring less than 50 bp and more than 400 bp were excluded for the data analyses because the internal standard used allows an accurate sizing for these lenghts. The sequencer detects all fluorescent DNA fragments and a background noise. The mixing samples/formamide, and partial digestions can generate signals that do not correspond to a true terminal restricting fragment (T-RF). To avoid these potential artefacts, two true replicates (i.e. independent PCRs and independent digestions) were performed. The replicated profils comparison make it possible to determine background noise from the peaks

(Vandenkoornhuyse et al., 2003)**.** Besides eliminating inconsistent peaks, these true replicates led to an increase in the number of observed T-RFs per T-RFLP profile by allowing us to retain very small peaks that were present consistently. Therefore, we do not apply herein a minimal cut-off peak height.

**3.10 - Clone library construction and sequencing**

Purified PCR products from 16S rRNA gene amplifications were cloned. As a first step a A-overhanging post-amplification procedure was done to add a non completed A at the end of the amplicons. One U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen), 1x concentrated Taq DNA polymerase buffer (Invitrogen) and 0.1 mM of dATP was added to the purified products, and incubated for 15 mn at 72°C. The ligation mixture contained, 1.5 µL of 3'A-tailed PCR products, 1.0 µL of pGEM-T vector, 5.0 µL of rapid pGEM-T buffer and 1 µL of T4-DNA ligase (pGEM-T cloning kit, Promega) in a final volume of 10 µL and was incubated at 4°C overnight. Transformation of *E. coli* DH5α competent cells (Invitrogen) were performed following the manufacturer's instructions. The screening of the positive clones was done by PCR amplifications targeting sequences of the vector with the primers T-7 and SP-6. Cloned DNA fragments (871 bp) were sequenced for the 2 strands on an automated sequencer ABI Prism® 3130*xl* DNA analyser (Applied Biosystems).

**3.11 - Sequence data analyses**

All the contigs were produced using Sequencher (GeneCodes) and all the nucleotides for each sequence were checked by the software and corrected manually when required. A multiple alignment of 16S rRNA gene sequences was performed using Clustal X 1.81 (Thompson et al., 1997) and refined by eye. Each sequence was compared to sequences of the NCBI using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Phylogenetic relationships among 48 known bacterial sequences (i.e. the highest BLAST hits and additional sequences to stabilised the tree topology) and the 107 environmental sequences were calculated using the neighbour joining (NJ) agglomeration algorithm (Saitou and Nei, 1987) and using the maximum parsimony (MP) procedure (Swofford, 1993) with Clustal X 1.81 and PAUP 4.0β10 sofwares respectively. Distances for the NJ tree were computed with a correction for multiple substitutions using a Kimura 2-parameter model. For the MP analysis, a heuristic tree search with tree bisection and reconnection (TBR) as swapping algorithm and 500 replicates with random addition of sequences was used to find the shortest tree. Bootstrap support values for branches were estimated from 500 replicates for the MP phylogeny and 1000 replicates for

the NJ tree. The outgroup is an uncultured Crenarchaeota (AJ347774). In addition to these phylogenies, a maximum likelihood (ML) reconstruction was calculated. As a fist step, the choice of the model which fits the dataset was performed using Modeltest 3.8 software (Posada and Crandall, 1998). The HKY model was selected to compute the ML tree with 50 bootstrap iterations using PAUP 4.0 β10 sofware (Sinauer associates).

### 3.12 - Patterns of microbial community analyses

According to Losos (1996) and Vandenkoornhuyse *et al.* (2002), one of the best way to compare community composition and to assess community structure is to use a phylogenetic-based strategy especially the MP reconstructions. We encoded the presence or absence (1/0, respectively) of each restriction fragment as a discrete variable, in order to undertake a comparison of community structure under a Maximum of Parsimony (MP) procedure using Paup 4.0. For the MP analysis, a heuristic tree search with tree bisection and reconnection (TBR) as swapping algorithm and 500 replicates with random addition order of sequences was used to find the shortest tree. Bootstrap support values of branches were estimated from 250 replicates for the MP topologies. To combine the information provided by the different TRFs, a multivariate approach based on principal component analysis (PCA) was performed. Non-centred PCAs were calculated, as these maintain the mean differences among variables (ie frequency of observation of each TRF, Vandenkoornhuyse et al, 2003). From the PCAs it is possible to determine the statistical reliability of the data by computing confidence ellipses and stars joining the gravity centre to each dot of the considered modality in the vectorial space. These are defined by a centre of gravity that corresponds to the mean of observations and by the two axes reflecting the deviation from the mean (Sokal and Rohlf, 1995). All the PCAs, were implemented with the ADE-4 software package (Thioulouse *et al*., 1997).

### 3.13 - Diversity comparisons

Genetic diversity (hereafter meaning species richness) was estimated using Shannon–Weaver calculated by the formula :

$$H' = -\sum_{i=1}^{n} Pi \times \log_2 Pi;$$

where $Pi=ni/N$, and $ni$ is the number of TRFs in the sample $i$ and N, the total number of TRFs in all the samples.

In addition, the Morisita-Horn index was computed to compare similarity between quantitative inventories (Magurran, 1998). This index is not influenced by sample size and richness; it represents specifically the similarity and is sensitive to the abundance of the most abundant TRF. This was calculated to compare each depth from the same campaign and each campaign to the same depth.

The Morisita-Horn index was calculated as followed :

$$CmH = 2\sum_{i=1}^{n}(ani \times bni)(da + db) \Big/ (aN \times bN)$$

where CmH is the Morista-Horn index of similarity, N is the total number of species at both communities, aN is the total number of individuals of all species collected at community A, bN is the total number of individuals of all species collected at community B, ani is the number of individuals of the ith species collected at community A, bni is the number of individuals of the ith species collected at community B. In the denominator, there are two terms summed that are defined as

$$da = \sum ani^2 / aN^2$$

This index was used to compare sample pairs where only one parameter was modified as the comparison between time t1 and t2, presence/absence of nitrates and oxygen, the sites. The index was calculated by EstimateS (Colwell, 2005). The Morisita-Horn index ranges from 0 to 1, with 0 indicating that no species are shared between the two communities and 1 indicating complete identity. Because the index takes species abundance into account, communities that contain the same species but have different species abundance will have an index value of less than 1 (Schmitt-Wagner et al., 2003).

## 4. Results

### 4.1 - Hydrology/Chemistry

Hydrogeology

The water-table fluctuation depth ranges from 2.1 to 6.1 m below the soil surface (Fig V-2) during the 2.4 years of monitoring. The hydrological year 2004/2005 was relatively dry. The water-table highest level is 4.2 m during winter. The recharge period of the following year (2005-2006) appeared relatively long with a slow water table increases during winter and a final peak during spring (highest level 2.9 m during March). Comparatively, the last hydrological year (2006-2007) showed a more important recharge process during winter (high water table level ranging from 3.8 to 2.1 m during January to March). A comparison to long-

term chronicles shows that the two first monitoring years can be considered as relatively dry years.

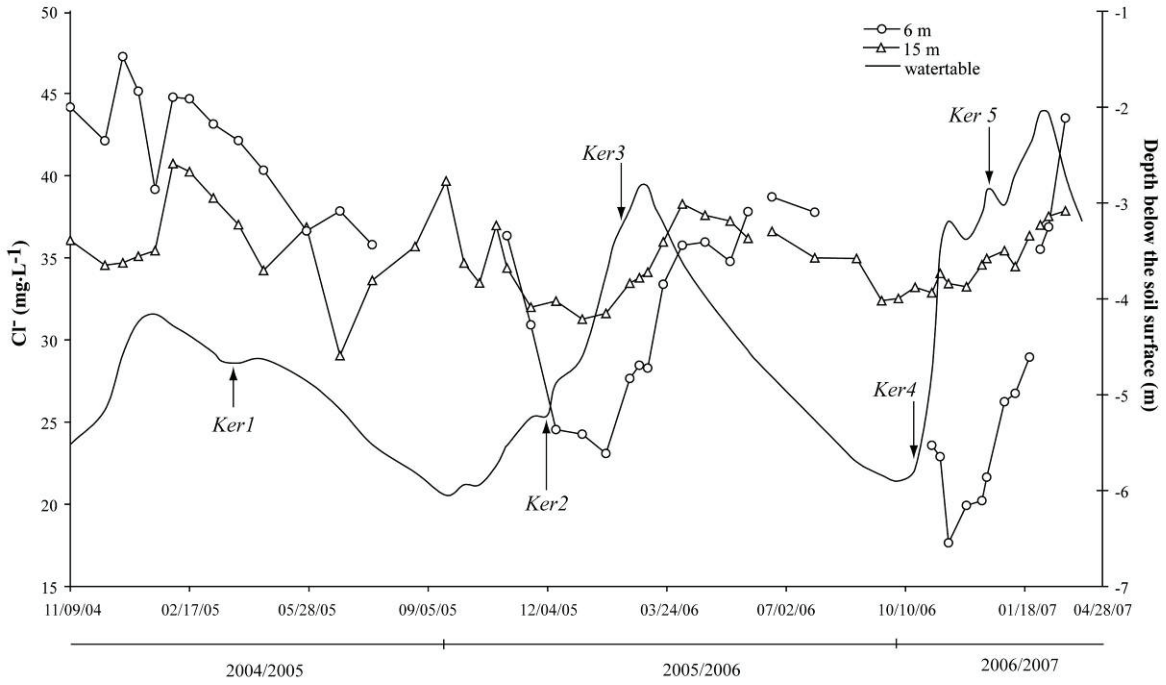



**Figure V-2 : Depth of the water table over-time and chloride concentration changes in the fluctuation zone (6 m depth) and the saturated zone (15 m depth).** The water table depth is represented along with the different sampling dates. Ker1 was sampled the 05/25/05, Ker2 the 01/18/06, Ker3 the 03/13/06, Ker4 the 11/22/06 and Ker5 the 01/25/07. Ker1, Ker3 and Ker5 have been sampled in high waters and Ker2 and Ker4 in low waters.

Groundwater chemistry

The groundwater is characterized by constant temperature, slight acidity (Tabl. V-1), low total organic carbon concentrations and high nitrate concentrations (Tabl. V-2). The data set allows the distinction of two kinds of chemical trends : (1) a relatively stable chemical composition in the permanent aquifer; (2) a high temporal chemical variability in the water-table fluctuation zone, which is related to hydrological fluctuations.

(1) Relative chemical stability : The chemical composition of the groundwater from 15 m has moderately evolved during the investigation period. The chloride largest variation is 11 $mg.L^{-1}$ between March and July 2005. Slight variations are observed for nitrate (~10 $mg.L^{-1}$), sulphate (2 $mg.L^{-1}$) and dissolved oxygen (1.7 $mg.L^{-1}$) concentrations.

(2) High chemical variability : Groundwaters from 6 m show high chemical variability. Chloride concentrations range from 17.7 $mgL^{-1}$ (12/20/2006) to 47.2 $mgL^{-1}$ (01/27/2005). Such variations are also correlated to nitrate ($\Delta$=31.2 $mgL^{-1}$), sulphate ($\Delta$=43.2 $mgL^{-1}$) and

dissolved oxygen ($\Delta$=5 $mgL^{-1}$) concentrations. These variations are closely linked to the hydrological fluctuations : the highest chloride, nitrate and sulphate concentrations are observed during most of the low water period (the whole 2004-2005 cycle) and the lowest concentrations are observed during the beginning of the recharge period (January-February 2006 and January 2007).

A slight vertical gradient can be however noticed for oxygen with relatively higher concentrations at 6 and 8 m depth. The hydrological cycle is also characterised at any depth by higher oxygen concentrations during the high water table periods.

**Table V-1 : Physico-chemical parameters in water samples collected from the different wells from 2005 to 2007.**

| | $O_2$ ($mg \cdot L^{-1}$) | | | | pH | | | | Temperature (°C) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | H6 | H8 | H10 | H15 | H6 | H8 | H10 | H15 | H6 | H8 | H10 | H15 |
| Ker1 | 4.4 | 4.5 | 4.0 | 5.0 | 4.8 | 5.5 | 5.5 | 5.4 | 17.9 | 16 | 17.1 | 18.1 |
| Ker2 | 6.8 | 7.6 | 5.7 | 4.8 | 6.4 | 5.9 | 6.2 | 6.0 | 12.6 | 12.4 | 13 | 13.1 |
| Ker3 | 7.9 | 7.6 | 6.2 | 6.5 | 5.9 | 5.1 | 5.2 | 5.3 | 12.5 | 12.5 | 12.6 | 12.9 |
| Ker4 | - | 5.7 | 5.8 | 5.5 | - | 5.7 | 5.6 | 5.5 | - | 14.1 | 13.4 | 14.4 |
| Ker5 | 9.4 | 8.2 | 8.7 | 6.5 | 6.0 | 5.2 | 5.4 | 5.2 | 11.3 | 12.1 | 10.2 | 12.2 |

**Table V-2: Nitrates, sulphates and dissolved organic carbon (DOC) in water samples collected at the different depths.** No values are indicated at 6 m the fourth campaign because the water table was below this level. No DOC measurements were done during the third and the fifth sampling campaigns.

| | Nitrates ($mg \cdot L^{-1}$) | | | | Sulphates ($mg \cdot L^{-1}$) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | H6 | H8 | H10 | H15 | H6 | H8 | H10 | H15 |
| Ker1 | 56.1 | 71.0 | 61.8 | 62.6 | 65.4 | 22.8 | 20.2 | 17.6 |
| Ker2 | 80.0 | 71.3 | 65.1 | 68,0 | 37.5 | 29.2 | 19.7 | 19.2 |
| Ker3 | 87.3 | 73.5 | 69.8 | 72.4 | 35.9 | 21.6 | 20.1 | 18.5 |
| Ker4 | - | 70.7 | 66.0 | 65.6 | - | 23.0 | 20.2 | 19.3 |
| Ker5 | 57.2 | 67.7 | 69.2 | 64.8 | 22.2 | 21.9 | 19.7 | 19.5 |

| | Dissolved Organic Carbon ($mg \cdot L^{-1}$) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | H6 (BP) | H8 (BP) | H10 (BP) | H15 (BP) | H6 (AP) | H8 (AP) | H10 (AP) | H15 (AP) |
| Ker1 | 3.73 | 0.98 | 1.42 | 1.45 | 1.50 | 1.13 | 1.40 | 1.53 |
| Ker2 | 1.66 | 0.89 | 0.87 | 1.13 | 1.62 | < QL | < QL | < QL |
| Ker3 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ker4 | - | 0.90 | < QL | < QL | - | 1.46 | 0.95 | < QL |
| Ker5 | - | - | - | - | - | - | - | - |

### 4.2 - Microbial analyses

The bacterial cell numeration which was estimated by flow cytometry, showed variations as a function of both sampling depth and time. Technical problems were encountered during the first and fifth campaigns (thus, not presented in figure V-3). The number of cells ranged from 2.3 $10^5$ to 2.5 $10^6$ per mL. A vertical gradient in the number of cell counted is observed. For the Ker2 and Ker4 campaigns, the higher bacterial concentrations are observed at the

shallowest (6 m) and the deepest (15 m) depth. The Ker3 campaign showed a distinct pattern. The number of bacterial cells varied from 2.3 $10^5$ to 2.8 $10^5$ cells.mL$^{-1}$ between 8 and 15 m. The highest concentration reached 1.3 $10^6$ cells.mL$^{-1}$ at 6 m. However, this microbial population size could not be correlated with the different measures of concentration performed at 15 m. The comparison of cell numeration before and after borehole purge highlights modifications related to the well purge. The purge induced a bacterial cell decrease at 6, 8 and 10 m. However, purging the boreholes did not have any effect on the 15 m' community. Furthermore, the bacterial cell decrease does not modify the vertical relationships of the different depth of a specific campaign, i.e. the shape of the curves in Fig.V-3.

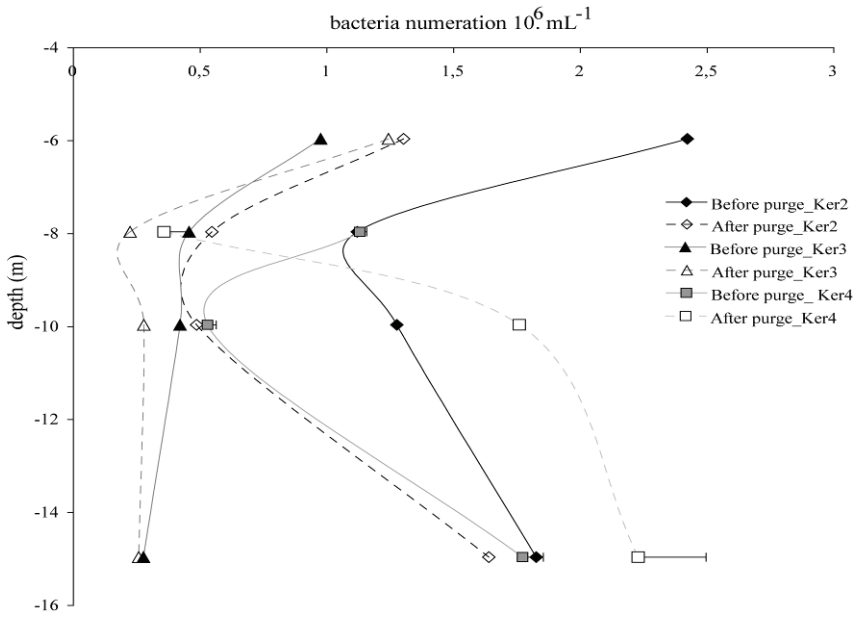



**Figure V-3: Bacterial numeration from water samples.** The symbols plotted represent means of 3 independent measures. For each mean, standard deviations are plotted as bars**.** The darkened symbols symbolize the samples before the well purge, while the open symbols represent the samples collected after purge.

The biological prokaryotic diversity determined by sequencing of a fragment of the 16S rRNA genes gave 27 different phylotypes (Fig. V-4). This number of phylogenetic species (see General Introduction section of the PhD thesis to know more about the species concept) is probably underestimated (from rarefaction curves, result not shown). Strikingly, 6 of these 27 phylogenetic species are new at the class or phylum level (phylotypes 1; 2, 3, 6, 9, 11; Fig V-4). Among the other phylotypes, most of those found within the Proteobacteria phylum are also new. From the 27 phylotypes only 6 displayed a high level of homology with known bacteria (phylotypes 5, 14, 16, 17, 20, 24; Fig V-4). The diversity discovered at the soil-aquifer interface in Kerrien should be considered highly original. This fact may be due to 2 different aspects (i) the primers used were new (Vandenkoornhuyse et al., 2007) (ii) the number of published studies about microbial diversity within this environment are very limited. However, the diversity of soil microorganisms is now better known. If the

microorganisms found colonised the aquifer habitat after percolation from soil surface, one would expect to find a more classical bacterial diversity. We can thus make the assumption that at least a part of the microorganisms found might be specific and adapted to life in water-table habitat.

Samples from 10 and 15 m show a higher diversity i.e. a higher number of phylotypes than those from 6 m. The 10 and 15 m samples are present in the different phylotypes identified and the Actinobacteria phylotypes were specifically assigned to 10 m clones. On the contrary, the 6 m is only represented in the α-, β-, and γ- proteobacteria phylotypes. Strikingly these phylotypes are closely related to Pseudomonas and to a Rickettsiella and known as abundant in soils. This result should support the hypothesis of modification in bacterial community composition along the depth, and argue that the microbial community at 6m might be connected to the soil community.

**Table V-3 : Similarity indexes calculated from the 16S rRNA gene T-RFLP analysis.**

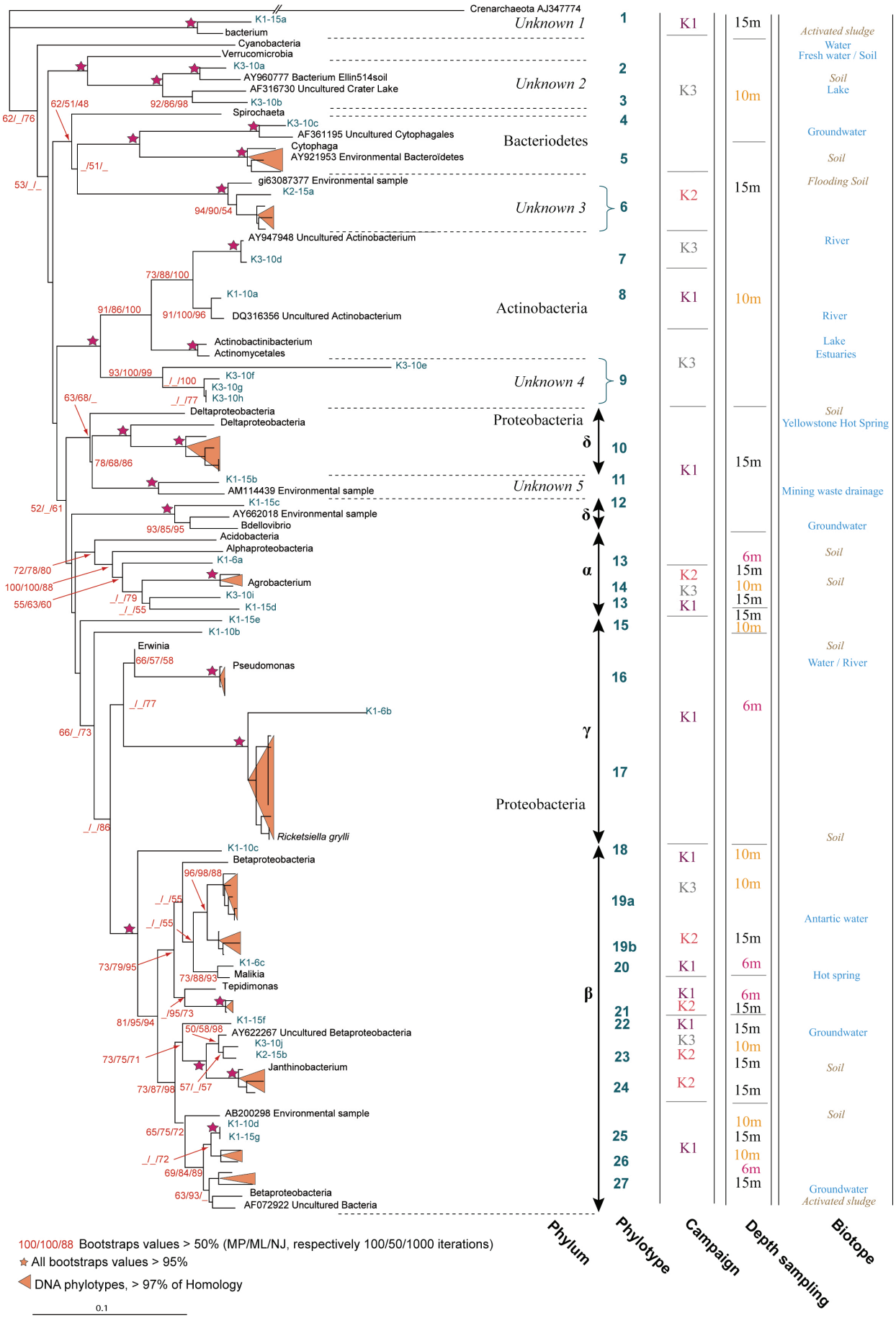
**a.**

| | | K1 | K2 | K3 | K4 | K5 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 6 m | K1 | 1 | | | | |
| | K2 | 0.16 | 1 | | | |
| | K3 | 0.32 | 0.18 | 1 | | |
| | K4 | - | - | - | - | |
| | K5 | 0.26 | 0.26 | 0.32 | - | 1 |
| 8 m | K1 | 1 | | | | |
| | K2 | 0.11 | 1 | | | |
| | K3 | 0.11 | 0.20 | 1 | | |
| | K4 | 0.29 | 0.21 | 0.26 | 1 | |
| | K5 | 0.26 | 0.21 | 0.17 | 0.41 | 1 |
| 10 m | K1 | 1 | | | | |
| | K2 | 0.24 | 1 | | | |
| | K3 | 0.33 | 0.26 | 1 | | |
| | K4 | 0.44 | 0.24 | 0.25 | 1 | |
| | K5 | 0.36 | 0.26 | 0.38 | 0.37 | 1 |
| 15 m | K1 | 1 | | | | |
| | K2 | 0.14 | 1 | | | |
| | K3 | 0.27 | 0.29 | 1 | | |
| | K4 | 0.35 | 0.39 | 0.41 | 1 | |
| | K5 | 0.18 | 0.44 | 0.32 | 0.68 | 1 |

**b.**

| | | 6 | 8 | 10 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|
| Ker1 | 6 | 1 | | | |
| | 8 | 0.20 | 1 | | |
| | 10 | 0.42 | 0.41 | 1 | |
| | 15 | 0.36 | 0.38 | 0.27 | 1 |
| Ker2 | 6 | 1 | | | |
| | 8 | 0.42 | 1 | | |
| | 10 | 0.46 | 0.64 | 1 | |
| | 15 | 0.47 | 0.63 | 0.61 | 1 |
| Ker3 | 6 | 1 | | | |
| | 8 | 0.50 | 1 | | |
| | 10 | 0.32 | 0.38 | 1 | |
| | 15 | 0.51 | 0.42 | 0.34 | 1 |
| Ker4 | 6 | - | | | |
| | 8 | - | 1 | | |
| | 10 | - | 0.66 | 1 | |
| | 15 | - | 0.62 | 0.62 | 1 |
| Ker5 | 6 | 1 | | | |
| | 8 | 0.58 | 1 | | |
| | 10 | 0.47 | 0.60 | 1 | |
| | 15 | 0.40 | 0.57 | 0.59 | 1 |

**Figure V-4 : Phylogenetic affinities of the environmental SSU rRNA gene sequences isolated from environmental ecosystems, in a consensus tree.** Closest known related SSU rRNA bacterial sequences are only represented (i.e. highest BLASTn hits). Tree was constructed using NJ algorithm under K2P distance model. Bootstrap values >50% are indicated at the nodes (respectively MP/ML/NJ estimated from 100/50/1000 iterations). The symbol * indicates bootstraps values higher than 95%. The sampling and depth period are presented sidelong the tree. K1 was sampled the 05/25/05; K2: 01/18/06 and K3: 03/13/06. The biotopes, on the right of the figure, correspond to the environments where the closest known SSU rRNA gene bacterial sequences were found.


Crenarchaeota AJ347774
K1-15a
bacterium
Cyanobacteria
Verrucomicrobia
K3-10a
AY960777 Bacterium Ellin514soil
AF316730 Uncultured Crater Lake
K3-10b
Spirochaeta
K3-10c
AF361195 Uncultured Cytophagales
Cytophaga
AY921953 Environmental Bacteroïdetes
gi63087377 Environmental sample
K2-15a
AY947948 Uncultured Actinobacterium
K3-10d
K1-10a
DQ316356 Uncultured Actinobacterium
Actinobactinibacterium
Actinomycetales
K3-10e
K3-10f
K3-10g
K3-10h
Deltaproteobacteria
Deltaproteobacteria
K1-15b
AM114439 Environmental sample
K1-15c
AY662018 Environmental sample
Bdellovibrio
Acidobacteria
Alphaproteobacteria
K1-6a
Agrobacterium
K3-10i
K1-15d
K1-15e
K1-10b
Erwinia
Pseudomonas
K1-6b
Ricketsiella grylli
K1-10c
Betaproteobacteria
K1-6c
Malikia
Tepidimonas
K1-15f
AY622267 Uncultured Betaproteobacteria
K3-10j
K2-15b
Janthinobacterium
AB200298 Environmental sample
K1-10d
K1-15g
Betaproteobacteria
AF072922 Uncultured Bacteria
Unknown 1
Unknown 2
Bacteriodetes
Unknown 3
Actinobacteria
Unknown 4
Proteobacteria
δ
Unknown 5
δ
α
γ
Proteobacteria
β
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
13
15
16
17
18
19a
19b
20
21
22
23
24
25
26
27
K1
K3
K2
K1
K3
K1
K3
K1
K2
K3
K1
K2
K1
K3
K2
K2
K1
K1
15m
10m
15m
10m
6m
15m
10m
15m
15m
10m
6m
10m
10m
15m
6m
15m
15m
10m
15m
10m
6m
15m
Activated sludge
Water
Fresh water / Soil
Soil
Lake
Groundwater
Soil
Flooding Soil
River
River
Lake
Estuaries
Soil
Yellowstone Hot Spring
Mining waste drainage
Groundwater
Soil
Soil
Soil
Water / River
Soil
Antartic water
Hot spring
Groundwater
Soil
Soil
Groundwater
Activated sludge
100/100/88 Bootstraps values > 50% (MP/ML/NJ, respectively 100/50/1000 iterations)
All bootstraps values > 95%
DNA phylotypes, > 97% of Homology
0.1
Phylum
Phylotype
Campaign
Depth sampling
Biotope

### 4.3 - 16S rRNA gene diversity

Although the borehole purge modifies the bacterial cells count, it has no effect on the community structure (Fig.V-5) analysed by T-RFLPs, since the ellipses drawn on the PCA vectorial space strongly overlap. This result indicates that the community analysed in each piezometer can be considered as representative of the groundwater community. The sampling of different depths along three hydrological cycles allows the microbial community diversity to be analysed both against time (1) and depth (2).

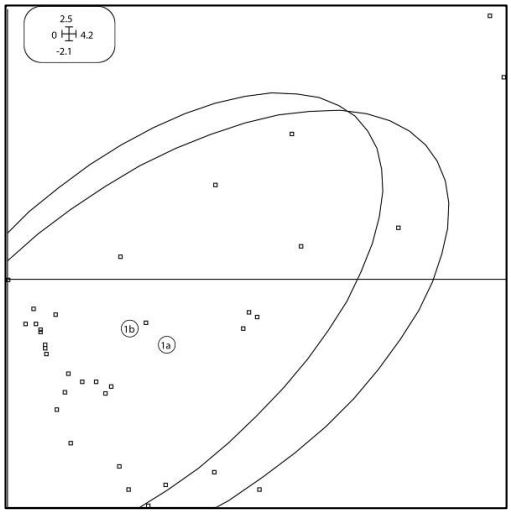



**Figure V-5: Non centred PCA representation highlighting the effect of the purge on the bacterial communities.** Ellipses grouped 95% of the communities (dots) projected on the vectorial space for a vine modality (i.e. before '1a' vs after purge '1b'). '1a' and '1b' represent the gravity centres of the ellipses

(1) Time (Fig.V-6) affects the community at both long and short term. Considering the sampling date, the closest samplings (i.e. Ker4/Ker5 and Ker2/Ker3) are more similar in their bacterial community composition than the more distant ones (Ker1/ker5). This can be seen in the proximity of the Ker4 /Ker 5 campaigns and in the strong difference between Ker1 and Ker5 at 15 m (Fig. V-6). We highlight a community structuration time-dependant. This effect can also be seen in the similarity index (Tab. V-3a) which increases with time: except for some values during the Ker-1 campaign, the index increases with the Ker3/Ker4 and Ker4/Ker5 campaigns. The maximal similarity (Tab V-3a) is found between Ker4 and Ker5 at 15 m, as also observed in Fig. V-6. The tree and the similarity indexes indicate that, during the monitoring period, the communities evolve towards more homogeneous structures.

The tree topologies also highlight a relative 'mixture' of communities between 6 and 15 m during the high water campaigns (samples Ker3 and Ker5). In Fig. IV-7, this

effect is seen in the better discrimination of the 6, 8 m depth vs the 10, 15 m in the Ker 1, 2 and 4 campaigns. This observation is supported by higher diversity values (Fig. IV-8). At Ker3 Shannon indexes range from 4.4 to 5.1 and at Ker5 from 4.3 to 5.8, the highest values being the 15 m ones. These results indicate short term community structure variations during the high water periods.

(2) The T-RFLP diversity signatures generated from depth data (Fig. V-8) showed no clear difference in the community structure. In the depth-trees (Fig. V-8) some groups can however be distinguished : 10/15 m groups are found in the Ker2, Ker3 and Ker5 campaigns, 8/15 m during Ker2, Ker3 and Ker4 campaigns; and 8/10m during the Ker1 and Ker2 campaigns. The higher similarity indexes are obtained between the 8/10 and 15 m at each campaign. In Ker 2 and 4, the index rises to 60% of similarity between the 8 and 15 m campaigns (Tab. V-3b). The tree topologies and the similarity indexes discriminate two different communities : the 6 m and the 8/10/15 m community

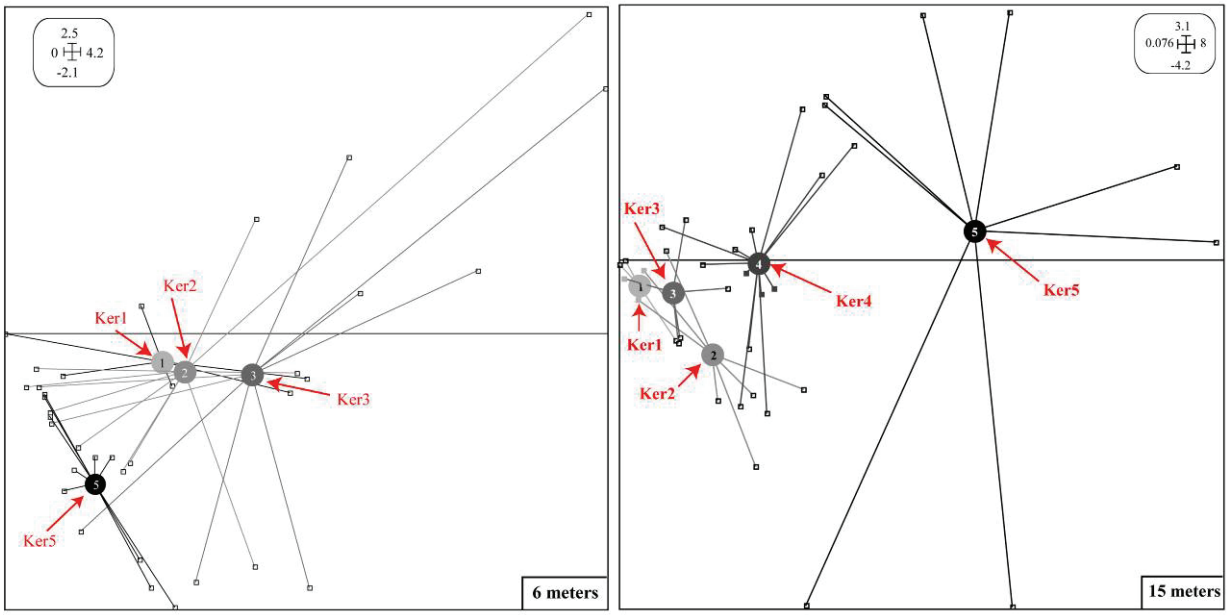



**Figure V-6**: **Non centred PCA highlighting the bacterial community structuration over-time for the 6 and 15 meters waters samples.** At the 6m depth, Ker4 is missing because at the sampling date there was no water at this depth. '1', '2', '3', '4', and '5' are the gravity centres for each modality, Ker1, Ker2, Ker3, Ker4 and Ker5

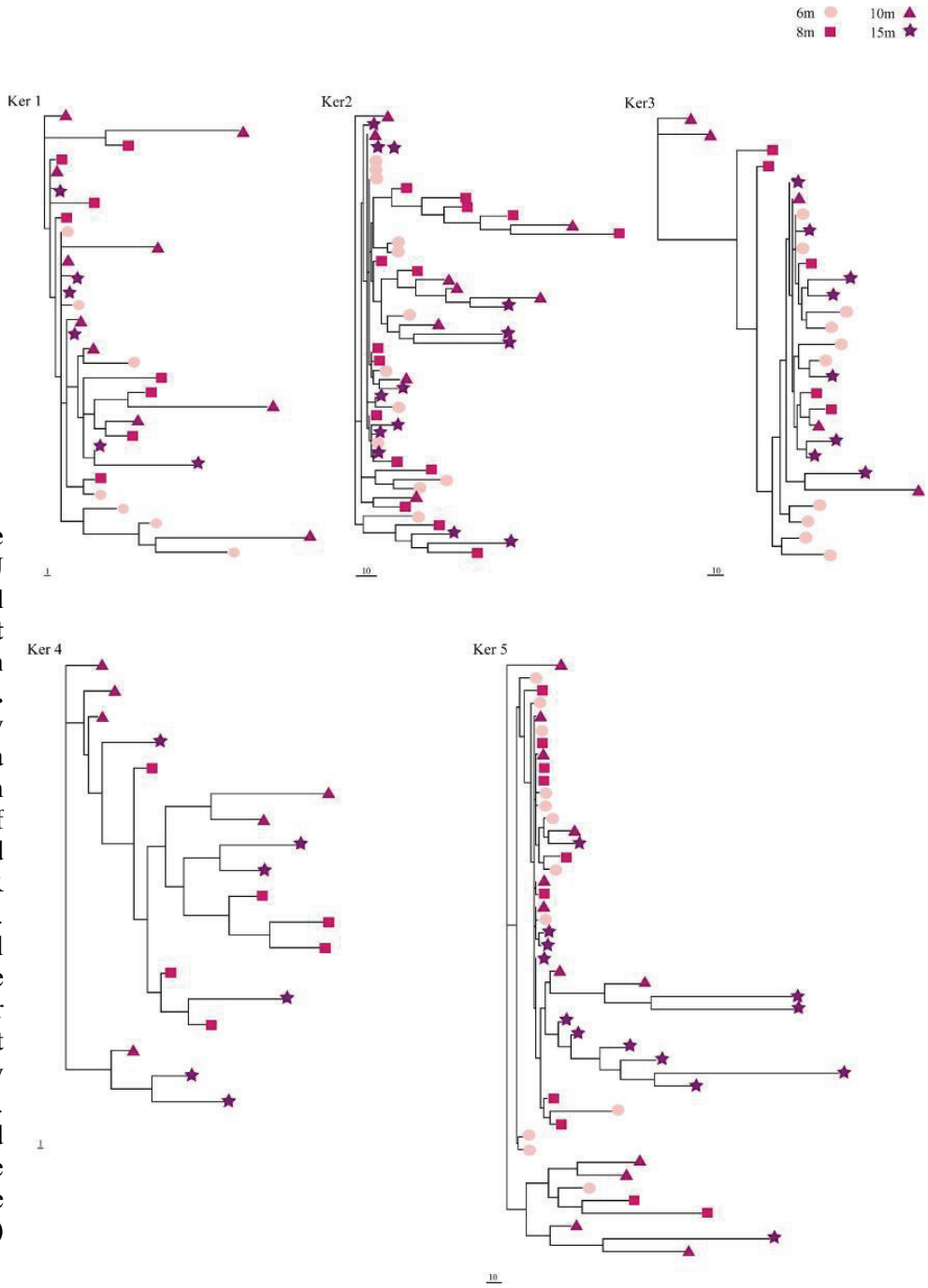



**Figure V-7 The similarity among SSU rRNA gene displayed as the shortest unrooted maximum parsimony topologies.** The shortest topology was found using a heuristic tree search with 500 replicates of random addition and using the TBR swapping algorithm. Each terminal corresponds to one community. The closer they are the most similar their diversity signature (T-RFs) is. The trees represented are computed from the same initial database according to time (A) and depth (B).

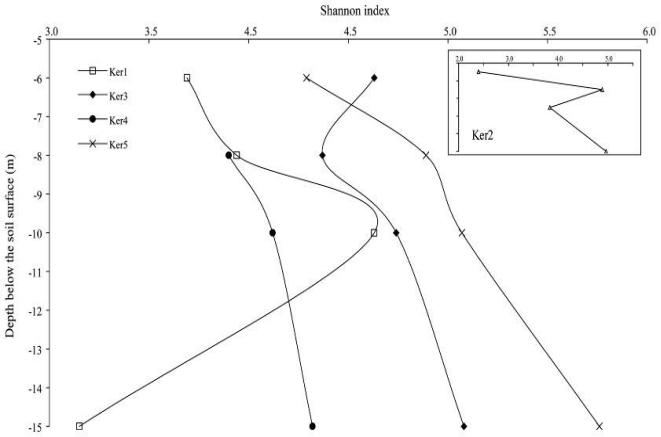



**Figure V-8: Diversity indexes versus depth obtained from the 16S rRNA gene T-RFLP analysis.**

### 4.4 - The narG gene diversity

The diversity indexes calculated from the T-RFLPs diversity signatures (Fig. V-9) changed with depth with a maximum values obtained at 8 and 10 m. From the Maximum of Parsimony topologies, no clear structuration of communities can be supported (Fig.V-10). As in the 16S rRNA gene analysis, time may structure the nitrate reducer diversity i.e. some campaigns can be distinguished (similarity between Ker4 and Ker5 campaigns), as well as individualization of the deepest wells (10 and 15 m). Even if little information is given by this analysis, the results are in agreement with those of the 16S rRNA gene analysis, time may structure the nitrate reducer diversity.

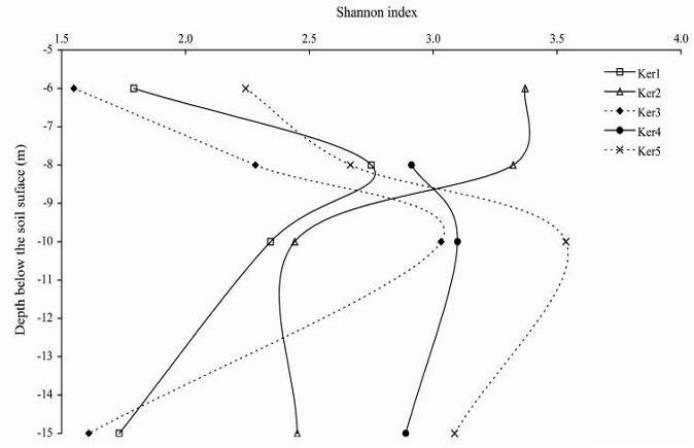



**Figure V-9 : Diversity indexes obtained from the *narG* gene T-RFLP analyses versus depth.**

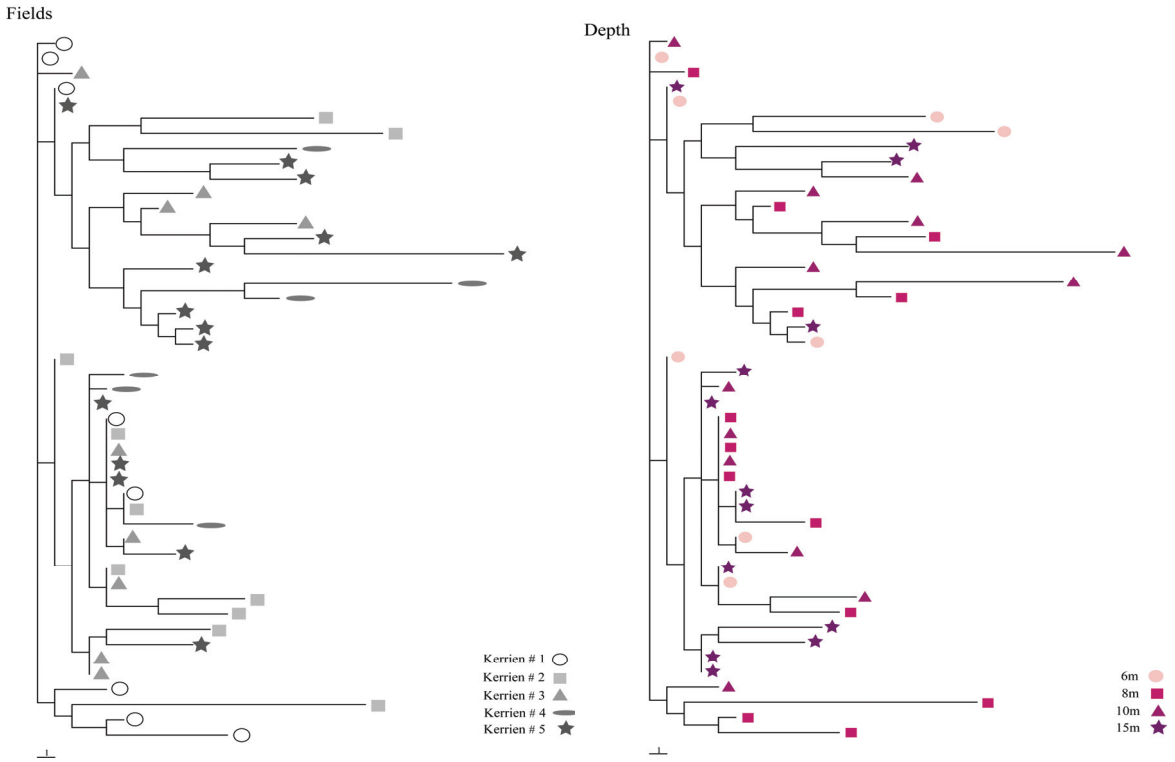



**Figure V-10: Similarity among *narG* gene displayed as the shortest unrooted maximum parsimony.** The shortest topology was found using a heuristic tree search with 500 replicates of random addition using the TBR swapping algorithm. Each terminal corresponds to a nitrate reducer community. The closer they are the more similar their diversity signature (T-RFs) is. The trees are issuing from the same database but represent among the time (A) and the depth (B).

## 5. Discussion

To analyse the microbial community composition, a PCR dependant molecular strategy was used to generate sequences and diversity signatures using the T-RFLP analysis. This latter strategy provides an interesting approach to assess the microbial diversity and to assess changes in microbial community structure that occur temporally or spatially or changes that occur in response to environmental perturbations (Liu *et al.*, 1997). Despite the high resolution level (Clement *et al.*, 1998) and the outstanding diversity signature reproducibility of T-RFLP analyses (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003), the specific band affectation to specific organism cluster is difficult. The T-RFLP analysis sensivity is of course lower than the sequencing analyses. Thus, as a preliminary step, the optimisation of the of the T-RFLP analyses is required. To do so, we have used sequences of 16S rRNA genes obtained from the environmental samples to analyse in the aim to maximize the polymorphism of the TRFs by selecting the best enzymes. The 2 enzymes chosen for the analyses of the 16S rRNAs amplicons have generated a total of 720 different TRFs. Similarly, a total of 112 different TRF were obtained when analysing the narG gene from the environmental samples. This level of polymorphism detected is high suggesting a high diversity. Most of the fingerprinting strategies do not reach such a high level because of a problem of detection. Thus, if a strong community structuration exists among modalities, we argue that these differences should be highlighted.

### 5.1. Bacterial characterization

***Bacterial diversity :*** The number of bacteria found in the water samples is characteristic of groundwater environment (Pedersen, 1997) with values ranging from $2\ 10^5$ to $2\ 10^6$ cells per milliliters. This number is however clearly inferior to those that can be found in soil environment. It was estimated that $10^{10}$ prokaryote microorganisms can coexist in one gram of soil (Torsvik et al., 1990). This difference can be explained by the low total organic carbon content of the Kerrien samples. The Kerrien unsaturated zone and groundwaters constitute an environment which can be considered as oligotrophe and more widely the Pristine aquifers are generally considered as oligotrophes (Ghiorse and Wilson, 1988). Surprisingly, a high and original bacterial diversity was found with at a minimum 27 different phylotypes (Fig. V-4). Considering the literature, no comparison can be done because when diversity is analysed in

groundwater or pristine aquifers, the studies focused on organic pollution (e.g. Alfreider & Voigt, 2007; Allen and Milenic, 2007) or other pollution types such as heavy metals (for review, Goldscheider et al., 2006). Nevertheless, the bacterial diversity discovered herein must be underestimated and more sequencing would be required to describe the whole diversity. In addition it has been shown recently that during the ammonia oxidation, the first step of nitrification, archaea prodominate their better known bacteria counterpart in pristine aquifer (Leininger et al., 2006). Thus we can speculate that in our environmental DNAs, archaea might also be detected. A global view of the microorganisms including bacteria but also archaea and eukaryotes (i.e. integrative diversity) should provide interesting outputs to better understand the microbial diversity in aquifers. From an evolutive point of view, the phylotype one (Fig. V-4) is very striking because it forms an old evolutionary lineage among the bacteria. More sequencing analyses would also allow to better resolve the phylogenetic position of this lineage and possibly would allow, if confirmed, new inputs in the knowledge of the bacterial evolution.

Our results indicate that depth influenced the microbial community composition. Actinomycetes, Bacteroidetes and α-proteobacteria are present only in the deeper zone (Fig V-4). We show a higher diversity and higher or similar number of species at 10 and 15 m than at 6 m. Our results disagree with the results of LaMontagne et al. (2003) who highlight a richness decline with depth through the vadose zone. However LaMontagne et al. (2003) compared bacterial communities in the subsurface soil with vadose zone (1-4 m). In our work we do not take into account the subsurface soil and compare the variably saturated zone (3-8 m) with the permanently saturated zone (8-15 m).

***Metabolic pathways :*** Our results do not support a clear conclusion about the microbial metabolic pathways. However the most likely hypothesis is a heterotrophic pathway. A previous study emphasized a heterotrophic activity in a similar environment (Legout et al., 2007). The negligible quantity of organic carbon measured in the samples implies that bacteria develop adaptations to specific nutrients. Subsurface communities are, in part, composed of surface microbes able to survive in the low nutrient conditions found at the subsurface (Holden and Fierer, 2005). In these systems, the heterotrophic life is supported by secondary organic component which are filtered from the soil (Ghiorse and Wilson, 1988). In the Kerrien context, nitrate is the main nutrient which is available whatever depth and time (Table V-2). No inverse relationship between nitrate and sulphate concentrations have been

observed, which rules out autotrophic pathways which have been observed elsewhere in similar environments (Ayraud *et al.*, 2006; Tarits *et al*., 2006). The nitrate reducing bacteria can represent 10 to 50 % of the environmental bacteria (Tiedje, 1988). Our results suggested that nitrate reducing bacteria is an important component of the Kerrien environment.

The absence of a clear depth structure for the nitrate reducing community can be attributable to the chemical concentration of minerals species, in particular a high nitrate concentration and a very low quantity of carbon, were surprisingly homogeneous along the whole water column. The nitrate reduction is strongly dependent on environmental conditions such as soil moisture, soil temperature, soil texture, nutrients and labile C availability (Knowles 1982; Clément *et al,.* 2002). The limited nitrate reduction can be attributed to the lack of organic carbon, and to a heterotrophic metabolic pathway. From the different sampling campaigns, only the first sampling at 6 m, displayed a contrasting pattern: a divergence in the nitrate reducer was found. For this sample a low $NO_3^-/Cl^-$ ratio (1.4) as compared to the other campaigns (~3) was measured. The low nitrate concentration is not related to a dilution process (no clear $Cl^-$ decrease). We assume that this difference is due to nitrate reducer activity. The T-RFLP analysis represents only the diversity and not the activity. The differences in concentrations may be the result of microbial activity related to environmental perturbation without modification in the composition microbial community. To address this hypothesis of modification in the activity among the microorganisms, qPCR or even more appropriate RT-qPCR analyses would be required.

### 5.2. Environmental influence on community structure

The water pumped from a well does not represent all the groundwater which is present around the well, but only the mobile water. The water which is more strongly bounded to the rock, especially in the microporosity (De Marsily, 1994), may represent an active part of the groundwater from a biological point of view (Legout *et al.*, 2005; Ayraud *et al.*, 2006; Tarits *et al*., 2006) which is not sampled by pumping. The relative contribution of mobile *vs* immobile water from a geological layer depends on its hydraulic conductivity. Consequently, bacteria in water samples from highly permeable layers may over-represent free-living bacteria (Goldscheider et al., 2006). However, the aim of this study is to determine the influence of hydrological fluxes on free-living bacteria. Furthermore, the purge test results showed that pumping had no influence on the community structure. This result confirms that

the bacteria in the water samples are characteristics of a great part of the water in the vadose zone environment.

***Effect of physical hydraulic recharge processes on the chemical concentrations :*** From a biological point of view, i.e. as regards the nutrients and oxygen concentrations, the chemical compositions are rather homogeneous, both with time and depth. Between the water table fluctuation zone (3-8 m) and the permanently saturated zone (8-15 m), no variation of the physico-chemical parameters is noticed (Table V-1). Slightly lower oxygen concentrations have been noticed at 15 m depth (Table V-1) but the redox conditions remain relatively oxidant whatever depth and time. The Kerrien subsurface community is characterized by a homogeneous redox environment. On the contrary, from a chemical (anion concentration) point of view the chloride concentrations indicate that hydraulic processes are important and modify the anion concentration (Fig. V-2). Nitrate and sulphate concentrations also present variations but these variations do not change the biological conditions (i.e. nitrate are always available and no reducing conditions appear). A $Cl^-$ seasonal variation at 15 m is present but is quite limited as regards the 6 m ones. The high $Cl^-$ variations observed at 6 m are strongly related to the water table fluctuations. During low water periods, the 6 m chloride concentrations are higher than at any other depth, and conversely during the high water periods, the 6 m chloride concentrations are lower than at any other depth (Fig. IV-2). Chloride is a conservative element; and is only influenced by physical processes such as evaporation or dilution (i.e. mixing). Mixing processes may be related to transport of waters with a different concentration (such as rainwater for example) and may be affected by convection. The chlorides concentration variation observed can be explained by recharge processes. During the recharge, different water compartments are mobilised : the mobile porosity and the immobile porosity (Legout et al., 2007). The mobile porosity transfers solutes down to the water-table through advection (through the effect of gravity in the mobile pore volume). The immobile or matrix porosity exchanges solutes with the mobile pore volume through diffusion. In the variably saturated zone, the mobile/immobile concept is somewhat made more complex through the evolution of the medium properties during the recharge process, it remains however useful to interpret the chemical variations. *i*) At the beginning of the hydrological cycle, at 6 m depth, the immobile porosity contains water with high chloride concentrations which is due to evapotranspiration during summer. During the water-table rise, the mobile porosity transfers waters with a high proportion of rainwater. This

leads to the saturation of the bulk volume of the water-table fluctuation zone, and low solute concentrations. Then mixing processes take place between matrix porosity and mobile porosity through diffusion, which leads to concentrations close to the 15 m ones. The whole processes are highly time dependant. *ii*) At 15 m depth, the seasonal variation is much more limited. It is mainly related to the vertical transfer from the variably saturated zone. Although it is time-dependant, it characterizes vertical transfer.

The physico-chemical parameters are constant with time, especially at 15 m. The composition and the structure of bacterial community in the subsurface groundwater are thus mainly influenced by hydrological conditions i.e. by physical rather than chemical processes. The distribution or the bacterial diversity is related to environmental characteristics or seasonal variations as shown in fig V-6. The relationships between the microbial populations and their environment are often complex and non linear. (Palumbo et al, 2004). In the case of the variably saturated zone, we suggest that the microbial variations time- and depth-related are linked to physical processes since the major difference is found between the 6 m and the 15 m communities.

***Effect of physical processes on the time-related bacteria diversity (6 m depth) :*** A diversity increase was observed during high water table periods in the fluctuation zone. During low water table periods, the chloride concentration decline is also concomitant to the diversity decrease. The chloride evolution at 6 m depth is strongly related to diffusion/mixing with the microporosity. Chloride diffusion might be also concomitant to bacterial diffusion. During subsurface bacterial transport, bacteria can passively migrate with the ambient groundwater flow or swim along a chemical gradient, they can attach to or detach from the solid matrix, and they can grow, die, or be consumed (Fenchel and Finlay, 2004). In oligotrophic environments, chemotaxis can be a very important transport mechanism (Ginn et al., 2002). It induces an increase of diversity and a dilution of present species. However this active process is oriented and chemotaxis is generally related to food availability which is not really the case when moving from soil to groundwater. The diversity increase might be related either to the introduction of bacteria from the soil or to the mobility of the microorganisms that migrate from the micro to the macroporosity. The soil influence is unlikely since the microorganisms are not adapted to the groundwater environmental conditions and because from the sequence analysis it is clear that very original microorganisms were detected in the samples of the Kerrien aquifer.

The species present in the fluctuation zone (6-8 m) have to be well adapted and thus must be specific to this zone. They bear a cyclic hydro stress more or less pronounced according to the hydrological year. The cyclic hydro stress induces a seasonal variation from advective transport which allows chemotaxis when the water content is sufficiently high to create a continuous water film (Schaefer et al., 1995), to limited transport conditions governed by capillary forces when the water content is low (Huysman and Verstracte, 1993). Such variation may explain the short-term diversity observed from the T-RFLP 16S analysis. Conversely, during the 2004-2005 hydrological cycles, the water-table was relatively low and never exceeded 4 m below the soil surface. The gradual humidity increase from 2005 can thus influence the gradual microbial diversity increase, i.e. the long-term diversity variation.

***Effect of physical processes on the depth-related bacteria diversity (15 m depth):*** In the deeper zone, the physical processes are different. The weathered granite presents a under constant water saturation. The bacteria thus do not bear cyclic hydro stress. High waters periods are characterized by an increase of diversity and a 'mixing' of bacterial communities along the water column. This diversity variation can be explained as a mixing of non-native and native species. Indeed, the number of bacterial cells at 15 m and 6 m is nearly the same. Vertical solutes and bacterial fluxes related to the recharge process can relate the 6 m depth bacterial communities to the 15 m depth ones. The small size of the bacteria can facilitate long distance passive dispersal. Furthermore, bacteria can form dormant life stages that enable them to survive long distant transport and harsh environmental conditions (Green and Bohannan, 2006). This was especially observed for Bacillus (Plomp, 2005). Between two hydrological cycles, the global community composition changes but a certain similarity is conserved. It is considered as a long-term changes. As mentioned above, it might be related to the global evolution during the monitoring period from a relatively dry to a more humid period.

Stable conditions are generally associated with increasing diversity, while disturbed environments lead to the outgrowth of dominant adapted populations (Torsvik et al., 2002, Haack et al., 2004), which can result in an 'epidemic' population structure […] *when a successful individual arises and increases rapidly to produce an epidemic clone* […] (Maynard –Smith et al., 1993). In fact, environmental changes or perturbations might induce higher infraspecific diversity, to select more rapidly adapted genotypes leading to the appearance of 'epidemic' population structure (e.g. Vandenkoornhuyse et al., 2001). This

hypothesis would need to be tested. To address this working hypothesis, genetic diversity should be analysed by *de novo* sequencing of the metagenome by pyrosequencing allowing to detect the single nuclear polymorphisms (SNPs) and subsequently to measure the level of variation of these SNPs.

The observations in the vadose zone agree with the hypothesis of increased bacterial community diversity in stable conditions. The water table fluctuation zone displays a specific community including a lower diversity (Fig V-6; Table V-3). Few meters below, the 15 m depth communities present a higher diversity related to the seasonal mixing with the more specific bacteria from the variably saturated zone.

The compartmentalization observed with depth is seen through the time with a clear bacterial community structuration (Fig. V-6). Microbial interaction may also contribute to the community structure but little is known about the interaction of species within microbial communities during the transport processes (Balkwill et al., 1998). Our results do not confirm potential interaction during transport but rather emphasize the potential 'mixing' of bacterial communities from two different environments.

## 6. Conclusion

The bacterial diversity estimations and the comparisons of community composition along a depth profile during a succession of three hydrological cycles provided clear evidence about a bacterial community structuration (Fig V-6). Although the physico-chemical conditions are rather similar through time, a bacterial community differentiation was highlighted at every depth (FIG V-6, results at 8 and 10 m not shown). We thus suggest that the physical processes of water migration should influence the bacterial community structure and diversity. This can also be explained by local competition among microorganisms which might result in differentiation of communities through time (Fig V-6) leading to a drift in the communities composition. The physical transport induced by the recharge process should stimulate a higher diversity in the permanently saturated zone, even several meters below the water table variation zone. Our results suggest that the physical structuration of water fluxes in the aquifer plays an important role in the bacterial structure.

## 7. Reference

Alfreider A. and Vogt C. (2007) Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. Water Air and Soil Pollution 183: 415-426

Allen A R. and Milenic D. (2007) Groundwater vulnerability assessment of the Cork Harbour area, SW Ireland. Environmental Geology, 53: 485-492

Ayraud V. (2006) Détermination du temps de résidence des eaux souterraines : application au transfert d'azote dans les aquifères fracturés dans les aquifères hétérogènes. Mémoire de thèse CAREN , Université de Rennes I, Rennes, 297pp

Ayraud V., Aquilina L., Pauwels H., Labasque T., Pierson-Wickmann A.C., Aquilina A.M. and Gallat G. (2006) Physical, biogeochemical and isotopic processes related to heterogeneity of a shallow crystalline rock aquifer. Biogeochemistry, 81:331-347

Balkwill D.L., Murphy E.M., Fair D.M., Ringelberg D.B. and White D.C. (1998) Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the vadose zone. Microbial Ecology, 35: 156-171

Berkowitz B. (2002) Characterizing flow and transport in fractures geological media: A review. Advances in Water Resource, 25:861-884

Chèneby D., Hallet S., Mondon A., Martin-Laurent F., Germon J.C.and Philippot L. (2003) Genetic characterization of the nitrate reducing community based on *narG* nucleotide sequence analysis. Microbial Ecology, 46: 113-121

Clement B. G., Kehl L. E., DeBord K. L. & C. L. Kitts**,** 1998 - Terminal restriction fragment pattern (TRFPs), a rapid PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. Journal of Microbiological Methods*,* 31: 135-142.

Clément JC, Aquilina L, Bour O, Plaine K**,** Burt TP and Pinay G (2003) Hydrological flowpaths and nitrate removal rates within a riparian floodplain along a fourth-order stream in Brittany (France). Hydrological processes, 17: 1177-1195

Clément J.C., Pinay G. and Marmonier P. 2002. Seasonal dynamics of denitrification along topohydrosequences in three different riparian wetlands. Journal of Environmental Quality 31:1025–37

Colwell R.K. (2005) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: http://purl.oclc.org/estimates.

De Marsily G. (1994) Hydrogéologie : Comprendre et estimer les écoulements souterrains et le transport de polluants. Paris, Ecole des Mines de Paris

Derby N. and Knighton R. (2001) Field-scale preferential transport of water and chloride tracer by depression-focused recharge. Journal of Environmental Quality, 30:194–199

Dunn A. M., Silliman S. E, Dhamwichukorn S. and Kulpa C. F. (2005) Demonstration of microbial transport into the capillary fringe via advection from below the water table. Journal of Hydrology, 306: 50-58

Fenchel T. and Finlay B.J. (2004) The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. BioScience, 54: 777-784

Fisk M.C., Ruether K.F. and Yavitt J.B. (2003) Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems Soil Biology and Biochemistry, 35: 591 – 602

Fretwell B.A., Burgess W.G., Barker J.A. and Jefferies N.L. (2005) Redistribution of contaminants by a fluctuating water table in a micro-porous, double-porosity aquifer: Field observations and model simulations. Journal of Contaminant Hydrology, 78:27-52

Ghiorse W.C. and Wilson J.T. (1988) Microbial ecology of the terrestrial subsurface. Advances in applied microbiology, 33:107-72.

Ginn T.R., Wood B.D., Nelson K.E., Scheibe T.D., Murphy E.M. and Clement T.P. (2002) Processes in microbial transport in the natural subsurface. Advanced in Water Resources, 25: 1017-1042

Goldscheider N., Hunkeler D. and Rossi P. (2006) Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods. Hydrogeology Journal, 14: 926-941

Green J. and Bohannan B.J.M (2006) Spatial scaling of microbial biodiversity. Microbial ecology, 21 : 501-507

Haack S.K., Fogarty L. R., West T.G., Alm E.W., McGuire J.T., Long D.T., Hyndman D.W. and Forney L. J. (2004) Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge – influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. Environmental Microbiology, 6:438-448

Haria A.H. and Shand P., (2004) Evidence for deep subsurface flow routing in forested upland Wales: implications for contaminant transport and stream flow generation. Hydrology and Earth System Sciences, 8 :334-344

Harvey R.W., Kinner N.E., MacDonald D., Metge D.W. and Bunn A. (1993) Role of physical heterogeneity in the interpretation of small-scale laboratory and field observations of bacteria, microbial-sized microsphere, and bromide transport through aquifer sediments. Applied and Environmental Microbiology, 29: 2713-2721

Hedin L.O., von Fischer J.C., Ostrom N.E., Kennedy B.P., Brown M.G. and Robertson G.P. (1998) Thermodynamic constraints on nitrogen transformations and other biogeochemical processes at soil – stream interfaces. Ecology 79: 684 – 703

Hill A.R., Devito K.J., Campagnolo S. and Sanmugadas K. (2000) Subsurface denitrification in a forest riparian zone: interactions between hydrology and supplies of nitrate and organic carbon. Biogeochemistry 51: 193–223

Holden P. and Fierer N. (2005) Microbial Processes in the Vadose Zone. Vadose Zone Journal, 4:1-21

Huysman F, and Verstracte W (1993) Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: Influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. Soil Biololgy and Biochemistry 25:83-90

Knowles R. 1982. Denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 46:43-70

LaMontagne M.G., Schimel J.P. and Holden P.A. (2003) Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. Microbial Ecology, 46:216-227

Legout C., Molenat, J., Lebevre, S., Marmonier, P. and Aquilina, L. (2005) Investigation of biogeochemical activities in the soil and unsaturated zone of weathered granite. Biogeochemistry, 75:329-350

Legout C. (2006) Etude des mécanismes hydrologiques et biogéochimiques de la recharge des nappes à surface libre. Mémoire de thèse CAREN Université Rennes 1 180pp

Legout C., Molenat J., Aquilina L., Gascuel-Odoux C., Faucheux M., Fauvel Y. and Bariac T. (2007) Solute transfer in the unsaturated zone-groundwater continuum of a headwater catchment Journal of Hydrology, 332: 427-441

Liu W.T., Marsh T.L., Cheng H. and Forney L.J. (1997) Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. Applied and Environmental microbiology, 63: 4516-4522

Leininger S., Urich T., Schloter M, Schwark L, Qi J, Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C. and Schleper C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature 442: 806-809

Losos J.B. (1996) Phylogenetic perspectives on community ecology. Ecology, 77:1344 - 1354

Magurran A E (1988) Ecological diversity and its measurements. Princeton university press, Princeton (New Jersey)

Massana R., Castresana J., Balagué V., Guillou L., Romari K., Groisillier A., Valentin K., and Pedrós-Alió C (2004) Phylogenetic and Ecological Analysis of Novel Marine Stramenopiles, Applied and Environmental Microbiology, 70: 3528-3534

Martin C. (2003) Mécanismes hydrologiques et hydrochimiques impliqués dans les variations saisonnières des teneurs en nitrates dans les basins versants agricoles. Approche expérimentale et modélisation. Rennes, Université de Rennes I

Martin C., Aquilina L., Gascuel-Odoux C., Molénat J., Faucheux M. and Ruiz L. (2004a). Seasonal and inter-annual variations of nitrate and chloride in stream waters related to spatial and temporal patterns of groundwater concentrations in agricultural catchments. Hydrological Processes, 18 :1237–1254

Martin C., Molénat J., Gascuel-Odoux C., Vouillamoz J. M., Robain H., Ruiz L., Faucheux M. and Aquilina L. (2004b). Modelling the effect of physical and chemical characteristics of shallow aquifers on water and nitrate transfer in small agricultural catchments. Submitted to Journal of Hydrology

Martin C., Pierson-Wickmann A.-C., Aquilina L., Ruiz L., Jaffrezic A., and Gascuel-Odoux C. (2004c). High chemical weathering rates in first-order granitic catchments induced by agricultural pressure. submitted to :. Chemical Geology

Maynard-Smith J., Smith N.H., O'Rourke M. and Spratt B.G. (1993) How clonal are bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90: 4384-4388

Molénat J. (1999) Rôle de la nappe sur les transferts d'eau et de nitrate dans un basin versant agricole. Etude expérimentale et modélisation. Rennes, Université de Rennes I, 269p

Molénat J., Aquilina L., Pierson-Wickmann A.C., Legout C., Marmonier P., Ruiz L., Vanderkoornhuyse P., Bougon N., Gascuel C., Mérot P., Faucheux M., Labasque T., Hamon Y. and Hénin O. (2007) Etude du rôle de l'interface SOl-NAppe sur les processus de Transfert de solutés, d'Erosion chimique et sur la diversité bactérienne dans un bassin versant (SONATE), Actes du colloque de clôture du programme Ecosphère Continentale. Toulouse, 5-7 décembre, 6 pages

Murphy E.M. and Ginn T.R. (2000) Modeling microbial processes in porous media. Hydrogeology Journal, 8: 142-158

Packman A.I., Salehin M. and Zaramella M. (2004) Hyporheic exchange with gravel beds: basic hydrodynamic interactions and bedform-induced advective flows Journal of Hydraulic Engineering, 130: 647–656

Palumbo A.V., Schryver J.C., Fields M.W., Bagwell C.E., Zhou J-Z, Yan T., Liu X. and Brandt C.C. (2004) Coupling of functional gene diversity and geochemical data from environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 70: 6525-6534

Pedersen K. (1997) Microbial life in deep granitic rocks. FEMS Microbiology Reviews, 20:399-414

Philippot L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. Biochimica Biophysica Acta, 1577:355-376

Plomp M., Leighton T.J., Wheeler K.E. and Malkin A. J. (2005) The High-resolution architecture and structural dynamics of *Bacillus* Spores. Biophysical Journal, 88 : 603-608

Posada D. and Crandall K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics Applications Note, 14: 817-818

Rawlins B., Baird A., Trudgill S. and Hornung M. (1997) Absence of preferential flow in the percolating waters of a coniferous forest soil. Hydrological Processes, 11:575–585

Rockhold ML, Yarwood RR and Selker JS (2004) Coupled microbial and transport processes in soil. Vadose Zone J 3: 368-383

Sabater S, Butturini A, Clement JC, Burt T, Dowrick D, Hefting M, Maître V, Pinay G, Postolache C, Rzepecki M and Sabater F (2003) Nitrogen Removal by Riparian Buffers along a European Climatic Gradient: Patterns and Factors of Variation. Ecosystems 6: 20–30

Saitou N. and Nei N. (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. Molecular biology and Evolution, 14: 276-284

Schaefer C.E., Arands R.R., v.d.Sloot H.A. and Kosson D.S. (1995) Prediction and experimental validation of liquid-phase diffusion resistance in unsaturated soils. Journal of Contaminant Hydrology, 20:145-166

Schmitt-Wagner D., Friedrich M.W., Wagner B. and Brune A. (2003) Axial Dynamics, Stability, and Interspecies Similarity of Bacterial Community Structure in the Highly Compartmentalized Gut of Soil-Feeding Termites (*Cubitermes* spp.). Applied and Environmental Microbiology, 69: 6018-6024

Sokal R.R. and Rohlf D.J. (1995) Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 3rd edn. W.H. Freeman &Co., New York

Swofford D.L. (1993) PAUP : Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0 BETA, Florida state University

Tarits C., Aquilina L., Ayraud V., Pauwels H., Davy P., Touchard F. and Bour O. (2006) Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). Applied Geochemistry, 21: 29-47

Thioulouse J., Chessel D., Doledec S., and Olivier J.M. (1997) ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. Statitics and computing, 7:75-83

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmouguin F. and Higins D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876-4882

Tiedje J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. p. 179-244. In A.J.B. Zehnder (ed), Environmental Microbiology of Anaerobes. John Wiley and Sons, N.Y.

Torsvik V, Goksøyr J and Daae F L (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 56: 782-787

Torsvik V., Øvreås L., and Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. Science, 296 :1064-1066

Trevors J.T., van Elsas J.D., VanOverbeek L.S. and Starodub M.E. (1990) Transport of a genetically-engineered Pseudomonas fluorescens strain through a soil microcosm. Applied and Environmental Microbiology, 56:401-408

Vandenkoornhuyse P., Leyval C. and Bonnin I. (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal for recombination events. Heredity, 87: 243-253

Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T.J., Watson I.J., Duck J.M., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2002) Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Molecular Ecology, 11: 1555-1564

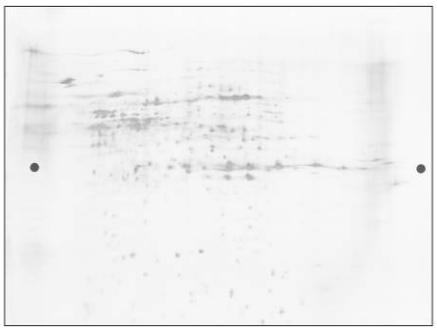
Vandenkoornhuyse P., Ridgway K.P., Watson I.J., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. Molecular Ecology, 12: 3085-3095

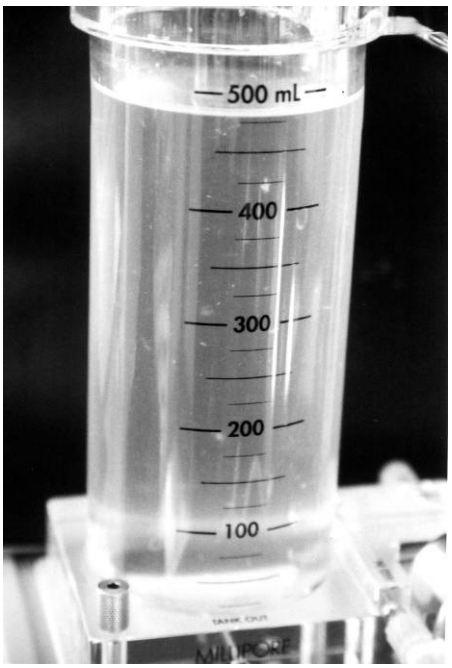
Vandenkoornhuyse P., Mahé S., Ineson P., Staddon P., Ostle N., Cliquet J-B,Francez A-J, Fitter A.H. and Young J.P.W. (2007) Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104: 16970–16975

Vidon PGF and Hill AR (2004) Landscape controls on the hydrology of stream riparian zones. Journal of Hydrology, 292: 210–228

# PARTIE VI

## Compréhension fonctionnelle des microorganismes à l'interface Sol-Nappe / métaprotéomique : Conséquences de paramètres de forçages






L'analyse de Métaprotéomique qui est abordée dans ce chapitre est basée sur l'étude de la diversité bactérienne réalisée sur le site expérimental de Kerrien., pour obtenir des informations fonctionnelles sur la réponse d'une communauté microbienne soumise à un stress en carbone.

# 1. Résumé

Pour comprendre le fonctionnement biotique du milieu, des prélèvements d'eau souterraine ont été effectués sur le site expérimental de Kerrien. Les analyses ont été effectuées sur la plate-forme protéomique Ouest Genopole[1]. En Protéomique, les techniques de base reposent sur la combinaison de méthodes de séparation des protéines, telle que l'électrophorèse 2D haute résolution couplée à la spectrométrie de masse et à la bio-informatique, et permettent l'identification et la caractérisation des protéines faiblement exprimées.

Le choix des volumes a été déterminé à la suite d'une expérience préliminaire (notée dans le texte expérience #1). Ce volume a été calculé de façon à obtenir assez de matériel protéique pour effectuer une identification systématique des protéines et une expression différentielle. L'expérience #1 a de plus permis la mise au point d'une technique d'extraction de protéines et de montrer la faisabilité de l'expérience. La réponse fonctionnelle des communautés microbiennes obtenue avec l'expérience #2 montre une différence importante face à deux sources carbonées (acétate et glucose). Ces deux sources de carbone ont été ajoutées de façon à tester la réactivité des communautés microbiennes face à des modifications de paramètres de forçage. La différence d'expression protéique souligne l'utilisation de deux voies métaboliques distinctes. Dans le cas des expériences avec ajout d'acétate, l'essentiel des protéines identifiées joue un rôle dans le cycle de l'acide citrique. Dans le cas des expériences avec ajout de glucose, les protéines rencontrées ont été plus difficilement déterminées et peu d'entre elles ont été à ce jour identifiées. La quantité insuffisante d'information produite par l'analyse du métaprotéome ne permet pas de déduire les conséquences induites par l'ajout de glucose. Cependant, l'absence d'identification de protéines impliquées dans la glycolyse et la faible consommation de glucose permet de supporter les hypothèses de compétition et d'inhibition. Ainsi on a pu mettre en évidence que la disponibilité en carbone est essentielle pour réduire les nitrates mais que la nature du carbone contrôle l'efficacité de l'activité bactérienne. Les analyses différentielles en cours devraient permettre de mieux comprendre les conséquences fonctionnelles liées à la nature du carbone consommé.

[1] http://www.innovaproteomics.com/index.php?lang=0&section=7&classeur=1

## 2. Introduction

Les études fonctionnelles globales comme la protéomique et la transcriptomique ont la capacité d'augmenter très rapidement notre connaissance des processus fonctionnels et par conséquent des processus écologiques. Les études reliant la façon dont l'organisme ou la communauté répond à des modifications environnementales fournissent un aperçu des propriétés physiologiques et des stratégies adaptatives. Comme il a été décrit précédemment (Partie I) les communautés microbiennes jouent un rôle essentiel dans la régulation des écosystèmes. Ainsi la compréhension de leur fonctionnement et de leur régulation face à des modifications environnementales est essentielle pour bien appréhender les risques de pollution sur le milieu.

Comprendre comment une communauté bactérienne naturellement exposée à des faibles teneurs en carbone (ou autre molécule) répond face à un stress chimique est particulièrement intéressante. La réalisation d'empreintes peptidiques[2] effectuées par une analyse du métaprotéome du milieu permet d'apporter des informations sur son fonctionnement. L'analyse du Métaprotéome est particulièrement enthousiasmante puisqu'elle permet, en mesurant le taux d'expression des protéines, de suivre les conséquences fonctionnelles des paramètres environnementaux. Les variations de ces paramètres peuvent être suivies *in situ* ou provoquées au laboratoire. Deux types d'approches existent en métaprotéomique : une approche dite classique de détermination systématique des protéines et une approche différentielle qui vise à quantifier la différence d'expression relative entre deux conditions environnementales.

L'application environnementale de l'approche de protéomique classique a été utilisée à huit reprises dans différents travaux qui seront présentés ci-après. En revanche aucune étude à notre connaissance n'a utilisé l'approche différentielle dans une optique environnementale. Elle apparaît pourtant essentielle pour définir les groupes fonctionnels impliqués dans la réponse d'une communauté aux perturbations. Les observations sur le terrain ont mis en

[2] Une **protéine** est une macromolécule composée par une séquence d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques. En général, on parle de protéines lorsque la chaîne contient plus de 100 acides aminés. Sinon, le terme de **peptides** et de polypeptides est employé. L'enchaînement des acides aminés est codé par le génome et constitue la structure primaire. La **synthèse protéique** est réalisée en deux étapes : la **transcription** où l'ADN codant pour la protéine est transcrit en ARN messager et la **traduction** où l'ARN messager est traduit en protéine en fonction de l'information présente dans le code génétique. L'assemblage d'une protéine se fait donc acide aminé par acide aminé de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale. Il faut également bien noter qu'un gène n'est pas forcément associé à une seule protéine mais bien souvent à plusieurs.

évidence que l'eau souterraine du site expérimental de Kerrien (Partie V) est naturellement pauvre en carbone (<1mg/L) et riche en nitrate (> 70mg/L). Ainsi pour tester l'impact des modifications de concentration en carbone deux sources ont été testées : l'acétate et le glucose. L'acétate est un intermédiaire clé dans la dégradation bactérienne aérobie de la matière organique (Ljungdahl, 1986). Cette molécule est souvent utilisée comme un système modèle simple pour simuler la matière organique plus complexe (par exemple : Pourret *et al.*, 2006). Le glucose est une molécule clé du métabolisme énergétique utilisée par de nombreux microorganismes (par exemple : Demoling *et al.*, 2007).

Les objectifs de cette étude sont de voir (1) quelle source de carbone est préférentiellement utilisée pour réduire les fortes teneurs en nitrates et (2) quelles voies métaboliques sont impliquées dans le processus de réduction des nitrates. Pour effectuer cela, un suivi chimique des concentrations en nitrates, glucose et acétate a été couplé à une analyse du métaprotéome.
L'originalité de l'étude porte sur l'application de l'approche différentielle à une application environnementale, en testant la différence d'expression relative suivant la nature du carbone implémentée dans le milieu.
Avant d'aborder la description de la procédure expérimentale et de discuter les résultats, un récapitulatif des travaux menés à ce jour dans le domaine de la métaprotéomique et la présentation de deux méthodes permettant d'accéder au métaprotéome.

## 3. La métaprotéomique jusqu'à aujourd'hui

L'essentiel des travaux réalisés dans le champ de la protéomique se sont focalisés sur l'étude d'une seule espèce soumise à différentes conditions expérimentales, laissant de côté le potentiel des protéomes de communautés microbiennes largement inexploré, malgré différents travaux publiés montrant la puissance de ce type d'outil. A ce jour, neuf études sur le protéome de mélanges bactériens à partir de différents systèmes environnementaux ont exploré le champ de la métaprotéomique.
Wilmes et Bond (2004) ont développé les méthodes de gel d'électrophorèse en 2D classique pour une analyse protéomique d'un mélange de communautés microbiennes impliquées dans l'élimination biologique du phosphore. Ce travail a été approfondi plus avant pour permettre l'analyse comparée de deux bio réacteurs avec des performances d'élimination du phosphore distinctes (Wilmes and Bond, 2006a). L'analyse métaprotéomique de ces systèmes a mis en

avant des schémas d'expression protéique assez stables au sein des réacteurs présentant une meilleure capacité d'élimination des phosphores. Alors que l'étude est toujours dans ses balbutiements, elle a permis à Wilmes et Bond de suggérer qu'un avantage bioénergétique est disponible dans le réacteur à fonctionnement optimal du fait de son équilibre d'expression protéique (Wilmes and Bond, 2006b). La détection des protéines a été approchée par 2D-MS mettant en évidence un grand nombre de protéines mais ne pouvant en identifier que trois. Cette étude a démontré la faisabilité de l'utilisation de la protéomique pour un mélange de communautés.

Schulze *et al.* (2005) ont aussi réalisé une empreinte protéomique sur la matière organique dissoute issue d'environnements différents (lac et sols forestiers) et ont analysé les fonctions catalytiques potentielles au sein de ces écosystèmes. Les environnements analysés montrent des différences nettes dans leur composition protéomique. La contribution des différents types d'organismes au pool protéique va varier suivant le type d'écosystème, la profondeur des sols et les saisons. Ils ont ainsi mis en avant que les enzymes impliquées dans la dégradation de la matière organique ne pouvaient pas être les mêmes que celles retrouvées libres dans la matière organiques dissoute des sols. Les enzymes impliquées dans la dégradation de la matière organique dans les sols sont étroitement liées aux particules du sol.

La même année, Kan *et al.* (2005) ont étudié l'estuaire de la baie de Chesapeake, le plus grand estuaire des Etats-Unis, par un gel électrophorèse en 2D couplé à la spectrométrie de masse basée sur l'identification des protéines par MALDI-TOF MS, ils ont ainsi pu en identifier 8. Les estuaires comportent un fort gradient environnemental, ce sont ainsi de bons systèmes modèles pour effectuer une étude intégrée sur la composition et la fonction des communautés microbiennes. La comparaison du métaprotéome du milieu de la baie à celui de la partie basse et haute indique respectivement 70% et 30% de spots protéiques identiques. Ce schéma peut être pleinement ou partiellement expliqué par la différence au sein des structures de populations de ces échantillons. L'empreinte génétique réalisée dans la baie a montré que la communauté de bactérioplancton dans la partie supérieure est différente de celle de la partie distale et moyenne. Cette étude est la première approche du métaprotéome sur un mélange de communauté microbienne aquatique et démontre le potentiel des approches de métaprotéomique pour relier les données de métagénomique, la diversité taxonomique, la diversité fonctionnelle et les processus biologiques dans un environnement naturel.

La plus vaste analyse de métaprotéome a été réalisée sur un biofilm microbien naturel par le groupe de Jillian Banfield basé à l'Université de Californie de Berkeley. L'étude sur les eaux de drainage de milieux acides miniers (Ram *et al.*., 2005) a notamment permis l'identification

de plus de 2000 protéines à partir du séquençage de communautés microbiennes échantillonnés sur la même mine mais à une localisation et une période différentes. Des protéines impliquées dans la réponse à un stress oxydatif ont été identifiées parmi les protéines fortement exprimées, donnant ainsi un fonctionnement écologique des biofilms microbiens. L'avantage majeur de l'étude du métaprotéome est l'absence de présélection des gènes supposés être présents dans l'environnement étudié comme il est nécessaire en transcriptomique. L'absence de ce biais permet ainsi à Ram *et al.* (2005) de détecter un nouvel et abondant cytochrome qui joue un rôle pivot dans l'oxydation du fer et de la formation du biofilm.

Récemment, Lacerda *et al.* (2007) ont utilisé cet outil pour obtenir des informations fonctionnelles sur la réponse dynamique d'une communauté microbienne soumise à un stress de toxicité en cadmium. La communauté analysée qui n'avait jamais été exposée au Cd permet de tester la réponse métabolique face à un stress chimique. Cette étude a permis d'identifier des marqueurs protéiques de changements environnementaux significatifs, par l'utilisation de spectrométrie de masse couplée à du séquençage *de novo*. Le protéome des cellules exposées au Cd était significativement différent suivant la durée d'exposition. Cela suggère que la réponse au stress d'une communauté est fonction de la durée d'exposition. Les protéines identifiées dans cette étude et la structuration temporelle de l'expression protéique, apportent non seulement des informations sur la confirmation de la toxicité du Cd pour les organismes au sein d'une communauté, mais apporte aussi un aperçu des mécanismes de tolérance et de résistance (Lacerda *et al.*, 2007).

Benndorf *et al.* (2007) ont développé une technique d'extraction au phénol pour extraire les protéines à partir d'eaux souterraines et de sols contaminés. Pour séparer les protéines des constituants organiques et inorganiques de la matrice du sol, la méthode d'extraction combine une extraction alcaline des protéines et une purification par extraction au phénol. L'incubation au NaOH libère les protéines et les acides humiques des sols minérals, ainsi que des cellules bactériennes altérées. L'extraction au phénol permet de séparer les protéines des acides humiques. Cette méthode a été appliquée sur deux métaprotéomes environnementaux : (1) un sol contaminé en acide 2.4-chlorophenoxy acétique et enrichi en bactéries dégradant ces acides ; et (2) une eau souterraine issue d'un aquifère contaminé par des chlorobenzènes. Ils ont ainsi pu identifier 29 protéines sur 90 bandes excisées sur un gel d'électrophorèse en 1D et 26/50 pour un gel d'électrophorèse en 2D. Ces protéines sont impliquées dans l'expression des voies métaboliques supposées être exprimées dans les échantillons testés. Le protocole permet ainsi l'analyse de métaprotéome dans le sol et l'eau souterraine.

Maron et al. (2007a) ont développé une stratégie pour optimiser l'extraction protéines bactériennes environnementales. Cette stratégie consiste à extraire, purifier et séparer les protéines bactériennes totales à partir d'une matrice ; en combinant les techniques de sonication, de tampon de lyse et d'ultracentrifugation sur gradient de densité Nycodenz. La faisabilité et la pertinence de cette stratégie déjà démontrées pour l'extraction d'ADN et la caractérisation les structures génétiques des communautés bactériennes indigènes se sont avérées recevables pour l'extraction de protéines bactériennes environnementales. Maron et al (2007a) ont adopté cette technique pour caractériser la sensibilité et la réactivité de Métaprotéome de communautés microbiennes indigènes soumises à une contamination au mercure et au cadmium ; en parallèle d'une détermination de l'influence de ces modifications environnementales sur la structure génétique des communautés. Ils ont mis en avant une sensibilité plus élevée des communautés microbiennes au cadmium qu'au mercure. Cette réponse se traduit par une simplification de l'empreinte peptidique et un plus fort impact sur la structure génétique.

Récemment l'approche métaprotéomique (Maron *et al.*, 2007b) a été pointée comme une nouvelle approche pour étudier l'écologie microbienne. Les études sur le métaprotéome couplées à celles sur le métagénome et le métatranscriptome vont contribuer à améliorer la connaissance actuelle des communautés microbiennes et leur contribution dans le fonctionnement de l'écosystème. Maron *et al.* (2007b) soulignent de plus l'importance de l'analyse du métaprotéome dans des situations environnementales contrastées dans la mise en évidence de nouveaux gènes fonctionnels et voies métaboliques et dans l'identification de protéines préférentiellement associées à des stress spécifiques.

L'ensemble des travaux met en avant la faisabilité de l'analyse de métaprotéomes environnementaux, pour différents types de milieux. De plus la métaprotéomique est un moyen d'étudier la diversité des communautés microbiennes environnementales tout en abordant l'aspect fonctionnel et ce de façon plus directe qu'avec l'analyse métagénomique.

## 4. Comment accéder au protéome ?

Les méthodes d'analyses protéomiques peuvent être divisées en deux catégories majeures : une approche « **classique** » qui tente de cataloguer les protéines et de déterminer

leur abondance, et une approche « **fonctionnelle** » qui reprend les protéines classifiées pour déterminer leurs activités et les interactions potentielles protéines : protéines.

## 4.1 Approche classique

### 4.1.1 Séparation des protéines

Les méthodes de protéomiques sont basées sur l'analyse de gel d'électrophorèse classique en 2 dimensions. La séparation des protéines est réalisée en 2 phases (Fig. VI-1); dans un premier temps les protéines migrent suivant leur point isoélectrique et suivant leur taille. Le point isoélectrique ou pI correspond au pH à laquelle une molécule ne comporte aucune charge électrique. Sur un même gel d'électrophorèse en 2D classique, il est possible de séparer plus de 10000 protéines différentes (Link *et al.*, 1999).

#### 4.1.1.1 Séparation suivant la charge

Pour séparer les protéines suivant leur point isoélectrique, un gradient de pH est appliqué sur le gel d'iso-électro-focalisation (IEF) et la migration s'accomplit dans un champ électrique appliqué au gel, rendant une extrémité plus positive que l'autre (Fig.VI-1). A tous les pH autres que leur point isoélectrique, les protéines sont chargées et migrent. Si elles sont chargées positivement, elles seront attirées vers l'extrémité plus négative du gel et inversement si elles sont chargées négativement. Une fois la région du gel correspondant à leur pHi atteint, les protéines deviennent alors neutre et s'immobilisent.

#### 4.1.1.2 Séparation suivant la taille

L'étape suivante consiste à faire migrer les protéines de l'IEF vers un gel de polyacrylamide dénaturant qui contient pour cela du Sodium Dodecyl Sulfate[3] (SDS) qui charge les protéines. Cette molécule dénature les protéines (c'est à dire induit une rupture des ponts ioniques, des liaisons de van der Walls, des interactions hydrophobes…) et attache un certain nombre de molécules de SDS proportionnelles à la longueur de la protéine. Les molécules SDS sont négativement chargées, ainsi l'ensemble des protéines aura approximativement le même ratio masse/charge. Le champ électrique appliqué est perpendiculaire au premier champ. Les protéines seront attirées par le côté le plus positif du gel proportionnellement à leur ratio masse/charge. Comme il a été décrit précédemment, ce ratio est quasi le même pour l'ensemble des protéines. La progression des protéines sera ralentie par les forces de friction. Ce ralentissement est proportionnellement inverse à la taille des protéines qui est

[3] **SDS** agit sur la dislocation des liaisons non – covalentes dans les protéines, en les dénaturants, cela provoque la perte de leur forme originelle (conformation).

proportionnel à sa masse quand la protéine est dénaturée. Le champ électrique est appliqué aussi longtemps que la protéine la plus petite cherche à atteindre la fin du gel.

Le résultat est un gel où les protéines sont dispersées en fonction de leur charge et de leur taille. Ces protéines peuvent ensuite être détectées à l'aide d'une large gamme de méthodes, la plus commune étant le marquage à l'argent. Dans ce cas, des colloïdes d'argent sont déposés sur le gel. L'argent se lie aux groupes cystéines[4] présents. L'argent est noirci par exposition aux UV. L'oxydation de l'argent peut être reliée à la quantité d'argent et ainsi à la quantité de protéines à un point donné sur le gel. Cette méthode ne donne qu'une quantité approximative, mais cela est suffisant dans la plupart des cas.

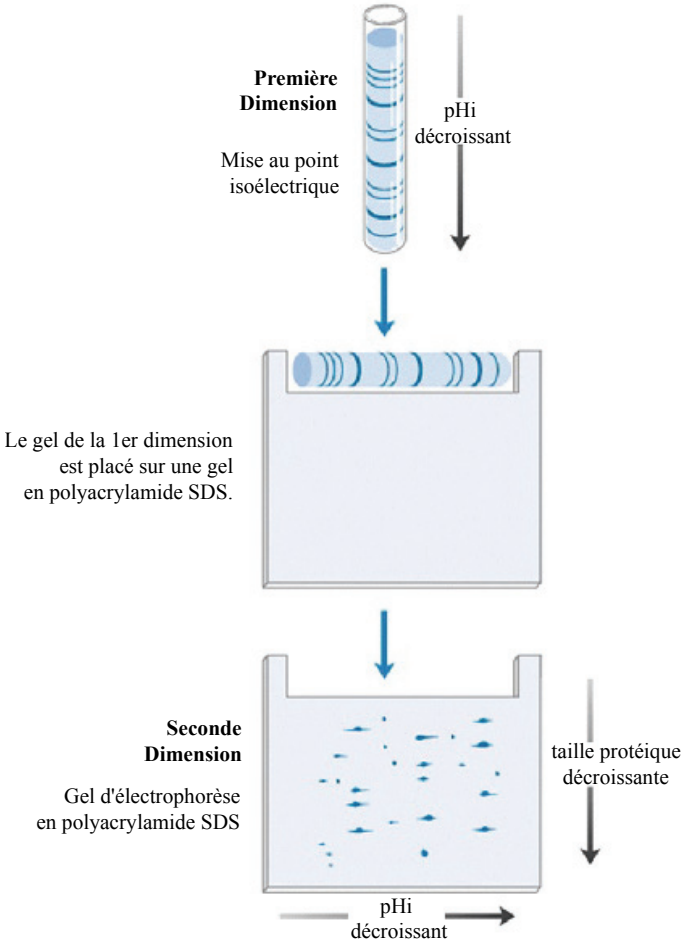



**Figure VI- 1 : Schéma de gel d'électrophorèse en 2 dimensions**

[4] **Cysteine** est un acide amine hydrophobe qui comporte un groupement thiol et qui se retrouve dans la plupart des protéines. Exposée à l'air, la cystéine s'oxyde pour former la cystine, qui correspond à deux molécules liées par un pont disulfure.

### 4.1.2 Identification des protéines

La séparation des protéines par gel d'électrophorèse en 2 dimensions est suivie par une digestion des spots excisés du gel suivie d'une identification par spectrométrie de masse. Le développement des méthodes d'ionisation des peptides à haute efficacité en spectrométrie de masse (MS), a permis une identification rapide et hautement sensible des protéines (Yates *et al.*., 1993) (Fig. VI-2). L'identification est réalisée par comparaison des empreintes peptidiques de masse attendues et obtenues (matrix assisted laser desorption/ ionization mass spectroscopy time of flight MS (Maldi-Tof-MS)) ou en fragmentant les données des peptides par une source ionisante couplée à une spectrométrie de masse en tandem (electrospray ionization source tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) ou Maldi-ToF/ToF-MS. Dans le cas où l'empreinte peptidique ne produit pas d'identification robuste, un séquençage peptidique *de novo* par MS/MS en tandem est effectué. La recherche sur les bases de données peut être réalisée en combinant la recherche des ions MS/MS ou l'empreinte peptidique de masse via MASCOT (http://matrixscience.com). C'est un moteur de recherche qui permet d'interroger des bases de données, NCBI en fait partie (http://www.ncbi.nih.gov). Le MALDI TOF est un outil analytique rapide et sensible bien adapté pour obtenir le poids moléculaire de peptides et de protéines à partir d'échantillons complexes. Il a été utilisé pour analysé pour analyser l'ensemble de cellules bactériennes (Zhang *et al.*, 2006) et l'analyse de protéines extraites à partir de cellules bactériennes (Krishnamurthy and Ross, 1996).

Les domaines d'application de l'approche classique sont vastes et regroupent : la recherche de bio marqueurs diagnostiques ou pronostiques en protéomique telles que les protéines associées aux maladies neurologiques (par exemple : Castegna *et al.*, 2003) ; l'identification de protéines spécifiques de micro-organismes permettant d'améliorer le traitement de maladies infectieuses (par exemple : Cash *et al.*, 2000); le développement de nouveaux médicaments, avec la recherche de cible mais aussi la recherche de nouvelles façons de tester la toxicité d'un produit (par exemple : Aisher *et al.*, 1998); le décryptage des mécanismes de la vie par l'identification des voies métaboliques dans la cellule (par exemple : Vuadens *et al.*, 2001) ; la recherche de bio marqueurs de pollution en milieu marin permettant par exemple d'identifier la présence d'hydrocarbures, de métaux lourds (par exemple : Monsinjon *et al.*, 2006) ; la compréhension d'un fonctionnement écologique d'un habitat (Ram *et al.*, 2005).

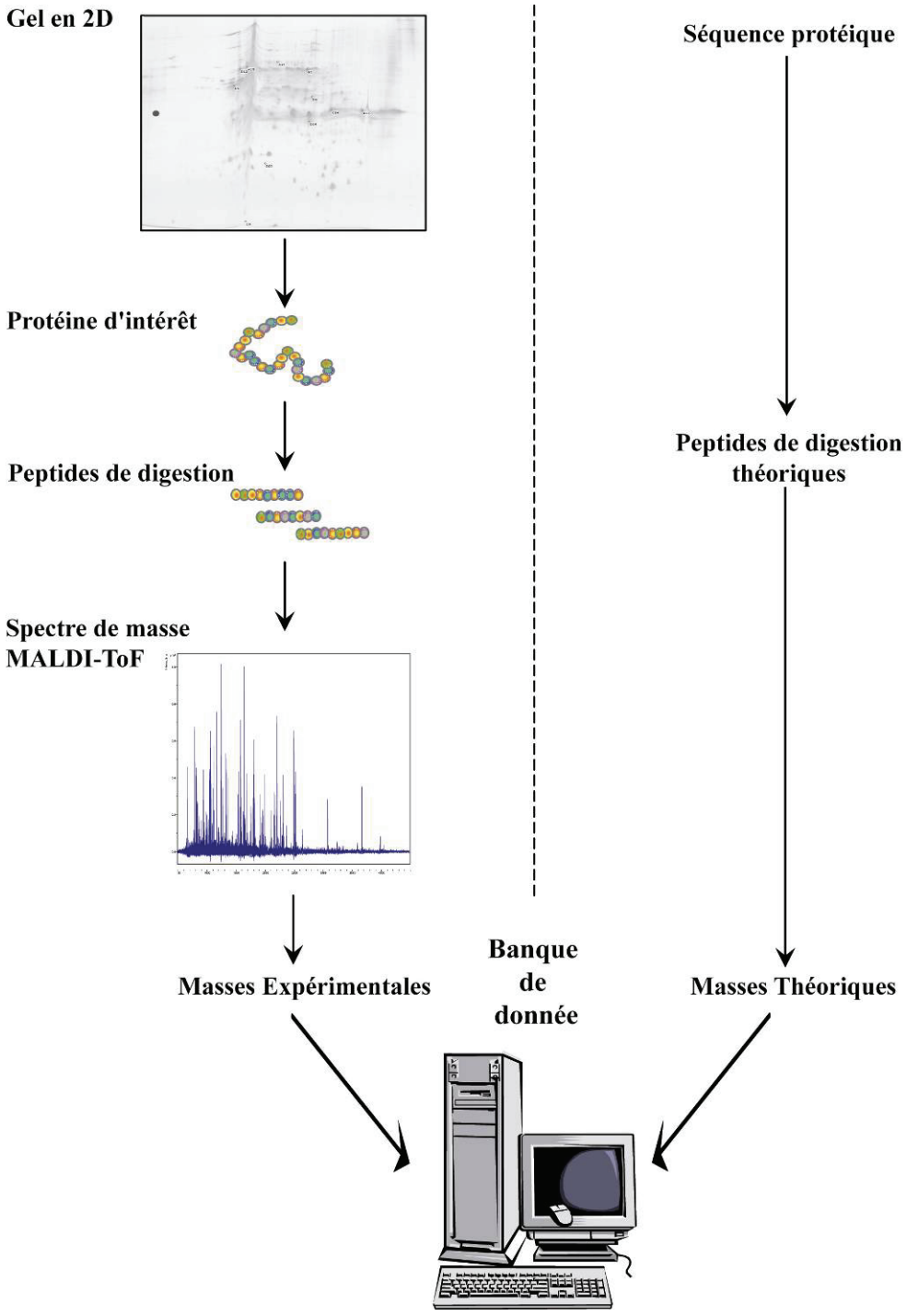



**Figure VI-2 : Principe de l'identification de protéines par empreinte peptidique**
A : Les protéines d'intérêt excisées à partir de gels 2D sont digérées par la trypsine. Les masses des peptides de digestion obtenus sont ensuite mesurées par spectrométrie de masse. Après calibration du spectre obtenu, l'analyse de ce dernier permet d'obtenir une liste de masses expérimentales qui sera soumise à des logiciels d'analyse protéomique. B : Dans ces logiciels, les séquences protéiques contenues ou issues des différentes banques de données sont virtuellement digérées par la trypsine, engendrant ainsi une liste de masses théoriques. Ces logiciels permettent la comparaison des masses expérimentales avec les masses théoriques et ainsi l'identification des protéines d'intérêt. (Modifié d'après Couvet, 2004)

## 4.2 Méthode d'analyse différentielle

### 4.2.1 Differential InGel Electrophoresis 2D (2D-DIGE)

La 2D DIGE consiste en un marquage des protéines de deux échantillons différents, par deux fluorochromes, sur un même gel (Fig.VI-3). Le concept de DIGE a été originellement développé par l'équipe de Minden (Unlu *et al.*, 1997). Il existe deux types de marquages : le premier consiste en un greffage covalent de cyanines Cy3, Cy5 ou encore Cy2 (chacune réagissant à des longueurs d'onde spécifiques) sur des résidus lysines ou cystéines. Le second consiste en un greffage non-covalent. On y trouve le sypro ruby qui est un complexe organométallique et qui se fixe par liaisons électrostatiques, ou les sypro red, orange ou tangérine dont la fluorescence dépend de l'environnement physico-chimique dans lequel ils sont.

Le principe (Fig.VI-3) consiste à marquer spécifiquement 2 pools de protéines extraites par les marqueurs de cyanine fluorescente, Cy3[5] et Cy5. Un mélange stoechiométrique des échantillons 1 et 2 est réalisé, les protéines de ce mélange sont marquées par un autre marqueur fluorescent, Cy2. L'ensemble des protéines marquées est ensuite mélangé, co-séparé et co-détecté sur le même gel en 2D. Le mélange marqué au Cy2 sert ainsi de standard interne. L'utilisation d'un standard interne permet de différencier les variations liées aux différences d'expressions biologiques de celle des conditions expérimentales (Chakravarti *et al.*, 2004). En effet par comparaison au standard interne, il est ainsi possible de mettre en évidence la sous ou sur expression des protéines et de la quantifier.

Les avantages de cette technique sont la co-séparation et la co-détection des protéines à partir d'échantillons différents sur le même gel; l'augmentation de la sensibilité et de la précision par l'utilisation d'un standard interne; l'aspect quantitatif relatif liée à la linéarité, la sensibilité et la large gamme dynamique des marqueurs et la bonne fiabilité liée à la réduction des effets de variation entre gels. Elle comporte tout de même certains inconvénients comme : la limitation du nombre de spots visualisés (en lien avec la taille de l'électrophorèse en 2D); l'impossibilité d'analyser les protéines fortement hydrophobes, acides ou basiques et les protéines ne contenant ni cystéine ni lysine (liaison amide).

[5] Cy2 = 3-(4-carboxymethyl)phenylmethyl)-3'- ethyloxacarbocyanine
Cy3 = 1-(5-carboxypentyl)-1' propylindodicarbocyanine
Cy5 = 1-(5-carboxypentyl)-1' methylindodicarbocyanine

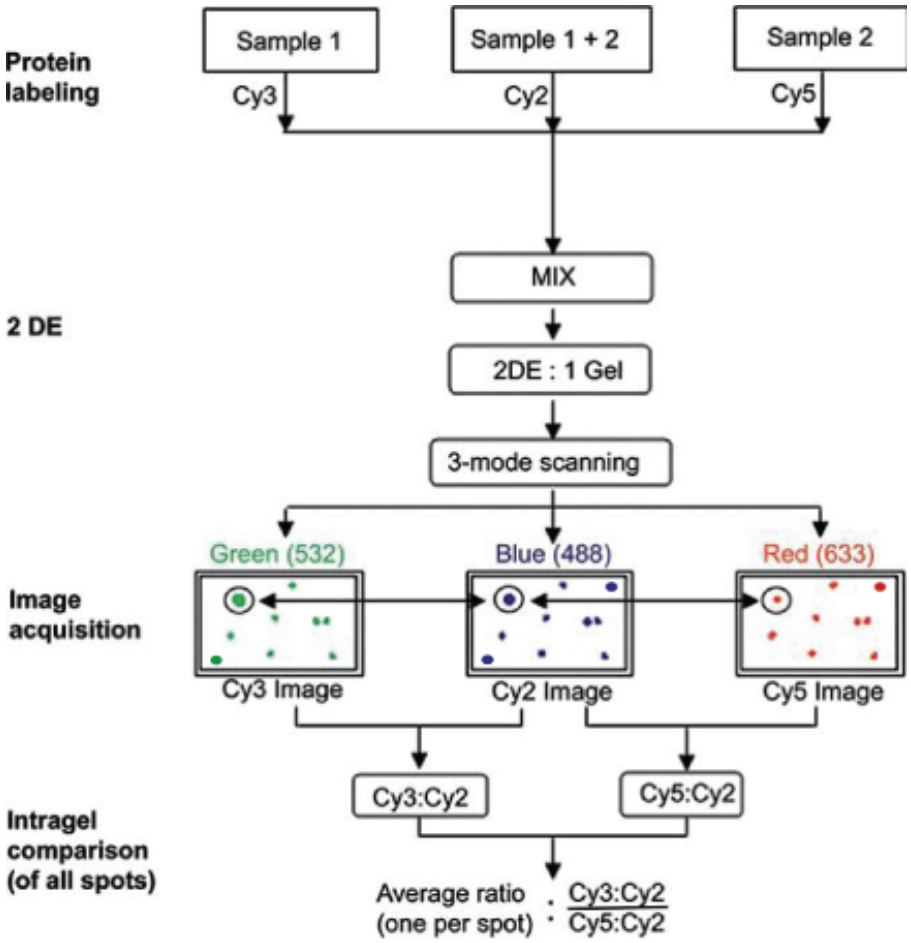



**Figure IV-3 : Représentation schématique de la 2D-DIGE** pour les analyses différentielles d'abondance protéique avec deux échantillons différents (1 et 2)

(1) Les 2 échantillons sont marqués au Cy3 et Cy5, respectivement. Une quantité équivalente de chaque échantillon protéique est mélangée et marquée par le Cy2 pour être utilisé comme standard interne.
(2) Les 3 préparations marquées sont ensuite mélangées et co-séparées sur le même gel en 2D.
(3) Pour chacun des 3 fluorophores CyDye DIGE, une image indépendant est capturée en scannant successivement le gel aux différentes longueurs d'onde d'excitation (montrées entre parenthèse) et d'émission spécifique des fluorophores.
(4) En comparaison intra-gel, pour chaque spot le ratio de des volumes normalisés entre les échantillons et le standard interne sont déterminés. Les différences d'abondance protéiques sont ainsi déterminées en calculant le ratio moyen [(Cy3:Cy2):(Cy5:Cy2)]. (Issu de Chakravarti 2004).

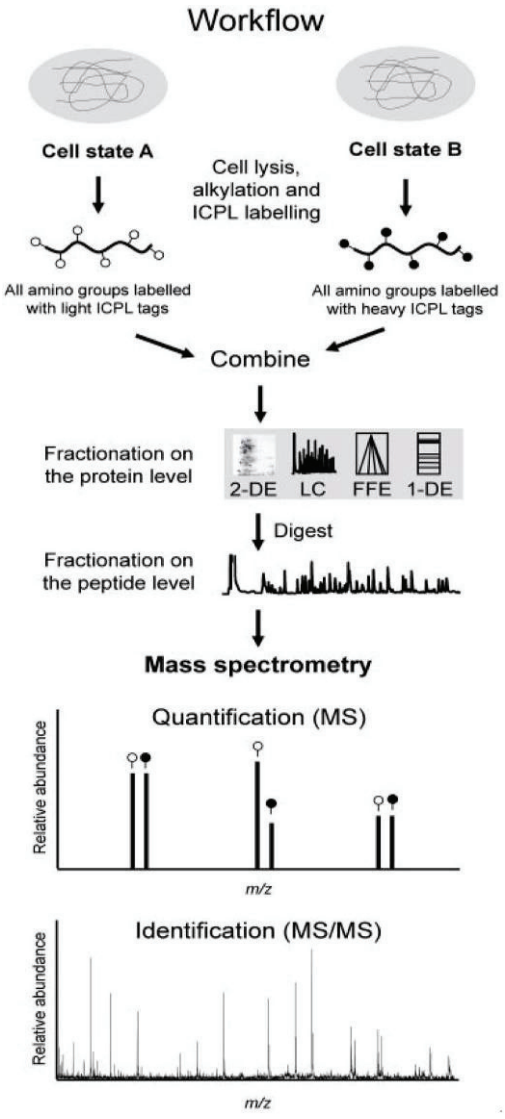
### 4.2.2 Isotope Coded Protein Label (ICPL)

L'approche ICPL est basée sur un marquage isotopique différentiel ($^{12}C$ versus $^{13}C$) des groupements amines libres des protéines issues de 2 états cellulaires ou conditions expérimentales distinctes avec un marqueur lourd ou léger.

Le mélange protéique est ensuite combiné (Fig.VI-4). Différentes méthodes de séparation peuvent être employées (par exemple 1-DE or 2-DE, free flow electrophoresis (FFE), LC)

pour réduire la complexité du niveau protéique. Après la digestion peptidique, elles peuvent être identifiées par Maldi-ToF-MS ou par MS/MS en tandem dans le cas d'un séquençage peptidique *de novo*. Des peptides similaires provenant de chaque échantillon sont modifiés par marquage ICPL lourd ou léger. Ils diffèrent en masse et apparaissent par conséquent en doublon dans le spectre de spectrométrie de masse (Fig.VI-4). Le ratio de l'intensité des pics pour ces peptides marqués apporte une information quantitative relative concernant la quantité de protéines parentes dans l'échantillon originel (Schmidt *et al.*, 2005).

Par rapport à la 2D-DIGE, l'ICPL a l'avantage de nécessiter de moins de matériel protéique pour effectuer les analyses. De plus, une séparation en chromatrophie liquide (LC) plutot qu'en IEF permet de s'affranchir d'une séparation peu résolue lié à des problème de précipitation. Cette méthode est cependant moins visuelle que la 2D-DIGE, la différence d'expression protéique n'est pas distinguable directement sur gel.




**FigureVI-4 : Vue d'ensemble de la technique ICPL. (Schmidt *et al.*, 2005)**
Les protéines issues de 2 cellules, tissues, ou conditions expérimentales différentes sont extraites, individuellement 'alkylées' et marque différentiellement sur les groupements amines.

## 5. Procédure expérimentale

La procédure expérimentale a été décrite dans la partie II - Matériel et Méthodes (de la page 100 à la page 111). Un rappel des expériences est présenté ici.

### 5.1 - Expérience # 1.

Les communautés microbiennes

Les communautés microbiennes utilisées dans cette étude n'ont subi aucune modification avant la mise en place de l'expérimentation. L'eau a été échantillonnée sur le terrain à 10m le 18 avril 2006 à l'aide pompe immergée Grundfos MP1. L'eau a été stockée 2 jours à 4°C avant le début de l'expérimentation.

Conditions de culture

L'eau échantillonnée a été aliquotée dans 16 flacons à plasma, préalablement stérilisés. Le volume d'eau dans chaque flacon est de 1 litre. Quatre conditions expérimentales ont été testées (Fig. VI-5): ajout de nitrate, ajout de glucose, ajout d'acétate et contrôle. Chaque modalité est doublée pour vérifier la reproductibilité des expériences. Le marquage des certaines molécules (carbone et azote) permet, d'une part d'avoir un duplicata mais aussi de pouvoir suivre le devenir de ces molécules au long de l'expérience. Le contrôle correspond à l'eau de la nappe non modifiée, pour voir les fonctions exprimées dans un système naturel.

Les teneurs en acétate et glucose ont été ajustée à un rapport C/N=10. A cette valeur correspond le maximum de minéralisation (Curtis *et al.*., 1990).

La teneur en carbone organique totale dans la nappe à 10m est inférieure à 1mg/L, les nitrates avoisinent les 70mg/L ce qui représente : **15.75 mg.L$^{-1}$ d'azote**. Ainsi pour atteindre un rapport C/N = 10 dans un volume de 1L, il faut **157.5 mg de C** soit *393.75 mg* de *glucose* et *543 mg d'acétate de sodium* dans un litre. Dans le cas de l'ajout de nitrate, 100mg/L ont été ajoutés.

Les expériences ont été réalisées simultanément sous condition aérobie et anaérobie, sous conditions contrôlées : dans l'obscurité, à température constante (15°C) dans une salle thermo régulée. La température de salle correspond à la température de l'eau de la nappe à la période d'échantillonnage. L'obscurité permet de simuler au mieux les conditions que rencontrent les bactéries vivant dans ce milieu. De plus, pour représenter les conditions hydrologiques, les

flacons ont été mis en agitation toute la durée de l'expérimentation. Pour simuler l'anaérobie, l'atmosphère présent dans les flacons a été remplacé à trois reprises par de l'azote. L'expérience s'est déroulée sur une semaine.

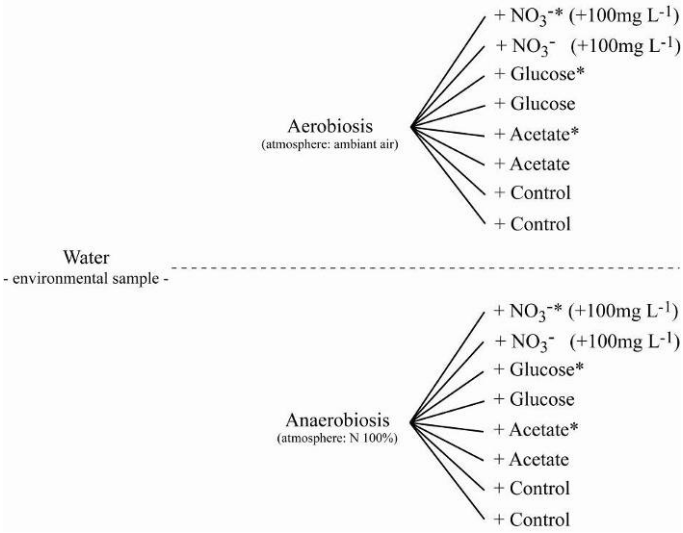



**Figure VI- 5 : Protocole expérimental de l'expérience de Méta-protéomique #1**.
Le symbole * correspondant aux molécules marquées

Suivi chimique

Un prélèvement quotidien a été effectué pour suivre :

- les **anions majeurs** ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$ et $Cl^-$) analysés par une chromatographie ionique Dionex DX120, les limites de détection et de quantification sont respectivement de 0.27 et 0.89 mg $L^{-1}$ pour les $NO_3^-$, 0.32 et 1.06 mg $L^{-1}$ pour le $Cl^-$, 0.38 et 1.25mg $L^{-1}$ pour les $SO_4^{2-}$ avec une incertitude pour ces trois espèces chimique de 5% (Martin, 2003). Les échantillons d'un volume de 5mL ont été filtrés à 0.2µm et stockés à 4°C avant analyse.
- le **pH** mesuré à l'aide d'une électrode combinée Sentix 41 qui mesure simultanément la température. Le pH est étalonné préalablement à l'aide de solutions tampons à pH=4.01 et à pH=7.
- La consommation de **glucose.** Le dosage du glucose se fait par spectrométrie UV en utilisant un kit EnzyPlus D-Glucose (Diffchamb), d'après le protocole du fabricant.
- La consommation d'**Acétate**. Les teneurs en acétate ont été obtenues en utilisant la chromatographie ionique.

Un prélèvement en début et en fin d'expérience a été effectué pour mesurer:

- les **teneurs en COD**. Le carbone organique dissous est mesuré par oxydation thermique avec un analyseur de carbone Shimadzu, TOC 5050A. Les limites de détection et de quantification du COD sont respectivement de 0.08 et 0.85 $mgL^{-1}$ avec une incertitude de 5% (Petitjean *et al.*., 2004).
- les **teneurs en fer II**. Le dosage du Fe(II) à l'orthophénantroline se fait par spectrométrie UV (AFNOR, 1997).

Un prélèvement en début, milieu et fin d'expérience a été effectué pour mesurer:

- l'**alcalinité**. Le dosage a été fait en laboratoire en utilisant une micro-burette graduée par titrage à HCL à 0.1N. La mesure de l'alcalinité s'est faite suivant la méthode de Gran (1952).

Concentration des protéines par nanofiltration

Au bout d'une semaine d'incubation dans l'obscurité à 15°C, l'expérience a été stoppée et l'ensemble des protéines (libres et cellulaires) exprimées ont été concentrée par filtration à flux tangentielle (Fig.VI-6). Le système utilisée est un système Millipore de type Labscale™ TFF avec des membrane Pellicon® XL (Pure Recovery Ultracel™ PLC) à 10kDa.

La filtration à flux tangentielle a été réalisée suivant le protocole du fabricant, soit à une vitesse de flux de 15mL/min, une pression d'entrée est de 30psi et de sortie de 10psi. Le volume mort de ces unités est de 3.2mL. Après concentration par filtration en flux tangentielle, les échantillons ont été culottés par centrifugation à 4°C pendant 20minutes à 16400rpm (Beckman Avanti® J-E). Les surnageants ont été conservé à -20°C et les culots protéiques à -80°C avant extraction.

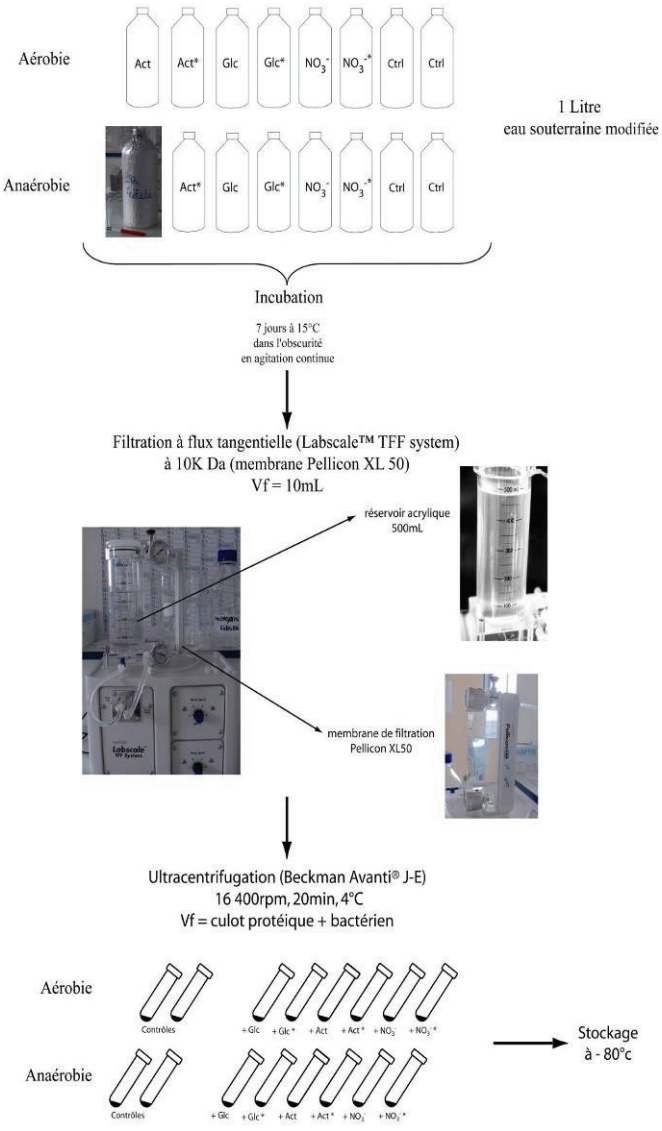



**Figure VI-6 : Plan de l'expérience #1 de protéomique.** L'étape de stockage à -80°C est suivi par l'étape d'extraction et n'est pas nécessaire si cette dernière est réalisée directement après l'ultracentrifugation.

**5.2 - Expérience # 2.**

Les concentrations protéiques obtenues suite à la première expérience étaient insuffisantes pour effectuer une analyse d'expression différentielle des empreintes peptidiques. En effet, la quantité de matériel protéique optimale est de 70-100 µg pour une détermination systématique par spectrométrie de masse et de 75 µg pour une analyse d'expression différentielle. La quantité obtenue lors de la première expérience atteint dans le meilleur des cas 95µg (sous la condition anaérobie glucose) et seulement 7µg dans le cas de la condition contrôle. Les volumes d'expérimentation ont dû être revus à la hausse et ainsi le nombre de modalités a été réduit à 4 et un contrôle de 20L. L'analyse par expression différentielle consiste à mettre en évidence la différence d'expression protéique, par l'utilisation d'un standard interne suivant les conditions expérimentales. Cette analyse est réalisée par la méthode d'ICPL, cette méthode a été choisie car elle permet notamment de s'affranchir des problèmes de précipitation rencontrés sur les gels en 2 dimensions.

Différence par rapport à l'expérience #1 :

- le volume d'expérimentation : 20L pour le contrôle et de 5L pour les autres modalités
- l'eau échantillonnée : lors de l'échantillonnage fin novembre, il était impossible de récupérer le volume souhaité pour l'expérimentation (40L). L'eau a donc été prélevée dans le puit à 15m.

Les communautés microbiennes

Les communautés microbiennes utilisées dans cette étude n'ont subi aucune modification avant la mise en place de l'expérimentation. L'eau a été échantillonnée sur le terrain à 15m le 22 novembre 2007 à l'aide pompe MP1 Grundfos.

Conditions de culture

L'eau échantillonnée a été aliquotée dans 4 bidons. Le volume d'eau dans chaque flacon est de 5 litres. Le volume du contrôle est de 20litres.

Quatre conditions expérimentales (Fig.VI-7) ont été testées : ajout de glucose, ajout de glucose + nitrate, ajout d'acétate et ajout d'acétate+nitrate. Les modalités n'ont pu être répliquées pour vérifier la reproductibilité des expériences. Les volumes utilisés étant importants et la vitesse de filtration à flux tangentielle longue (15mL/min, pour un liquide peu chargé), il y a un risque de modification des communautés et d'expression. Pour limiter ce

risque, les expériences ont été stockées à 4°C avant filtration. L'utilisation de molécules marquées n'a pu être reconduit du fait du coup de ces molécules.

Le contrôle est l'eau de la nappe sans ajout de nutriments, pour accéder aux fonctions exprimées dans un système naturel.

Le rapport C/N=10 correspondant au maximum de minéralisation (Curtis *et al.*., 1990) a été conservé. La teneur en carbone organique totale dans la nappe à 15m est inférieure à 1mg/L, les nitrates ont une concentration de 70mg/L ce qui représente : **15.75 mg.L$^{-1}$ d'azote**. Ainsi pour atteindre un rapport C/N = 10 dans un volume de 1L, il faut **157.5 mg de C**.

On a 40% de C dans une molécule de glucose :

- dans la modalité 'Glucose' il faut ajouter 1968.75 mg de glucose pour 5 litres ;
- dans la modalité 'Glucose+Nitrate' : 3937.5mg de glucose et 700mg de nitrate pour respecter le rapport C/N=10

Dans l'acétate de sodium, le carbone représente 29% :

- dans la modalité 'Acétate' il faut ajouter 2715 mg de acétate pour 5 litres ;
- dans la modalité 'Acétate+Nitrate' : 5430mg de acétate et 700mg de nitrate

Les expériences ont été réalisées sous condition aérobie, sous conditions contrôlées : dans l'obscurité, à température constante (15°C) dans une salle thermo régulée. La température de salle correspond à la température de l'eau de la nappe à la période d'échantillonnage. L'obscurité a été optée pour simuler au mieux les conditions que rencontrent les bactéries vivant dans ce milieu. De plus, pour représenter au mieux les conditions hydrologiques, les flacons ont été mis en agitation toute la durée de l'expérimentation.

L'expérience s'est déroulée sur une durée de une semaine.

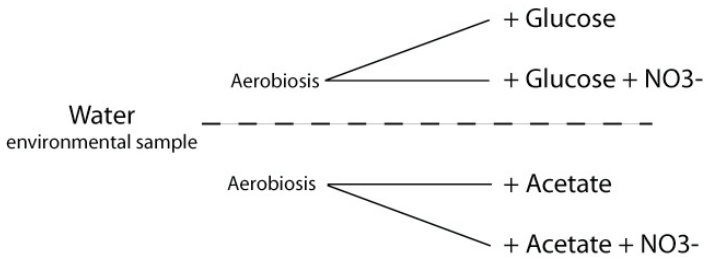



**Figure VI-7 : Protocole expérimental de l'expérience de Méta-protéomique #2.**

Suivi chimique

Un prélèvement à t0h, t+2j, t+4j et t +7j a été effectué pour suivre : les concentrations **anions majeurs** ($NO_3^-$, $SO_4^{2-}$ et $Cl^-$) analysées par une chromatographie ionique Dionex DX120 (le même principe que l'expérience #1) ; la concentration en **glucose,** analysée par spectrométrie UV en utilisant un kit EnzyPlus D-Glucose (Diffchamb), d'après le protocole du fabricant ; et les teneurs en **acétate** analysées par la chromatographie ionique (même principe que l'expérience #1).

Un prélèvement en début, milieu et fin d'expérience a été effectué pour mesurer: les **teneurs en COD** sont mesurées par un analyseur de carbone Shimadzu, TOC 5050A (même principe que l'expérience #1) ; et le **pH** mesuré à l'aide d'une électrode combinée Sentix 41 qui mesure simultanément la température (même principe que l'expérience #1).

Séquencage

Un prélèvement en début et fin d'expérience a été effectué pour identifier les organismes présents. Les échantillons ont été stockés à -20°C. Le kit d'extraction utilisé est le kit Qiagen, QIAamp® DNA Mini Kit, selon le protocole proposé dans le manuel d'instruction du fabricant. Le protocole employé est décrit dans la Partie II - Matériel et Méthode. Le gène de l'ARNr 16S a été amplifié par PCR suivant le protocole décrit précédemment puis purifié, cloné et séquencé. L'alignement des séquences a été réalisé en utilisant Clustal X software version V.1.8.1. Chaque séquence a été comparée aux séquences de ncbi dans 'Basic Local Alignment Search Tool' en utilisant la base de données Blastn. L'effort d'échantillonnage n'est pas assez important, les données sont représentées en Annexe II.

Concentration des protéines par nanofiltration

Le contrôle a été concentré sur la durée de l'expérimentation. Après une semaine d'incubation dans l'obscurité à 15°C, l'expérience a été stoppée et l'ensemble des protéines (libres et cellulaires) exprimées ont été concentrée par filtration à flux tangentielle (Fig.VI-8). Le système utilisée est un système Millipore de type Labscale™ TFF avec des membrane Pellicon® XL (Pure Recovery Ultracel™ PLC) à 10kDa. La filtration à flux tangentielle a été réalisée suivant le protocole du fabricant, soit à une vitesse de flux de 15mL/min, une pression d'entrée est de 30psi et de sortie de 10psi. Après concentration par filtration en flux tangentielle, les échantillons ont été culottés par centrifugation à 4°C pendant 20minutes à

16400rpm (Beckman Avanti® J-E). Les surnageants ont été conservés à -20°C et les culots protéiques à -80°C avant extraction.

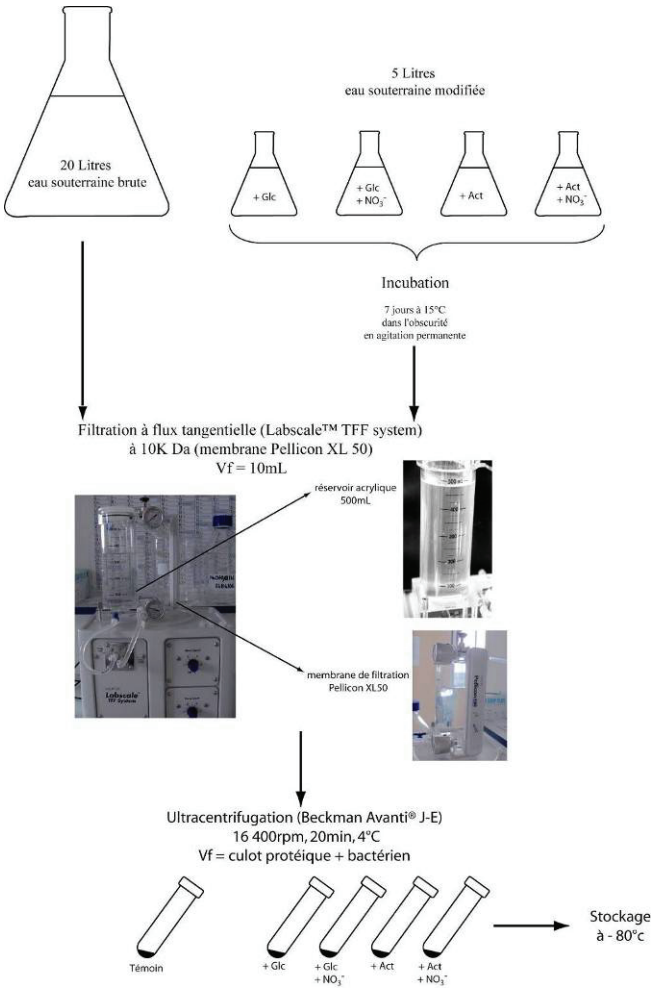



**Figure VI-8 : Plan de l'expérience # 2 de protéomique**

### 5.3 – Extraction et préparation protéique

Le protocole utilisé pour l'extraction protéique est basé sur le protocole de Wilmes et Bond (2004). L'extraction et la préparation de l'ensemble du protéome ont nécessité différents essais pour la méthode de lyse cellulaire : sonication, vibroyage ('bead beating') et la presse de French. Le meilleur rendement a été obtenu avec la presse de French.

Extraction et Purification protéique.

Toutes les solutions ont été réalisées en utilisant de l'eau ultra pure. Les échantillons stockés à -80°C ont été décongelés sur glace. Les concentras ont été centrifugés à 4000g pendant 20min à 4°C sur une centrifugeuse Heraeus Multifuge® 1SR. Le surnageant éliminé, les culots ont été lavés dans 15mL de tampon PBS 1X, puis centrifugés comme précédemment. Cette étape a été répétée 2 fois. Les culots ont été suspendus dans 50mM de Tris-HCl, pH7.

Après centrifugation à 4000g, 20min, 4°C, 10mL de tampon Urée 6M / Thio-urée 2M / CHAPS 4% a été ajouté au culot. Les culots sont resuspendus en pipetant et en vortexant, puis placés 2h sur glace en mélangeant toutes les 15 minutes. Le lysat cellulaire a été obtenu en effectuant 4 passages à la presse de French à 1200psi. Le lysat a ensuite été centrifugé 30min à 15 000g pour enlever tous les débris cellulaires. Le surnageant a été récupéré et contient l'extrait protéique brut. Les protéines ont été précipitées dans 10% (v/v) de TCA-Acétone ; incubées à -20°C pendant une nuit puis centrifugé à 15000g pendant 15 min à 4°C. Le culot protéique a ensuite été lavé à 2 reprises dans 90% (v/v) d'acétone glacé, à -20°C et centrifugé 15000g, 15min à 4°C. Les culots protéiques secs sont ensuite resuspendus dans un tampon Urée 6M / Thiourée 2M / CHAPS 4%. Après une heure sur vortex à température ambiante, une centrifugation à 15 000g (Heraeus, Biofuge ® Fresco), 15min à 4°C, est effectuée. Le surnageant protéique est récupéré et dosé par la méthode colorimétrique de Bradford (Biorad Protein Assay) sur un spectro photomètre (Multiskan Ascent, THERMO electron corporation).

Séparation en 2D –PAGE.

Les bandelettes à gradient de pH immobilisé (IPG) de pH 3-10 de 24cm (GE Healthcare) ont été individuellement réhydratés avec 450µL d'une solution finale de réhydratation DeStreak™ (GE Healthcare) et 80µg d'extrait protéique, et 0.5% d'IPG buffer (GE Healthcare). Le rapport à respecter est de 1 volume d'échantillon pour 4 volumes de DeStreak™ Rehydratation. Pour la séparation en 1$^{er}$ dimension, les bandelettes ont été placés dans des sarcophages individuels, recouverts avec 'IPG cover fluid' (GE Healthcare) et ont migré sur un IPGPhor (GE Healthcare) pendant plus de 22h à un voltage total de 56412 volt heures. Si la seconde dimension n'est pas réalisée immédiatement les bandelettes peuvent être stocké à -80°C jusqu'à utilisation. La séparation en seconde dimension a été effectuée sur un gel DALT 12.5% (GE Healthcare), la migration s'est faite sur DALTsix (GE Healthcare). Deux étapes de migration existent, la première est réalisée à 2.5W par gel pendant 30minutes et la seconde à 100W par gel[6]. La durée de cette dernière est dépendante des échantillons. Pour l'analyses d'images les gels ont été colorés au nitrate d'argent ; scannés et analysés par

[6] Les gels standards en acrylamide sont typiquement composes de deux couches : une couche supérieur décrite comme un gel d'empilement ou 'stacking gel' et une couche inférieure appelée gel de séparation ou de résolution. La couche d'empilement comporte un faible pourcentage d'acrylamide et un faible pH, alors que la concentration d'acrylamide du gel de résolution est fonction de l'échantillon et son pH est plus élevé. Les différences de pH et de concentration en acrylamide procurent une meilleure résolution et des bandes plus nettes sur le gel de séparation. La différence de voltage est ainsi due à la différence de composition du gel. La première étape correspond ainsi à la période d'empilement ou 'stacking period' et la seconde étape à la séparation.

PROTEOMWEAVER, version 1.3 (Definiens). La coloration au nitrate d'argent est compatible avec la spectrométrie de masse.

Identification protéique par spectrométrie de masse Maldi-Tof MS**.**

Les spots protéiques d'intérêts sont excisés à partir des gels marqués au nitrate d'argent. Ce processus est robotisé (Ettan Spot Handling Workstation, GE Healthcare). Les spots sont digérés et analysés en MALDI-ToF MS (Ultraflex Daltonic Bruker). Les recherches d'empreinte de masse peptidiques en comparaison avec les banques de données ont été réalisées via le moteur de recherche MASCOT http://www.matrixscience.com, sur NCBInr et EST_others.

### 5.4 – Expérience de faisabilité de ICPL

Le protocole présenté ici est celui réalisé pour tester la faisabilité de la technique d'ICPL sur les échantillons de l'expérience#2. Il est constitué de trois étapes :

**La première étape consiste en une séparation par une électrophorèse monodimensionnelle.** Les quatre échantillons destinés à être ultérieurement marqués par ICPL (glucose, glucose + nitrate, acétate, acétate + nitrate) sont séparés par électrophorèse monodimensionnelle. 20µg de chaque échantillon sont chargés sur un gel 1D 10% Tris-Glycine à 200V, 70mA, 100W pendant 51 min. Le gel 1D est ensuite coloré à l'EZBlue (Sigma).

Pour chacun des 4 échantillons, 3 à 4 bandes correspondant à des poids moléculaires différents sont prélevées sur le gel et digérées selon le protocole en vigueur sur la plate-forme Protéomique Haut-Débit Ouest Génopôle. Suite à cette digestion, les peptides sont extraits des bouts de gel de manière active et ajoutés aux digestats obtenus par extraction passive sur la nuit. Le volume final est diminué par évaporation au Speed-vac et complété à 28µL avec du TFA 0,1%.

**La seconde étape consiste en la mise au point des méthodes de chromatographie liquide à haute pression (nano-HPLC).** La mise au point des méthodes de nanoLC (Utimate 3000, Dionex[7]) a été faite sur les bandes 11, 12 et 13 (échantillon: Acétate + Nitrate). Lors de ces mises au point, aucune identification n'a été obtenue à partir de ces bandes. La bande 14 a

[7] **La nanoHPLC** Ultimate 3000 (Dionex) utilisée à la plate-forme Protéomique Haut-Débit Ouest Génopôle comporte une pé-colonne : C18 PepMap300, 5µm, 300Å / 300µm id x 5mm et une colonne : C18 PepMap100, 3µm, 100Å / 75 µm id x 150mm. La température y est maintenue à 30°C.

donc été prélevée, digérée et analysée, afin de vérifier la possibilité d'obtenir des identifications pour des protéines issues de cet échantillon. Un gradient de solvant A (eau / TFA 0,04%) et de solvant B (ACN / TFA 0,04%) est appliqué pour extraire un maximum de peptide. De 0 à 30min, la teneur du solvant B passe de 2% à 35% ; de 30 à 40 min, elle passe de 35 - 60% de solvant B ; de 40 à 43 min, 60 de 90% de solvant B ; de 43 à 52 min, 90% de solvant B ; de 52 à 57 min, de 90 - 2% de solvant B et enfin de 57 à 75 min: 2% de solvant B. Le débit est de 220nL/min. La détection UV s'effectue à 214 nm. Le volume d'injection est de 22µL.

**La collecte** des échantillons est réalisée toutes les 25 secondes de 7 à 60 min. Les échantillons collectés sont ensuite **déposés** sur une cible MALDI (cible PAC, Bruker Daltonics), grâce au robot ProteineerFC (Bruker Daltonics).

**La troisième étape consiste en l'analyse des dépôts par MS/MS.** Suite au dépôt sur cible MALDI, celle-ci est lavée avec du phosphate d'ammonium monobasique 10mM afin d'éliminer les sels, et analysée de manière automatique (MS puis MS/MS sur les pics ayant une qualité suffisante). Cette étape est effectuée sur un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF Ultraflex (Bruker Daltonics).

## 6. Résultats

### 6.1 - Expérience # 1

L'expérience #1 a servi de mise au point pour la préparation de l'échantillon et l'électrophorèse bidimensionnelle. Ainsi, seul un gel sera présenté dans les résultats. Les concentrations protéiques étant très faibles, il a été impossible d'appliquer une migration en 2 dimensions pour l'ensemble des modalités testées. Seuls les échantillons non marqués ont de plus été analysés. Les résultats démontrent la faisabilité de l'expérience mais mettent aussi en évidence un verrou méthodologique, la quantité de matériel protéique nécessaire. Par conséquent, un surdimensionnement est nécessaire pour la seconde expérience. Les résultats des paramètres physico-chimiques et d'analyse chimique de l'eau sont présentés en Annexe I. Aucune variation n'a été observée lors de l'expérience#1.

#### 6.1.1 - Concentration protéique

Les concentrations protéiques obtenues (Tabl. VI-1) indiquent des valeurs basses qui rendent difficile la détermination systématique sur les échantillons 'Aérobie Nitrate', 'Anaérobie

Nitrate', 'Aérobie Contrôle', 'Anaérobie Contrôle' et 'Anaérobie Acétate'. En effet, pour faire de la détermination en spectrométrie de masse, **80-100µg** de protéines sont nécessaires. Les échantillons 'Anaérobie Glucose' et 'Aérobie Acétate' ont des concentrations suffisantes. Pour la mise au point de l'électrophorèse bidimensionnelle, l'échantillon 'Anaérobie Glucose' a été choisi pour sa concentration élevée.

L'expression protéique est supérieure en présence de carbone dans le milieu.

**Tableau VI-1 : Concentration et masse de protéines obtenues après extraction**

| | Concentration (mg/mL) | Masse protéique (µg) |
|---|---|---|
| Aérobie Nitrate | 0.07 | 12.6 |
| Anaérobie Nitrate | 0.04 | 7.2 |
| Aérobie Acétate | 0.46 | 82.8 |
| Anaérobie Acétate | 0.29 | 52.2 |
| Anaérobie Glucose | 0.53 | 95.4 |
| Aérobie Contrôle | 0.09 | 16.2 |
| Anaérobie Contrôle | 0.04 | 7.2 |

### 6.1.2 - Gel bidimensionnel

Le gel en 2D obtenu est d'une qualité et d'une résolution supérieure à ce qui est publié jusqu'à présent (par exemple : Wilmes and Bond, 2004). Par ailleurs, seize spots (Fig.VI-9) ont été analysés par spectrométrie de masse. Sur ces 16 spots, 5 protéines ont été identifiées sans ambiguïté par empreinte peptidique de type MALDI ToF après interrogation de la base

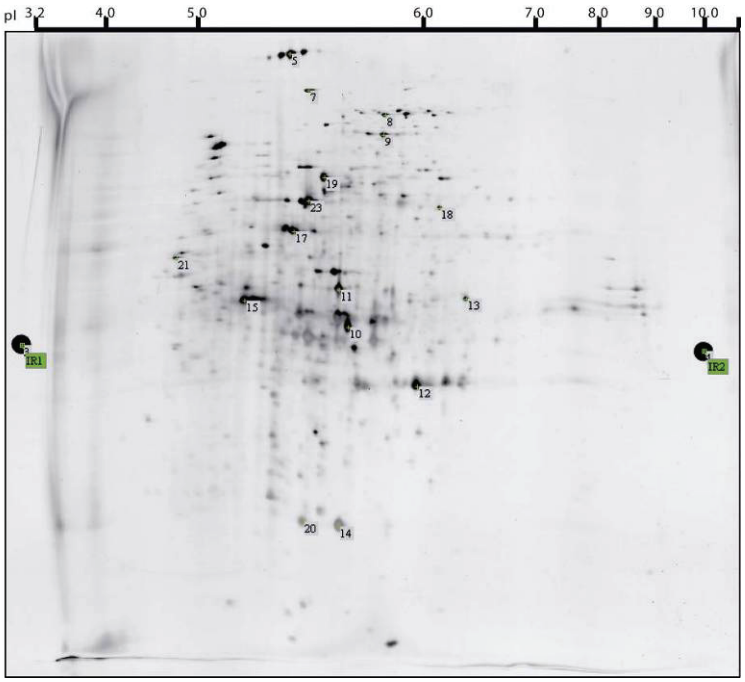



**Figure VI-9 : Image du gel en 2 dimension coloré au nitrate d'argent, réalisé à partir de la modalité 'Aérobie Glucose'**. Les chiffres annotés indiquent les protéines digérées pour une identification.

de donnée NCBInr (avec un bon score[8] et un bon pourcentage de recouvrement de séquence). Les spots 5, 7, 8, 10, 12, 13, 18, 19, 20, 21 et 23 n'ont pas été identifiés. Leur spectre de masse manifeste un manque de matériel biologique. Les valeurs de score et de pourcentage de recouvrement sont présentées en annexe III.

### 6.1.3 - Protéines identifiées et rôle

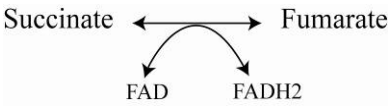
L'ensemble des protéines digérées n'a pu être identifié, malgré des spectres de masse de bonne qualité. Les protéines identifiées sont répertoriées dans le tableau VI-2. Le rôle des protéines identifiées est présenté par la suite.

**Tableau VI-2 : Identification des protéines extraites à partir de la modalité 'Aérobie Glucose' et séparée sur gel d'électrophorèse en 2 dimension.**

| n° du Spot | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Groupe fonctionnel | Rm |
|---|---|---|---|---|---|
| 9 | COG1053: Succinate dehydrogenase/fumarate reductase flavoprotein subunit | ZP_00696109 | Shigella boydii BS512 | Métabolisme | |
| 11 | outer membrane protein A | Aat98590 | Escherichia coli | Métabolisme | |
| 15 | Chain C, Elongation Factor Complex Ef-TuEF-Ts | 1EFU_C | Escherichia coli | Synthèse protéique | |
| 17 | translation elongation factor EF-Tu | YP_542801 | Escherichia coli | Synthèse protéique | |
| 14 | Chain B, Orthorhombic Glutathione S-Transferase | 1Y6E_B | Schistosoma japanicum | Métabolisme | Eucaryote |

**Succinate déshydrogénase ou Fumarate réductase**

Cette enzyme intervient dans le cycle de l'acide tricarboxylique (TAC) aussi connu sous le nom de cycle de Acide citrique ou Cycle de Krebs. Cette enzyme catalyse la réaction d'oxydation du succinate qui génère du fumarate (Eq.VI-1). Cette réaction nécessite l'intervention d'une coenzyme : FAD/$FADH_2$. La molécule de $FADH_2$ engendrée par cette réaction va intervenir dans une chaîne de transport d'électron pour réaliser de la phosphorylation oxydative. Cette dernière produit la majeure partie de l'ATP dans le processus de respiration cellulaire.




**Équation VI-1**

**Protéine A intra membranaire**

La protéine A intra membranaire de *Escherichia coli* (OmpA) est une des plus étudiée dans ce groupe (Pines and Inouye, 1999). Elle comporte divers rôle. L'OmpA est requise pour

[8] Le score est basé sur les probabilités et/ou les techniques de statistiques pour vérifier la validité des résultats. Le programme Mascot que nous avons utilisé pour identifier les protéines est un programme probabiliste, où la fonction déterminant le score prend en considération la probabilité que la séquence peptidique identifiée puisse être obtenue par hasard

l'action de colicines[9] spécifiques (K et L) et pour la stabilisation de l'accouplement d'agrégats lors de la conjugaison. Elle sert aussi temporairement de récepteur pour les phages et peut agir comme une porine de faible perméabilité ce qui permet une pénétration lente de petits solutés (MacIntyre and Henning, 1990).

**Facteurs d'élongations**

Les facteurs d'élongations sont responsables de deux processus majeurs lors de la synthèse de protéines sur les ribosomes (Andersen and Nyborg, 2001; Andersen *et al.*., 2003; Nilsson and Nissen, 2005). EF1α ou (EF-Tu) est responsable de la sélection et de la liaison de l'ADN parent sur le site accepteur (site A) du ribosome. EF2 (ou EF-G) est responsable de la translocation de peptidyl-tRNA du site A vers le site P (site peptidyl-tRNA), libérant ainsi le site A pour la liaison du prochain Aminoacyl-ARNt. Les facteurs d'élongations sont responsables de la réussite de la translation et chaque EF1α et EF2 est remarquablement conservé tout au long de l'évolution.

**Gluthatione S tranférase**

La gluthation S transférase (Eq.VI-2) est une protéine cytosolique impliquée dans la détoxification cellulaire en catalysant la conjugaison du glutathion (GSH) avec une large gamme d'agents endogènes ou alkylant xénobiotique (Habig *et al.*., 1974 ; Jakoby, 1978).

$$RX + glutathion = HX + R - S - glutathion \qquad \textbf{Équation VI-2}$$

Où R peut être un groupement aliphatique, aromatique ou hétérocyclique ; et X un groupement sulfate, nitrile ou halide[10].

### 6.1.4 - Conclusion de l'expérience #1

Nous avons pu montrer par l'expérience #1 que l'identification protéique est possible sur les échantillons environnementaux que la méthode d'extraction et de préparation des protéines est au point, mais que la quantité de matériel biologique est insuffisante pour analyser tous les échantillons d'où la nécessité de surdimensionner l'expérience.

[9] La colicine est une protéine toxique produite par *E. coli* qui inhibe la croissance de souches bactériennes proches ou similaires.

[10] Un halide est un compose binaire dont une partie est un atome halogéné et l'autre partie est un élément ou radical moins électronégatif que les halogènes, pour faire des fluorures, chlorures, sodiques. Beaucoup de sels sont des halides.

Aux vues des concentration protéiques obtenues, il faut multiplier par 20 la modalité contrôle, et par 5 les modalités acétate et glucose. Ainsi les volumes d'expérimentation passent à 20L en contrôle, et 5L pour les autres modalités.

Les protéines identifiées prennent part dans la régulation des voies métaboliques ou dans la synthèse de protéines.

Les variations en alcalinité et en teneurs en carbone sont globalement les seules données de chimie de l'eau montrant une différence entre les modalité Glucose et Acétate.

## 6.2 - Expérience # 2

Suite aux résultats obtenus dans l'analyse du protéome une seconde expérience a été réalisée.

Dans un premier temps seront présentés les résultats de chimie de l'eau puis les résultats de protéomiques.

### 6.2.1 – Chimie

#### 6.2.1.1 Paramètres physico-chimiques

**pH**.

Le pH est légèrement acide en début d'expérience (Fig.VI-10) et varie dans une gamme de 6.0 à 6.3. Sous les conditions '**Acétate et Acétate+Nitrate**', le pH augmente tout au long de l'expérience pour atteindre 6.6. Au contraire, sous les conditions '**Glucose et Glucose+Nitrate**', l'eau est plus acide en fin d'expérience, la valeur de pH atteint 5.6. Soit 1 unité de pH entre les conditions Acétate et les conditions Glucose.

Ce résultat suggère des fonctionnements métaboliques différents avec pour la modalité glucose une suspicion de processus de fermentation.

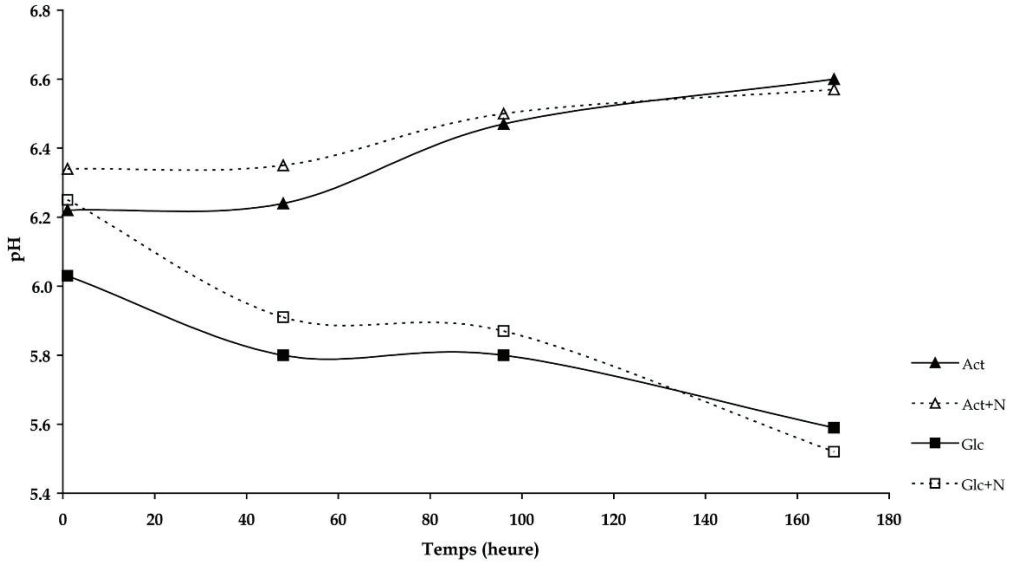



**Figure VI-10 : Evolution du pH au cours de l'expérience #2**

6.2.1.2 Composition chimique de l'eau

**Chlorures**.

Les concentrations en chlorures varient fortement au cours de l'expérience (Fig.VI-11). L'erreur analytique est nettement inférieure à 5% ces variations n'y sont donc pas liées. Les concentrations décroissent tout au long de l'expérience, particulièrement sous la condition '**Acétate**' où une perte de 10 mg L-1 est observée. Une telle diminution est généralement attribuée à une dilution, or aucun apport d'eau n'a été effectué au cours de l'expérience. Les données en nitrates et sulfates ont été corrigées sur la base de la diminution des chlorures.

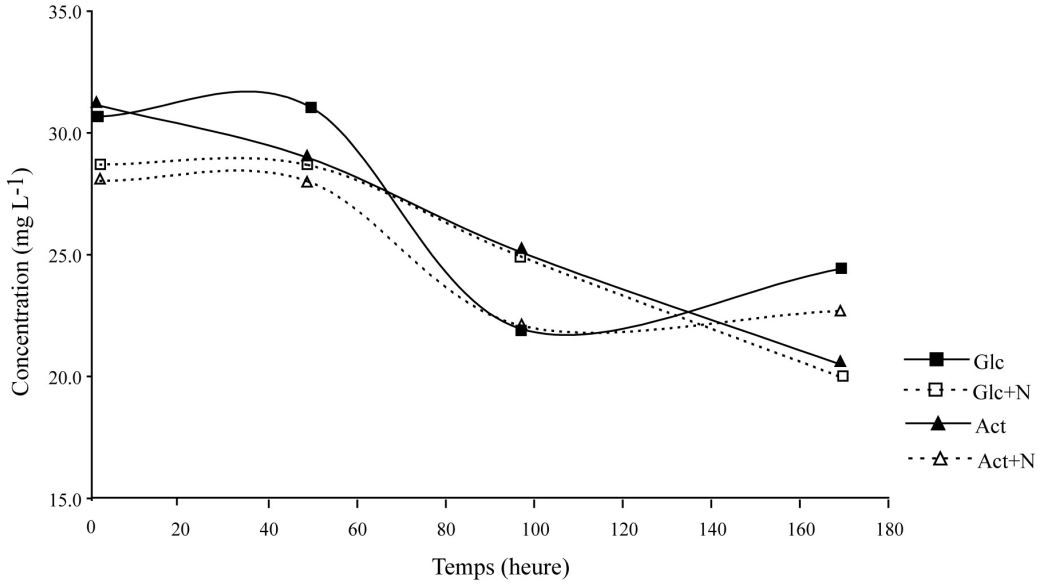



**Figure VI-11 : Evolution temporelle des chlorures au cours de l'expérience # 2.**

**Sulfates.**

Les concentrations en sulfates **sous les conditions avec ajouts de nitrates** sont initialement inférieures à celles sans nitrate ajouté, respectivement de 15.5 mgL-1 et 17mgL-1 (Fig.VI-12).

Les variations de concentration observées sont dans l'erreur analytique de 5% pour les conditions 'Acétate', 'Acétate + Nitrate' et 'Glucose'. La concentration est conservée au cours de l'analyse pour les **conditions 'acétate' et 'glucose'.** Les concentrations en sulfates augmentent en fin d'expérience pour les **conditions 'glucose+Nitrate'**.

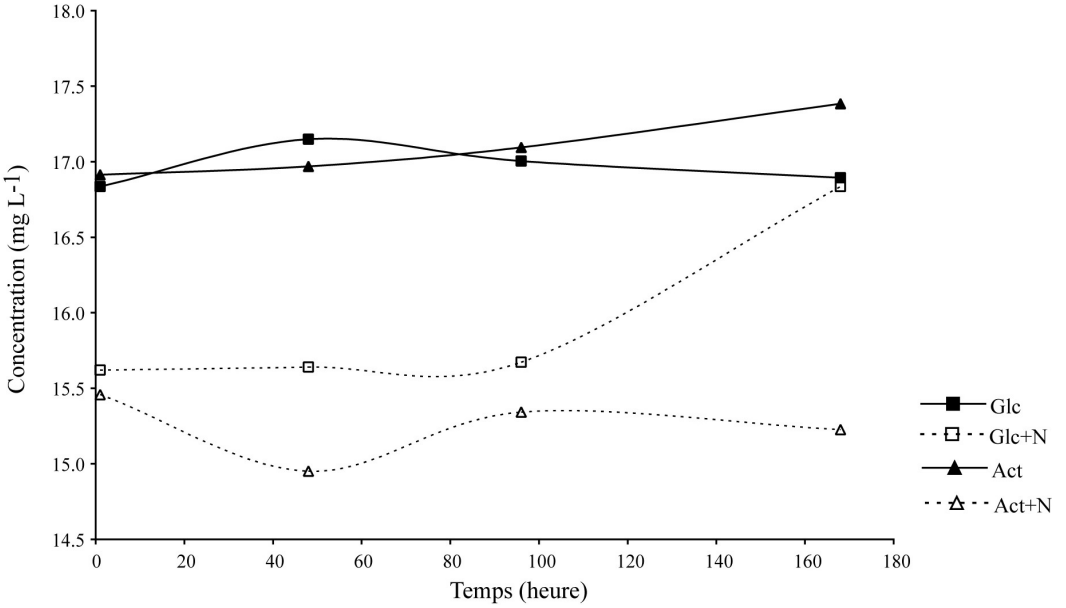



**Figure VI-12 : Evolution temporelle des sulfates au cours de l'expérience # 2.**

**Nitrates & Nitrites.**

Les différences de concentration initialement apportées par l'ajout de nitrate sont conservées au cours de l'expérience (Fig.VI-13). Dans l'ensemble des conditions testées, deux phases sont discernables : une phase à concentration constante en nitrates entre t0h et t+96h et une phase de réduction des **nitrates** à parti de t+96h. Sous les **conditions acétates**, la seconde phase est d'avantage marquée. Elles aboutissent à une disparition totale des nitrates sous la condition 'Acétate'. Cette disparition des nitrates est de plus accompagnée par une production de **nitrites** ; production qui atteint les 10 mg L-1 sous les **conditions acétates.**

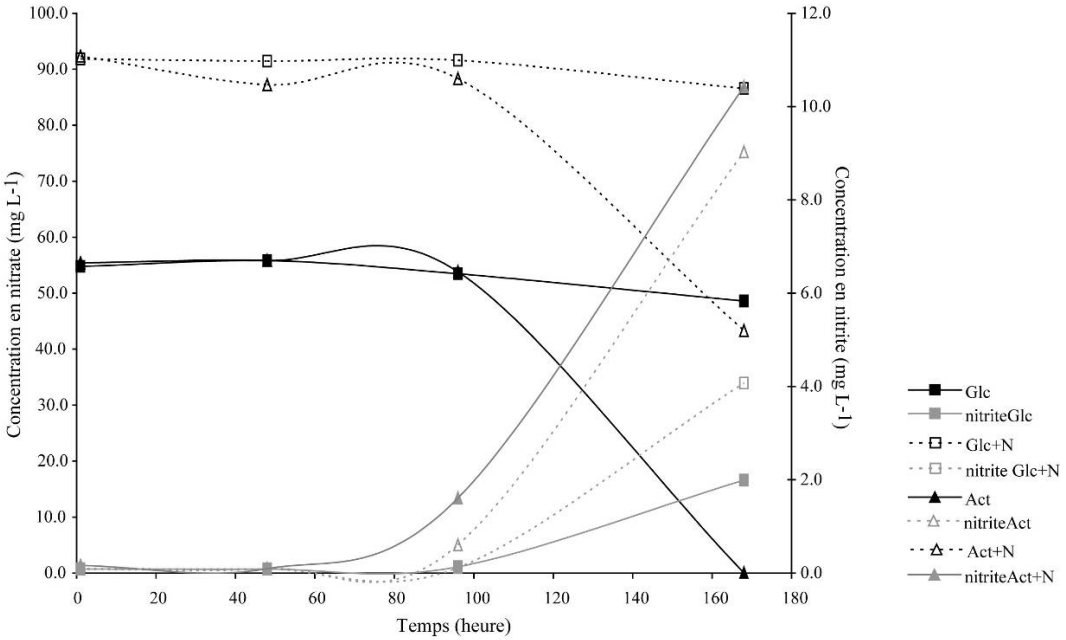



**Figure VI-13 : Evolution temporelle des concentrations en nitrates et en nitrites mesurées au cours de l'expérience #2.** Les concentrations en nitrates sont représentées par un figuré noir et nitrite par un figuré gris.

**Carbone.**

Le carbone de la molécule d'acétate est plus facilement consommé que celui du glucose (Fig.IV-14A). La décroissance maximale est observée entre t+48h et t+96h dans les conditions avec ajout de nitrates. Dans les 2 autres conditions, elle est positive tout au long de l'expérience. Les concentrations en carbone organique total augmentent pendant les premières 48h pour décroître par la suite. Pour les modalités Glc et Act des teneurs en COD différentes ont été observés indiquant une minéralisation plus importante dans le cas où l'eau est supplémentée en acétate. Cette consommation en carbone (Fig.VI-14) est concomitante à la consommation en nitrate (Fig.VI-13).

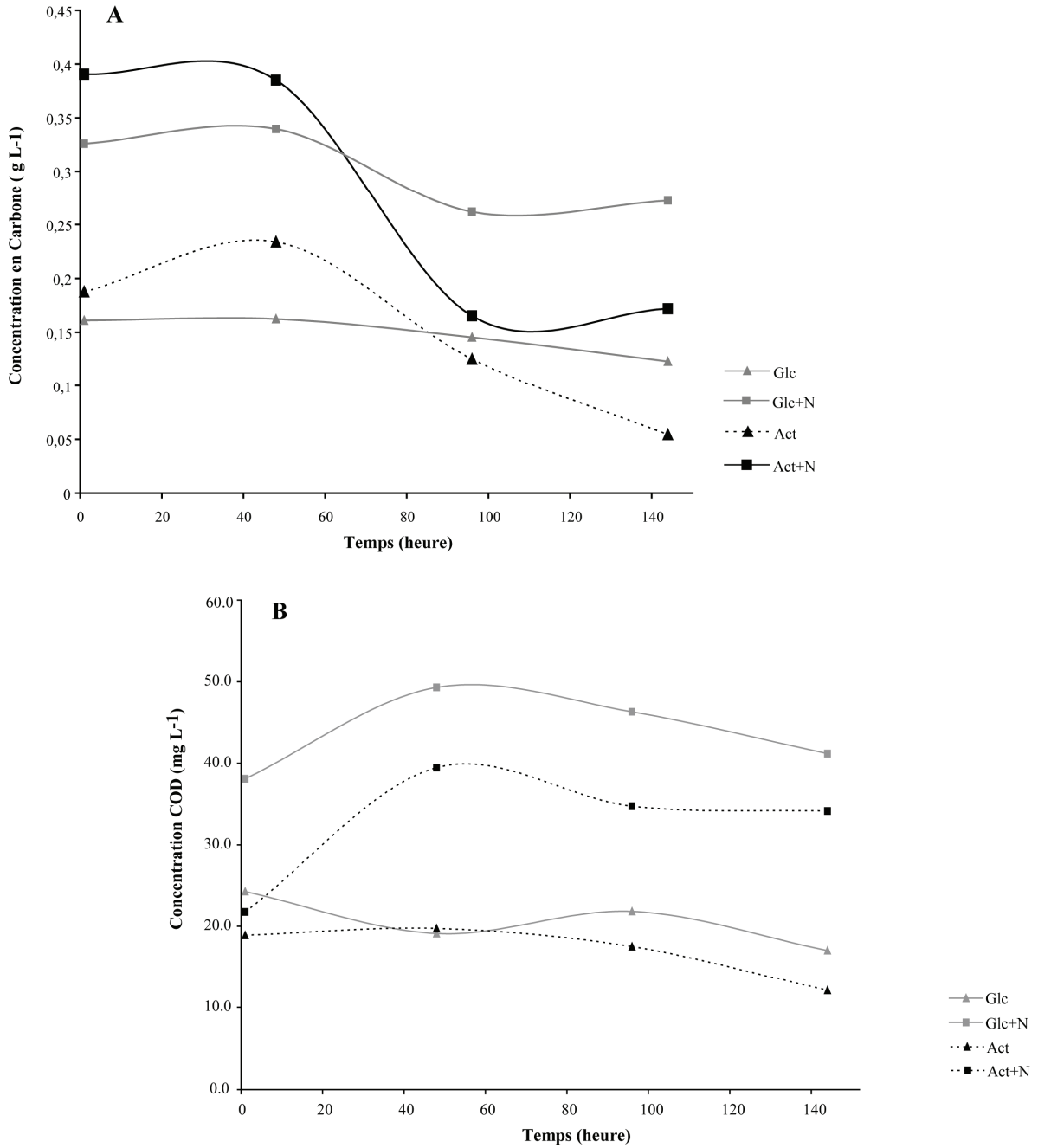



**Figure VI-14 : Evolution des concentrations en carbone.** A est le suivi des concentrations en Acétate et Glucose ; et B est le suivi des concentrations en carbone organique dissous.

### 6.2.2 Protéomique

#### 6.2.2.1 Concentration protéique

Les concentrations de protéines (Tabl.VI-3) obtenues sont supérieures à celles de la première expérience. La quantité de protéines obtenue est ainsi suffisante pour effectuer les analyses de discrimination systématique et de l'expression différentielle.

**Tableau VI-3 : Concentration et masse de protéines obtenues après extraction**

| | Concentration (mg/mL) | Masse protéique (µg) |
|---|---|---|
| Aérobie Acétate | 5.73 | 1146 |
| Aérobie Acétate+Nitrate | 4.07 | 814 |
| Aérobie Glucose | 3.1 | 620 |
| Aérobie Glucose+Nitrate | 3.03 | 602 |
| Aérobie Contrôle | 0.62 | 155 |

#### 6.2.2.2 Gel bidimensionnel

L'ensemble des protéines digérées n'a pu être identifié (Fig.VI-15). Le maximum d'identification a été obtenu pour les conditions sous ajout d'acétate (Tabl.VI-4). Les figures VI-15, 16, 17 et 18 représentent l'emplacement sur gel des protéines identifiées. Le problème principal auquel nous nous sommes heurtés dans cette analyse est le manque de protéines identifiées en référence aux banques de données. En dépit de spectre de masse de très bonne qualité (Fig.VI-19), aucune protéine ne correspond à une protéine connue à ce jour. Les analyses effectuées sous condition naturelles ne pourront être présentées. Un problème technique a provoqué la perte du gel et des résultats. Les valeurs de score et de pourcentage de recouvrement sont présentées de l'annexe IV à l'annexe VII

**Tableau VI-4 : Tableau récapitulatif du nombre de protéines analysées et identifiées.** Les picklists 1et 2 représentent l'échantillonnage du gel A et B, respectivement de la figure VI-16.

| | nombre de spots analysés | | nombre de spots identifiés | remarque |
|---|---|---|---|---|
| Aérobie Acétate | 143 | 96 | 11 | picklist1 |
| | | 47 | 1 | picklist2 |
| Aérobie Acétate+Nitrate | | 192 | 11 | |
| Aérobie Glucose | | 192 | 2 | |
| Aérobie Glucose+Nitrate | | 192 | 4 | |
| Aérobie Contrôle | | - | - | |

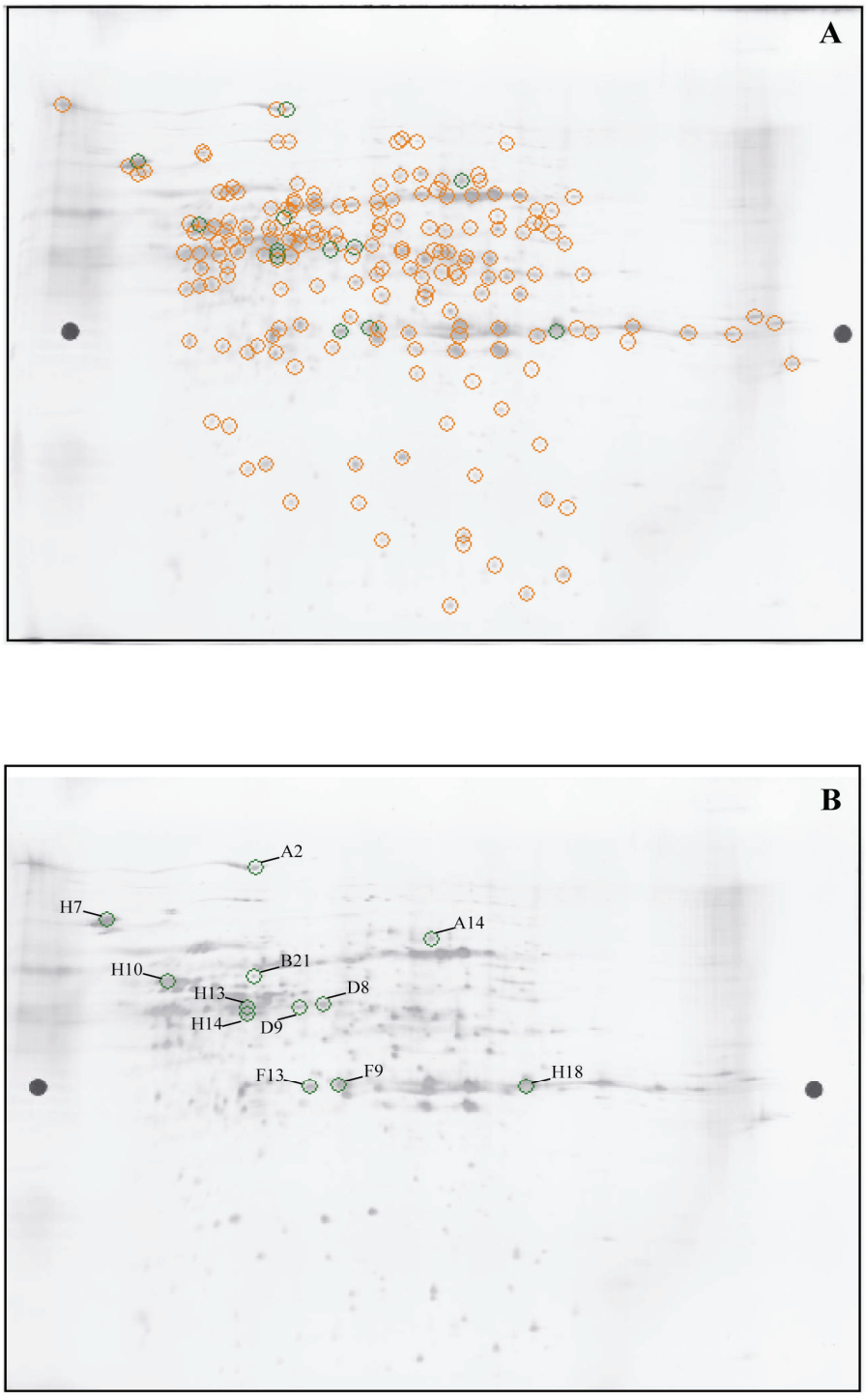



**Figure VI-15 : Gel sous condition acétate+nitrate.** Le gel représente l'ensemble des protéines qui ont été digérées pour identification. Les ronds orange indiquent la position des protéines et les ronds verts les protéines qui ont été identifiées. Sur le gel B, ne sont représentées que les protéines identifiées. Le gel 2D est très bon et très bien résolu.

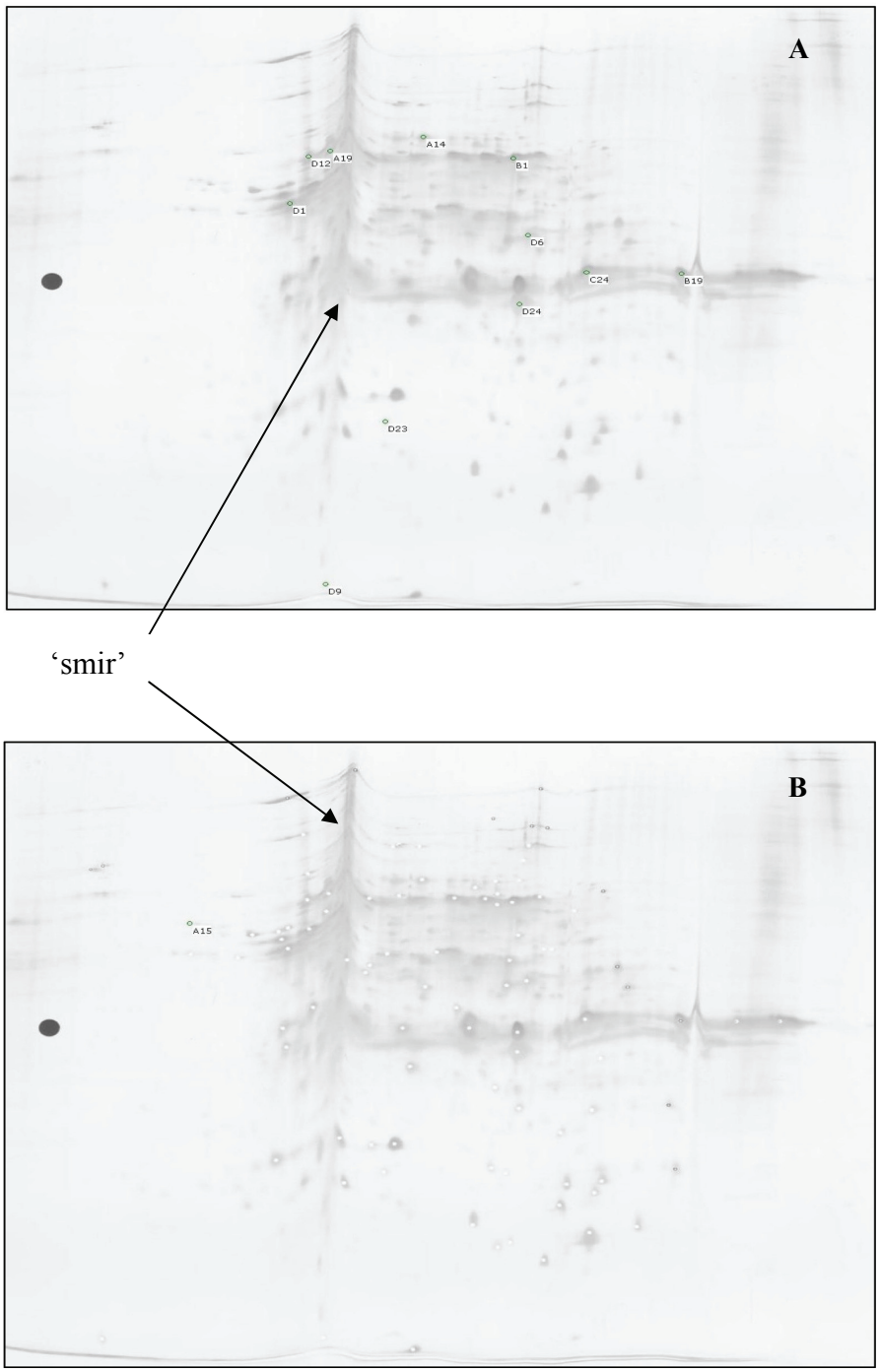



**Figure VI-16 : Gel sous condition Acétate.** En A est représenté l'ensemble des protéines qui ont été identifiées lors d'un premier échantillonnage et en B lors d'un second. Cela est noté dans le tableau A : picklist1 et B : picklist2. Sur le gel réalisé pour cette modalité, on peut remarquer un « smir » lié à une précipitation protéique lors de l'IEF qui induit un gel de moins bonne résolution.

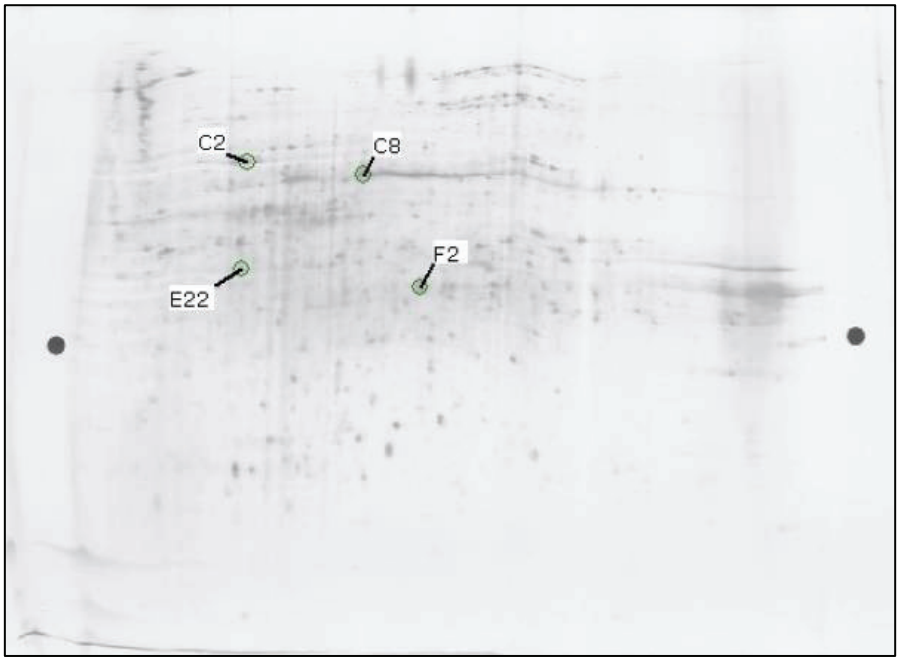



**Figure VI-17 : Gel sous condition Glucose**

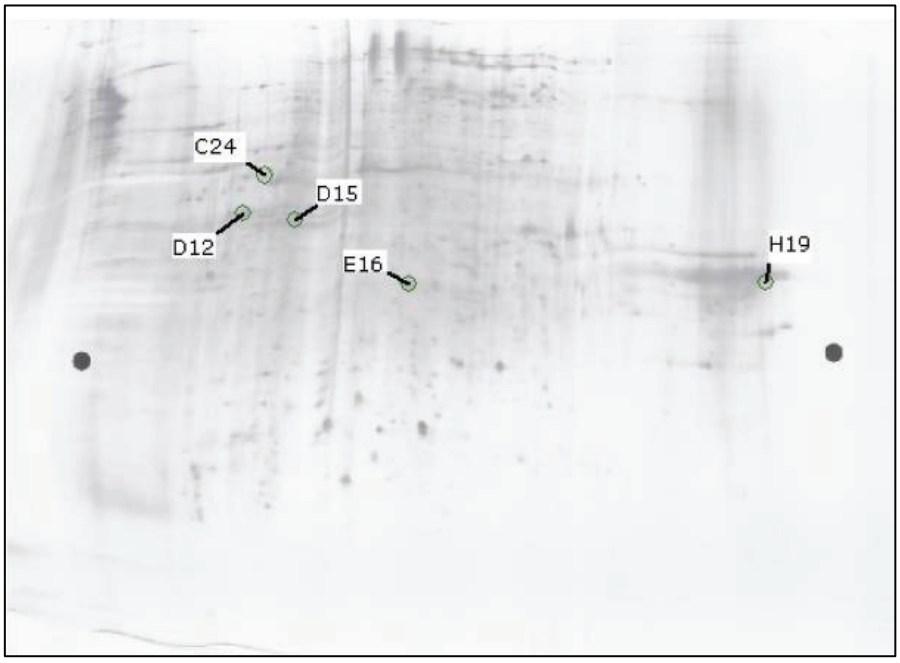



**Figure VI-18: Gel sous condition Glucose + Nitrate**

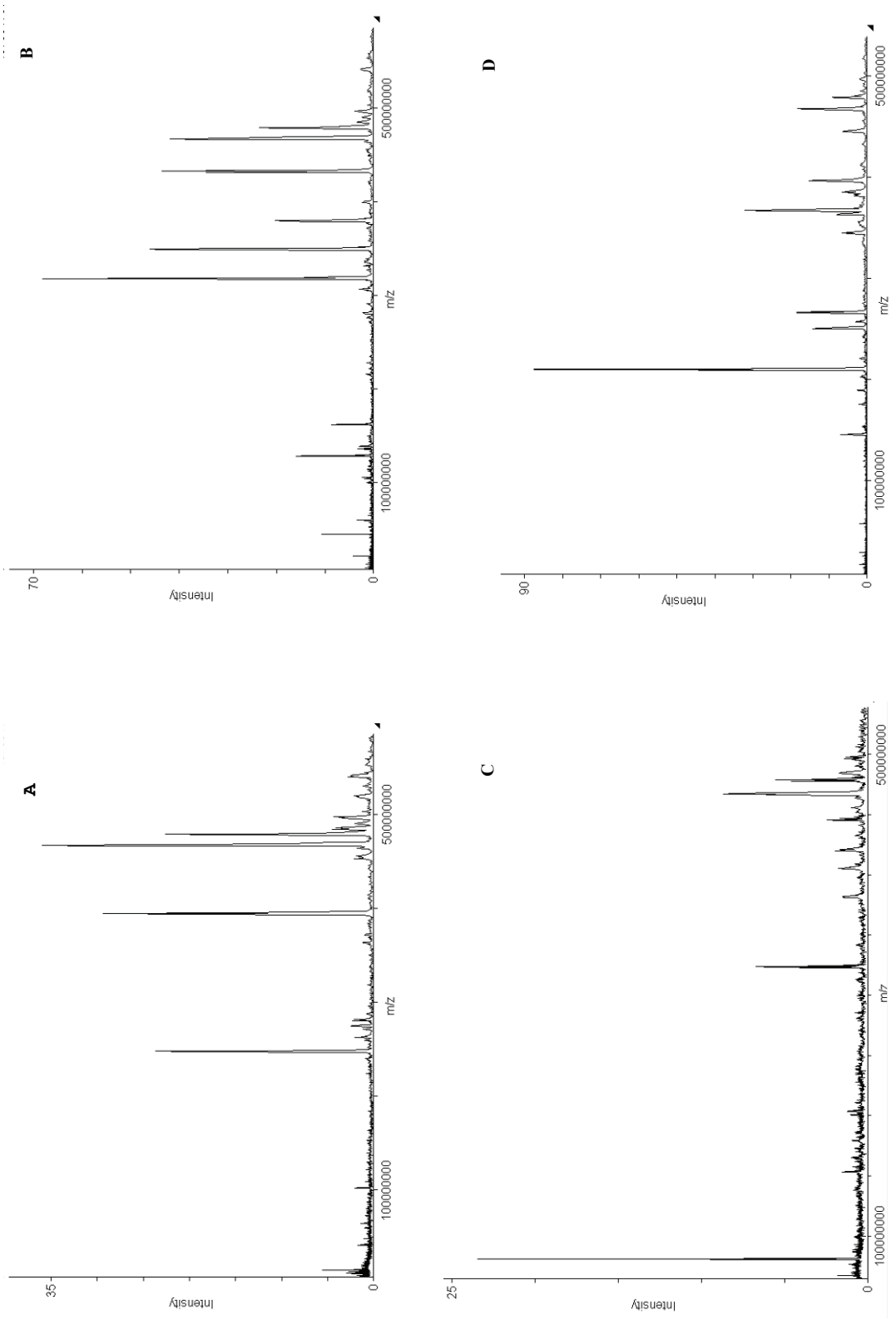



**Figure VI-19 : Exemples de spectres de masses obtenus après le fractionnement et l'ionisation des peptides.** M/Z représente le ratio de la masse sur la charge, et 'intensity' représente l'abondance relative des peptides. Les spectres A et B correspondent aux protéines D3 et A3, qui n'ont pas été identifiés ; les spectres C et D correspondent eux aux protéines A14 et B1 qui ont été identifiées comme respectivement une déshydrogénase succinate et un transporteur de phosphate (Tabl.VI-6). Les spectres ont été récupérés via le logiciel MoverZ (Genomic Solutions ®) (http://bioinformatics.genomicsolutions.com/MoverZ.html)

6.2.3-Protéines identifiées & Rôle

6.2.3.1. Conditions Acétates

Les protéines identifiées sous les conditions Acétate sont répertoriées dans le tableau VI-6.

***Protéines impliquées dans la synthèse protéique***

**Facteurs d'élongations**

Le rôle de cette protéine a été abordé dans le paragraphe traitant de l'expérience #1.

**KrfA protéine**

Cette protéine est une protéine de liaison de l'ADN, elle a ainsi une affinité générale ou spécifique à l'ADN. Le rôle de cette protéine n'est pas déterminé (Rosche *et al.*., 2000). Cependant il semblerait qu'elle joue un rôle dans la stabilité des plasmides (Adamczyk *et al.*, 2006). Elle peut de plus être essentielle dans l'ancrage du complexe ADN plasmidique - protéine. Ainsi cette protéine semble agir comme un organisateur de la région nucléaire spécifique au plasmide ce qui est important pour une hérédité stable et la stabilité du plasmide (Adamczyk *et al.*, 2006).

**Ketol-acid reductoisomerase**

La ketol-acid reductoisomerase aussi connue sous le nom d''acetohydroxy acid isomeroreductase' est une enzyme bi fonctionnelle qui intervient dans la biosynthèse d'acides aminés (Fig.VI-20). Elle catalyse 2 réactions différentes, agissant dans chacune comme une isomérase et une réductase (Tyagi *et al.*., 2005).

Dans la réaction d'isomérisation, le 2-hydroxy-2-methyl-3-ketobutyrate (ou 2-acetolactate) est réarrangé via une migration d'un groupement méthyle pour produire le 3-hydroxy-3-methyl-2-ketobutyrate en présence de $Mg^{2+}$.

Dans la réaction de réductase, le produit de la réaction subit une réduction dépendante de $M^{2+}$ ($Mg^{2+}$, $Mn^{2+}$ ou $Co^{2+}$) par NADPH et conduit au 2,3-dihydroxy-3-methylbutyrate. Ce produit est précurseur de la valine et de la leucine. L'isoleucine est produite dans une voie parallèle à celle de la valine, employant les mêmes séries d'enzymes où la ketol-acid reductoisomerase catalyse la conversion de 2-hydroxy-2-ethyl-3-ketobutyrate en 2,3-dihydroxy-3-ethylbutyrate.

**Tableau VI-5 : Protéines identifiées sous les conditions acétate**

Acétate

| n° du Spot | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Groupe fonctionnel |
|---|---|---|---|---|
| A14 | succinate deshydrogenase | YP_235088 | Pseudomonas syringae pv. syringae B728a | Métabolisme |
| A19_1 | ATP synthase subunit A | YP_263276 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| A19_2 | KfrA protein | NP_598100 | uncultured bacterium | Synthèse protéique |
| B1 | dihydrolipoamide dehydrogenase | YP_258846 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| B19 | phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein | YP_263177 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| C24 | phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein | YP_263177 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| D1 | elongation factor Tu | YP_350809 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Synthèse protéique |
| D24 | succinyl-CoA synthetase alpha subunit | YP_258848 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| D6 | beta-ketothiolase | BAA36197 | Pseudomonas sp. 61-3 | Métabolisme |
| D9 | nitrogen regulatory protein P-II | NP_747335 | Pseudomonas putida KT2440 | Métabolisme |
| A15 | ATP synthase subunit B | YP_351454 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Métabolisme |

Acétate + Nitrate

| n° du Spot | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Groupe fonctionnel |
|---|---|---|---|---|
| A2 | aconitate hydratase | YP_259740 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| A14 | succinate dehydrogenase | YP_347344 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Métabolisme |
| B21 | Membrane-bound ATP synthase, F1 sector,beta-subunit | YP_728062 | Ralstonia eutropha H16 | Métabolisme |
| D8 | arginine deiminase | YP_261719 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |
| D9 | arginine deiminase | YP_261719 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Métabolisme |
| F9 | ketol-acid reductoisomerase | YP_350114 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Synthèse protéique |
| F13 | ketol-acid reductoisomerase | YP_262325 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Synthèse protéique |
| H7 | ChtH | YP_262325 | Agrobacterium sp. | |
| H10 | ATP synthase subunit B | AAC12800 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Métabolisme |
| H13 | elongation factor Tu | YP_351454 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Synthèse protéique |
| H14 | elongation factor Tu | YP_350809 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Synthèse protéique |
| H18 | phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein | YP_263177 | Pseudomonas fluorescens Pf-5 | Métabolisme |

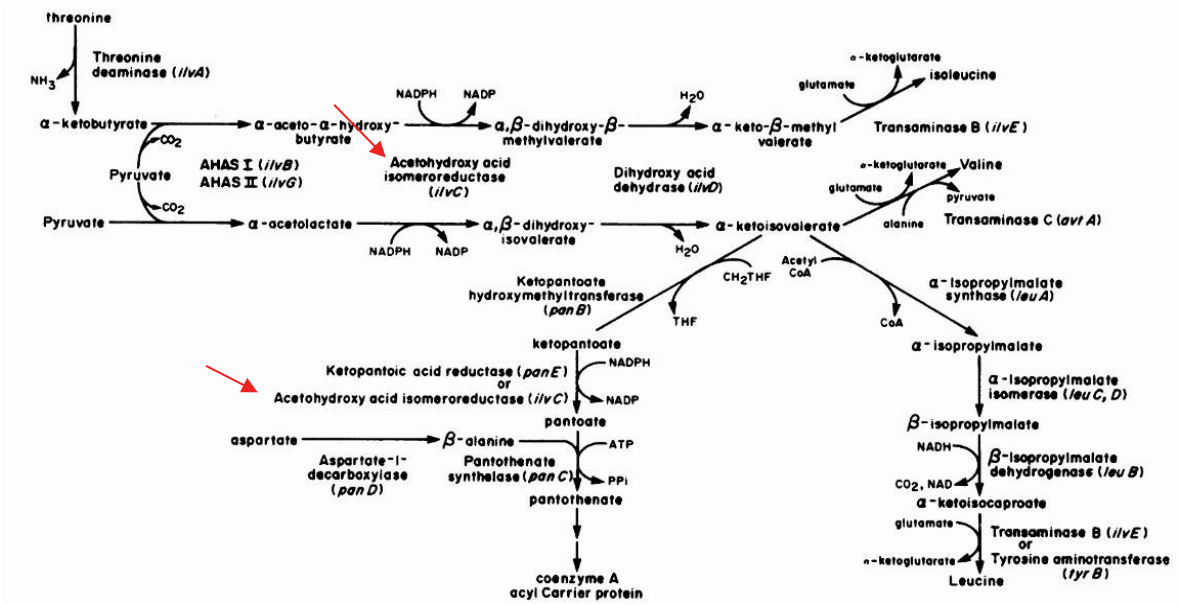



**Figure VI-20 : Représentation de la biosynthèse d'acides aminés à chaîne ramifiée (Valine, Leucine et Isoleucine) et de coenzyme A (d'après Primerano and Burns, 1983)**. L'emplacement de la protéine kétol acide réductoismérase ou acétohydroxy acid isomeroreductase est indiqué par les flèches.

### *Protéines impliquées dans les voies métaboliques*

#### Succinate deshydrogenase

Le rôle de cette protéine a été abordé dans le paragraphe traitant de l'expérience #1.

#### ATP synthase sous unité A/B

Les ATPases ou ATP synthases sont des complexes / transporteurs d'ions liés à la membrane qui combinent la synthèse et/ou l'hydrolyse d'ATP avec le transport de protons à travers la membrane. Les ATPases peuvent exploiter l'énergie à partir d'un gradient protonique, en utilisant le flux d'ions à travers la membrane via un canal protonique ATPase pour conduire à la synthèse d'ATP (Fig. VI-21A). Quelques ATPases réalisent un travail inverse en utilisant l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP pour créer un gradient protonique (Fig. VI-21B).

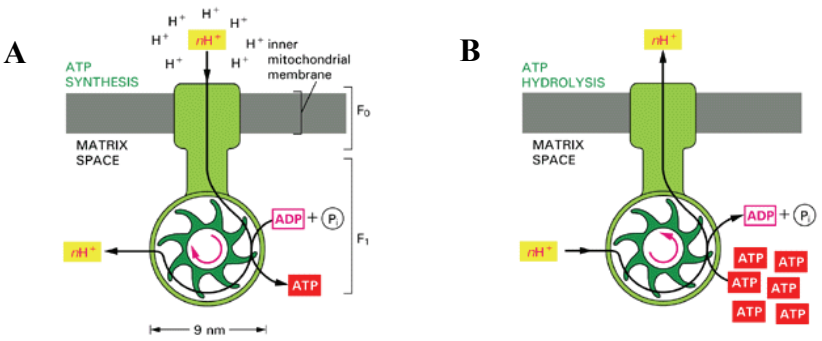



**Figure VI-21 : Représentation de l'ATPase.** La figure A représente la synthèse d'ATP et la figure B l'hydrolyse d'ATP. (Alberts *et al.*., 1994)

**Dihydrolipoamide dehydrogenase**

Elle catalyse la réduction des lipoamide par NADH, $H^+$ pour générer du dihydrolipoamide et NAD+. Elle est aussi connue sous le nom de dihydrolipoyl dehydrogenase. Elle intervient dans le processus de transformation du pyruvate en acétyl-CoA (Fig. VI-22) dans la catalyse du cycle FAD/NAD. La réduction du NAD en NADH, H+ libère 3 ATP.

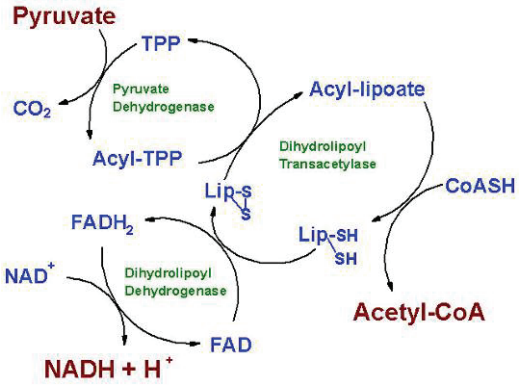



**Figure VI-22 Diagramme représentant l'activité du complexe de la pyruvate.** Le produit de cette réaction est l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de l'acide citrique pour une oxydation complète en CO2 et H2O.

**Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein**

Cette protéine a été initialement découverte chez les bactéries Gram - . Elle comporte une forte affinité avec le substrat et est localisée dans l'espace périplamisque qui est le site de reconnaissance majeur du substrat. Elle est impliquée dans le transport de phosphate à travers la membrane.

**Succinyl-CoA synthetase alpha subunit**

La protéine 'succinyl-CoA synthetase (SCS)' catalyse la réaction suivante (Eq.VI-3) par trois étapes qui impliquent l'enzyme phosphoryle et l'enzyme lié au succinyle phosphate comme intermédiaires :

$$\text{succinate} + \text{coA} + \text{ATP} \xrightleftharpoons{Mg^{2+}} \text{succinyl-coA} + \text{ADP} + \text{Pi} \qquad \textbf{Équation VI-3}$$

Durant le métabolisme aérobie, cela est réalisé dans le cycle de l'Acide citrique (TCA) en couplant l'hydrolyse de la succinyl-CoA à la synthèse d'ATP et ainsi représente un site important de phosphorylation du substrat. Cette enzyme peut aussi être impliquée dans une

voie anabolique générant du succinyl-CoA durant la croissance anaérobie lorsque les voies oxydatives à partir du 2-oxoglutarate sont réprimées (Buck *et al*., 1985).

**Beta-ketothiolase**

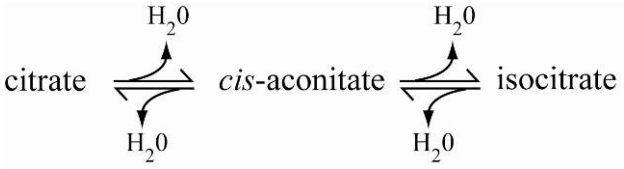
Cette enzyme catalyse la formation d'acétyl-CoA. Elle apparaît dans un grand nombre d'organismes vivants en aérobiose et anaérobiose. Chez les organismes aérobies, elle est impliquée dans la dégradation des acides gras, la synthèse de beta-hydroxy- beta - methylglutaryl CoA et la synthèse et la réutilisation d'acide poly-beta-hydroxy butyrique. Pour les bactéries anaérobies, sa fonction principale réside dans la formation d'acétoacétyl-CoA à partir d'acétyl CoA. Cette réaction est la première étape de synthèse d'acide butyrique dans la fermentation d'acide butyrique (Thauer *et al.*, 1977).

**Nitrogen regulatory protein P-II**

Cette protéine est impliquée dans la régulation de l'utilisation d'azote. Chez les bactéries Gram -, l'activité et la concentration de la glutamine[11] synthétase est régulée en réponse à la quantité d'azote disponible dans le milieu. En condition d'azote limitant, la glutamine synthétase est activée et inversement. P II contrôle indirectement la transcription du gène de la glutamine synthétase (Zamaroczy *et al.*., 1990).

**Aconitate hydratase**

Cette enzyme intervient dans le cycle de l'acide citrique en catalysant la réaction suivante (Eq.VI-4):




**Équation VI-4**

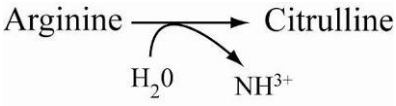
**ChtH**

C'est une protéine de liaison de l'ADN. C'est une double protéine hélicoïdale que l'on retrouve chez beaucoup de protéines qui régulent les gènes d'expression.

[11] La **glutamine** est un acide aminé. Elle joue un rôle biochimique important en tant que constituant des protéines. Elle est également un élément crucial de la métabolisation de l'azote : l'ammoniac formé par la fixation d'azote est assimilé en composé organique par la conversion de l'acide glutamique en glutamine. Cette conversion est catalysée par la glutamine synthétase. De plus, la glutamine peut être utilisée comme donneur d'azote dans les biosynthèses de nombreux composés, y compris d'autres acides aminés, les purines et les pyrimidines.

**Arginine deiminase**

L'arginine déiminase catalyse l'hydrolyse irréversible de l'arginine en citrulline et ammonium (Eq.VI-5). Elle est impliquée dans la première étape de la voie anaérobie de dégradation de l'arginine la plus étendue. La citrulline est un acide aminé qui n'est pas utilisé lors de la synthèse protéique.




**Équation VI-5**

6.2.3.2. Conditions Glucoses

Le rôle de certaines protéines identifiées n'est à ce jour pas connu, la protéine à fonction inconnue DUF404 et les protéines hypothétiques TTHERM_00038910. Les protéines identifiées sont répertoriées dans le tableau VI-7.

***Protéines impliquées dans la synthèse protéique***

**Facteurs d'élongations**

Le rôle de cette protéine a été abordé dans le paragraphe traitant de l'expérience #1.

**Exonucléase supposée, RdgC**

L'exonucléase est une nucléase, une enzyme qui coupe l'ADN ou l'ARN à partir d'une extrémité, un nucléotide à la fois, et dans un sens : 5' vers 3' ou l'inverse. Les membres de la famille RdgC peuvent avoir une activité nucléasique. Chez *E.coli* RdgC est nécessaire pour la croissance de souches dont la recombinaison est déficiente et l'exonucléase insuffisante. Sous certaines conditions, la RdgC peut agir comme une exonucléase pour éliminer les fourches de réplications effondrées.

***Protéines impliquées dans les voies métaboliques***

**ATPase**

Le rôle de cette protéine a été abordé dans le paragraphe traitant de l'expérience #2 – Acétate.

**Tableau VI-6 : Protéines identifiées sous conditions 'Glucose'**

Glucose

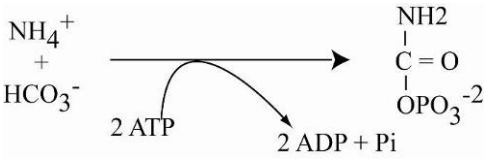
| n° du Spot | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Groupe fonctionnel | Rm |
|---|---|---|---|---|---|
| C2 | Listeria phage A118 Attention VIRUS | NP 463503 | Bacteriophage A118 | | phage |
| C8 | ATPase | ZP 01144275 | Acidiphilium cryptum JF-5 | Métabolisme | |
| E22 | protein of unknown function DUF404 | ZP 01567720 | Burkholderia multivorans ATCC 17616 | ? | |
| F2 | carbamoyl-phosphate synthase large subunit | NP 960053 | Mycobacterium avium subsp. | | champignon |

Glucose + Nitrate

| n° du Spot | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Groupe fonctionnel |
|---|---|---|---|---|
| C24 | ATP synthase F1, beta subunit | YP 995283 | Verminephrobacter eiseniae EF01-2 | Métabolisme |
| D12 | translation elongation factor Tu | NP 903858 | Chromobacterium violaceum ATCC 12472 | Synthèse protéique |
| D15 | translation elongation factor Tu | YP 980447 | Polaromonas naphthalenivorans CJ2 | Synthèse protéique |
| E16 | putative exonuclease, RdgC | ZP 01602198 | Shewanella pealeana ATCC 700345 | Synthèse protéique |
| H19 | hypothetical protein TTHERM 00038910 | XP 977192 | Tetrahymena thermophila SB210 | - |

**Carbamoyl-phosphate synthase**

Cette protéine intervient dans le cycle de dégradation des Acides Aminés. Elle est stimulée par la N-acétylglutamine, qui signale présence de fortes quantités d'azote. Elle catalyse la réaction suivante :




**Équation VI-6**

## 7. Discussion

### 7.1-Expérience #2

Les microorganismes montrent une activité augmentée lorsque du carbone est supplémenté au milieu naturel. En effet l'eau prélevée sur le site présente des teneurs en carbone inférieures à 1mg.$L^{-1}$ et les teneurs en nitrates varient autour de 70mg.$L^{-1}$ (voir la partie V - Influence des circulations hydrologiques verticales sur la structure des communautés bactériennes). Dans ces conditions, on peut considérer le milieu comme un milieu oligotrophe où le carbone est l'élément limitant la croissance bactérienne. La source de carbone a été apportée pour atteindre un maximum de minéralisation tel que C/N=10 (Curtis *et al.*, 1990). La nature du substrat apporté joue sur la vitesse et le taux de réduction des nitrates. La réduction des nitrates se déroule en deux temps ; une première phase de 0 à 96h où la concentration en nitrate est stable et une seconde de 96h à la fin de l'expérience où une partie des nitrates présents est réduite en nitrites. L'absence de réduction au cours des 96h premières heures est liée à la présence d'oxygène. Une fois l'oxydant le plus fort consommé les bactéries respirent plus efficacement les nitrates présents. Sous condition acétate, la réduction des nitrates, complète à la fin de l'expérience, s'accompagne d'une production de nitrites. En présence de glucose, la réduction des nitrates est partielle, inférieur à 5mg.$L^{-1}$ en fin d'expérience, et accompagnée d'une production faible de nitrite. La réduction des nitrates en présence de carbone souligne le métabolisme hétérotrophe des organismes présents dans les eaux souterraines de Kerrien. Cette différence d'affinité pour le substrat organique suggère la mise en place de 2 processus métaboliques différents. Les valeurs de pH viennent aussi appuyer

cette hypothèse. En fin d'expérience le milieu est acide sous les conditions glucose ce qui suggèrent une fermentation anaérobie.

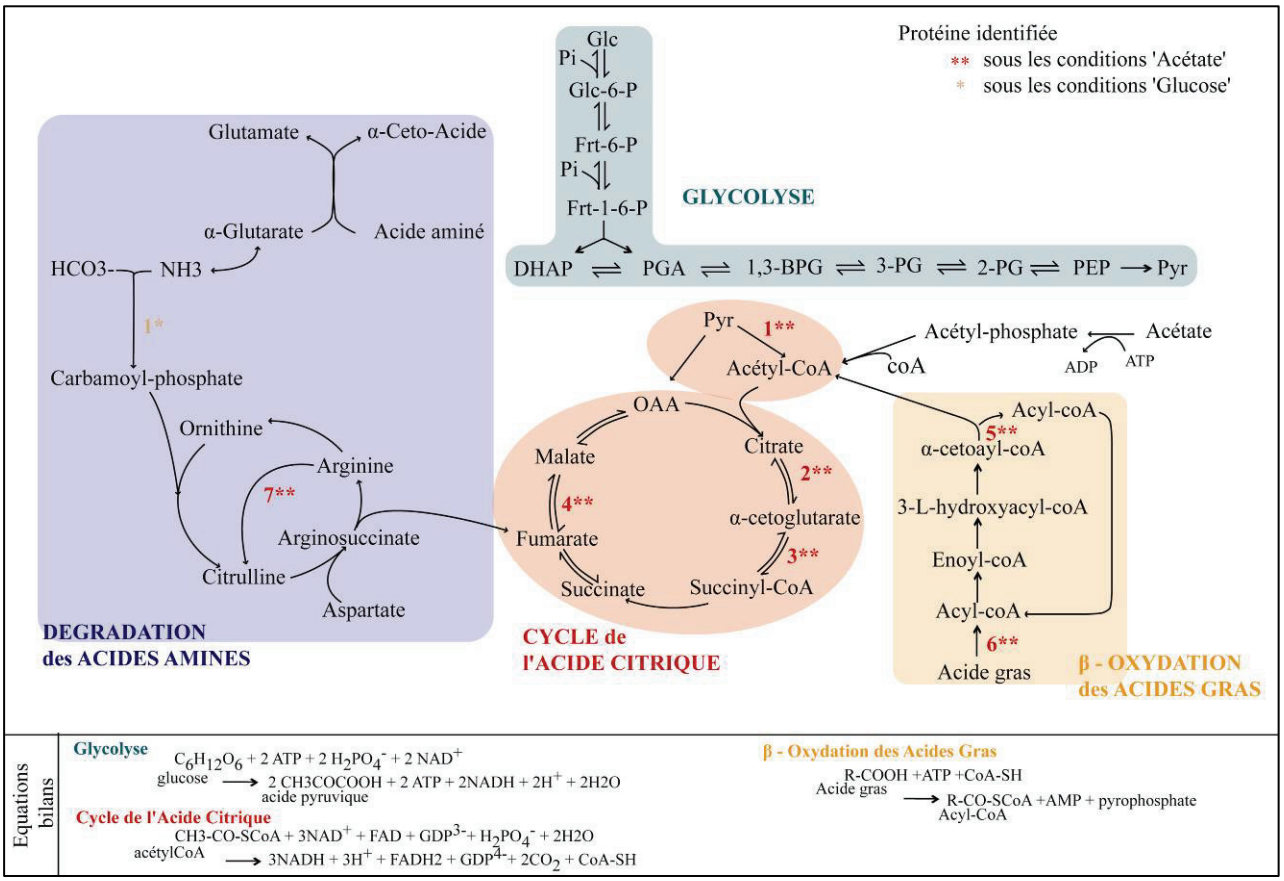



**Figure VI – 23 : Représentation des voies métaboliques dans lesquelles des protéines déterminées sont exprimées.** Aucune protéine intervenant dans la glycolyse n'a été identifiée, hors c'est la voie métabolique de dégradation du glucose. Les chiffres notés '1*' sont les protéines extraites et déterminées dans les conditions *glucose* et '1**' dans les conditions acétates. *1 * : Carbamoyl-phosphate synthétase* ; 1** : Dihydrolypoamide dehydrogenase, 2** : Aconitate hydratase, 3** : Succinyl-CoA synthétase, 4** : Succinate déhydrogénase, 5**: β-cétothiolase, 6** : Céto-acide réducto iosomérase et 7** : arginine déiaminase. L'ammoniac présent dans la dégradation des acides aminés peut aussi être le produit de réduction des nitrates. La nitrate réductase catalyse la réduction des nitrates en nitrite en faisant intervenir un coenzyme nicotinique (NADH2/NAD), puis la nitrite réductase catalyse la réduction des nitrites en ammoniac.

Dans les conditions Glucose et Acétate, beaucoup de protéines impliquées dans des fonctions clés physiologiques ont été exprimées. C'est le cas pour les facteurs d'élongations EF-1α, les ATP synthases, identifiées en Acétate et Glucose ; pour les enzymes du cycle de l'acide citrique, pour l'Acétate. L'expression de ces protéines indique que les cellules sont en bon état physiologique. Pour les conditions acétates, les meilleures correspondances pour les enzymes cataboliques ont été obtenues avec des séquences de *Proteobactéries* incluant les taxons *Pseudomonas*, *Ralstonia* et *Agrobacterium* qui ont été identifiés sur le site d'étude (Partie V, Fig.V-4). Les *Ralstonia* sont des bactéries aérobies, à métabolisme à oxydase et à catalase positive ; les *Pseudomonas* sont des bactéries aérobies strictes qui dégradent le

glucose par respiration aérobie ou qui sont inertes vis-à-vis du glucose, elles ne réalisent ainsi pas de respiration fermentative ; et les *Agrobacterium* sont retrouvées principalement dans le sol au niveau de la rizosphère. Elles peuvent métaboliser une large gamme de mono et disaccharides et d'acides organiques ; et certaines souches peuvent respirer les nitrates. Sur les 23 protéines identifiées sous les conditions acétate, 5 interviennent dans le cycle de l'acide citrique ; les autres jouent un rôle dans la synthèse protéique ou dans le transport ionique ou ATPases (Figure VI-23). Pour les conditions glucose, les correspondances pour les protéines identifiées sont obtenues pour une large gamme de bactéries ; certaines protéines identifiées sont issues de champignons et de protéines virales.

Cette différence d'expression entre les deux conditions suggère aussi des fonctionnements écologiques différents.

### 7.1.1. Les Voies métaboliques

Les protéines métaboliques ne laissent aucun doute quant à l'utilisation de la voie métabolique du cycle de l'Acide Citrique dans la dégradation des nitrates sous les conditions acétate (Fig.VI-23). L'utilisation de l'acétate comme source carbonée pour la dénitrification se déroule suivant l'équation suivante (van Rijn *et al.*, 2006) :

$$5CH_3COO^- + 8NO_3^- + 3H^+ \rightarrow 10HCO_3^- + 4N_2(g) + 4H_2O \quad (\Delta G°' = -792 kJ.mol-1)$$

La dénitrification à la différence de la nitrification à tendance à augmenter le pH rendant ainsi le milieu plus alcalin (van Rijn *et al*., 2006) ; résultat observé en fin d'expérience.

Cependant cette réaction doit se produire une fois que tout l'oxygène présent a été consommé, en effet la dégradation de l'acétate par voie oxydative est plus énergétique (ΔG°' = -844kJ par mole).

$$CH_3COO^- + 2O_2 \rightarrow 2HCO_3^- + H^+ \quad (\Delta G°' = -844 kJ.mol-1)$$

Ainsi la consommation de l'oxygène dans un premier temps explique pourquoi la consommation en nitrate ne débute réellement qu'à partir de 96h. Cela rend ainsi plus explicite le passage en un système anaérobie alors que l'atmosphère n'a pas été initialement modifiée. La transformation de la molécule d'acétate en méthane et en $CO_2$ fournit très peu d'énergie (ΔG°'=-36kJ par mole). Il n'est ainsi pas surprenant que la voie de dégradation de l'acétate par la respiration nitratée soit préférée.

En revanche, il est étonnant que peu de carbone soit consommé sous la condition glucose. En effet, la glycolyse oxydative est hautement énergétique (ΔG°' = -2870kJ par mole) (Schink,

1997) et plus de trois fois supérieure à l'énergie fournie par une respiration nitratée de l'acétate,

$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O \qquad (\Delta G°' = -2870 kJ.mol^{-1})$$

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3CO_2 + 3CH_4 \qquad (\Delta G°' = -390 kJ.mol^{-1})$$

La dégradation méthanogène génère un champ d'énergie faible comparativement au processus d'oxydation (ΔG°' = -390kJ par mole). Cela permet d'expliquer le déroulement de la méthanogénèse en dernière étape de la séquence des réactions redox. L'absence d'oxygène est indispensable pour que cette réaction se produise. La dégradation oxydative du glucose en présence de nitrate est elle aussi très exergonique (ΔG°' = -2386.1kJ par mole) (Winkelman *et al.*, 2004) et se fait selon l'équation suivante :

$$C_6H_{12}O_6 + 4.8NO_3^- \rightarrow 6CO_2 + 36\,H_2O + 4.8OH^- + 2.4\,N_2$$

Les protéines exprimées sous conditions 'Glucose' étant principalement impliquées dans la synthèse protéiques (Tabl.VI-7), ne nous permettent pas à l'heure actuelle d'identifier la voie métabolique activée. Sous conditions glucose, les nitrates sont peu réduits alors que le glucose est consommé. La totalité de l'oxygène présent n'a possiblement pas été respirée.

7.1.2. Pourquoi cette différence entre les conditions acétates et glucoses ?

L'activité hétérotrophe dénitrifiante est fonction du type de substrat carboné. Dans les sols sous conditions anoxiques, elle est plus efficace en présence d'acétate que de glucose (Paul *et al.*, 1989, Tam *et al.*., 1992 ; van Rijn *et al.*, 2006 ). Deux hypothèses peuvent être formulées pour expliquer la moindre réduction des nitrates en présence de glucose : soit une interaction biotique du type compétition soit une inhibition de la consommation du glucose. A priori pour les conditions Acétate, la réduction des nitrates (Fig. VI-13) accompagnée d'une consommation de l'acétate (Fig. VI-14) ne laisse pas sous entendre de compétition bactérienne vis-à-vis de l'acétate.

Le métabolisme microbien et la compétition pour des substrats organiques complexes comme le glucose sont mal connus (Chidthaisong and Conrad, 2000). Dans des conditions anoxiques, les bactéries réduisant les nitrates peuvent entrer en compétition avec les bactéries fermentatives pour le glucose. Les bactéries réduisant les nitrates utilisent plus efficacement le glucose que les bactéries fermentatives. La compétition résulterait en une inhibition de production de $CH_4$ (Chidtaisong and Conrad, 2000). L'effet de l'ajout de nitrate indique que

les populations microbiennes fermentant le glucose sont inhibées par les nitrates et/ou les produits de dégradation intermédiaire des nitrates. Le turnover du glucose est ainsi inhibé par la présence de nitrate (Chidtaisong and Conrad, 2000). Dans le cas présent, les protéines identifiées ne sont pas spécifiquement issues de bactéries. Une protéine très proche de celle que l'on retrouve chez un champignon ainsi qu'une protéine virale ont été trouvées. Au cours de l'expérience #1, une protéine identifiée (OmpA) est connue pour fonctionner comme un récepteur de bactériophage (Datta *et al.*, 1977) et est requise pour l'action de colicines spécifiques (par exemple Davies and Reeves, 1975). Les colicines sont des protéines toxiques produites par *Escherichia coli* pour inhiber la croissance de souches bactériennes proches ou similaires. La présence d'une protéine lytique de bactériophage (Listeria phage A118) (Loessner *et al.*, 1995) et d'un récepteur possible de bactériophage (OmpA) peuvent ainsi être responsables de la régulation de la population au sein de la communauté. De plus les protéines exprimées sous les conditions glucose sont issues d'une large gamme de bactéries. La faible consommation en présence de glucose peut être le résultat d'une action simultanée de compétition et d'inhibition. Le processus utilisé par les bactéries dans le cas du glucose est peu compréhensible. Les voies oxydatives et fermentatives engendrent par la dégradation du glucose une acidification du milieu. La voie oxydative ne donne naissance qu'à de petite quantité de composés acides alors que la voie fermentative engendre l'apparition d'un plus grand nombres d'acides. Les valeurs de pH mesurées au début et à la fin de l'expérience sous la condition glucose montre une légère acidification du milieu. De plus la présence d'oxygène et de nitrate est de nature à inhiber le processus de fermentation. On peut donc supposer que le processus métabolique dans le cas du glucose est une glycolyse oxydative. Une protéine impliquée dans le cycle de l'acide citrique a été identifiée dans l'expérience #1 (succinate déshydrogénase) sous les expériences Glucose.

Cette expérience met en avant que les fortes teneurs en nitrates observées dans l'eau souterraine de Kerrien sont principalement dues à une absence de carbone organique. Les bactéries retrouvées sont essentiellement hétérotrophes. On peut aussi mettre en avant que la nature de la source carbonée disponible est très importante pour avoir une denitrification efficace et que suivant la forme de carbone, les voies métaboliques activées ne seront pas les mêmes. Le but de cette expérience était de proposer un modèle de fonctionnement de niche écologique ; ce que nous ne pouvons faire seulement partiellement à ce jour. Même si à priori la connaissance au préalable du méta génome n'est pas nécessaire, sa méconnaissance est un inconvénient dans l'identification des protéines. Toutes les protéines exprimées n'ont pas été

identifiées du fait de leur absence dans les bases de données. On peut néanmoins souligner que pour l'homme, organisme modèle en génomique, plus de 30% du protéome reste inconnu. De fait une analyse exhaustive semble peu réaliste aujourd'hui mais n'est qu'une contrainte contournable par l'identification de protéines clés. Par ailleurs, certaines des protéines non identifiées peuvent être dans les 2 conditions expérimentales. L'expression différentielle pourra nous donner plus d'information sur ce dernier point. Même si les protéines ne sont pas identifiées, le différentiel d'expression entre les 2 conditions sera une information primordiale.

### 7.2 - Expérience #2-Expression différentielle

Les gels en 2D classique sous condition acétate (Fig.VI-16) montrent une bande autour du pH 5 qui peut gêner lors de la migration. De fait une analyse différentielle utilisant l'électrophorèse 2D (2D-DIGE) est contrariée. Pour cette raison essentiellement la méthode ICPL a été choisie. De plus une quantité inférieure de matériel protéique est nécessaire pour la méthode ICPL.

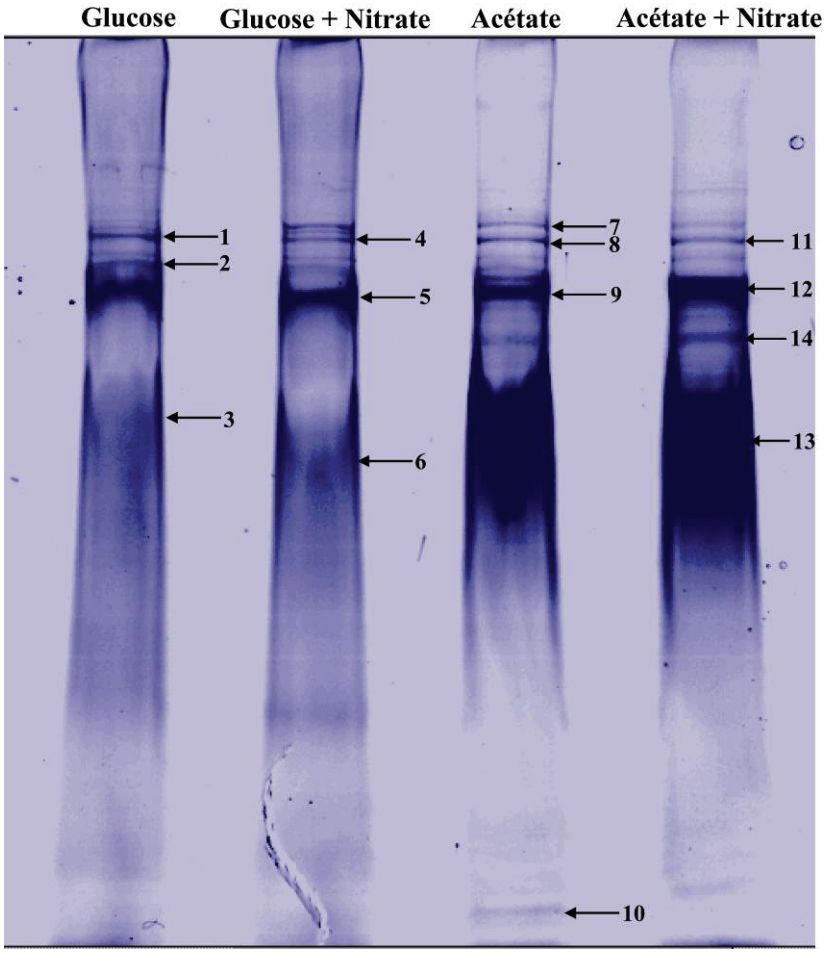



**Figure VI-24: Expérience de faisabilité**. Gel de migration en 1 dimension des protéines exprimées dans l'ensemble de l'expérience #2, les numéros correspondent aux bandes qui ont été excisées pour identification.

Une expérience de faisabilité a été réalisée (Fig.VI-24). Sur les 14 bandes prélevées, cinq ont abouti à au moins un résultat significatif. Le traitement et l'analyse des échantillons 'Glucose+Nitrate' et 'Acétate+Nitrate' n'ont abouti à aucune identification (bandes 4, 5 et 6 ; bandes 11, 12, 13 et 14).

**Tableau VI-7: Protéines identifiées sous les conditions Acétate et Glucose dans l'expérience de faisabilité d'ICPL.** Le symbole * est utilisée pour les protéines dont l'identification semble incertaine car issue de protéine eucaryote.

Glucose

| n° de la bande | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Rôle | Groupe fonctionnel |
|---|---|---|---|---|---|
| 1* | Heat shock protein HSP 90-beta | P11499 | Mus musculus | Protéine chaperonne exprimée en cas de forte température ou de stress | Chaperonne |

Acétate

| n° de la bande | nom de la protéine | n° d'accession NCBInr de la protéine la plus proche | Espèces | Rôle | Groupe fonctionnel |
|---|---|---|---|---|---|
| 7 | DNA-directed RNA polymerase beta' subunit | NP_742614 | Pseudomonas putida KT2440 | Catalyse la polymérisation de l'ARN dépendante de l'ADN | Synthèse d'acide nucléique |
| 7 | elongation factor Tu | NP_742606 | Pseudomonas putida KT2440 | Protéine impliquées dans la synthèse des protéines sur les ribosomes | Synthèse protéique |
| 8 | alpha-subunit of nitrate reductase (=narG) | AAB50620 | Pseudomonas fluorescens | Protéine impliquées dans la réduction des nitrates | Métabolisme |
| 8 | phosphoribosylformyl-glycinamidine synthase | YP_346731 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Protéine catalysant la transformation de formylglycinamide ribonucleotide et glutamine en formylglycinamidine ribonucleotide | Synthèse de nucléotides |
| 9 | aconitate hydratase | YP_349124 | Pseudomonas fluorescens PfO-1 | Protéine impliquées dans le cycle de l'acide citrique, catalysant l'hydratation réversible de la cis-aconitate en citrate ou isocitrate | Métabolisme |
| 9 | pyruvate dehydrogenase, E1 component | YP_257653 | Pseudomonas fluorescens Pf5 | Protéine impliquées dans le cycle de l'acide citrique, catalysant la décarboxylation oxydative du pyruvate, pour former l'acétyl-CoA | Métabolisme |
| 9 | alanyl-tRNA synthetase | NP_746585 | Pseudomonas putida KT2440 | Catalyse l'attachement de l'alanine sur l'ARNt | Synthèse d'acide nucléique |
| 9 | NADH dehydrogenase gamma subunit | NP_793153 | Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | Protéine impliquée dans la chaine de transferts d'énergie, catalysant le transfert d'électron de NADH vers la Coenzyme Q | Métabolisme |
| 9 | translation initiation factor IF-2 | NP_794243 | Pseudomonas syringae pv. tomato str. DC3000 | Protéine impliquées dans la synthèse des protéines sur les ribosomes | Synthèse protéique |
| 10 | 90kDa heat shock protein | AAA36025 | Homo sapiens | Protéine chaperonne exprimée en cas de forte température ou de stress | Chaperonne |

Au total, onze protéines ont été identifiées par une fragmentation peptidique sur un spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF, après une interrogation des bases de donnée NCBInr et EST_others. Pour chaque bande prélevée, des fragmentations peptidiques ont été effectuées sur de nombreux pics, traduisant une bonne qualité des spectres obtenus en spectrométrie. Mais les résultats obtenus grâce à ces fragmentations peptidiques ne correspondent à aucune protéine présente dans les bases de données NCBInr et EST_others (*c'est à dire,* bandes 2, 3, 4, 5, 6, 11, 12, 13 et 14). Cette étape de faisabilité a permis de valider techniquement la méthode de LC-MS/MS sur ces 4 échantillons, dans la mesure où toutes les bandes ont permis d'obtenir des spectres de qualité satisfaisante. De nouvelles

protéines ont été identifiées, notamment la sous unité alpha de la nitrate réductase et les 'Heat shock protein' (HSP). La sous unité alpha de la nitrate réductase est aussi connue sous le nom de *narG*, et est impliquée dans la réduction des nitrates. Son expression sous les conditions Acétate confirme la consommation des nitrates en présence d'acétate. Les HSP sont des protéines chaperonnes exprimées en cas de stress ou de forte température. Les protéines exprimées ici sont très proches celles d'eucaryotes supérieures, il faut donc être réservé sur cette protéine.

### 7.3 - Conclusion

Cette expérience a mis en avant la différence d'expression protéique d'une communauté bactérienne suivant la source de carbone. En effet, lors de l'ajout d'acétate, les protéines déterminées ne laissent aucun doute quant à l'utilisation de la voie métabolique de l'acide citrique. En revanche, la faible consommation en présence de glucose et les protéines identifiées supportent l'idée forte d'une action simultanée de compétition et d'inhibition. Ainsi la présence de carbone est indispensable dans le cas d'une dénitrification hétérotrophe mais la nature de la source carbonée est primordiale sur son efficacité.

La continuité de cette étude de manière systématique nécessite de disposer des bases EST correspondant à plusieurs des espèces supposées présentes dans les échantillons. Dans le cas contraire, un nombre important de prédiction de peptides par MS/MS ne pourrait être exploité plus avant. La restriction évoquée ci-dessus s'applique aussi à une étude différentielle par marquage isotopique (ICPL). Ce travail d'analyse différentielle est en cours et devrait bientôt être achevé.

# CONCLUSIONS
# &
# PERSPECTIVES

# Conclusion

Les objectifs de cette thèse étaient de caractériser l'influence **du transfert de l'eau** sur les **processus biochimiques** et la structure des **communautés bactériennes.** Pour ce faire, une approche de terrain couplée à une approche expérimentale a été réalisée et deux types de circulations hydrologiques ont été appréhendés : horizontales et verticales.

(1) Comment les flux horizontaux, à savoir la relation nappe superficielle/rivière, conditionnent l'activité bactérienne et la structure des communautés réduisant les nitrates? Cette étude a été menée dans un milieu de tourbe (les marais du Cotentin et du Bessin) où des transferts horizontaux variables ont été caractérisés entre deux sites différents.

(2) Comment une communauté bactérienne taxonomique et fonctionnelle est-elle structurée dans une zone de battement de nappe ? Cette étude a été menée sur une profondeur de 6 à 15 m sous la surface du sol, ce qui permet de tester l'influence du gradient hydrique sur la communauté bactérienne. Le suivi dans les zones saturées temporairement ou de manière permanente et durant 3 cycles hydrologiques ont permis de tester l'effet de la profondeur et de l'année hydrologique (hautes eaux/basses eaux).

(3) L'étude a été complétée par une expérience en laboratoire visant caractériser l'expression de la communauté native des eaux souterraines face à des modifications environnementales pouvant être assimilées à une pollution. L'originalité de cette expérience réside dans l'approche : la Métaprotéomique.

## Connaissances acquises

1. Les circulations hydrologiques horizontales

Différentes conditions hydrogéologiques du site du marais ont été testées en fonction (1) de la proximité à la rivière qui est connectée de manière plus ou moins importante à la tourbe et introduit dans le milieu des eaux oxygénées et riches en nutriments ; (2) en fonction de l'influence de pression anthropique forte, ici un pompage dans la nappe sous-jacente qui induit de forts transferts horizontaux. Dans cette dernière configuration, les transferts de la rivière vers la nappe sont permanents alors qu'une déconnection nappe/rivière est observée dans le site non influencé durant une partie importante de l'année.

L'analyse de la réactivité et de la diversité bactérienne des échantillons des différents sites soumis à des conditions expérimentales variables ont montré que (1) les paramètres qui

conditionnent l'activité, et la diversité des communauté sont différents en ce qui concerne les bactéries réduisant les nitrates, comme cela a été signalé récemment (Wallenstein *et al.*, 2006) et que (2) la présence des circulations horizontales n'est pas le paramètre majeur qui contrôle l'activité et la distribution des communautés. Ce dernier point a été mis en évidence par une absence de différence entre les tourbes prélevées en proximité et à distance de la rivière (partie III et IV). Les communautés issues de sites non influencées ont été plus perturbées lors des expériences que celles du site sous l'influence de pression anthropique forte. Ce ne sont pas les circulations en elle même qui induisent les différences de communautés mais bien plus les modifications des caractéristiques chimiques et physiques des tourbes, caractéristiques issues des modifications de circulations hydrologiques. L'absence de déconnection sur un site et sa répétition sur l'autre semble le paramètre qui gouverne la structuration et l'activité des communautés bactériennes.

*1.1-Réactivité*

L'analyse expérimentale de la réactivité des différents prélèvements de tourbe dans des conditions expérimentales variables montre que :

(1) Suivant le lieu de prélèvement de tourbe, l'activité biologique répond différemment face aux conditions expérimentales ;
(2) la totalité des nitrates présents dans le milieu est réduite en anaérobiose ;
(3) les conditions d'oxygénation imposent des conditions redox ne permettant pas la réduction des sulfates.

La réduction des nitrates est liée à une dénitrification hétérotrophe et non pas autotrophe comme pouvaient le laisser suggérer les fortes concentrations en sulfates observées sur le terrain. Ainsi l'augmentation des teneurs en sulfate au cours des expériences apparaît principalement liée au relargage de l'eau porale enrichie en sulfate à travers les interactions. Cette dernière production de sulfates est imputée à i) un processus chimique de déstabilisation de la phase minérale et ii) un processus biologique de minéralisation de la tourbe.

Ces différences nous ont permis de conclure que des conditions hydrogéologiques différentes permettent le développement d'écosystèmes spécifiques, et que les conditions d'oxygénation sont primordiales en terme de réduction des nitrates.

*1.2-Communauté bactérienne*

Les résultats obtenus au cours des expérimentations en conditions variables des échantillons des différents sites de tourbe ont permis d'établir l'ordre d'importance des différents facteurs

suivant sur la structure de la communauté : (1) le site de prélèvement, (2) l'impact temporel au cours des expériences, et dans une moindre mesure, (3) les conditions d'oxygénation. En revanche, l'ajout de nitrate et la distance à la rivière ne jouent pas sur les structures de communautés.

Les échantillons issus des sites sous des conditions hydrogéologiques distinctes montrent une diversité légèrement différente en début d'expérience, qui est amplifiée au cours de l'expérience. Les communautés issues du site non influencé sont plus perturbées par les expériences que celles du site sous l'influence de pression anthropique forte (ici un pompage dans la nappe sous-jacente qui induit de forts transferts horizontaux). Le temps induit une structuration de la communauté au cours de l'expérience, liée à la re-saturation du système. La modification des conditions hydrologiques liée à la pression anthropique a induit des caractéristiques physiques et chimiques au sein des tourbes pouvant expliquer la structuration des communautés.

L'alternance des flux hydrologiques suivant les périodes de hautes et basses eaux, implique une faible réactivité et une instabilité forte en termes de communauté. Le pompage dans la nappe sous jacente modifie les circulations initiales, et génère une connexion permanente entre la rivière et la zone de marais. Cette circulation permanente implique des caractéristiques chimiques et physiques qui structurent différemment les communautés. Les modifications induites par la pression anthropique conduisent à une meilleure réponse du système et un accroissement du taux de dégradation de la matière organique par une réduction totale des nitrates et une déstabilisation de la phase minérale par la production de sulfates. Une augmentation de l'aération après un drainage augmente l'activité des décomposeurs organiques et ainsi favorise la disparition de la matière organique. L'influence des sites de prélèvement, à conditions physico-chimiques variables, indique que le transfert physique joue également un rôle dans la structuration des communautés.

2. Les circulations hydrologiques verticales

Les analyses de diversité réalisées sur les gènes de l'ARNr 16S et *narG* ont révélé des résultats cohérents avec les analyses chimiques et avec la nature et la rapidité des écoulements. Les résultats majeurs qui ont été obtenus sont : (1) la présence d'une flore microbienne diversifiée et originale, (2) l'influence de la profondeur sur la structure d'une communauté, avec une différence forte entre la zone de battement de nappe et la zone à saturation permanente, et (3) l'influence temporelle qui se joue à 2 niveaux : sur le long terme

avec une évolution des communautés sur l'ensemble des échantillonnages et sur le court terme avec un conditionnement liée aux périodes de basses eaux et de hautes eaux.
Les communautés bactériennes sont plus affectées par les paramètres physiques que par les paramètres chimiques. Durant la période de recharge, différents compartiments sont mobilisés : dans un premiers temps la porosité mobile qui permet le transport de solutés par advection, puis la porosité immobile qui permet un échange diffusif entre l'eau matricielle et l'eau de la nappe. Cet échange libère ainsi des bactéries par chémotaxie. Proche de la surface dans la zone de battement de la nappe, les bactéries sont régulièrement soumises à un stress hydrique et nutritif ce qui nécessite une adaptation et une spéciation. En profondeur dans la zone saturée en permanence, la stabilité chimique et hydrologique permet le développement d'une communauté plus diversifiée. Cette communauté montre des variations sur le long terme liées aux fluctuations inter cycles hydrologiques, et des variations sur le court terme liées aux apports verticaux depuis la zone de battement de la nappe.

Bilan global sur l'hydrologie

Si l'on compare les sites étudiés en terme de stabilité, sans tenir compte du gène et du milieu étudié, on se rend compte que des conditions stables créent, comme l'a supposé Torsvik (2000), une diversité importante, bien adaptée qui change peu, même lorsque le milieu est perturbé (Fig.VII-1). Ce type de milieu peut être caractérisé par le milieu saturé en permanence pour le site de Kerrien et le marais connecté en permanence à la rivière pour le site de Carentan. A l'inverse, les sites soumis à des conditions fluctuantes montrent une variabilité chimique plus intense et des espèces plus spécifiques. Les environnements instables semblent induire une réponse plus rapide du système en terme de communauté lors d'une modification du milieu.

Dans les milieux à faibles teneurs en carbone et avec une chimie stable, les circulations hydrologiques sont le facteur qui semble conditionner les structures de communauté de manière importante, indépendamment des apports de nutriments.

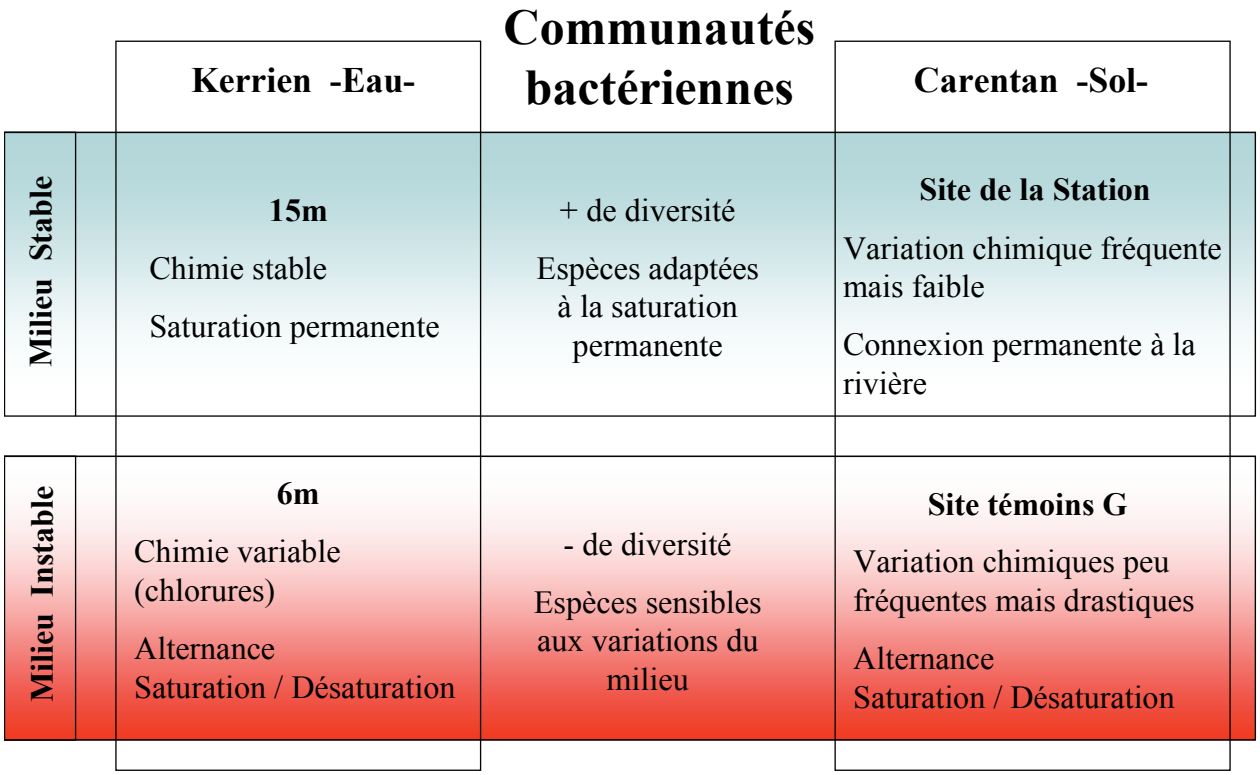



**Figure VII-1 : figure bilan**

3. La Protéomique

Les protéomes des cellules exposées au glucose ou à l'acétate sont très différents. Les différences fortes dans l'utilisation de la source carbone laissent suggérer que la réponse du système à une pollution sera différente suivant la source de carbone disponible, ce qui peut être nuisible pour le milieu si la pollution ne peut pas être naturellement réduite. La présence de carbone est essentielle en termes d'activité dans le milieu étudié puisque la concentration en carbone y est limitante. Mais la nature de celui est d'autant plus importante pour une réduction efficace des nitrates. De fait, ce carbone a une incidence directe sur la structure de communauté ; en effet, suivant la nature du carbone, le milieu réagit différemment. La présence de forte teneur en nitrates (> 70mg/L) est liée à l'absence de carbone organique en quantité suffisante, ce qui diminue l'activité microbienne. Les bactéries réduisant les nitrates dans ce milieu sont hétérotrophes. Pour pallier l'absence de carbone, les bactéries sur le site expérimental de Kerrien doivent utiliser des stratégies de vie leur permettant de vivre ou survivre en consommant le minimum d'énergie. Elles pourraient ainsi être en état de vie ralentie, utiliser les acides aminés libres comme source carbonée pour le développement et la

croissance, voir même être impliquées dans une boucle microbienne. Sur les génomes initialement présents dans le milieu naturel, seuls certains sont favorisés lors de l'ajout d'acétate ou de glucose, microorganismes qui ne sont pas les mêmes suivant la source de carbone (Annexe II). L'analyse différentielle est en cours de réalisation et les premiers résultats sont encourageants.

Ainsi cette étude a permis de confirmer l'importance de facteurs physiques comme les circulations hydrologiques sur les communautés bactériennes en agissant soit directement sur la structure des communautés soit indirectement par la distribution de ressources (Fig.VII-2). Ainsi en contrôlant la disponibilité en ressource nutritive, l'hydrologie conditionne la structuration des communautés, en favorisant la survie et l'adaptation de certaines espèces aux dépends d'autres. Les circulations hydrologiques permettent le déplacement de certains organismes, et ainsi l'introduction de nouvelles espèces dans des milieux encore non colonisés. L'hétérogénéité des transferts hydrologiques semble induire la création d'habitats spécifiques avec des espèces adaptées. En effet la modification de circulations hydrologiques peut ainsi provoquer de nouvelles arrivées d'espèces dans les milieu à population endémique et ainsi modifier l'équilibre établi et potentiellement le fonctionnement de la niche écologique. L'interaction chimie/hydrologie/bactéries est ainsi relativement forte et la modification d'un des maillons aura un impact sur l'ensemble du système.
Un certains nombre de questions restent encore cependant en suspend, ce qui permet aussi d'ouvrir un grand nombre de perspectives de travail.

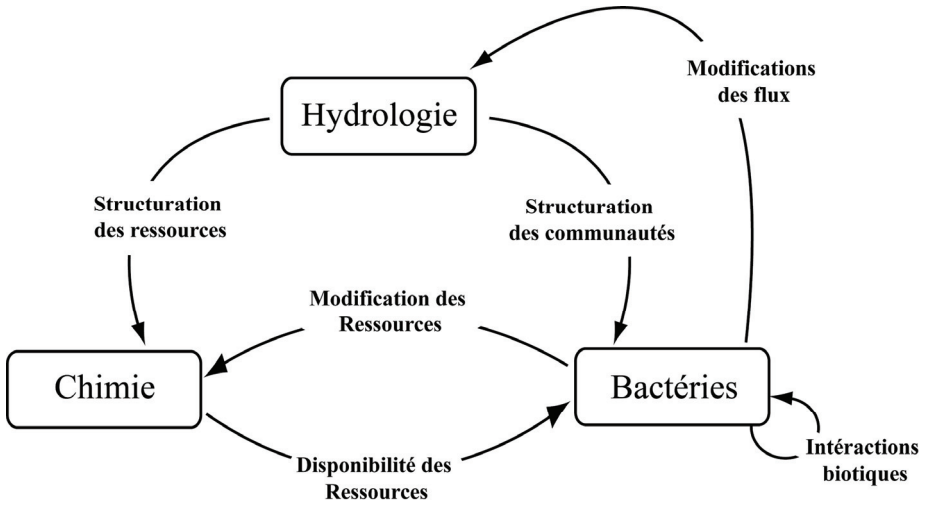



**Figure VII-2 : Schéma synthétisant les relations existantes entre les facteurs physiques, chimiques et biologiques.**

## Perspectives & Applications possibles

L'étude réalisée dans le cadre de la thèse de Chrystelle Auterives a préconisé des mesures compensatoires visant à limiter les alternances saturation/désaturation et le maintien de conditions réductrices par le biais de submersions forcées au cours de l'hiver. Dans notre étude nous avons reproduit en laboratoire les réactions observées sur le site d'étude, et montré une différence d'activité et de communauté microbienne entre le site influencé anthropiquement par la station de pompage et le site témoin. Nous n'avons cependant pas caractérisé la cinétique des réactions et la sensibilité aux variations répétées de circulations hydrologiques. Cette caractérisation sera effectuée dans le cadre d'un projet mutuel du CAREN et du Parc Naturel Régional du Cotentin et du Bessin. Dans ce projet, l'effet et le rôle des mesures compensatoires sur les communautés microbiennes seront aussi abordés. L'alternance de phase d'inondation et d'assèchement entraîne des pics d'éléments, qui modifient l'activité microbienne et les émissions de gaz dans l'atmosphère. En effet une dénitrification incomplète peut induire la libération de gaz à effet de serre de type NOx. Ces pics sont particulièrement importants à l'échelle du microsite mais se répercutent aussi à l'échelle de la station. Les études menées en laboratoire donnent une image du potentiel réactif de la tourbière, mais l'hétérogénéité des flux hydrologiques et de la structure de la tourbe rencontrée sur le terrain peut donner un résultat différent de celui observé en laboratoire. Il est ainsi important de mener de front une étude de terrain et une étude expérimentale, pour éviter tout biais expérimental.

La caractérisation des communautés microbiennes réalisée au cours de cette étude s'est focalisée sur 6 prélèvements de sol. Pour pouvoir généraliser les observations, une étude plus globale à l'échelle du site doit être effectuée. Nous n'avons pas mis en évidence l'influence de la distance à la rivière sur les communautés. Cela peut être néanmoins un biais lié au prélèvement ou à l'outil moléculaire choisi. Ainsi il serait intéressant d'imaginer un plan d'expérience plus puissant, en effectuant par exemple un ensemble de prélèvement le long transept horizontal depuis la rivière vers l'intérieur du marais pour confirmer ou non cette observation et éventuellement de produire d'avantage de données de séquences. Cela est désormais possible avec la robotisation du laboratoire de génomique environnementale qui permet des analyses haut débit.

Les résultats obtenus sur le site expérimental de Kerrien nécessitent également d'être plus approfondis, notamment par une caractérisation à l'échelle du site. Nous n'avons travaillé que sur un groupement de piézomètres. Hors un ensemble de dispositifs en flûte de pan a été mis en place sur le bassin versant de Kerrien. Une analyse globale permettrait de cartographier spatialement l'ensemble de la communauté bactérienne et de réaliser une évolution temporelle des communautés suivant les variations hydrologiques et de vérifier que les variations temporelles de composition de communautés entre la zone de fluctuation de nappe et la zone saturée en permanence ne sont pas simplement un effet de site. Une analyse de diversité à faible résolution peut être réalisée dans un premier temps par un comptage bactérien par une analyse de nombre le plus probable (NPP) ou de cytométrie de flux. Cela serait complété par une analyse d'ARNr 16S de polymorphisme de fragment de restriction (T-RFLP) car elle permet de rendre compte rapidement de la composition de la communauté et de comparer avec les résultats acquis au cours de cette étude. De plus, pour tester l'hypothèse de diffusion moléculaire mise en avant pour expliquer les différences de communautés bactériennes entre le milieu à saturation variable et le milieu stable, il faudrait envisager une expérience en laboratoire comme celle réalisée dans le cadre de la thèse de Cédric Legout (Legout, 2006). Les conditions de saturation/désaturation sont simulées dans une colonne remplie de granite altéré (c'est-à-dire le substrat présent sur le site expérimentale de Kerrien) où le niveau de l'eau dans la colonne est contrôlé. Dans le cadre de la thèse de Cédric Legout un traçage au chlore a été effectué pour déterminer le chemin de l'eau dans la zone de battement de nappe. Cette expérience pourrait ainsi être utilisée pour tracer le déplacement des communautés bactériennes.

Le manque de connaissances actuel dans les bases de données ne nous a pas permis d'aller aussi loin que nous l'aurions souhaité dans les expériences de protéomique. En effet en dépit de signatures peptidiques idéales, plus de la moitié des protéines analysées n'ont pas été identifiées. Pour pouvoir développer plus avant cette étude, il pourrait être utile d'acquérir des données de métatranscriptome ou de métagénome comme un outil pour la métaprotéomique. Combinée à une approche de génomique et/ou de transcriptomique, l'analyse du Métaprotéome permettra ainsi de préciser les voies métaboliques nécessaires à l'assimilation du carbone par les micro-organismes dénitrifiants. Pour comprendre un système bactérien à une échelle locale il est important de comprendre la méta-communauté à partir de laquelle il est issu. Pour cela, la détermination du génome par une approche de Métagénomique permettra de définir plus précisément les gènes impliqués dans l'adaptation aux conditions de

milieu. Cette approche pourrait être réalisée par pyroséquençage *de novo* sans nécessairement accéder à un niveau de couverture élevé (Edwards *et al.*, 2006). Pourquoi proposer une méthode de novo ? Celle-ci comporte l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance au préalable du génome et est applicable à tous les organismes vivant (par exemple : Margulies *et al.*, 2005 ; Leininger *et al.*, 2006) et même fossiles (par exemple : Green *et al.*, 2006 ; Poinar *et al.*, 2006). L'avantage du pyroséquençage par rapport à la méthode classique de Sanger est la rapidité de l'analyse et l'affranchissement de l'étape de clonage et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. De plus cette méthode de séquençage de masses est applicable dans la détermination rapide et en profondeur d'un grand nombre de bactéries, levures et virus par des analyses d'amplicons (par exemple : Sogin et *al.*, 2006 ; Roesch *et al.*, 2007).
A la différence du génome, l'étude du transcriptome permet de rendre compte plus facilement des voies métaboliques exprimées. La technique de pyroséquençage pourra aussi être employée pour séquencer de façon directe l'ARN (par exemple : Nielsen *et al.*, 2006 ;Weber *et al.*, 2007).

A plus ou moins long terme, les différentes approches employées pour l'étude du fonctionnement de l'interface sol-nappe pourraient permettre le traitement *in situ* des nappes phréatiques riches en nitrates, en stimulant de façon raisonnée l'activité des communautés bactériennes grâce à des apports adéquats en molécules carbonées. Cependant toute application i*n situ* nécessite de tester en laboratoire l'effet de l'ajout de molécule carbonée sur la réactivité du milieu. Nous avons vu que la réduction des nitrates par l'ajout d'acétate provoquait une modification de pH du milieu. Néanmoins, il est nécessaire de tester à une échelle expérimentale l'impact écologique d'un tel traitement pour évaluer l'applicabilité d'une telle stratégie. En effet, l'acétate peut complexer les métaux présents dans l'environnement (Pourret *et al.*, 2006). Le propionate et le butyrate sont des molécules connues aussi pour favoriser la dégradation des nitrates dans le sol (Paul *et al.*, 1989), mais tout comme l'acétate elle peuvent complexer les métaux. Ainsi les métaux sont séquestrés sous forme de complexes stables faiblement mobiles. Mais la dégradation de la matière organique par les microorganismes rend les métaux ainsi biodisponibles. Pour cela, il serait intéressant de mener une expérience sur le même type de colonne citée précédemment pour tester l'influence de l'apport d'acétate dans le milieu, en effectuant un suivi chimique et transcriptomique.

# BIBLIOGRAPHIE

**A**

Abu-Ashour J., Joy D.M., Lee H., Whiteley H.R. and Zelin S. (1994) Transport of microorganisms through soil. Water Air and Soil Pollution, 75: 141-158

Abu-Ashour J., Joy D.M., Lee H., Whiteley H.R. and Zelin S. (1998) Movements of bacteria in unsaturated soil columns with macropores. Transactions of the ASAE, 1998 - asae.frymulti.com

Adamczyk M., Dolowy P., Jonczyk M., Thomas C. M and Jagura-Burdzy G. (2006) The kfrA gene is the first in a tricistronic operon required for survival of IncP-1 plasmid R751. Microbiology, 152: 1621–1637

Aelion C.M. and Bradley P.M. (1991) Aerobic biodegradation potential of subsurface microorganisms from a jet-fuel-contaminated aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 57 : 57–63

AFNOR (1997) Qualité de l'Eau, Méthodes d'Analyses 2, Elément Majeurs; Autres Eléments et Composés Minéraux, Association Française de Normalisation, Paris

Ahn I.S. and Lee C.H. (2003) Kinetic studies of attachment and detachment of microbial cells from soil. Environmental Technology 24:411–418

Aicher L., Wahl D., Arce A., Grenet O. and Steiner S. (1998) New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. Electrophoresis, 19**:** 1998–2003

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M. Roberts K. and Watson J.D. (1994) Molecular Biology of the Cell, 3rd ed, Garland, New York, USA

Alfreider A. and Vogt C. (2007) Bacterial diversity and aerobic biodegradation potential in a BTEX-contaminated aquifer. Water Air and Soil Pollution 183: 415-426

Allen E.E. and Banfield J.F. (2005) Community genomics in microbial ecology and evolution**.** Nature Reviews Microbiology, 3**:**489-498

Allen A R. and Milenic D. (2007) Groundwater vulnerability assessment of the Cork Harbour area, SW Ireland. Environmental Geology, 53: 485-492

Altschul, S.F.*et al.* (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25: 3389-3402

Andersen G.R., Nissen P. and Nyborg J. (2003) Elongation factors in protein biosynthesis. Trends in Biochemical Sciences, 28: 434-41 [PubMed: 12932732]

Andersen G.R. and Nyborg J. (2001) Structural studies of eukaryotic elongation factors. Cold Spring Harb. Symposium on Quantitative Biology, 66: 425-37 [PubMed: 12762045]

Arnon S., Ronen Z., Adar E., Yakirevich A. and Nativ R. (2005) Two-dimensional distribution of microbial activity and flow patterns within naturally fractured chalk. Journal of contaminant hydrology, 19:165-186

Atlas R.M., and Bartha R. (1993) Microbial ecology—Fundamentals and applications. 3rd ed. Benjamin/Cummings, Redwood City, CA

Auterives C. (2007) Influence des flux d'eau souterraine entre une zone humide superficielle et un aquifère profond sur le fonctionnement hydrochimiques des tourbières : exemple des marais

du Cotentin, Basse-Normandie. Mémoire de thèse CAREN, Université de Rennes I, Rennes, 261pp

Auterives C., Aquilina L, Bour O., Davranche M. and Paquereau V. Hydrological budget of a peatland related to the discharge of a regional aquifer. Submitted to

Ayraud V. (2006) Détermination du temps de résidence des eaux souterraines : application au transfert d'azote dans les aquifères fracturés dans les aquifères hétérogènes. Mémoire de thèse CAREN , Université de Rennes I, Rennes, 297pp

Ayraud V., Aquilina L., Pauwels H., Labasque T., Pierson-Wickmann A.C., Aquilina A.M. and Gallat G. (2006) Physical, biogeochemical and isotopic processes related to heterogeneity of a shallow crystalline rock aquifer. Biogeochemistry, 81:331-347

**B**

Baker B. J., Tyson G. W., Webb R. I., Flanagan J., Hugenholtz P., Allen Eric E., and Banfield J. F. (2006) Lineages of Acidophilic Archaea Revealed by Community Genomic Analysis. Science, 314: 1933-1935. [DOI: 0.1126/science.1132690]

Baldauf S. L., Bhattacharya D., Cockrill J., Hugenholtz P., Pawlowski J. and Simpson A.G.B. (2004) *The Tree of Life: An Overview,* Chapter 4 in *Assembling the Tree of Life.* Eds. Cracraft and Donoghue, Oxford University Press, USA

Balkwill D.L., Murphy E.M., Fair D.M., Ringelberg D.B. and White D.C. (1998) Microbial communities in high and low recharge environments: implications for microbial transport in the vadose zone. Microbial Ecology, 35: 156-171

Ball D.F. (1964) Loss-on-ignition as an estimate of organic matter and organic carbon in non-calcareous soils. J. Soil Sci 15:84-92

Banton O. and Bangoy L.M. (1999) Hydrogéologie : multisciences environnementales des eaux souterraines, pp 460, Presse de l'Université du Québec, Québec

Barnard R., Leadley P.W. and Hungate B. A. (2005) Global change, nitrification and denitrification : a review. Global Biogeochemical Cycles, 19: GB1007 [doi: 10.1029 / 2004GB002282]

Barry D. A., Prommer H., Miller C. T., Engesgaard P., Brun A. and Zheng C. (2002). Modelling the fate of oxidisable organic contaminants in groundwater. Advances in Water Resources, 25: 945-983**.**

Beare M.H., Coleman D.C., Crossley D.A. Jr, Hendrix P.F. and Odum E.P. (1995) A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. Plant Soil 170: 5–22

Beauchamp E.G., Trevors J.T. and Paul J.W. (1989) Carbon sources for bacterial denitrification. Advances in Soil Sciences 10:113-142

Béhennec F., Hallégouët B. and Thiéblemont D. (1999) Carte Géologique de la France au 1/50000, avec la collaboration de C. Guerrot, A. Cocherie, A. Carn

Béjà O., Aravind L., Koonin E.V., Suzuki M.T., Hadd A., Nguyen L.P.,. Jovanovich S.B, Gates C.M., Feldman R.A., Spudich J.L., Spudich E.N. and DeLong E.F. (2000) Bacterial Rhodopsin: Evidence for a New Type of Phototrophy in the Sea. Science, 289: 1902 - 1906

Bell T., Newman J. A., Silverman B. W., Turner S. L. and Lilley A. K. (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. Nature, 436: 1157–1160

Benndorf D., Balcke G.U., Harms H. and von Bergen M. (2007) Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. The ISME Journal, 1:224-234

Berkowitz B. (2002) Characterizing flow and transport in fractures geological media: A review. Advances in Water Resource, 25:861-884

Bilanovic D., Battistoni P., Cecchi F., Pavan P., and Mata-Alvarez J. (1999) Denitrification under high nitrate concentration and alternating anoxic conditions. Water Resource, 33: 3311 – 3320

Boon N., De Windt W., Verstraete W. and Top E. M. (2002) Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiology Ecology, 39: 101-112

Borneman J. and Triplett E. (1997) Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. Applied and Environmental Microbiology, 63:2647–2653

Bougon N., Aquilina L., Auterives C. and Vandenkoornhuyse P. Influence of hydrological fluxes on bio-geochemical processes in a peatland. Submitted to biogeochemistry

Bowman J.P., McCammon S.A., Brown M.V., Nichols D.S. and McMeekin T.A. (1997) Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. Applied and Environmental biology, 63: 3068-3078

Braker G., Fesefeldt A. and Witzel K.P. (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 64:769–3775

Braker G., Zhou J., Wu L., Devol A. H., and Tiedje J. M. (2000) Nitrite Reductase Genes (*nirK* and *nirS*) as Functional Markers To Investigate Diversity of Denitrifying Bacteria in Pacific Northwest Marine Sediment Communities. Applied and Environmental Microbology, 66: 2096-2104

Buck D., Spencer M. E., and Guest J.R. (1985) Primary Structure of the Succinyl-CoA Synthetase of *Escherichia coli.* Biochemistry, 24: 6245-6252

Buckley, D. and Schmidt, T. (2002) in Biodiversity of Microbial Life, eds. Staley, J. & Reysenbach, A. (Wiley, New York), pp. 183–208

**C**

Cabello P., Roldan M.D. and Moreno-Vivian C. (2004) Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. Microbiology, 150:3527-3546

Cannavo P., Richaume A. and Lafolie F. (2004) Fate of nitrogen and carbone in the vadose zone: in situ and laboratory measurements of seasonal variations in aerobic respiratory and denitrifying activities. Soil Biology and Biochemistry, 36: 463 – 478

Casamayor E.O., Massana R., Benlloch S., Øvreås L., Díez B., Goddard V. J., Gasol J. M., Joint I., Rodríguez-Valera F. and Pedrós-Alió C. (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. Environmental Microbiology, 4: 338–348

Cash P. (2000) Proteomics in medical microbiology. Electrophoresis, 21:1187–1201

Castegna A., Thongboonkerd V., Klein J.B., Lynn B., Markesbery W.R. and Butterfield D.A. (2003) Proteomic identification of nitrated proteins in Alzheimer's disease brain. Journal of Neurochemistry, 85: 1394–1401

Cavigelli M.A. and Robertson G.P. (2000) The functional significance of denitrifier community composition in a terrestrial ecosystem. Ecology, 81: 1402–1414

Chakravarti D. N., Gallagher S. and Chakravarti B. (2004) Difference Gel Electrophoresis: Application in Quantitative Proteomics. Current Proteomics, 1: 261-271

Chantraine J., Autran A. and Cavelier C. (1996) Carte Géologique de la France au millionième, BRGM, Orléans

Chapelle F.H. (2001) Ground-water microbiology and geochemistry. NewYork, John Wiley and sons

Chapelle F.H., Zelibor J.L., Grimes D.J. and Knobel L.L. (1987) Bacteria in deep coastal plain sediments of Maryland: a possible source of $CO_2$ to ground water. Water Resources Research, 23: 1625-1632

Chapman S.J. and Davidson M.S. (2001) $^{35}$S-Sulphate reduction and transformation in peat. Soil Biology and Biochemistry, 33, 593-602

Chèneby D., Hallet S., Mondon M., Martin-Laurent F., Germon J. C. and Philippot L. (2003) Genetic Characterization of the Nitrate Reducing Community Based on *narG* Nucleotide Sequence Analysis. Microbial Ecology, 6:113-121

Chidthaisong A. and Conrad R. (2000) Turnover of glucose and acetate coupled to reduction of nitrate, ferric iron and sulphate and to methanogenesis in anoxic rice field soil. FEMS Microbiology Ecology, 31:73-86

Clegg C.D., Ritz K. and Griffiths B.S. (2000) %G+C profiling and cross hybridisation of microbial DNA reveals great variation in below-ground community structure in UK upland grasslands. Applied Soil Ecology, 14: 125-134

Clement B. G., Kehl L. E., DeBord K. L. and Kitts C. L. (1998) Terminal restriction fragment pattern (TRFPs), a rapid PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. Journal of Microbiological Methods, 31: 135-142

Clément J.C., Aquilina L., Bour O., Plaine K., Burt T.P., and Pinay G. (2003) Hydrological flowpaths and nitrate removal rates within a riparian floodplain along a fourth-order stream in Brittany (France). Hydrological Processes, 17: 1177-1195

Clément J.C., Pinay G. and Marmonier P. (2002) Seasonal dynamics of denitrification along topohydrosequences in three different riparian wetlands. Journal of Environmental Quality, 31: 1025–1037

Clymo R.S. (1983) Peat. In: Mires :swamp, bog, fen and moor. Ecosystems of the world, 4A. A.J. Gore, editor. Elsevier Scientific Publishing. New York. New York. USA, 159-224

Colwell R.K. (2005) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 7.5. User's Guide and application published at: http://purl.oclc.org/estimates.

Conrad R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases ($H_2$, CO, $CH_4$, OCS, $N_2O$ and NO). Microbiological Reviews, 60:609-640

Correl D.L. (1997) Buffer zones and water quality protection: General principles. In: Naycock, N.E., Burt, T.P., Goulding, K.W., Pinay, G. (Eds.), Buffer Zones: Their Processes and Potential in Water Protection. Quest Environment, Hertfordshire, pp. 7–20

Courchesne F. (1991) Electrolyte concentration and composition effects on sulphate sorption by two spodosols. Soil Science Society of America Journal, 55: 1576-1581

Couvet M. (2004) Décryptage systématique des cellules souches chez le rat: identification de nouvelles protéines. Mémoire de DESS, Université des Sciences et Technologies de Lille

Crosbie N.D., Teubner K. and Weisse T. (2003) Flow-cytometric mapping provides novel insights into the seasonal and vertical distributions of freshwater autotrophic picoplankton. Aquatic Microbial Ecology, 33:53-66

Curtin D. and Syers J.K. (1990) Extractability and adsorption of sulphate in soils. Journal of Soil Sciences, 41: 305–312

Curtis P.S., Balduman L.M., Drake B.G. and Whigham D.F. (1990) Elevated atmospheric CO2 effects on belowground processes in C3 and C4 estuarine marsh communities. Ecology, 71: 2001-2006

**D**

Dahllöf I. (2002) Molecular community analysis of microbial diversity. Current Opinion in Biotechnology, 13:213–217

Darlu P. and Tassy P. (1993) Reconstruction phylogénétique: concepts et méthodes. Collection Biologie Théorique, Masson, Paris: 245 pp

Dassonville F. and Renault P. (2002) Interactions between microbial processes and geochemical transformations under anaerobic conditions: a review. Agronomie 22: 51–68

Datta D.B., Arden B., and Henning H. (1977) Major Proteins of the Escherichia coli Outer Cell Envelope Membrane as Bacteriophage Receptors. Journal of bacteriology, 131:821-829

Davies J.K. and Reeves P. (1975) Genetics of Resistance to Colicins in Escherichia coli K-12:Cross-Resistance among Colicins of Group A. Journal of bacteriology, 123: 102-117

DeLong E.F. (1992) Archaea in costal marine environments. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 89: 5685-5689

DeLong E.F., Wu K.Y., Prezelin B.B. and Jovine R.V.M. (1994) High abundance of Archaea in Antartic marine picoplankton. Nature, 371: 695-697

DeLong E. F., Preston C.M., Mincer T., Rich V., Hallam S.J., Frigaard N-U, Martinez A., Sullivan M.B., Edwards R., Rodriguez Brito B., Chisholm S.W. and Karl D.M. (2006) Community

Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. Science,311: 96-503

De Marsily G. (1994) Hydrogéologie : Comprendre et estimer les écoulements souterrains et le transport de polluants. Paris, Ecole des Mines de Paris

Demoling F., Figueroa D. and Bååth E. (2007) Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils. Soil biology and biochemistry, 39: 2485–2495

Denaro R., D'Auria G., Di Marco G., Genovese M., Troussellier M., Yakimov M.M. and Giuliano L. (2005) Assessing terminal restriction fragment length polymorphism suitability for the description of bacterial community structure and dynamics in hydrocarbon-polluted marine environments. Environmental Microbiology 7 :8–87

Derby N. and Knighton R. (2001) Field-scale preferential transport of water and chloride tracer by depression-focused recharge. Journal of Environmental Quality, 30:194–199

Devito K.J. (1995) Sulphate mass balances of Precambrian Shield wetlands: The influence of catchment hydrogeology. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52: 1750–1760

Devito K.J., Hill A.R. and Roulet N. (1996) Groundwater-surface water interactions in headwater forested wetlands of the Canadian Shield. Journal of Hydrology, 181: 127-147

Devito K.J., Waddington J.M. and Branfireun B.A (1997) Flow reversals in peatlands influenced by local groundwater systems. Hydrological Processes, 11 :103-110

Devito K.J. and Hill A.R. (1999) Sulphate Mobilization and Pore Water Chemistry in Relation of Groundwater Hydrology and Summer Drought in two Conifer Swamps on the Canadian Shield. Water Air Soil Poll 113: 97-114

Devol A.H. (2003) Nitrogen cycle-solution to a marine mystery. Nature, 422:975-976

Dodd J.C., Boddington C.L., Rodriguez A., Gonzalez-Chavez C. and Mansur I. (2000). Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. Plant Soil, 226: 131–151

Dommergues Y. and Mangenot F. (1970) Ecologie microbienne du sol. Masson éditeur, Paris

Dunbar J., Ticknor L.O. and Kuske C.R. (2000) Assessment of microbial diversity in two southwestern U.S. soils by terminal restriction fragment analysis. Applied and Environmental Microbiology, 66:2943-2950

Dunn A.M., Silliman S.E, Dhamwichukorn S. and Kulpa C.F. (2005) Demonstration of microbial transport into the capillary fringe via advection from below the water table. Journal of Hydrology, 306: 50-58

**E**

Edwards R.A., Rodriguez-Brito B., Wegley L., Haynes M., Breitbart M., Peterson D.M., Saar M.O., Alexander S., Alexander Jr E.C. and Rohwer F. (2006) Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. BMC Genomics, 7:57-70

Eimers M.C., Dillon P.J., Schiff S.L. and Jeffries D.S. (2003) The effects of drying and re-wetting and increased temperature on sulphate release from upland and wetland material. Soil Biology and Biochemistry, 35: 1663-1673

Enwall K., Philippot L., and Hallin S. (2005) Activity and Composition of the Denitrifying Bacterial Community Respond Differently to Long-Term Fertilization. Applied and Environmental Microbiology, 71:8335-8343

**F**

Farris J.S. (1970) Methods for computing Wagner trees. Systematic Zoology, 19: 83-92

Fenchel T. and Finlay B.J. (2004) The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. BioScience, 54: 777-784

Fenner N., Freeman C. and Reynolds B. (2005) Hydrological effects on the diversity of phenolic degrading bacteria in a peatland: implications for carbon cycling. Soil Biology and Biochemistry 37: 1277-1287

Ferris M.J., Muyzer G. and Ward D.M. (1996) Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiles of 16S rRNA-Defined Populations Inhabiting a Hot Spring Microbial Mat Community. Applied and Environmental Microbiology, 62: 340–346

Fierer N, Schimel J.P., Holden P.A. (2003) Influence of drying– rewetting frequency on soil bacterial community structure. Microbial Ecology45: 63–71

Fierer N., Schimel J.P. and Holden P.A. (2003) Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. Soil Biology and Biochemistry, 35:167-176

Fierer N. and Jackson R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. Proceedings of the National Academy of Sciences U S A, 103: 626–631

Filion M., St-Arnaud M. and Fortin J.A. (1999) Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus Glomus intraradices and different rhizosphere microorganisms. New Phytologist, 141: 525–533

Firestone M.K., firestone R.B. and Tiedje J.M. (1980) Nitrous oxide from soil denitrification: factor controlling its biological production. Science, 208:749-751

Fisk M.C., Ruether K.F. and Yavitt J.B. (2003) Microbial activity and functional composition among northern peatland ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 35: 591 – 602

Flanagan D.A., Gregory L.G., Carter J.P., Karakas-Sen A., Richardson D.J. and Spiro S. (1999) Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. FEMS Microbiology Letter, 177: 263–270.

Florinsky I.V., McMahon S. and Burton D.L. (2004) Topographic control of soil microbial activity: a case study of denitrifiers. Geoderma, 119: 33 – 53

Flynn R (2003) Virus transport and attenuation in perialpine gravel aquifers. PhD Thesis, University of Neuchâtel, Switzerland, 178 pp

Ford T.E. (2000) Response of marine microbial communities to anthropogenic stress. Journal of Aquatic Ecosystem and Stress Recovery 7: 75–89.

Foucault A. and Raoult J.F. (1995) Dictionnaire de Géologie 4$^{e}$ éd., Masson, Paris

Fox G.E., Pechman K.J. and Woese C.R. (1977) Comparative cataloguing of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to prokaryotic systematics. International Journal of Systematic Bacteriology. 27 : 44–57

Francez A. J. (2000) La dynamique du carbone dans les tourbières à Sphagnum, de la sphaigne à l'effet de serre. Année Biologique, 39: 205-270

Fraser C.J.D., Roulet N.T., and Lafleur M. (2001) Groundwater flows patterns in a large peatland, Journal of Hydrology, 246, 142-154

Freeman C., Ostle N.J., Fenner N. and Kang H. (2004) A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. Soil Biology and Biochemistry 36: 1663-1667

Fretwell B.A., Burgess W.G., Barker J.A. and Jefferies N.L., (2005) Redistribution of contaminants by a fluctuating water table in a micro-porous, double-porosity aquifer: Field observations and model simulations. Journal of Contaminant Hydrology, 78:27-52

Fry N. K., Frederickson J. K., Fishbain S., Wagner M., and Stahl D.A. (1997) Population Structure of Microbial Communities Associated with Two Deep, Anaerobic, Alkaline Aquifers. Applied and Environmental Microbiology, 63: 1498-1504

**G**

Galloway T.S., Sanger R.C., Smith K.L., Fillmann G., Readman J.W., Ford T.E. and Depledge M.H. (2002) Rapid assessment of marine pollution using multiple biomarkers and chemical immunoassays. Environmental Science & Technology, 36: 2219–2226

George E., Marschner H. and Jakobsen I. (1995) Role of arbuscular mycorrhizal fungi in uptake of phosphorous and nitrogen from soil. Critical Reviews in Biotechnology15, 257–270

Ghiorse W.C. and Wilson J.T. (1988) Microbial ecology of the terrestrial subsurface. Advances in applied microbiology, 33:107-72

Gibert J., Danielopol D.L. and Stanford J.A (1994) Groundwater ecology, Academic Press, San Diego, California, USA

Ginn T.R., Wood B.D., Nelson K.E., Scheibe T.D., Murphy E.M. and Clement T.P. (2002) Processes in microbial transport in the natural subsurface. Advanced in Water Resources, 25: 1017-1042

Glatzel S., Basiliko N. and Moore T. (2004) Carbon dioxide and methane production potentials of peats from natural, harvested and restored sites, Eastern Québec, Canada, Wetlands 24 (2004), pp. 261–267

Goldscheider N., Hunkeler D. and Rossi P. (2006) Review: Microbial biocenoses in pristine aquifers and an assessment of investigative methods, Hydrogeology journal, 14: 926-941

Gran G. (1952) Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II, Analyst, 7:661-671

Grayston S.J., Campbell C.D., Bardgett R.D., Mawdsley J.L., Clegg C.D., Ritz K., Griffiths B.S., Rodwell J.S., Edwards S.J., Davies W.J., Elston D J. and Millard P. (2004) Assessing shifts in microbial community structure across a range of grasslands of differing management intensity using CLPP, PLFA and community DNA techniques. Applied Soil Ecology, 25: 63-84

Green J. and Bohannan B.J.M (2006) Spatial scaling of microbial biodiversity. Microbial ecology, 21 : 501-507

Green C.T. and Scow K.M. (2000) Analysis of phospholipid fatty acids (PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. Hydrogeology Journal, 8: 126-141

Green R.E, Krause J., Ptak S.E., Briggs A.W., Ronan M.T., Simons J.F., Du L., Egholm M., Rothberg J.M., Paunovic. M. and Pääbo S. (2006) Analyis of Neanderthal Genomic DNA. Nature, 444:330–336

Gregory L.G., Bond P.L., Richardson D.J. and Spiro S. (2003) Characterization of a nitrate-respiring bacterial community using the nitrate reductase gene (narG) as a functional marker. Microbiology**,** 149: 229-237

Griffiths B.S., Ritz K., Wheatley R., Kuan H.L., Boag B., Christensen S., Ekelund F., Sorensen S.J., Muller S. and Bloem J. (2001) An examination of the biodiversity-ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry, 33: 1713-1722

Grinnell J. (1917) Field tests of theories concerning distributional control, American Naturalist, 51: 115–128

**H**

Haack S.K., Fogarty L.R., West T.G., Alm E.W. McGuire J.T., Long D.T., Hyndman D.W. and Forney L.J. (2004) Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge – influenced chemical gradients in a contaminated aquifer. Environmental Microbiology, 6:438-448

Habig W.H., Pabst M.J. and Jakoby W.B. (1974) Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biology and Chemistry.249 7130-7139 [PMID: 4436300]

Haldeman D.L., Pitonzo B.J., Story S.P. and Amy P.S. (1994) Comparison of the microbiota recovered from surface and deep subsurface rock, water and soil along an elevational gradient. Geomicrobiology Journal, 12: 99–111

Hallin S. and Lindgren P.-E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductases in denitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 65:1652–1657

Hannig M., Braker G., Dippner J. and Jürgens K. (2006) Linking denitrifier community structure and prevalent biogeochemical parameters in the pelagial of the central Baltic Porpe (Baltic Sea). FEMS Microbial Ecology, 57: 260-271

Haria A.H. and Shand P. (2004) Evidence for deep subsurface flow routing in forested upland Wales: implications for contaminant transport and stream flow generation. Hydrology and Earth System Sciences, 8:334-344

Harvey R.W., Kinner N.E., MacDonald D., Metge D.W. and Bunn A. (1993) Role of physical heterogeneity in the interpretation of small-scale laboratory and field observations of bacteria, microbial-sized microsphere, and bromide transport through aquifer sediments. Advances in Water Resources, 29: 2713-2721

Harvey R.W., Smith R.L. and George L. (1984) Effect of organic contamination upon microbial distributions and heterotrophic uptake in a Cape Cod, Mass., Aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 48:1197–1202

Head I.M., Saunders J.R. and Pickup R.W. (1998) Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. Microbial Ecology*,* 35: 1-21

Hedin L.O., von Fischer J.C., Ostrom N.E., Kennedy B.P., Brown M.G. and Robertson G.P. (1998) Thermodynamic constraints on nitrogen transformations and other biogeochemical processes at soil – stream interfaces. Ecology, 79 : 684 – 703

Hénault C., Chéneby D., Heurlier K., Garrido F., Perez S. and Germon J.C. (2001) Laboratory kinetics of soil denitrification are useful to discriminate soils with potentially high levels of N2O. Agronomie 21: 713–723

Hill D.D. and Sleep B.E. (2002) Effects of biofilm growth on flow and transport through a glass parallel plate fracture. Journal of Contaminant Hydrology, 56:227-246

Hill A.R., Devito K.J., Campagnolo S. and Sanmugadas K. (2000) Subsurface denitrification in a forest riparian zone: interactions between hydrology and supplies of nitrate and organic carbon. Biogeochemistry, 51: 193–223

Hill G.T., Mitkowsky N.A., Aldrich-Wolfe L., Emele L.R., Jurkonie D.D., Ficke A., Maldonado-Ramirez S., Lynch S.T. and Nelson E.B. (2000) Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. Applied Soil Ecology, 15: 25-36

Holben W.E., Jansson J.K., Chelm B.K. and Tiedje J.M. (1988) DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. Applied and Environmental Microbiology, 54: 703–711

Holben W.E. (1994) Isolation and purification of bacterial DNA from soil. In: Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties (eds Weaver, R.W.Angle, S.Bottomley, P.D et al.), pp. 727 752. SSSA Book Series no. 5. Madison, WI:Soil Science Society of America.

Holben W.E. and Boone D.R. (1998) Microbial transport, survival, and succession in a sequence of buried sediments. Microbial Ecology, 36: 336-348

Holden P.A. and Fierer N. (2005) Microbial processes in the Vadose Zone. Vadose Zone Journal, 4: 1-21

Holliger C. and Zehnder A.J.B. (1996) Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. Current opinion in microbiology, 7:326-330

Holtan-Hatwig L., Bechman L., Risnes Höyås T., Linjordet R. and Bakken L.R. (2002) Heavy metal tolerance of soil denitrifying communities : $NO_2$ Dynamics. Soil Biology and Biochemistry, 34: 1181-1190

Horlacher R., Xavier K. B., Santos H., Diruggiero J., Kossmann M., and Boos W. (1998) Archaeal Binding Protein-Dependent ABC Transporter: Molecular and Biochemical Analysis of the Trehalose/Maltose Transport System of the Hyperthermophilic Archaeon Thermococcus litoralis. Journal of bacteriology, 180: 680-689

Horz H.-P., Barbrook A., Field C.B. and Bohanna, B.J.M. (2004) Ammonia-oxidizing bacteria respond to multifactorial global change. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 101: 15136–15141.

Huber R. and Hannig M. (2004) The Prokaryotes: An Evolving electronic resource for the Microbiological community. Srinpger-Verlag, New York, LLC

Hudson-Edwards K.A., Shell C. and Mackling M.G. (1999). Mineralogy and Geochemistry of alluvium contaminated by metal mining in the Rio Tinto area, southwest Spain. Applied Geochemistry 14 (1999), pp 1015-1030

Hugenholtz P., Goebel B.M. and Pace N.R. (1998) Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. Journal of bacteriology, 18 : 4765-4774

Hunter-Cevera, J.C. (1998). The value of microbial diversity. Current Opinion of Microbiology, 1: 279–285

Huysman F. and Verstracte W. (1993) Water-facilitated transport of bacteria in unsaturated soil columns: Influence of cell surface hydrophobicity and soil properties. Soil Biology and Biochemistry, 25:83-90

**I**

Ingersoll T.L. and Baker L.A. (1998) Nitrate removal in wetland microcosms. Water Research, 32: 677 – 684

**J**

Jakoby W.B. (1978) The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins.Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, 46:383-383

Jetten M. (2001) New pathways for ammonia conversions in soil and aquatic systems. Plant and Soil, 230:9-19

Johnsen K., Jacobsen C.S., Torsvik V. and Sorensen J. (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils- a review. Biology and Fertility of Soils, 33: 443-453

Johnson D., Vandenkoornhuyse P.J., Leake J.R., Gilbert L., Booth R.E., Grime J.P., Young J.P.W. and Read D.J. (2004) Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. New Phytologist, 161:503–515

Jost L. (2006) Entropy and diversity. Oikos, 113:363–37

**K**

Kaiser K. and Kaupenjohann M. (1998) Influence of the soil composition on retention and release of sulphate in acid forest soils. Water Air and Soil Pollution, 101: 363-376

Kan J., Hanson T.E., Ginter J.M., Wang K., Chen F. (2005) Metaproteomic analysis of Chesapeake Bay microbial communities. Saline Systems, 1:7-19

Keller, M. and Zengler K. (2004) Tapping into microbial diversity. Nature reviews, Microbiology, 2:141-150

Kelso B.H.L., Smith R.V., and Laughlin R.J. (1999) Effects of Carbon Substrates on Nitrite Accumulation in Freshwater Sediments. Applied and environmental microbiology, 65:61-66

Kennedy M.J., Reader S.L. and Swierczynski L.M. (1994) Preservation records of micro-organism : evidence of the tenacity of life. Microbiology (Reading), 140:2513-2529

Kieft T., Murphy E.M., Haldeman D.L., Amy P.S., Bjornstad B.N., Mcdonald E.V., Ringelberg D.B., White D.C., Stair J., Gsell R.P.G.T.C., Kukita, Y., Tahira T., Sommer S.S. and Hayashi K (1997) SSCP Analysis of Long DNA Fragments in Low pH Gel. Human Mutation, 10: 400-407

Kieft T., Murphy E.M., Haldeman D.L., Amy P.S., Bjornstad B.N., Mcdonald E.V., Ringelberg D.B., White D.C., Stair J., Gsell R.P.G.T.C., Holben W.E. and Boone DR. (1998) Microbial

transport, survival, and succession in a sequence of buried sediments. Microbial Ecology, 36: 336-348

Kieft T.L. (1999) Microbial Ecology of the Vadose Zone. Subsurface Microbial Ecology Microbial in Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada

Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H. and Trevors J.T. (2004) Methods of studying soil microbial diversity. Journal of Microbiological Methods 58: 169–188

Kitts C.L. (2001) Terminal restriction fragment patterns: a tool for comparing microbial communities and assessing community dynamics. Current Issues in Intestinal Microbiology, 2:17–25

Kluge G. and Farris J.S. (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. Systematic Zoology, 18: 1-32

Knowles R. (1982) Denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews? 46: 43-70

Konstantinidis K.T., Isaacs N., Fett J., Simpson S., Long D.T., Marsh T.L. (2003) Microbial Diversity and Resistance to Copper in Metal-Contaminated Lake Sediment. Microbial Ecology, 45:191–202

Koonin E.V. (2007) Metagenomic sorcery and the expanding protein universe. Nature Biotechnology, 25:540-542

Krishnamurthy T. and Ross P.L. Rapid Identification of Bacteria by Direct Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Whole Cells. Rapid communications in mass spectrometry, 10: 1992-1996

Krumholtz L.R. (2000) Microbial community in deep surface. Hydrogeology Journal, 8:4-10

Kukita Y., Tahira T., Sommer S.S. and Hayashi K. (1997) SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. Human mutation, 10: 400-407

**L**

Lacerda C.M.R., Choe L.H., and Reardon K.F. (2007) Metaproteomic analysis of a bacterial community response to cadmium exposure. Journal of Proteome Research, 6:1145-1152

Lamar R.T. and Dietrich D.M. (1990). *In-situ* depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by. Phanerochaete Spp. Applied and Environmental Microbiology, 56: 3093–3100

LaMontagne M.G., Schimel J.P. and Holden P.A. (2003) Comparison of subsurface and surface soil bacterial communities in California grassland as assessed by terminal restriction fragment length polymorphisms of PCR-amplified 16S rRNA genes. Microbial Ecology, 46:216-227

Langmuir D. (1997) Aqueous Environmental Geochemistry, Prentice-Hall, Inc., USA

Laperrousaz P., Van den Vos V.and du Guerny S. (1997) Dépollution de l'eau, faut-il dépenser plus? L'évènement du jeudi, 2580:18-20

Lee D., Zo, Y. and Kim, S. (1996) Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-singlestrand-conformation polymorphism. Applied and Environmental Microbiology, 62 :3112-3120.

Legout C. (2006) Etude des mécanismes hydrologiques et biogéochimiques de la recharge des nappes à surface libre. Mémoire de thèse CAREN Université Rennes I, Rennes 180pp.

Legout C., Molenat J., Aquilina L., Gascuel-Odoux C., Faucheux M., Fauvel Y. and Bariac T. (2007) Solute transfer in the unsaturated zone-groundwater continuum of a headwater catchment Journal of Hydrology, 332: 427-441

Legout C., Molenat J., Lebevre S., Marmonier P. and Aquilina L. (2005) Investigation of biogeochemical activities in the soil and unsaturated zone of weathered granite. Biogeochemistry, 75:329-350

Leininger S., Urich T., Schloter M., Schwark L., Qi J., Nicol G.W., Prosser J.I., Schuster S.C. and Schleper C. (2006) Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. Nature, 442:806-809

Lescure C., Menendez L., Lensi R., Chalamet A., and Pidello A. (1992) Effect of addition of various carbon substrates on denitrification in a vertic Mollisol. Biology and Fertility of Soils, 13:125-129

Li B., Loehle C. and Malon D. (1996) Microbial transport through heterogeneous porous media: random walk, fractal, and percolation approaches. Ecological Modelling 85:285–302

Link A.J., Eng J., Schieltz D.M., Carmack E., Mize G.J., Morris D.R., Garvik B.M. and Yates J.R. III. (1999) Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. Nature Biotechnology, 17:676–682.

Liu W., Marsh T.L., Cheng H. and Forney L.J. (1997) Characterization of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. Applied and Environnemental Microbiology, 63: 4516-4522

Ljungdahl L.G. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. Annual Review of Microbiology, 40: 415-450

Lloyd J.R., Klessa D.A., Parry D.L., Buck P. and Brown N.L. (2004) Stimulation of microbial sulphate reduction in a constructed wetland: microbiological and geochemical analysis. Water research, 38: 1822–1830

Loessner M.J., Wendlinger G. and Scherer S. (1995) Heterogeneous endolysins in *Listeria monocytogenes* bacteriophages: a new class of enzymes and evidence for conserved holin genes within the siphoviral lysis cassettes. Molecular Microbiology, 16:1231–1241

López-Gutiérrez J.C., Henry S., Hallet S., Martin-Laurent F., Catroux G. and Philippot L. (2004) Quantification of a novel group of nitrate-reducing bacteria in the environment by real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 57: 399 – 407

Losos J.B. (1996) Phylogenetic perspectives on community ecology. Ecology, 77:1344 – 1354

Lou GQJ and Warman PR (1994) Characterization of ester sulphate in a gypsum-amended podzol using an immobilized sulphatase reactor. Biology and fertility of soils 17: 276 - 280

Lynch J.M., Benedetti A., Insam H., Nuti M.P., Smalla K., Torsvik V. and Nannipieri P. (2004) Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. Biology and fertility of soils 40: 363–385

**M**

MacIntyre S. and Henning U. (1990) The role of the mature part of secretory proteins in translocation across the plasma membrane and in regulation of their synthesis in Escherichia coli. Biochimie, 72:157-167

Madsen E.L. (2000) Nucleic-acid characterization of the identity and activity of subsurface microorganisms, Hydrogeology Journal, 8: 112-125

Magurran A.E. (1988) Ecological diversity and its measurements. Princeton university press, Princeton (New Jersey)

Maidak B.L., Cole, J.R., Parker C.T., Garrity G.M., Larsen N., Li B., Lilburn T.G., McCaughey M.J., Olsen G.J., Overbeek R., Pramanik S., Schmidt T.M., Tiedje J.M. and Woese C.R. (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Research, 27:171-173

Mailloux B.J. and Fuller M.E. (2003) Determination of In Situ Bacterial Growth Rates in Aquifers and Aquifer Sediments. Applied and Environmental Microbiology, 69: 3798–3808

Mandernack K.W., Lynch L., Krouse H.R and Morgan M.D (2000) Sulfur cycling in wetland peat of New Jersey Pinelands and its effect on stream water chemistry. Geochimica et Cosmochimica Acta, 64 : 3949-3964

Margulies M., Egholm M., Altman W.E., Attiya S., Bader J.S., Bemben L.A., Berka J., Braverman M.S., Chen Y.J. and Chen Z. *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437: 376–380

Mariotti A. (1994) Dénitrification in situ dans les eaux souterraines, Processus naturels ou provoqués : une revue, Hydrogéologie, 3, 43-68

Maron P.A., Mougel C., Siblot S., Abbas H., Lemanceau P. and Ranjard L. (2007a) Protein extraction and fingerprinting optimization of bacterial communities in natural environment. Microbial Ecology, 53: 426-434

Maron P.A., Ranjard L., Mougel C. and Lemanceau P. (2007b) Metaproteomics: a new approach for studying functional microbial ecology. Microbial Ecology, 53: 486-493

Marsh T. L. (1999) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Current Opinion in Microbiology, 2:323-327

Martin C. (2003) Mécanismes hydrologiques et hydrochimiques impliqués dans les variations saisonnières des teneurs en nitrate dans les bassins versants agricoles, Thèse, pp. 268, Université de Rennes 1, Rennes

Martin C., Aquilina L., Gascuel-Odoux C., Molénat J., Faucheux M. and Ruiz L. (2004a). Seasonal and inter-annual variations of nitrate and chloride in stream waters related to spatial and temporal patterns of groundwater concentrations in agricultural catchments. Hydrological Processes, 18 :1237–1254

Martin C., Molénat J., Gascuel-Odoux C., Vouillamoz J. M., Robain H., Ruiz L., Faucheux M., and Aquilina L. (2004b). Modelling the effect of physical and chemical characteristics of shallow aquifers on water and nitrate transfer in small agricultural catchments. Submitted to Journal of Hydrology

Martin C., Pierson-Wickmann A.-C., Aquilina L., Ruiz L., Jaffrezic A., and Gascuel-Odoux C. (2004c). High chemical weathering rates in first-order granitic catchments induced by agricultural pressure. Submitted to: Chemical Geology

Martin T.L., Trevors J.T. and Kaushik N.K. (1999) Soil microbial diversity, community structure and denitrification in a temperate riparian zone. Biodivers Conserv 8: 1057 -1078

Martinez-Murcia A.J., Acinas S.G. and Rodriguez-Valera F. (1995) Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. FEMS Microbiology Ecology, 17, 247–255

Martin-Laurent F., Piutti S., Hallet S., Wagschal I., Philippot L., Catroux G. and Soulas G. (2003) Monitoring of atrazine treatment on soil bacterial, fungal and atrazine-degrading communities by quantitative competitive PCR. Pesticid Management Science, 59: 259-268

Martino D.P., Grossman E.L., Ulrich G.A., Burger K.C., Schlichenmeyer J.L., Suflita J.M., and Ammerman J.W. (1998). Microbial abundance and activity in a low conductivity aquifer system in east-central Texas. Microbial Ecology, 35: 224-234

Martiny, J.B.H., Bohannan B., Brown J., Colwell R., Fuhrman J., Green J.,. Horner-Devine M.C, Kane M., Krumins J., Kuske C., Morin P., Naeem S., Øvreås L., Reysenbach A.L., Smith V. and Staley J. (2006) Microbial biogeography: Putting microorganisms on the map. Nature Reviews Microbiology 4: 102-112

Massana R., Balagué V., Guillou L. and Pedrós-Alió C. (2004) Picoeukaryotic diversity in an oligotrophic coastal site studied by molecular and culturing approaches. FEMS Microbiology Ecology, 50:231-243

Maxam A.M. and Gilbert W. (1977) A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74: 560–564

Maynard-Smith J., Smith N.H., O'Rourke M. and Spratt B.G. (1993) How clonal are bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90: 4384-4388

Mayr E. (1963) Animal Species and Evolution, Cambridge, Mass., Belknap Press, Harvard University Press, 797 pp

Mazurek M., Gautschi A., Smith P.A. and Zuidema P. (2000) The role of water-conducting features in the Swiss concept for the disposal of high-level radioactive waste. In: Stober I, Bucher K (eds) Hydrogeology in crystalline rocks. Kluwer Scientific, Dordrecht, pp 105–125

Mc Grady-Steed J., Harris P. M. and Morin P. J. (1997) Biodiversity regulates ecosystem predictability. Nature, 390: 162–165

McClain M.E., Boyer E.W., Dent C.L., Gergel S.E., Grimm N.B., Groffman P.M., Hart S.C., Harvey J.W., Johnston C.A., Mayorga E., McDowell W.H. and Pinay G. (2003) Biogeochemical Hot Spots and Hot Moments at the Interface of Terrestrial and Aquatic Ecosystems. Ecosystems 6: 301–312

McGill W.B. and Cole C.V. (1981) Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma 26: 267–286

McNally D.L., Mihelcic J.R and Lueking D.R. (1998) Biodegradation of three- and four- ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions. Environmental Science and Technology, 32: 2633-2639

McMahon P. (2001) Aquifer/aquitard interfaces:mixing zones that enhance biogeochemical reactions. Hydrogeology Journal, 9:34–43

Melcher K. (2000) A modular set of prokaryotic and eukaryotic expression vectors. Analytical Biochemistry, 277:109–120

Mengoni A., Grassi E., Barzanti R., Biondi E.G., Gonnelli C., Kim C.K. anf Bazzicalupo M. (2004) Genetic diversity of bacterial communities of serpentine soil and of rhizosphere of the nickelhyperaccumulator plant Alyssum bertolonii. Microbial Ecology, 48: 209–217

Mengoni A., Tatti E., Decorosi F., Viti C., Bazzicalupo M. and Giovannetti L. (2005) Comparison of 16S rRNA and 16S rDNA T-RFLP Approaches to Study Bacterial Communities in Soil Microcosms Treated with Chromate as Perturbing Agent. Microbial Ecolgy, 50: 375-384

Mergel A., Schmitz O., Mallmann T. and Bothe H. (2001) Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. Fems Microbiology Ecology, 36: 33-42

Mishler B.D. and Brandon R.N. (1987) Individuality, pluralism, and the phylogenetic species concept. Biology and Philosophy, 2:397-414

Mitchell C.P.J. and Branfireun B.A. (2005) Hydrogeomorphic Controls on Reduction– Oxidation Conditions across Boreal Upland–Peatland Interfaces. Ecosystems 8: 731-747

Mitsch W.J. and Gosselink J.G. (2000) Wetlands, pp920, John Wiley and Sons, Inc, New York.

Molénat J. (1999) Rôle de la nappe sur les transferts d'eau et de nitrate dans un basin versant agricole. Etude expérimentale et modélisation. Rennes, Université de Rennes I, 269p

Molénat J., Aquilina L., Pierson-Wickmann A.C., Legout C., Marmonier P., Ruiz L., Vanderkoornhuyse P., Bougon N., Gascuel C., Mérot P., Faucheux M., Labasque T., Hamon Y. and Hénin O. (2007) Etude du rôle de l'interface SOl-NAppe sur les processus de Transfert de solutés, d'Erosion chimique et sur la diversité bactérienne dans un bassin versant (SONATE), Actes du colloque de clôture du programme Ecosphère Continentale. Toulouse, 5-7 décembre, 6 pages

Monsinjon T., Andersen O.K, Leboulenger F. and Knigge T. (2006) Data processing and classification analysis of proteomic changes: a case study of oil pollution in the mussel, *Mytilus edulis*.Proteome Science, 4: 17-30

Morel F.M.M. and Hering J.G. (1993) Principles and applications of aquatic chemistry. John Wiley and sons, New York, USA

Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., and Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 51 (1), 263-73

Murphy E.M. and Ginn T.R. (2000) Modeling microbial processes in porous media. Hydrogeology Journal, 8:142-158

Murphy EM, Schramke JA (1998) Estimation of microbial respiration rates in groundwater by geochemical modeling constrained with stable isotopes. Geochimica et Cosmochimica Acta, 62:3395–3406

Murphy E.M., Schramke J.A., Fredrickson, J.K., Sklarew D.S., Linehan J.C., Bledsoe H.W. and Francis A.J. (1992) The influence of microbial activity and sedimentary organic carbon on the isotope geochemistry of the Middendorf aquifer. Water Resources Research, 28:723-740

Muyzer G., Teske A., Wirsen C.O. and Jannasch H.W. (1995) Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Archives of Microbiology, 164:165-172

Muyzer G. (1999) DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current opinion in Microbiology 2: 317-22

**N**

Naeem S. and Li S.B. (1997) Biodiversity enhances ecosystem reliability. Nature 390, 507–509

Nannipieri P., Ascher J., Ceccherini M.T., Landi L., Pietramellara G. and Renella G. (2003) Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Sciences ,54: 655 - 670

Nealson K.H. and Stahl D.A. (1997) Microorganisms and biogeochemical cycles: what can we learn from the layered microbial community. Geomicrobiology: interaction between microbes and minerals. J.F. Banefield and K.H. Nealson. Washington, Mineralogical society of America, 35: 2-31

Neretnieks I. (1980) Diffusion in the rocks matrix: an important factor for radionuclide migration. Journal of Geophysical Research, 85:4379-4397

Nielsen K.L., Høgh A.L. and Emmersen J. (2006) DeepSAGE-digital transcriptomics with high sensitivity, simple experimental protocol and multiplexing of samples. Nucleic Acids Research, 34: 133-137

Nilsson J. and Nissen P. (2005) Elongation factors on the ribosome. Current Opinion in Structural Biology, 15: 349-54

Nold S.C and Zwart G. (1998) Patterns and governing forces in aquatic microbial communities. Aquatic Ecology, 32:17-35

**O**

Odum E.P. (1959) Fundamentals of Ecology, Second edition, Philadelphia and London: W. B. Saunders Co., 546 pp

Ogram A. (2000) Soil molecular microbial ecology at age 20: methodological challenges for the future. Soil Biology & Biochemistry, 32: 1499-1504.

Olsen G.J., Lane D.J., et al. (1986) Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. Annual Review of Microbiology, 40: 337-365

Olsson O. (1992) Site characterization and validation – Final Report, Stripa Project 92-22.Uppsala, Conterra AB.

Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., and Sekiya T. (1989) Detection of Polymorphisms of Human DNA by Gel Electrophoresis as SSCPs. Proceedings of the National Academy of Sciences ,USA, 86: 2766-2770

Orphan V.J., Taylor L.T., Hafenbradl D. and Delong E.F. (2000) Culture-Dependent and Culture-Independent Characterization of Microbial Assemblages Associated with High-Temperature Petroleum Reservoirs. Applied and Environmental Microbiology, 66: 700-711

Osborn A.M., Moore E.R.B. and Timmis K.N. (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics Environmental Microbiology, 2: 39–50

Ostrom N.E., Hedin L.O., von Fischer J.C. and Robertson G.P (2002) Nitrogen transformations and NO3- removal at a soil stream interface: A stable isotope approach. Ecological Application, 12 : 1027 - 1043

Øvreås L. (2000) Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. Ecology letters, 3: 236-251

**P**

Pace N.R. (1997) A molecular view of microbial diversity and the biosphere. Science 276, 734– 740

Packman A.I., Salehin M. and Zaramella M. (2004) Hyporheic exchange with gravel beds: basic hydrodynamic interactions and bedform-induced advective flows. Journal of Hydraulic Engineering 130: 647–656

Palumbo A.V., Schryver J.C., Fields M.W., Bagwell C.E., Zhou J.Z., Yan T., Liu X. and Brandt C.C. (2004) Coupling of functional gene diversity and geochemical data from environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 70: 6525-6534

Paro V., Moreno-Paz M. and Gonzàlez-Toril E. (2007) Analysis of environmental transcriptomes by DNA microarrays. Environmental Microbiology, 9: 453–464

Paul E.A. and Clark F.E. (1989) Soil Microbiology and biochemistry. San Diego, Academic press

Paul J.W., Beauchamp E.G. and Trevors J.T. (1989) Acetate, propionate, butyrate, glucose, and sucrose as carbon sources for denitrifying bacteria in soil. Canadian Journal of Microbiology, 35: 754-759

Pedersen K. (1997) Microbial life in deep granitic rocks. FEMS Microbiology Reviews, 20:399-414

Pedersen K. (1999) Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden. Engineering Geology, 52:163-176

Perry A.D.M., Amaranthus M.P., Borchers J.G., Borchers S.L. and Brainerd R.E. (1989) Bootstrapping in ecosystems. Bioscience, 39, 230–237

Peters S., Koschinksy S., Schwieger F. and Tebbe C. (2000) Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-single-strand-conformation polymorphism-based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. Applied and Environmental Microbiology, 66: 930-93

Petitjean P., Henin O. and Gruau G. (2004) Dosage du carbone organique dissous dans les eaux douces naturelles. Intérêt, Principe, Mise en Oeuvre et Précautions Opératoires. pp. 61. Cahiers Techniques de Géosciences Rennes, Rennes.

Philippot L., Piutti S., Martin-Laurent F., Halle S. and Germon J.C. (2002) Molecular analysis of the nitrate-reducing community from unplanted and maize-planted soils. Applied and Environmental Microbiology, 68: 6121 – 6128

Philippot L. (2002) Denitrifying in genes in bacterial and Archaeal genomes. Biochimica et Biophysica Acta, 1577:355-376

Philippot L. (2005) Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment**.** Biochemical Society Focused Meetings**.** Biochemical Society Transactions, 33: 200–204

Philippot L. and Hallin S. (2005) Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. Current Opinion in Microbiology, 8: 234–239

Pinder G.F. and Celia M.A. (2006) Subsurface Hydrology. John Wiley & Sins, Inc., Hoboken, New Jersey

Pines O. and Inouye M. (1999) Expression and secretion of proteins in E. coli. Molecular Biotechnology, 12:25-34

Plomp M., Leighton T.J., Wheeler K.E. and Malkin A. J. (2005) The High-resolution architecture and structural dynamics of *Bacillus* Spores. Biophysical Journal, 88: 603-608

Plummer L.N. Parkhurst D.L and Thorstenson DC (1983) Development of reaction models for ground-water systems. Geochemica Et Cosmochemica Acta, 47 :665-686

Poinar H.N., Schwarz C., Qi ,J., Shapiro B., MacPhee R.D.E., Buigues B., Tikhonov A., Huson D.H., Tomsho L.P., Auch A. *et al.* (2006) Metagenomics to paleogenomics: large-scale sequencing of mammoth DNA. Science, 311: 392–394

Polak A., Grader A.S., *et al.* (2003) Chemical diffusion between a fracture and the surrounding matrix: measured by computed tomography and modelling. Water resource research, 39: doi:10.1029/2001WR000813.

Ponnamperuma F. N. (1972) The chemistry of submerged soils, Advances in Agronomy, 24, 29-61

Posada D. and Crandall K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics Applications Note, 14: 817-818

Pourret O., Davranche M., Gruau G. and Dia A. (2007) Organic complexation of rare earth elements in natural waters: Evaluating model calculations from ultrafiltration data. Geochimica et Cosmochimica Acta 71: 2718–2735

Prather M., Ehhalt D. et al. (2001) Atmospheric chemistry and greenhouse gases. Pages 239-288 *in* J.T. Houghton, Y. Ding, D.J. Griggs, M. Noguer, P.J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell and C.A. Johnson, editors. Climate change 2001 : the scientific basis. Third Assessment Report in the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge, New York, USA

Priemé A., Braker G. and Tiedje J. M. (2002) Diversity of Nitrite Reductase (nirK and nirS) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils Applied and Environmental Microbiology, 68:1893-1900

Primerano D.A and Burns R. O. (1983) Role of Acetohydroxy Acid Isomeroreductase in Biosynthesis of Pantothenic Acid in Salmonella typhimurium. Journal of bacteriology; 153 : 259-269

## Q

Quinn G. P. and Keough M. J (2002) Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge (ed).,pp 537

**R**

Ram R.J., Verboekmoes N.C., Thelen M.P., Tyson G.W., Baker B.J., Blake R.C., Shah M., Hettich R.L. and Banfield J.F. (2005) Community proteomics of a natural microbial biofilm. Science, 308:1915-1920

Ranjard L., Poly F., Combrisson J., Richaume A., Gourbière F., Thioulouse J. and Nazaret S. (2000) Heterogeneous cell density and genetic structure of bacterial pools associated with various soil microenvironments as determined by enumeration and DNA fingerprinting approach (RISA). Microbial Ecology, 39:263–272.

Rawlins B., Baird A., Trudgill S. and Hornung M. (1997) Absence of preferential flow in the percolating waters of a coniferous forest soil. Hydrological Processes, 11:575–585

Robert M. (1996) Le sol. Masson (ed), Paris

Rockhold M.L., Yarwood R.R. and Selker J.S. (2004) Coupled microbial and transport processes in soil. Vadose Zone Journal, 3: 368-383

Roesch L.F.W., Fulthorpe R.R., Riva A., Casella G., Hadwin A.K.M., Kent A.D., Daroub S.H., Camargo F.A.O., Farmerie W.G. and Triplett E.W. (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. The ISME Journal, 1: 283–290

Röling W.F.M., Van Breukelen B.M., Braster M., Lin B. and Van Verseveld H.W. (2001). Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. Applied and Environmental Microbiology, 6: 4619-4629

Ronaghi M. (2001) Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. Genome research, 11 : 3-11

Ronaghi M. and Elahi E. (2002) Pyrosequencing for microbial typing. Journal of Chromatography B, 782: 67-72

Rondon M.R., August P.R., Bettermann A.D., Brady S.F., Grossman T.H., Liles M.R., Loiacono K.A., Lynch B.A., MacNeil I.A., Minor C., Tiong C.L., Gilman M., Osburne M. S., Clardy J., Handelsman J., and Goodman R.M. (2000) Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. Applied and Environmental Microbiology, 66:2541–2547

Rosche T.M., Siddique A., Larsen M.H., and Figurski D.H. (2000**)** Incompatibility Protein IncC and Global Regulator KorB Interact in Active Partition of Promiscuous Plasmid RK. Journal of Bacteriology, 182: 6014-6026

Roussel-Delif L., Tarnawski S., Hamelin J., Philippot L., Aragno M. and Fromin N. (2005) Frequency and Diversity of Nitrate Reductase Genes among Nitrate-Dissimilating Pseudomonas in the Rhizosphere of Perennial Grasses Grown in Field Conditions. Microbial Ecology, 49: 63-72

Ruiz L., Abiven S., Durand P., Martin C., Beaujouan V and Molénat J. (2002b) Effect on nitrate concentration in stream water of agricultural practices in six small catchments in Brittany : I.Temporal variations and mixing processes. Hydrology and Earth System Sciences, 6:507-513

Ruiz L., Abiven S., Durand P., Martin C., Vertès F. and Beaujouan V. (2002a) Effect on nitrate concentration in stream water of agricultural practices in six small catchments in Brittany : I.Annual nitrogen budgets. Hydrology and Earth System Sciences, 6:497-505

**S**

Sabater S., Butturini A., Clement J.C., Burt T., Dowrick D., Hefting M., Maître V., Pinay G., Postolache C., Rzepecki M. and Sabater F. (2003) Nitrogen Removal by Riparian Buffers along a European Climatic Gradient: Patterns and Factors of Variation. Ecosystems 6: 20–30

Saitou N. and Nei N. (1987) The Neighbor-Joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. Molecular biology and Evolution, 14: 276-284

Saleh-Lakha S., Miller M., Campbell R.G., Schneider K., Elahimanesh P., Hart M.M. and Trevors J.T. (2005) Microbial gene expression in soil: methods, applications and challenges Journal of microbiological methods, 63:1-19

Sánchez-Pérez J.M. and Trémolières M. (2003) Change in groundwater chemistry as a consequence of suppression of floods: the case of the Rhine floodplain. Journal of Hydrology 270: 89– 104

Sanger F., Nicklen S., and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74: 5463–5467

Schaefer C.E., Arands R.R., v.d.Sloot H.A. and Kosson D.S. (1995) Prediction and experimental validation of liquid-phase diffusion resistance in unsaturated soils. Journal of Contaminant Hydrology, 20:145-166

Scheibe T., Donh H. and Xie Y.L. (2007) Correlation between bacterial attachment rate coefficients and hydraulic conductivity and its effect on field-scale bacterial transport. Advances in water resources, 6-7: 1571-1582

Schimel J., Balser T.C. and Wallenstein M. (2007) Microbial stress response physiology and its implication for ecosystem function. Ecology, 88: 1386–1394

Schimel J.P., Gulledge J.M., Clein-Curley J.S., Lindstrom J.E. and Braddock J.F. (1999) Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. Soil Biology and Biochemistry, 31:831-838

Schink B. (1997) Energetics of Syntrophic Cooperation in Methanogenic Degradation. Microbiology and Molecular Review, 61: 262-280

Schlesinger W.H. (1997) Biogeochemistry: an analysis of global change. Academic Press, San Diego, California, USA

Schmidt A., Kellermen J. and Lottspeich F. (2005) A novel strategy for quantitative proteomics using isotope-coded protein labels. Proteomics, 5:4-15

Schmitt-Wagner D., Friedrich M.W., Wagner B. and Brune A. (2003) Axial Dynamics, Stability, and Interspecies Similarity of Bacterial Community Structure in the Highly Compartmentalized Gut of Soil-Feeding Termites (*Cubitermes* spp.). Applied and Environmental Microbiology, 69: 6018-6024

Schulze et al. (2005) A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. Oecologia 142: 335-343

Schwieger F. and Tebbe C. (1998) A new approach to utilize PCR single-strand-confromation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. Applied and Environmental Microbiology 64: 4870-4876.

Shannon C.E. and Weaver W. (1969) The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, Ill.

Sharma S., Aneja M.K., Mayer J., Munch J.C., and Schloter M. (2005) Diversity of Transcripts of Nitrite Reductase Genes (nirK and nirS) in Rhizospheres of Grain Legumes. Applied and Environmental Microbiology, 71: 2001-2007

Sharma S., Szele Z., Schilling R., Munch J. C. and Schloter M. (2006) Influence of Freeze-Thaw Stress on the Structure and Function of Microbial Communities and Denitrifying Populations in Soil. Applied and Environmental Microbiology, 72: 2148-2154

Sikora L.J. and Keeney D.R (1983) Further aspects of soil chemistry under anaerobic conditions, Ecosystems of the world, Vol 4A, Mires: Swamp, Bog, Fen and Moor, A. J. P. Gore, pp. 247-256, Elsevier, Amsterdam

Singh B.K., Munro S., Reid E., Ord B., Potts J.M., Paterson E. and Millard P. (2006) Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. European Journal of Soil Science 57: 72–82.

Singleton P. and Sainsbury D. (2001) Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 3rd edition. John Wiley and Sons Ltd., Baffins Lane, Chischester, West Sussew, UK

Smith C.J., Nedwell D.B., Dong L.F. and Osborn A.M. (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (narG and napA), nitrite reductase genes (nirS and nrfA), and their transcripts in estuarine sediments. Applied and Environmental Microbiology,73: 3612-3622

Smith K.P. and Goodman R.M. (1999) Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. Annual Review of Phytopathology, 37: 473– 491.

Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Welch D.M., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta, J.M. and Herndl G.J. (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA :12115-12120

Sokal R.R. and Rohlf D.J. (1995) Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, 3rd edn. W.H. Freeman &Co., New York

Sorci J., Paulauskis J.D. and Ford T. (1999) 16S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial diversity as a biomarker of ecological health in polluted sediments from New Bedford harbor, Massachusetts. Marine Pollution Bulletin 38: 663–675

Stahl D. A. and Tiedje J.M. (2002) Microbial ecology and genomics: a crossroad of opportunity. A report from the American Academy of Microbiology. Washington, D.C. From www.asmusa.org

Stark J. and Firestone M. (1995) Mechanism for soil moisture effects on activity of nitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 61:218-221

Steffan R.J. and Atlas R.M. (1988) DNA amplification to enhance detection of genetically engineered bacteria in environmental samples. Applied and Environmental Microbiology, 54: 2185–2191

Stevens T.O and McKinley J. P. (1995) Lithoautotrophic Microbial Ecosystems in Deep Basalt Aquifers. Science**,** 270 : 450 - 455

Stotzky G. (1997) Soil as an environment for microbial life. In: Modern Soil microbiology,eds Van Elsas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H., Marcel Dekker, NY, 1-20

Streit W. R. and Schmitz R. A. (2004) Metagenomics – the key to the uncultured microbes. Current Opinion in Microbiology, 7:492–498

Stumm W. and Morgan J.J. (1996) Aquatic chemistry: Chemical equilibra and rates in natural waters. John Wiley and sons, New York, USA

Sunnucks P., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., Zenger K., French J. and Taylor A.C. (2000) SSCP Is Not So Difficult: The Application and Utility of Single-Stranded Conformation Polymorphism in Evolutionary Biology and Molecular Ecology. Molecular Ecology, 9: 1699-1710

Swofford D.L. (1993) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony, Version 4.0 BETA, Florida state University

**T**

Tam N.F.T., Wong Y.S. and Leung G. (1992) Effect of exogeneous carbon sources on removal of inorganic nutrient by the nitrification-denitrification process. Water research, 26:1229-1236

Tarits C., Aquilina L., Ayraud V., Pauwels H., Davy P., Touchard F. and Bour O. (2006) Oxido-reduction sequence related to flux variations of groundwater from a fractured basement aquifer (Ploemeur area, France). Applied Geochemistry, 21: 29-47

Thauer R.K., Jungermann K. and Decker K. (1977) Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. Bacteriological reviews, 41:100-180

Thioulouse J., Chessel D., Doledec S. and Olivier J.M. (1997) ADE-4 : a multivariate analysis and graphical display software. Statitics and computing, 7:75-83

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmouguin F. and Higins D.G. (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876-4882

Thorstenson D.C., Fisher D.W. and Croft M.G. (1979) The geochemistryof the Fox Hills–Basal Hell Creek aquifer in southwestern North Dakota and northwestern South Dakota. Water Resources Research, 15:1479–1498

Thröback I.N., Enwall K., Jarvis A. and Hallin S. (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes from community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. FEMS Microbiology Ecology, 49: 401–417

Throbäck I.N. (2006) Exploring Denitrifying Communities in the Environment. Doctoral thesis, Swedish University Of Agricultural Sciences, Uppsala

Tiedje J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In : Zhuder, A. (Ed.), Biology of Anaerobic Microorganisms. Wiley, New York, pp. 179-244

Tiedje J.M., Sexstone A.J., Myrold D.D. and Robinson J.A. (1982) Denitrification: ecological niches, competition and survival. Anton van Leeuwenhoek Journal of Microbiology 48: 569 - 583

Tiedje J.M. (1994) Denitrifiers. pp 245-267. Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical Properties. Soil Science Society of America journal, Madison, Wisconsin

Toulhoat P. (1996) Evolution chimique des eaux profondes et de surface. Les Techniques, Vol 96, Numéro spécial "Mines et Carrières ", décembre 1996, pp. 26-29

Torsvik V., Goksoyr J. and Daae F.L. (1990) High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 56: 782–787

Torsvik V., Daae F.L., Sandaa R.A. and Øvreås L. (1998) Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. Journal of Biotechnology 64, 53–62

Torsvik V. and Øvreås L**.** (2002) Microbial diversity and function in soil: from gene to ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 5: 240-245.

Torsvik V., Øvreås L. and Thingstad T.F. (2002) Prokaryotic diversity – magnitude, dynamics and controlling factors. Science, 296:1064-1066

Torsvik V., Salte K., Soerheim R. and Goksoeyr J. (1990) Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a J.L. Kirk *et al.* / Journal of Microbiological Methods 58 (2004) 169–188 187 population of soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 56: 776– 781

Trevors J.T., van Elsas J.D., VanOverbeek L.S. and Starodub M.E. (1990) Transport of a genetically-engineered Pseudomonas fluorescens strain through a soil microcosm. Applied and Environmental Microbiology, 56: 401-408

Trevors J.T. (1998b) Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. Water Air Soil and Pollution, 101: 45– 67

Tringe S.G., von Mering C., Kobayashi A., Salamov A.A., Chen K., Chang H.W., Podar M., Short J.M. , Mathur E.J., Detter J.C., Bork P., Hugenholtz P. and Rubin E.M. (2005) Comparative Metagenomics of Microbial Communities. Science, 308:554-557

Tsang C.-F. and Neretnieks I. (1998) Flow channelling in heterogeneous fractured rocks. Reviews of Geophysics, 36:257-298

Tsai Y. and Olson B.H. (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, 58: 2292–2295

Tyagi R., Lee Y.T, Guddat L.W. and Duggleby R.G. (2005) Probing the mechanism of the bifunctional enzyme ketol-acid reductoisomerase by site-directed mutagenesis of the active site FEBS Journal 272 (2), 593–602

**U**

Unlu M., Morgan M.E. and Minden J.S. (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. Electrophoresis, 18:2071–2077

**V**

van der Heijden M.G.A. *et al.* (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, 396: 69–72

van Rijn J., Tal Y. and Schreier H.J. (2006) Denitrification in recirculating systems : Theory and applications. Aquacultural Engineering, 34:364-376

Vandenkoornhuyse P., Leyval C. and Bonnin I. (2001) High genetic diversity in arbuscular mycorrhizal for recombination events. Heredity, 87: 243-253

Vandenkoornhuyse P., Husband R., Daniell T.J., Watson I.J., Duck J.M., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2002) Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. Molecular Ecology, 11: 1555-1564

Vandenkoornhuyse P., Ridgway K.P., Watson I.J., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2003) Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. Molecular Ecology, 12: 3085-3095.

Vandenkoornhuyse P., Mahé S., Ineson P., Staddon P., Ostle N., Francez A.J., Fitter A.H. and Young J.P.W. (2007) Isotopic labeling of RNA reveals differential carbon flux to cohabiting mycorrhizal fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA,

Venter J.C., Remington K., Heidelberg J.F., Halpern A.L., Rusch D., Eisen J.A., Wu. D., Paulsen I., Nelson K.E., Nelson W., Fouts D.E., Levy S., Knap A.H., Lomas M.W., Nealson K., White O., Peterson J., Hoffman J., Parsons R., Baden-Tillson H., Pfannkoch C., Rogers Y-H., and Smith H.O. (2004) Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. Science, 304: 66-74

Vidon P.G.F. and Hill A.R. (2004) Landscape controls on the hydrology of stream riparian zones. Journal of Hydrology, 292: 210–228

Vives-Rego J., Lebaron P., Nebe-von Caron G. (2000) Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology FEMS Microbiology Reviews, 24: 429–448

von Wintzingerode F., Gobel U.B. and Stackebrandt E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples : pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 21:213-229

Vuadens F., Gasparini D., Déon C., Sanchez J-C, Hochstrasser D.F., Schneider P. and Tissot J-D (2002) Identification of specific proteins in different lymphocyte populations by proteomic tools. Proteomics, 2:105-111

**W**

Wall D.H. and Virginia R.A. (1999) Controls on soil biodiversity: insights from extreme environments. Applied Soil Ecology, 13: 137– 150

Wallenstein M.D., Myrold D.D., Firestone M. and Voytek M. (2006) Environmental controls on denitrifying communities and denitrification rates: insights from molecular methods. Ecological Aplications, 16 :2143-2152

Ward D. (1998) A natural species concept for prokaryotes. Current Opinion in Microbiology, 1:271-277

Ward D., Brassell M.S.C. and Eglinton G. (1985) Archaebacterial lipids in hot-spring mats. Nature, 318: 693–694

Warren F.J., Waddington J.M., Bourbonniere R.A. and Day S.M. (2001) Effect of drought on hydrology and sulphate dynamics in a temperate swamp. Hydrological Processes, 15: 3133-3150

Weber A.P.M., Weber K.L., Carr K., Wilkerson C., and Ohlrogge J.B. (2007) Sampling the Arabidopsis Transcriptome with Massively Parallel Pyrosequencing.Plant Physiology, 144: 32-42

Whalen J.K. and Warman P.R. (1996) Arylsulfatase activity in soil and soil extracts using natural and artificial substrates. Biology and fertility of soils 22: 373-378

Wilkinson S., Anderson J., Scardelis S., Tisiafouli M., Taylor A. and Wolters V. (2002) PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. Soil Biology and Biochemistry, 34:189-200

Wilmes P. and Bond P.L. (2004) The application of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and downstream analyses to a mixed community of prokaryotic microorganisms. Environmental Microbiology, 6:911-920

Wilmes P. and Bond P.L. (2006a) Metaproteomics: studying functional gene expression in microbial ecosystems. Trends in Microbiology, 14:92-97

Wilmes P. and Bond P.L. (2006b) Towards exposure of elusive metabolic mixed-culture processes: the application of Metaproteomic analyses to activated sludge. Water Sciences and Technology, 54:217-226

Wilson J.T., McNabb J.F., Balkwill D.L. and Ghiorse W.C. (1983) Enumeration and characterization of bacteria indigenous to a shallow water-table aquifer. Ground Water 21 : 134-142

Winkelmann M., Hüttl R. and Wolf G. (2004) Application of batch-calorimetry for the investigation of microbial activity. Thermochimica Acta, 415 : 75–82

Withman W.B., Coleman D.C. and Wiebe W.J. (1996) Prokaryotes: the unseen majority. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 95: 6578-6583

Woese C.R. (1987) Bacterial evolution. Microbiological Reviews, 51:221–271.

Woese C.R. (1991) Prokaryote systematics: the evolution of a science. The prokaryotes. *Sous la direction de* : A. Balows, H.G.Trüper, M. Dworkin, W. Harder et K.H. Schleifer. Vol. 1. Springer, New York. pp. 3–18

Woese C.R. and Fox G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 74 : 5088–5090

Wolda H. (1981) Similarity indices, sample size and diversity. Oecologia, 50: 296-302

Wolsing M. and Priemé A. (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of *nir* gene fragments. FEMS Microbiology Ecology, 48:261-271

**Y**

Yao H., He Z., Wilson M.J. and Campbell C.D. (2000) Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. Microbial Ecology, 40: 223– 237

Yarwood R.R., Rockhold M.L., Niemet M.R., Selker J.S. and Bottomley P.J. (2006) Impact of microbial growth on water flow and solute transport in unsaturated porous media. Water Resources Research, 42, W10405, doi: 10.1029/2005WR004550

Yates J.R., Speicher S., Griffin P.R. and Hunkapiller T. (1993) "Peptide Mass Maps: A Highly Informative Approach to Protein Identification." Analytical Biochemistry 214(2): 397-408

Yeates C., Gillings M.R., Davison A.D., Altavilla N. and Veal D.A. (1997) PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. Letter in Applied Microbiology, 25: 303–307

## Z

Zakhia F. and de Lajudie P. (2006) La taxonomie bactérienne moderne : revue des techniques — application à la caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses (BNL). Canadian Journal of Microbiology, 52: 169–181

Zamaroczy M., Delorme F. and Elmerich C. (1990) Characterization of three different nitrogen-regulated promoter regions for the expression of glnB and glnA in Azospirillum brasilense. Molecular and General Genetics, 224: 421-430

Zhang Z., Jackson G.W., Fox G.E. and Wilson R.C. (2006) Microbial identification by mass cataloguing. BMC Bioinformatics, 7:117

Zhou Z. and Hogetsu T. (2002) Subterranean community structure of ectomycorrhizal fungi under *Suillus grevillei* sporocarps in a *Larix kaempferi* forest. New Phytologist, 154: 529-539

Zumft W G. (1997) Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61:533-616

Zumft W. G. (1992) The denitrifying prokaryotes, p. 554–582. *In* A. Balows,H. G. Tru¨per, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation,identification, applications, 2nd ed., vol. 1. Springer-Verlag, NewYork, N.Y.

Zumstein E., Moletta R. and Godon J.-J. (2000) Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. Environmental Microbiology, 2: 69-78

## Source internet

Cours d'hydrologie général, http://hydram.epfl.ch/e-drologie/, accès le 10 octobre 2007.

Croissance bactériologique, http://croissbact.free.fr/bacterie.php, accès le 3 juillet 2007.

Melcher, Ulrich. SSCPs : http://opbs.okstate.edu/~melcher/MG/MGW1/MG11129.html, accès le 14 octobre 2007.

NRCS, http://soils.usda.gov/education/facts/soil.html, accès le 1 août 2007.

L'Organisation Mondiale de la Santé: http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/methaemoglob/fr/, accès le 24 octobre 2007.

The R project for statistical computing (2003) http://www.r-project.org, accès le 1 décembre 2006.

Ribosomal Database Project II : http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU, accès le 6 octobre 2007.

Wagner, John. Screening Methods for Detection of Unknown Point Mutations :http://www-users.med.cornell.edu/~jawagne/screening_for_mutations.html#Single-Strand.Conformational.Polymorphism, accès le 14 octobre 2007.

## INTRODUCTION

**Figure I**

Relations existantes entre les processus chimiques, biologiques et physiques. **4**

## PARTIE I

**Figure I-1.**

Schéma d'une bactérie. **11**

**Figure I-2**

Arbre phylogénétique universel ou arbre de la vie déterminé à partir de comparaison de séquence d'ARNr **19**

**FigureI-3**

Représentation en diagramme radial de l'étendue phylogénétique connue du règne des bactéries en 1987 (Woese, 1987) (dans l'encart) et en 1998 (Hugenholtz *et al.*, 1998). **20**

**Figure I-4**

Thermodynamiques des combustibles et oxydants chimiques de la vie. **25**

**Figure I-5**

Cycle simplifié de l'azote. **28**

**Figure I-6**

Cycle de l'azote, du point de vue microbien. **29**

**Figure I-7**

Organisation en modulaires de la dénitrification. **31**

**Figure I-8**

Représentation schématique des interactions environnement/physiologie microbienne, composition de la communauté et processus de l'écosystème. **34**

**Figure I-9**

Distinction entre la zone non saturée et la zone saturée. **38**

**Figure I – 10**

Représentation schématique des habitats écologiques microbiens à macro et à micro échelle dans un aquifère poreux hétérogène. **47**

**Figure I-11**

Historique et évolution de l'écologie microbienne. **52**

**Figure I-12**

Exemple de profil obtenu par une analyse de PLFA. **54**

**Figure I-13**

Figure résumant les méthodes moléculaires cultures indépendantes pour étudier les communautés microbiennes. **55**

**Figure I-14**

Représentation schématique de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). **57**

**Figure I-15**

Représentation d'espaceurs intergéniques ribosomaux (ISR), localisés entre les gènes de l'ARNr 16S et 23S et entre les gènes de l'ARNr 23S et 5S. **59**

**Figure I-16**

Electrophorèses sur gel à gradient dénaturant. **61**

**Figure I-17**

Représentation de l'analyse du polymorphisme des fragments terminaux de restriction. **63**

**Figure I - 18**

Exemple de résultat obtenu par séquence automatique. **64**

**PARTIE II**

**Figure II-1**

Localisation des sites S et G le long de la rivière *Holerotte* **73**

**Figure II-2**

Localisation et carte géologique du Cotentin. **74**

**Figure II-3**

Plan d'implantation des piézomètres dans la tourbe et les argiles, localisation du forage d'exploitation F1 et des forages d'observation des sables G et Pz4. **75**

**Figure II-4**

Figure synthétisant les relations entre les flux hydrologique, les conditions redox du milieu et les processus engagés. **77**

**Figure II-5**

Situation géographique du Bassin versant de Kerrien et localisation des piézomètres**.** **79**

**Figure II-6**

Extrait de la carte géologique de Quimper (Feuille 1/50000) incluant la zone d'étude. **80**

**Figure II-7**

Flacon à plasma de 250 mL avec septum et bague**.** **84**

**Figure II-8**

Flacon à plasma de 250 mL recouvert d'une feuille d'aluminium pour représenter une condition en présence d'oxygène ou aérobiose. **84**

**Figure II-9**

Dispositif expérimental. **85**

**Figure II-10**

Coupe schématique des piézomètres implantés en flûte de pan. **89**

**Figure II-11**

Evolution des concentrations en chlorures sur le terrain dans la zone de fluctuation de nappe (6mètres) et dans la zone saturée (15mètres). **90**

**Figure II- 12**

Protocole expérimental de l'expérience de Méta-protéomique #1. **102**

**Figure II-13**

Illustration de la mesure de l'alcalinité selon la méthode de Gran (1952). **104**

**Figure II-14**

Plan de l'expérience #1 de protéomique. **105**

**Figure II-15**

Protocole expérimental de l'expérience de Méta-protéomique #2. **107**

**Figure II-16**

Plan de l'expérience # 2 de protéomique. **109**

**PARTIE III**

**Figure III-1**

Location and piezometer map of Carentan site. **128**

**Figure III-2**

Experimental design**.** **130**

**Figure III-3**

Batch experiments: temporal variation of nitrate and sulphate concentrations in peat samples under aerobic and anaerobic conditions. **133**

**Figure III-4**

Comparison of the experiments with and without nitrate additions. **134**

**Figure III-5**

Batch experiments: sulphate concentration normalization by chlorides concentrations. **135**

**Figure III-6**

Comparison of the change of nitrate and sulphate concentrations throughout the experiment. **137**

**PARTIE IV**

**Figure IV-1.**

Piezometer map. **156**

**Figure IV-2**

Design of the experiment. **158**

**Figure IV-3**

Non Centred PCA analysis showing differentiation among nitrate reducers' community according to the sampling time. **164**

**Figure IV-4**

Unrooted maximum parsimony tree showing differences in the composition of nitrate reducers' communities associated to time 1 (white) and time 2 (black)**.** **165**

**Figure IV-5**

Histogram representation of the restriction fragment in t1 and t2. **166**

**Figure IV-6**

Unrooted maximum parsimony trees showing differences in the composition of nitrate reducers' communities associated to G site (black square), Right bank (white triangle) and left bank (grey circle). **168**

**Figure IV-7**

Unrooted maximum parsimony trees from the Right bank samples showing differences in the composition of nitrate reducers' communities associated to the time t1 (white) and time t2 (grey). **169**

**PARTIE V**

**Figure V-1**

Location map of Kerrien catchment site**.** **183**

**Figure V-2.**

Chloride concentration changes in the fluctuation zone (6 m depth) and the saturated zone (15 m depth). **191**

**Figure V-3**

Bacterial numeration from water samples. **192**

**Figure V-4**

Phylogenetic positions of environmental SSU rRNA isolated from environmental ecosystems, in a consensus tree. **195**

**Figure V-5**

Non centred PCA elliptic representation of purge influence on the microbial community obtained from the 16s RNA gene T-RFLP analysis. **196**

**Figure V-6**

Diversity indexes versus depth obtained from the 16S rRNA gene T-RFLP analysis. **196**

**Figure V-7**

The similarity among SSU RRNA gene displayed as the shortest unrooted maximum parsimony. **197-198**

**Figure V-8**

Diversity indexes along the depth obtained from the narG gene T-RFLP analysis. **199**

**Figure V-9**

The similarity among the narG gene displayed as the shortest unrooted maximum parsimony. **199**

**PARTIE VI**

**Figure VI- 1**

Schéma de gel d'électrophorèse en 2 dimensions. **217**

**Figure VI-2**

Principe de l'identification de protéines par empreinte peptidique. **219**

**Figure IV-3**

Représentation schématique de la 2D-DIGE pour les analyses différentielles d'abondance protéique avec deux échantillons différents (1 et 2). **221**

**Figure IV-4**

Vue d'ensemble de la technique ICPL**.** **222**

**Figure VI- 5**

Protocole expérimental de l'expérience de Méta-protéomique #1**.** **224**

**Figure VI-6**

Plan de l'expérience #1 de protéomique. **226**

**Figure VI-7**

Protocole expérimental de l'expérience de Méta-protéomique #2. **228**

**Figure VI-8**

Plan de l'expérience # 2 de protéomique. **230**

**Figure VI-9**

Image du gel en 2 dimensions coloré au nitrate d'argent, réalisé à partir de la modalité 'Aérobie Glucose'. Les chiffres annotés indiquent les protéines digérées pour une identification**.** **233**

**Figure VI-10**

Evolution du pH au cours de l'expérience#2. **236**

**Figure VI-11**

Evolution temporelle des chlorures au cours de l'expérience # 2. **237**

**Figure VI-12**

Evolution temporelle des sulfates au cours de l'expérience # 2. **237**

**Figure VI-13**

Evolution temporelle des concentrations en nitrates et en nitrites mesurées au cours de l'expérience #2. **238**

**Figure VI-14**

Evolution des concentrations en carbone. **239**

**Figure VI-15**

Gel sous condition acétate+nitrate. **241**

**Figure VI-16**

Gel sous condition Acétate. **242**

**Figure VI-17**

Gel sous condition Glucose. **243**

**Figure VI-18**

Gel sous condition Glucose + Nitrate. **243**

**Figure VI-19**

Exemples de spectres de masses obtenus après le fractionnement et l'ionisation des peptides. **244**

**Figure VI-20**

Représentation de la biosynthèse d'acides aminés à chaîne ramifiée (Valine, Leucine et Isoleucine) et de coenzyme A. **247**

**Figure VI-21**

Représentation de l'ATPase. **247**

**Figure VI-22**

Diagramme représentant l'activité du complexe de la pyruvate. **248**

**Figure VI– 23**

Représentation des voies métaboliques dans lesquels des protéines déterminées sont exprimées. **253**

**Figure VI-24**

Expérience de faisabilité. **257**

**CONCLUSION**

**Figure VII-1**

Figure bilan. **265**

**Figure VII-2**

Schéma synthétisant les relations existantes entre les facteurs physiques, chimiques et biologiques. **266**

**PARTIE I**

**Tableau I-1**
Groupes métaboliques permettant de classifier les organismes procaryotes. **18**

**Tableau I - 2**
Séquence des réactions redox. **25**

**Tableau I-3**
Réaction d'oxydation et réduction du manganèse. **26**

**Tableau I-4**
Réaction d'oxydation et réduction du fer. **27**

**Tableau I-5**
Les groupes trophiques des espèces dénitrifiantes. **30**

**PARTIE II**

**Tableau II-1**
Caractéristique de la tourbe : profil de sol et pH. **84**

**PARTIE III**

**Table III-1**
Characteristics of soils and sulphur and carbon content in soil extracted at the Carentan sites. **128**

**Table III-2**
Physico - chemical parameters at the end of the experiment. **130**

**Table III-3**
The chlorides mean concentration during the experiment. **135**

**PARTIE IV**

**Table IV-1**
Caracteristics of sulfures and carbon content in soil extracted at the Carentan sites. **158**

**Table IV-2**
Shannon-Weaver index (H') calculated per time and per site. **164**

**Table IV-3**
Shannon index calculated for each site per time, with or without N and oxygen supply. **167**

**Table IV-4**
Morisita-Horn index calculated for each site. **168**

**PARTIE V**

**Table V-1**
Nitrates, sulphates and total organic carbon (TOC) in water samples collected at the different depths. **190**

**Table V-2**
Physico-chemical parameters in water samples collected from the different wells from 2005 to 2007. **192**

**Table V-3**
Similarity indexes calculated from the 16S rRNA gene T-RFLP analysis**.** **194**

## PARTIE VI

**Tableau VI-I**

Concentration et masse de protéines obtenues après extraction. **233**

**Tableau VI-2**

Identification des protéines extraites à partir de la modalité ‘Aérobie Glucose’ et séparée sur gel d’électrophorèse en 2 dimensions. **234**

**Tableau VI-3**

Température (°C) mesurée au cours de l'expérience#2 dans la salle thermo régulée et les flacons d'expérimentation. **236**

**Tableau VI-4**

Concentration et masse de protéines obtenues après extraction. **240**

**Tableau VI-5**

Tableau récapitulatif du nombre de protéines analysées et identifiées. **240**

**Tableau VI-6**

Protéines identifiées sous les conditions acétate. **246**

**Tableau VI-7**

Protéines identifiées sous conditions ‘Glucose’. **251**

**Tableau VI-8**

Protéines identifiées sous les conditions Acétate et Glucose dans l’expérience de faisabilité d’ICPL. **258**

# ANNEXES

# ANNEXE I

## Résultats de paramètres physico-chimiques et de la chimie de l'eau de l'expérience #1

1. Paramètres physico-chimiques

**pH** L'eau souterraine de Kerrien est naturellement légèrement acide, elle varie entre 5.5 et 6. **Sous condition aérobie**, le pH évolue au cours de l'expérience (Fig. 1). Une phase de croissance est observée entre t0h et t+76h. Elle est suivie d'une stabilisation autour de 7.4. Les expériences sous ajout d'acétate ne semblent pas se stabiliser et atteignent des valeurs de pH proche de 8 en fin d'expérience. **Sous condition anaérobie**, la phase de croissance est moins marquée que sous condition aérobie. Les valeurs tendent à se stabiliser autour de 6-6.3. De façon similaire aux conditions aérobie + Acétate, les expériences sous condition anaérobie+acétate les valeurs de pH en fin d'expériences sont supérieur aux autres modalités et atteignent des valeurs autour de 6.7-6.8. Globalement, les expériences sous condition anaérobie sont acides que sous condition aérobie.

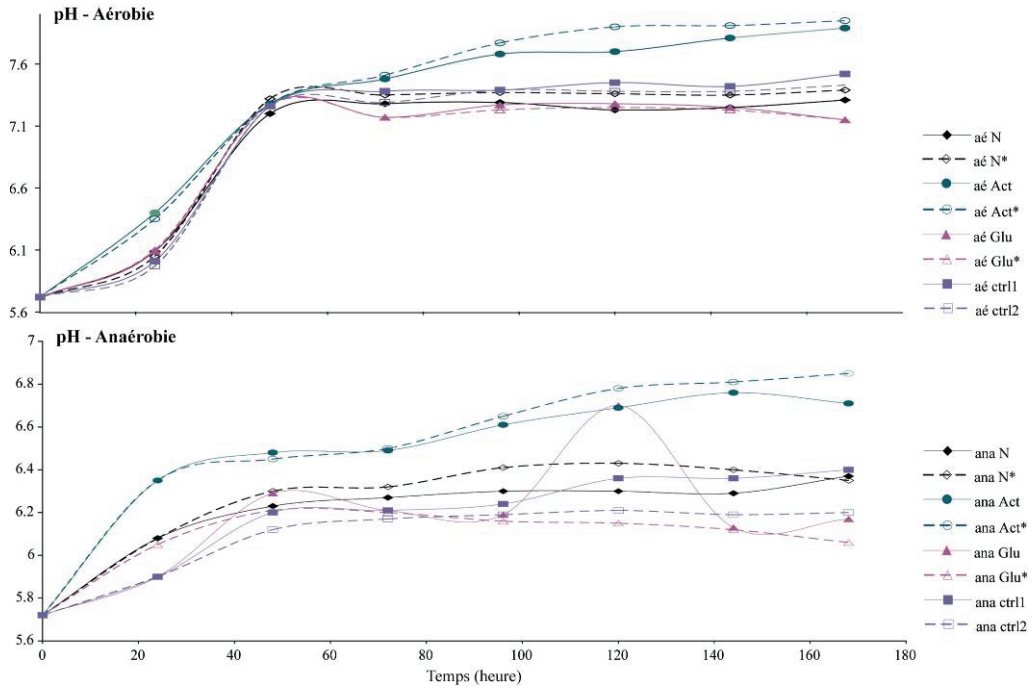



**Figure 1 : Evolution du pH mesuré au cours de l'expérience#1.**

**Température** La température est constante au cours de l'expérimentation (tabl.1). Sous condition aérobie, les valeurs varient entre 15.2 et 17.4 °C. La température est légèrement plus basse en anaérobie et varie entre14.3 et 15.9°C

**Tableau 1 : Température (°C) mesurée au cours de l'expérience#1 dans la salle thermo régulée et les flacons d'expérimentation.**

| | t1 | t2 | t3 | t4 | t5 | t6 | t7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T°C salle | 13.2 | 13.6 | 13.1 | 13.4 | 13.6 | 13.6 | 13.6 |
| Aé N | 20.5 | 15.2 | 15.3 | 16.6 | 17.5 | 16.7 | 17.4 |
| Aé N* | 20.5 | 15.6 | 15.7 | 16.7 | 17 | 17 | 17.3 |
| Aé Act | 20.5 | 16.2 | 15.8 | 16.1 | 16.7 | 16.8 | 16.3 |
| Aé Act* | 19 | 16 | 16.1 | 16.1 | 16.2 | 16.9 | 16 |
| Aé Glc | 20.5 | 15.7 | 15.6 | 16.2 | 17.1 | 16.7 | 16.3 |
| Aé Glc* | 20.5 | 15.7 | 15.6 | 16 | 16.4 | 16.2 | 16 |
| Aé Ctrl1 | 19.5 | 15.7 | 15.6 | 15.8 | 15.4 | 15.9 | 16 |
| Aé Ctrl2 | 19,5 | 15,7 | 15,5 | 16,2 | 15,8 | 15,9 | 15,9 |

| | t1 | t2 | t3 | t4 | t5 | t6 | t7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T°C salle | 13.2 | 13.6 | 13.1 | 13.6 | 13.6 | 13.6 | 13.6 |
| Ana N | 20.6 | 15.6 | 14.7 | 15.2 | 15.3 | 15.8 | 15.5 |
| Ana N* | 20.6 | 15.6 | 14.4 | 15.1 | 15.6 | 15.5 | 15 |
| Ana Act | 21 | 14.3 | 14.2 | 14.2 | 15 | 14.6 | 14.7 |
| Ana Act* | 20.7 | 15.3 | 15.3 | 15.5 | 15.9 | 15.9 | 15.6 |
| Ana Glc | 20.6 | 15.6 | 14.3 | 14.4 | 14.9 | 15.1 | 15.3 |
| Ana Glc* | 20.6 | 15.3 | 14.3 | 14.6 | 14.6 | 14.8 | 15.3 |
| Ana Ctrl1 | 20.6 | 14.9 | 15.5 | 15.2 | 15.2 | 15.7 | 15.9 |
| Ana Ctrl2 | 20.6 | 14.9 | 15.5 | 15.5 | 15.5 | 15.8 | 15 |

2. Composition chimique de l'eau

**Alcalinité** L'alcalinité mesurée au cours de l'expérience #1 (Fig.2) sous **condition aérobie** est relativement constante dans la gamme de 0 à 2 mmol $L^{-1}$ ; seule la modalité 'aé N' présente des valeurs supérieures comprises entre 2.5 et 4 mmol $L^{-1}$. Sous **condition anaérobie**, l'alcalinité est plus variable et particulièrement pour les modalités acétate et glucose. En Acétate, on observe 2 phases : une diminution de l'alcalinité, entre t0h et t+76h, pour atteindre une alcalinité nulle et une augmentation sur la fin de l'expérience pour revenir à l'alcalinité initiale. En Glucose, on observe aussi 2 phases mais inversée par rapport à l'acétate, c'est-à-dire une augmentation suivie d'une diminution.

**Chlorures** Les concentrations en chlorures (Fig.3) varient dans le temps de façon similaire sous condition aérobie et anaérobie dans une gamme de 33.7 à 37.5 mg $L^{-1}$. Ces variations en chlorures ont été corrigées sur les données de nitrates et de sulfates.

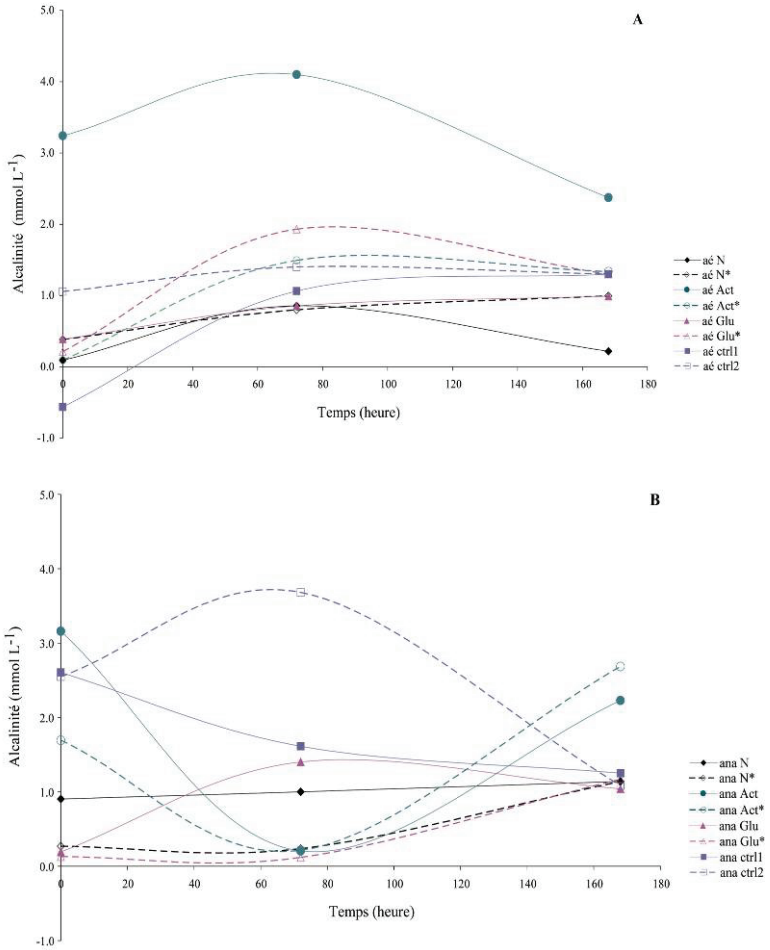



**Figure VI-2: Evolution de l'alcalinité (mmol $L^{-1}$) mesurée au cours de l'expérience#1. A : exp#1 sous condition aérobie et B : exp#1 sous condition anaérobie.**

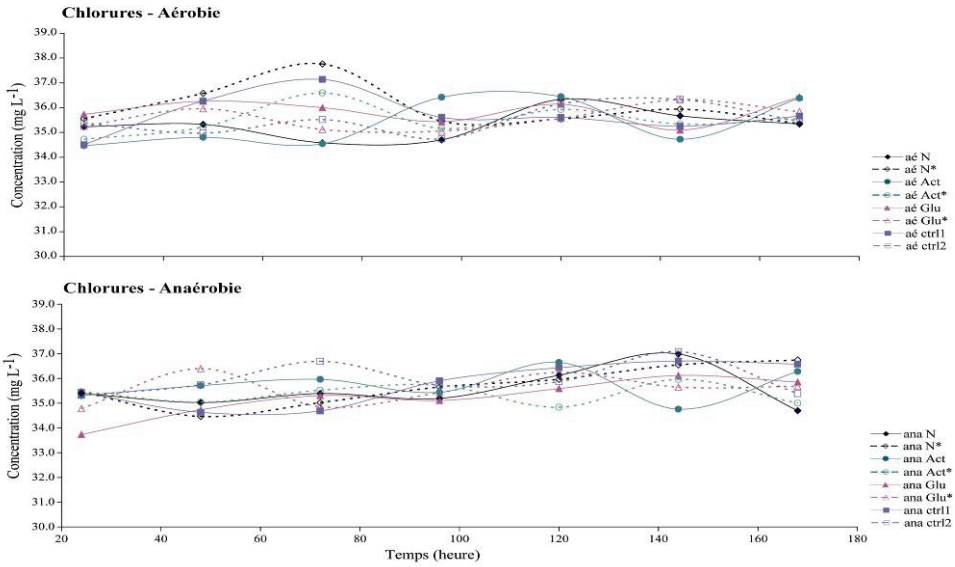



**Figure 3 : Evolution temporelle des chlorures (mg $L^{-1}$) mesurée au cours de l'expérience#1.**

**Nitrates** Les concentrations en nitrates restent constantes jusque t+120h sous condition aérobie et anaérobie (Fig. 4). Puis une légère diminution est observée sur l'ensemble des modalités.

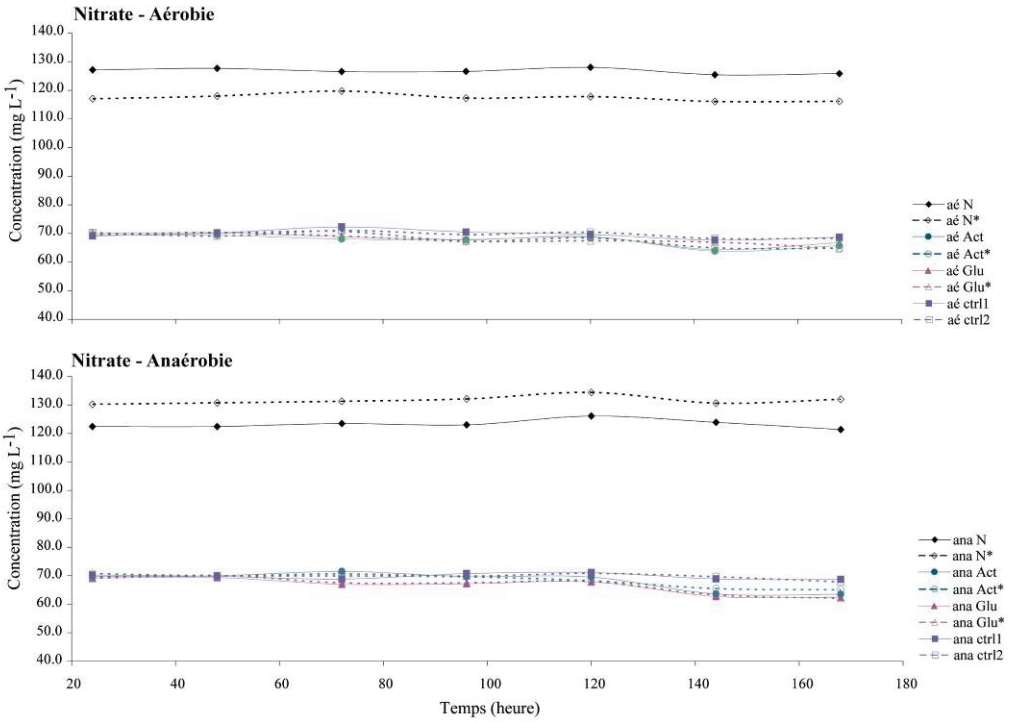



**Figure 4 : Evolution temporelle des nitrates mesurée au cours de l'expérience #1**

**Sulfates** Les concentrations en sulfates sous **condition aérobie** varient dans une gamme de 20 à 25 mg $L^{-1}$ et les variations sont assez similaires dans l'ensemble des modalités testées. Seules les expériences sous 'Act* et Glc*' enregistrent de plus fortes variations (Fig.IV-16). Sous la condition 'aé Act*', la concentration augmente progressivement jusque t+96h, passant de 20 à 29mg$L^{-1}$ et chute à 22 mg $L^{-1}$ à t-120h. Sous la condition 'aé Glc*', la concentration en sulfates évolue à partir de t+120h et augmente de 10mg $L^{-1}$ entre t+120h et t+140h. Sous les **condition anaérobies**, les concentrations en sulfates sont plus variable que sous aérobie, particulièrement pour les conditions 'ana Act* et Glc*' qui varient respectivement dans une gamme de 20 à 40mg $L^{-1}$ et 20 à 60 mg $L^{-1}$. Les autres conditions enregistrent des variations entre 20 et 23 mg$L^{-1}$.

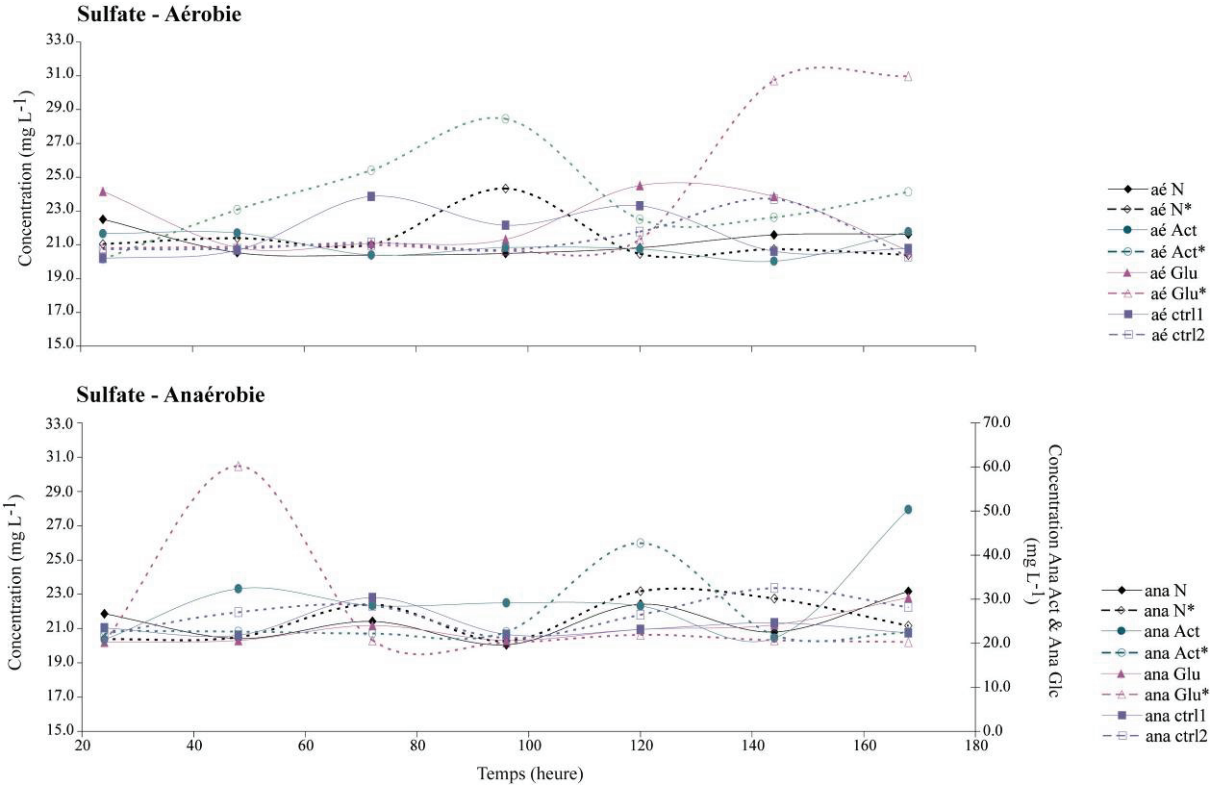



**Figure 5: Evolution temporelle des sulfates mesurés au cours de l'expérience #1**

## Carbone Organique total

Les concentrations en carbone organique total (TOC) sont naturellement faibles dans la nappe (conditions 'aé N et N*', 'aé Ctrl1 et Ctrl2', 'ana N et N*' et 'ana Ctrl1 et Ctrl2') (tabl. 2). La concentration mesurée en '**aé Ctrl2**' est anormalement élevée. Une telle valeur n'a jamais été observée sur le terrain. Deux hypothèses peuvent expliquer une telle concentration : la présence de carbone dans le flacon en début d'expérimentation et une erreur analytique. L'ensemble des échantillons ont été mesuré à la même date, une erreur de mesure devrait ainsi se répercuter sur l'ensemble de l'analyse. Ainsi la première hypothèse est adoptée et cette valeur ne sera pas prise en compte dans l'interprétation. Sous **condition aérobie**, les variations les plus fortes enregistrées sont rencontrées dans les conditions avec ajout de nitrate, où plus de 50% du carbone présent est consommé et dans l'expérimentation 'ctrl1' où une production de carbone est observée à hauteur de 80% par rapport à la concentration de départ. Dans le cas où du carbone a été ajouté, une différence de consommation du carbone est observée. Sous les conditions 'Glc' la consommation enregistrée avoisinent les 30% contre 20% dans le cas de l'acétate. Comme il a été observé sous la condition aérobie, le maximum de variation de concentration en TOC sous la **condition anaérobie** est obtenu en 'ctrl1'. Dans les modalités 'ana N', une production de

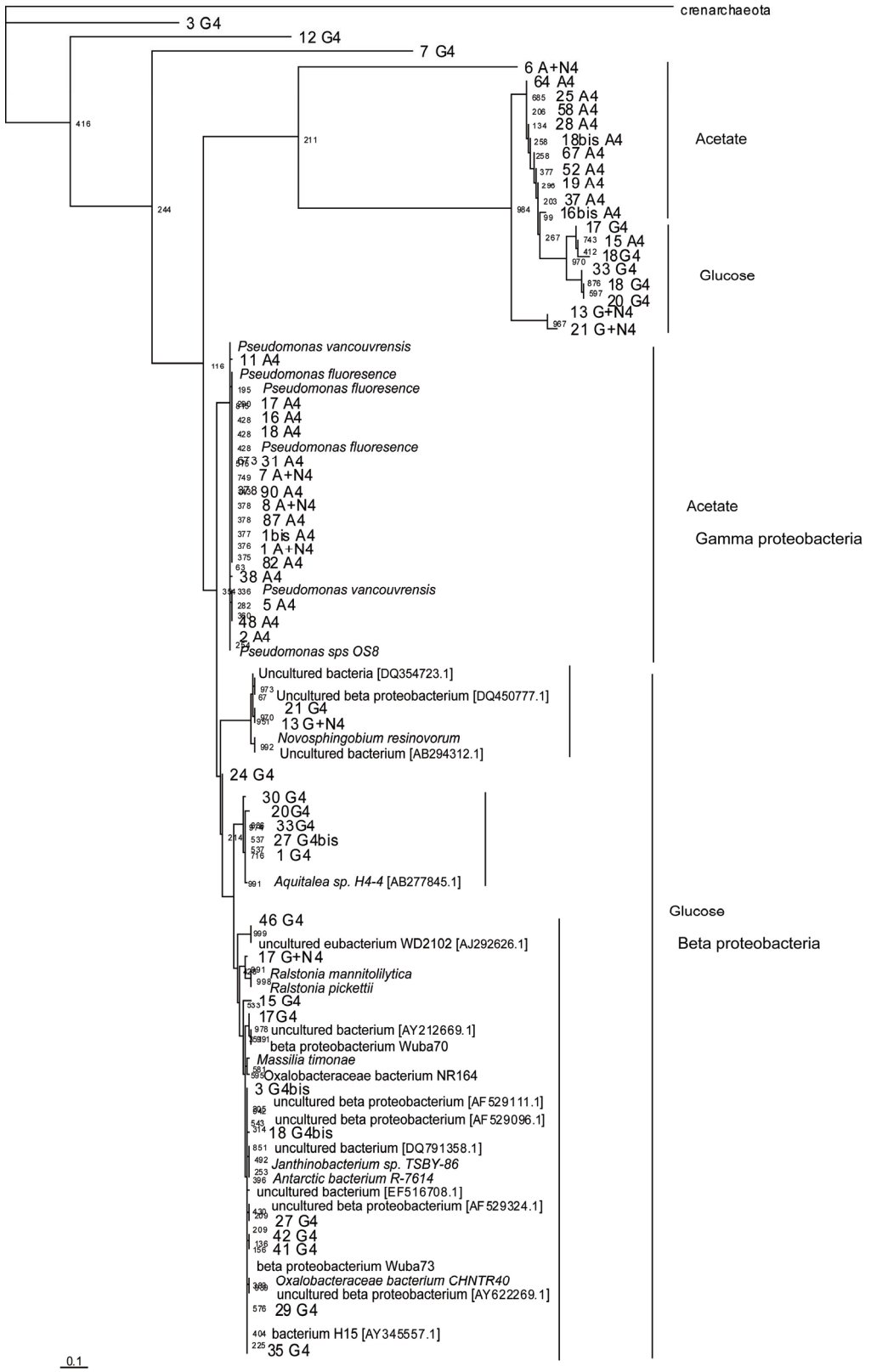
TOC est observée. Alors que dans les conditions avec ajout de carbone, le carbone présent est consommé. La diminution est relativement plus importante sous les conditions 'Act'.

**Tableau 2 : Concentration (mg $L^{-1}$) en carbone organique total (TOC) mesurée en début et fin d'expérience. Les variations en TOC sont exprimées en mg/L et en pourcentage. Le symbole '-' indiquant une diminution.**

| | t0h | t+176h | ΔTOC | % ΔTOC |
|---|---|---|---|---|
| **aé N** | 3.46 | 1.70 | **1.76** | **- 51.0** |
| **aé N*** | 2.31 | 1.10 | **1.21** | **- 52.7** |
| **aé Glc** | 164.84 | 114.63 | **50.21** | **- 30.5** |
| **aé Glc*** | 64.51 | 42.94 | **21.57** | **- 33.4** |
| **aé act** | 137.75 | 111.98 | **25.77** | **- 18.7** |
| **aé act*** | 66.10 | 52.90 | **13.20** | **- 20.0** |
| **aé ctrl1** | 1.74 | 3.11 | **1.37** | **78.4** |
| **aé ctrl2** | 14.65 | 1.51 | **13.15** | **- 89.7** |
| **ana N** | 2.01 | 2.54 | **0.54** | **26.8** |
| **ana N*** | 1.17 | 1.45 | **0.28** | **24.0** |
| **ana Glc** | 171.32 | 123.31 | **48.01** | **- 28.0** |
| **ana Glc*** | 66.90 | 43.46 | **23.44** | **- 35.0** |
| **ana act** | 145.54 | 88.30 | **57.24** | **- 39.2** |
| **ana act*** | 66.25 | 44.19 | **22.06** | **- 33.3** |
| **ana ctrl1** | 0.80 | 2.85 | **2.05** | **256.8** |
| **ana ctrl2** | 1.16 | 2.22 | **1.06** | **91.8** |

# ANNEXE II

## Arbre phylogénétique des séquences d'ADN extraites en début et en fin de l'expérience#2



# ANNEXE III

**Protocole employé au cours de l'expérience de faisabilité.**

**Étape 1: séparation par électrophorèse monodimensionnelle**
Les quatre échantillons destinés à être ultérieurement marqués par ICPL (glucose, glucose + nitrate, acétate, acétate + nitrate) sont séparés par électrophorèse monodimensionnelle.
20µg de chaque échantillon sont chargés sur un gel 1D 10% Tris-Glycine (n°de lot: 7011753): 200V, 70mA, 100W, 51 min. Le gel 1D est coloré à l'EZBlue (Sigma).

Pour chacun des 4 échantillons, 3 à 4 bandes correspondant à des poids moléculaires différents sont prélevées sur le gel et digérées selon le protocole en vigueur sur la plate-forme Protéomique Haut-Débit Ouest Génopôle. Suite à cette digestion, les peptides sont extraits des bouts de gel de manière active et ajoutés aux digestats obtenus par extraction passive sur la nuit. Le volume final est diminué par évaporation au Speed-vac et complété à 28µL avec du TFA 0,1%.

**Étape 2: nano-HPLC**
La mise au point des méthodes de nanoLC a été faite sur les bandes 11, 12 et 13 (échantillon: Acétate + Nitrate). Lors de ces mises au point, aucune identification n'a été obtenue à partir de ces bandes. La bande 14 a donc été prélevée, digérée et analysée, afin de vérifier la possibilité d'obtenir des identifications pour des protéines issues de cet échantillon.

*Appareil*: Ultimate 3000 (Dionex)
• Pre-colonne: C18 PepMap300, 5µm, 300Å / 300µm id x 5mm
• Colonne:C18 PepMap100, 3µm, 100Å / 75 µm id x 150mm
• Température: 30°C
*Méthode:*
• Gradient (Solvant A: eau / TFA 0,04% ; Solvant B: ACN / TFA 0,04%)
0-30min: 2% - 35% de B
30 - 40 min: 35 - 60% de B
40 - 43 min: 60 - 90% de B
43 – 52 min: 90% de B
52 – 57 min: 90 - 2% de B
57 – 75 min: 2% de B
• Débit: 220nL/min
• Détection UV: 214 nm
• Volume d'injection: 22µL
*Collecte* toutes les 25 secondes de 7 à 60 min et **dépôt** sur cible MALDI (cible PAC, Bruker Daltonics), grâce au robot ProteineerFC (Bruker Daltonics).

**Étape 3: analyse MS/MS**
Suite au dépôt sur cible MALDI, celle-ci est lavée avec du phosphate d'ammonium monobasique 10mM afin d'éliminer les sels, et analysée de manière automatique (MS puis MS/MS sur les pics ayant une qualité suffisante).
*Appareil:* spectromètre de masse MALDI-TOF/TOF Ultraflex (Bruker Daltonics)

# ANNEXE IV

## Tableau d'analyse protéique de l'échantillon Glucose Aérobie, expérience#1

| n° du spot | Nom de la protéine | Nom de l'espèce | n° d'accessibilité gi | db source | Mw estimée (Da) | pI théorique | Nombre de peptides matchés / nombre total de peptides | Erreur en ppm | % de couverture | score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 9 | COG1053: Succinatedehydrogenase/fumarate reductase flavoprotein subunit | *Shigella boydii BS512* | ZP_00696109 | NZ_AAKA01000023.1 | 64935 | 5,.85 | 14/31 | 21 | 30 | 145 |
| 11 | outer membrane protein A | *Escherichia coli* | Aat98590 | AY682206.1 | 37291 | 6.53 | 14/38 | 19 | 42 | 165 |
| 14 | Chain B, Orthorhombic Glutathione S-Transferase | *Schistosoma japonicum* | 1Y6E_B | | 26246 | 6.09 | 12/53 | 20 | 41 | 100 |
| 15 | Chain C, Elongation Factor Complex Ef-TuEF-Ts | *Escherichia coli* | 1EFU_C | | 42321 | 5.22 | 14/49 | 24 | 50 | 138 |
| 17 | translation elongation factor EF-Tu | Escherichia coli | YP_542801 | NC_007946.1 | 45023 | 5.25 | 13/40 | 32 | 43 | 137 |

# ANNEXE VI

## Tableau d'analyse protéique de l'échantillon Acétate, expérience#2

| n° du spot | Nom de la protéine | Nom de l'espèce | n° d'accessibilité | | Mw estimée (Da) | pI théorique | nombre de peptides matchés / nombre de peptides totals | Erreur en ppm | % de couverture | score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | gi | db source | | | | | | |
| A14 | Succinate deshydrogenase | *Pseudomonas syringae pv. syringae B728a* | YP_235088 | NC_007005.1 | 63868 | 5.77 | 11/24 | 11 | 23 | 118 |
| A19_1 | ATP synthase subunit A | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_263276 | NC_004129.6 | 55394 | 5.38 | 17/45 | 20 | 42 | 170 |
| A19_2 | KfrA protein | *uncultured bacterium* | NP_598100 | NC_003430.1 | 33606 | 5.06 | 9/45 | 24 | 45 | 79 |
| B1 | Dihydrolipoamide dehydrogenase | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_258846 | NC_004129.6 | 50128 | 5.93 | 9/35 | 20 | 28 | 81 |
| B19 | Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_263177 | NC_004129.6 | 34810 | 8.74 | 9/38 | 19 | 33 | 90 |
| C24 | Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_263177 | NC_004129.6 | 34810 | 8.74 | 11/35 | 21 | 37 | 96 |
| D1 | Elongation factor Tu | *Pseudomonas fluorescens Pf0-1* | YP_350809 | NC_007492.1 | 43813 | 5.23 | 16/45 | 21 | 45 | 150 |
| D24 | Succinyl-CoA synthetase alpha subunit | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_258848 | NC_004129.6 | 30324 | 6.08 | 10/49 | 18 | 45 | 97 |
| D6 | Beta-ketothiolase | *Pseudomonas sp. 61-3* | BAA36197 | AB014757.1 | 40736 | 5.92 | 13/50 | 17 | 35 | 114 |
| D9 | Nitrogen regulatory protein P-II | *Pseudomonas putida KT2440* | NP_747335 | NC_002947.3 | 12323 | 5.42 | 7/33 | 14 | 55 | 98 |
| A15 | ATP synthase subunit B | *Pseudomonas fluorescens Pf0-1* | YP_351454 | NC_007492.1 | 49471 | 4.92 | 17/56 | 21 | 49 | 124 |

# ANNEXE VII

## Tableau d'analyse protéique de l'échantillon Acétate+Nitrate, expérience#2

| n° du spot | Nom de la protéine | Nom de l'espèce | n° d'accessibilité gi | db source | Mw estimée (Da) | pI théorique | nombre de peptides matchés / nombre de peptides totals | Erreur en ppm | % de couverture | score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A2 | Aconitate hydratase | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_259740.1 | NC_004129.6 | 94402 | 5,21 | 11/34 | 27 | 19 | 80 |
| A14 | Succinate dehydrogenase | *Pseudomonas fluorescens Pf0-1* | YP_347344 | NC_007492.1 | 64170 | 5,67 | 21/47 | 19 | 35 | 173 |
| B21 | Membrane-bound ATP synthase, F1 sector,beta-subunit | *Ralstonia eutropha H16* | YP_728062.1 | NC_008313.1 | 51027 | 5,18 | 10/31 | 14 | 32 | 97 |
| D8 | Arginine deiminase | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_2617191 | NC_004129.6 | 46735 | 5,47 | 21/61 | 29 | 36 | 162 |
| I9 | Arginine deiminase | *[Pseudomonas fluorescens Pf0-1]* | YP_350114 | NC_007492.1 | 46675 | 5,55 | 11/32 | 18 | 30 | 108 |
| F9 | Ketol-acid reductoisomerase | *[Pseudomonas fluorescens Pf-5]* | YP_262325.1 | NC_004129.6 | 36441 | 5,48 | 7/23 | 10 | 30 | 84 |
| F13 | Ketol-acid reductoisomerase | *[Pseudomonas fluorescens Pf-5]* | YP_262325.1 | NC_004129.6 | 36441 | 5,48 | 7/26 | 13 | 33 | 78 |
| H7 | ChtH | *Agrobacterium sp.* | AAC12800 | U67851.1 | 38720 | 9,33 | 9/42 | 42 | 29 | 81 |
| H10 | ATP synthase subunit B | *[Pseudomonas fluorescens Pf0-1]* | YP_3514541 | NC_007492.1 | 49471 | 4,92 | 18/69 | 21 | 54 | 153 |
| H13 | Elongation factor Tu | *[Pseudomonas fluorescens Pf0-1]* | YP_350809 | NC_007492.1 | 43813 | 5,23 | 24/85 | 22 | 51 | 189 |
| H14 | Elongation factor Tu | *[Pseudomonas fluorescens Pf0-1]* | YP_350809 | NC_007492.1 | 43813 | 5,23 | 27/73 | 20 | 60 | 266 |
| H18 | Phosphate ABC transporter, periplasmic phosphate-binding protein | *Pseudomonas fluorescens Pf-5* | YP_263177 | NC_004129.6 | 34810 | 8,74 | 10/46 | 21 | 35 | 96 |

# ANNEXE VIII

## Tableau d'analyse protéique de l'échantillon Glucose, expérience#2

| n° du spot | Nom de la protéine | Nom de l'espèce | n° d'accessibilité gi | db source | Mw estimée (Da) | pI théorique | nombre de peptides matchés / nombre de peptides totals | Erreur en ppm | % de couverture | Score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C2 | Listeria phage A118 Attention VIRUS | *Bacteriophage A118]* | NP_463503 | NC_003216.1 | | | | | | |
| C8 | ATPase | *Acidiphilium cryptum JF-5* | ZP_01144275 | NZ_AAOO01000002.1 | 65837 | 4.89 | 14/51 | 28 | 28 | 90 |
| E22 | Protein of unknown function DUF404 | *Burkholderia multivorans ATCC 17616* | ZP_01567720 | NZ_AAYB01000001.1 | 52076 | 5.3 | 12/58 | 25 | 24 | 81 |
| F2 | Carbamoyl-phosphate synthase large subunit | Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis K-10 | NP_960053 | NC_002944.2 | 120190 | | 12/36 | | | 81 |

# ANNEXE IX

## Tableau d'analyse protéique de l'échantillon Glucose,+Nitrate, expérience#2

| n° de spot | Nom de la protéine | Nom de l'espèce | n° d'accessibilité gi | db source | Mw estimée (Da) | pI théorique | nombre de peptides matchés / nombre de peptides totals | Erreur en ppm | % de couverture | Score |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C24 | ATP synthase F1, beta subunit | *Verminephrobacter eiseniae EF01-2* | YP_995283 | NC_008786.1 | 50944 | 5.30 | 11/25 | 19 | 31 | 121 |
| D12 | Translation elongation factor Tu | *Chromobacterium violaceum ATCC 12472* | NP_903858 | NC_005085.1 | 43216 | 5.11 | 10/23 | 14 | 31 | 106 |
| D15 | Translation elongation factor Tu | *Polaromonas naphthalenivorans CJ2* | YP_980447 | NC_008781.1 | 43204 | 5.32 | 13/40 | 18 | 29 | 106 |
| E16 | Putative exonuclease, RdgC | *Shewanella pealeana ATCC 700345* | ZP_01602198 | | 37823 | 5.1 | 11/52 | 38 | 36 | 81 |
| E19 | Hypothetical protein TTHERM_00038910 | *Tetrahymena thermophila SB210* | XP_977192 | XM_972099.1 | 59103 | vers 8 | 11/43 | | | 84 |