



HAL
open science

Etude de la diversité bactérienne et génétique dans des cultures dégradant l'ETBE ou le MTBE

Yoann Le Digabel

► **To cite this version:**

Yoann Le Digabel. Etude de la diversité bactérienne et génétique dans des cultures dégradant l'ETBE ou le MTBE. Autre. Ecole Centrale de Lyon, 2013. Français. NNT : 2013ECDL0026 . tel-00966858

HAL Id: tel-00966858

<https://theses.hal.science/tel-00966858>

Submitted on 27 Mar 2014

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

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

Université de Lyon



Environmental Microbial Genomics
www.GenomEnviron.org



Sujet de la thèse

ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ BACTÉRIENNE ET GÉNÉTIQUE DANS DES CULTURES DÉGRADANT L'ETBE OU LE MTBE

THÈSE

Discipline : microbiologie environnementale

présentée et soutenue

par

Yoann Le Digabel

le 4 octobre 2013

devant le jury composé de

Pascale Bauda, Université de Lorraine
Charles W. Greer, IRB
Françoise Fayolle-Guichard, IFPEN
Timothy M. Vogel, Université Claude Bernard Lyon 1
Pascal Simonet, Ecole Centrale de Lyon
Théodore Bouchez, IRSTEA

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Examineur

Directeur de thèse : Timothy M. Vogel
Promotrice de thèse : Françoise Fayolle-Guichard
Président du jury : Pascal Simonet

“All we have to decide is what to do with the time that is given to us.”

— J.R.R. Tolkien, *The Fellowship of the Ring*

Remerciements

Cette thèse aura été effectuée dans deux laboratoires d'accueil différents, au sein du département Biotechnologie à IFPEN (Rueil-Malmaison), ainsi qu'au laboratoire Ampère de l'Ecole Centrale Lyon (Ecully).

Je souhaite tout d'abord remercier les différents membres du jury ayant accepté d'évaluer mon travail : Pascal Simonet (Directeur de recherche CNRS à l'Ecole Centrale de Lyon), Timothy M. Vogel (Professeur à l'Université de Lyon), Françoise Fayolle-Guichard (Ingénieur de recherche à IFPEN, Rueil-Malmaison), et Théodore Bouchez (Chargé de recherches à IRSTEA, Antony). Je remercie en particulier Pascale Bauda (Professeur et Directrice adjointe du LIEC, Metz) et Charles W. Greer (Manager à l'IRB, Montréal), qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie chaleureusement Tim Vogel, pour son rôle de directeur de thèse, ses propositions fructueuses pour l'orientation des travaux, mais aussi pour ses conseils avisés et ses discussions si enrichissantes au cours de ces trois années.

Mes remerciements vont également à Frédéric Monot, chef du département Biotechnologie à IFPEN, pour m'avoir accepté dans son équipe, et pour ses conseils et l'intérêt qu'il a porté à ma thèse durant ces trois années. Je remercie également les différents membres du département pour leur aide, leur disponibilité et leur bonne humeur au quotidien, particulièrement Hugues, Senta et Françoise. De même, je remercie mes collègues de pronostics (Marcel, Fadhel et Rémy), pour ces bons moments de rigolade et de détente dans le bureau en fin d'après-midi. Mes plus plates excuses à Rémy, qui n'aura pas su me faire apprécier la bonne cuisine ni les vieilles chansons françaises malgré moult tentatives! Rhalala, ces jeunes...tout va à vau l'eau! Enfin, merci à Denis pour toutes nos conversations si intéressantes sur tant de sujets (sauf de foot, parce que bon, faut pas déconner, quand on confond Real et Barça...^_^).

Un grand merci également à Yves Benoit, mon ancien chef de projet (mais qui restera quand même "chef!"), pour sa disponibilité, son aide précieuse, son implication malgré son changement de thématique, et pour toutes nos discussions, sérieuses ou non.

Enfin, je souhaiterais remercier tout particulièrement Françoise Fayolle-Guichard, la promotrice de ma thèse et mon encadrante à IFPEN. Un merci des plus sincères pour m'avoir donné ma chance pour cette thèse, et pour m'avoir suivi durant ces trois années. Ça aura été un réel honneur pour moi d'avoir la chance de côtoyer une personne si compétente, humaine et impliquée. La thèse n'aurait jamais été aussi réussie sans elle. Puissent les années à venir lui offrir la reconnaissance qu'elle mérite.

Je tiens également à saluer le personnel du laboratoire Ampère à l'Ecole Centrale de Lyon. Mes remerciements vont également à Bénédicte Lafay pour sa disponibilité et sa précieuse aide, ainsi que pour nos conversations.

Enfin, je remercie tout particulièrement Sandrine Demanèche, co-encadrante de la thèse à l'ECL, excellente dans ce rôle durant tout ce temps. Un grand merci pour toute cette implication, cette disponibilité, cette gentillesse et cette bonne humeur.

Je remercie également mes anciens collègues de l'INRA, notamment Agnès et Marina à Jouy en Josas (merci pour le prêt de l'appareil DGGE), ainsi qu'Anne-Marie et Michèle à Grignon-plage. Malgré les années, la bonne entente règne toujours, et c'est bien ça qui compte! Avec une pensée également pour Jean-Claude qui s'est exilé à Montpellier, mais dont les précieux conseils m'auront à nouveau servi. Mentor un jour, mentor toujours.

Enfin, je remercie mes amis pour leur soutien durant ces trois années (Rosy, Alain, Reinette, Mappy, Loïc, Bobo, Mathilde, et bien d'autres), de même que la brochette de geeks du labo à Lyon, notamment Benoit (aka God of Steel), Jerem' (aka Hugo), Oliv' (aka Darkmaster), Sam (CRÔM!), Laurine (qui a quand même le potentiel pour être une geekette, on y croit!), et surtout, mon super pote qui est devenu un vrai ami, Mathieu (aka Bobby69): merci pour tous ces bons moments à parler de trucs de geeks et tous nos fous rires à coup de citations de Kaamelott et HC. Crypte powa mec!

Pour finir, mes derniers remerciements vont à ma famille, notamment à Jacqueline et Joël, mes parents, ainsi qu'à Seb, mon frère, Karine, son épouse, et leur petit dernier, Adrien. Merci pour votre soutien et vos attentions.

Résumé

L'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) et le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) sont des éthers carburants utilisés comme additifs dans les essences sans plomb. Du fait de leur utilisation massive, de nombreux cas de pollutions d'aquifères ont été répertoriés, en particulier pour le MTBE, et ces composés représentent donc un risque sanitaire potentiel. Des travaux récents ont permis de mettre en évidence différents micro-organismes capables de dégrader ces composés malgré leur faible biodégradabilité dans l'environnement. Néanmoins, une meilleure compréhension de l'écologie et de la régulation de ces capacités de dégradation permettrait une meilleure gestion de la bioremédiation de sites contaminés par l'ETBE ou le MTBE.

L'objectif de la thèse, réalisée dans le cadre d'un projet ANR Blanc (MiOxyFun), est de mieux comprendre l'écologie des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de ces éthers et leur relation avec la régulation ainsi qu'avec les cinétiques de dégradation de ces composés par des membres spécifiques de ces communautés. Ainsi, à partir de différents échantillons environnementaux venant de sites pollués par l'ETBE ou le MTBE, des enrichissements ont pu être réalisés en laboratoire afin d'étudier leurs microflores. Ces enrichissements ont été étudiés notamment pour leurs cinétiques de dégradation, la composition de leurs communautés bactériennes, et pour l'isolement de souches bactériennes directement impliquées dans la dégradation de ces composés. L'étude des cinétiques de dégradation de l'ETBE ou du MTBE par différents enrichissements obtenus sur ETBE (cinq) et sur MTBE (six) a permis de montrer des profils de dégradation très différents. La dégradation était généralement lente et s'accompagnait d'un faible rendement en biomasse avec parfois accumulation transitoire de *tert*-butanol (TBA). Les capacités de dégradation d'autres composés des essences (BTEXs et *n*-alcane) étaient aussi différentes d'un enrichissement à l'autre, le benzène, entre autres, étant dégradé par 10/11 enrichissements. Des techniques d'empreinte moléculaire (RISA, DGGE) ont permis de constater que les communautés bactériennes présentes dans les cinq enrichissements sur ETBE étaient différentes de celles sur les enrichissements sur MTBE. Les enrichissements sur ETBE ont fait spécifiquement l'objet d'une étude par analyse de banques de clones réalisées à partir des gènes codant l'ARNr 16S de ces enrichissements. Cette étude a montré la prédominance des *Proteobacteria* dans trois enrichissements, la prédominance des *Acidobacteria* dans un autre ainsi qu'une composition plus hétérogène dans le cinquième. De plus, des *Actinobacteria* ont été détectées dans les 5 enrichissements.

En parallèle, plusieurs souches possédant des capacités de dégradation ont été isolées des enrichissements: *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043 (dégradant l'ETBE jusqu'au TBA), une *Betaproteobacteria* IFP 2047 (dégradant l'ETBE), *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 (dégradant le TBA), *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 (dégradant l'ETBE et le MTBE), *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 et une *Proteobacteria* IFP 2052 (dégradant le MTBE). Une étude par qPCR sur les gènes codant l'ARNr 16S a montré la prédominance de certaines souches isolées dans les enrichissements ETBE. Enfin, plusieurs gènes connus comme étant impliqués dans la dégradation des éthers carburants ont pu être mis en évidence dans les enrichissements et dans certaines des souches isolées.

Mots-clés: ETBE (éthyl *tert*-butyl éther), MTBE (méthyl *tert*-butyl éther), enrichissements, biodégradation, écologie microbienne, gènes de dégradation, RISA, DGGE, qPCR, RT-qPCR

Abstract

ETBE and MTBE are fuel oxygenates added to unleaded gasoline to improve combustion. Due to their extensive use, numerous aquifers have been contaminated, particularly by MTBE. The use of ETBE and MTBE is considered to represent an environmental risk. Recent research has uncovered a range of microorganisms capable of degrading these compounds, even though their environmental half-lives are long. Improved understanding of the ecology and regulation of this degradative ability could improve the management of the ETBE and MTBE contaminated site remediation.

The aim of this work, taking place in the framework of the ANR project MiOxyFun was to investigate the ecology of ETBE- and MTBE-degrading microbial communities and their relationship to the regulation and kinetics of ETBE- and MTBE-degradation by specific members of these communities. Several ETBE- and MTBE-degrading microbial communities were enriched in the laboratory from environmental samples from contaminated sites throughout the world. These enrichments were examined for their degradation kinetics, microbial community structure, and used to isolate specific community members actively degrading ETBE and/or MTBE. The ETBE or MTBE biodegradation kinetics of the five ETBE- and six MTBE- degrading enrichments demonstrated a diversity of biodegradation rates. Overall, biodegradation was generally slow and associated to a low biomass yield. *Tert*-butanol (TBA) was transiently produced in several cases. Biodegradation of other gasoline compounds (BTEXs and *n*-alkanes) was tested and varied among the enrichments studied. Benzene, however, was degraded in 10 out of the 11 enrichments. DNA fingerprinting techniques (RISA, DGGE) showed that the microflora present in the five ETBE enrichments were different from those of the MTBE enrichments. The ETBE enrichments were studied further by sequencing the 16S rRNA genes extracted, amplified and cloned from these enrichments. *Proteobacteria* dominated three of the ETBE enrichments, *Acidobacteria* in another one, and a more heterogeneous composition was found in the fifth ETBE enrichment. *Actinobacteria* were detected in all five enrichments.

Several strains with ETBE or MTBE degradation capacities were isolated: *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043 (degrading ETBE to TBA), a *Betaproteobacteria* IFP 2047 (degrading ETBE), *Bradyrhizobium* sp. IFP 2047 (degrading TBA), *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 (degrading ETBE and MTBE), *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 and a *Proteobacteria* IFP 2052 (degrading MTBE). Quantification of the 16S rRNA gene confirmed the relatively high number of these isolates in some of the ETBE enrichments. Several genes involved in ETBE and/or MTBE biodegradation were detected in some of the enrichments and in some of the isolated strains.

Key words: ETBE (ethyl *tert*-butyl ether), MTBE (methyl *tert*-butyl ether), biodegradation capacities, microbial ecology, biodegradation genes, RISA, DGGE, qPCR, RTqPCR

Table des matières

REMERCIEMENTS	I
RESUME	III
ABSTRACT.....	IV
TABLE DES MATIERES	V
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	VII
LISTE DES TRAVAUX	IX
LISTE ABBREVIATIONS	XI
INTRODUCTION.....	3
I – ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	9
I – 1. COMPOSITION DES ESSENCES.....	9
I – 1 – 1. <i>Les essences</i>	9
I – 1 – 2. <i>Additifs des essences</i>	12
I – 2 – TOXICITE ET RISQUES SANITAIRES DUS AUX ETHERS CARBURANTS (MTBE / ETBE)	14
I – 3. POLLUTION DES AQUIFERES ET IMPACT ENVIRONNEMENTAL.....	16
I – 3 – 1. <i>Les aquifères</i>	16
I – 3 – 2. <i>Nature et origine des contaminations des aquifères</i>	18
I – 4. DIVERSITE BACTERIENNE ET GENETIQUE AU SEIN DES AQUIFERES	21
I – 4 – 1. <i>Diversité bactérienne des aquifères</i>	21
I – 4 – 2. <i>Micro-organismes dégradant les éthers carburants</i>	22
I – 4 – 3. <i>Gènes impliqués dans la dégradation des éthers</i>	27
I – 5. LES DIFFERENTES APPROCHES DE L'ÉTUDE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EN MICROBIOLOGIE ENVIRONNEMENTALE	30
I – 5 – 1. <i>Isolement de bactéries et cultures</i>	30
I – 5 – 2. <i>Techniques d'empreintes moléculaires (fingerprinting)</i>	30
I – 5 – 3. <i>Recherche des gènes fonctionnels</i>	31
I – 5 – 4. <i>Puces à ADN</i>	32
I – 5 – 5. <i>Approches métagénomiques</i>	33
I – 5 – 6. <i>Autres approches</i>	33
II – MATERIEL ET METHODES.....	37
II – 1. ORIGINE DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX	37
* DANS CES CAS LA TENTATIVE D'ENRICHISSEMENT SUR MTBE N'A PAS PERMIS D'OBTENIR LA BIODEGRADATION DE CE COMPOSE.	37
** DANS CES CAS LA TENTATIVE D'ENRICHISSEMENT SUR ETBE N'A PAS PERMIS D'OBTENIR LA BIODEGRADATION DE CE COMPOSE.	37
II – 2. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES.....	38
II – 2 – 1. <i>Micro-organismes utilisés</i>	38
II – 2 – 2. <i>Milieux de culture</i>	38
II – 2 – 3. <i>Méthodes de culture</i>	39
II – 2 – 4. <i>Isolement des souches à partir des enrichissements</i>	43
II – 3. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	43
II – 3 – 1. <i>Extraction d'ADN</i>	43
III – 3 – 2. <i>Amplification d'ADN par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction)</i>	44
II – 3 – 3. <i>PCR quantitative (qPCR)</i>	49
II – 3 – 4. <i>Extraction des ARN totaux</i>	51
II – 3 – 5. <i>Retro-Transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR)</i>	56
II – 3 – 6. <i>Électrophorèse sur gel d'agarose</i>	56
II – 3 – 7. <i>Technique RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)</i>	56
II – 3 – 8. <i>Technique DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)</i>	57
II – 3 – 9. <i>Clonage</i>	58
II – 3 – 10. <i>Séquençage</i>	60
II – 3 – 11. <i>Arbres phylogénétiques</i>	60

II – 4. TECHNIQUES ANALYTIQUES	61
II – 4 – 1. Analyse par CPG des composés très solubles.....	61
II – 4 – 2. Détermination des teneurs en CO ₂	61
II – 4 – 3. Analyse des autres composés utilisés.....	61
III – OBJECTIFS DE L'ETUDE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	65
ÉTUDE PHYLOGENETIQUE.....	66
IV – RESULTATS ET DISCUSSION.....	69
IV – 1. CAPACITES DE DEGRADATION DES DIFFERENTS ENRICHISSEMENTS	69
IV – 1 – 1. Biodégradation de l'ETBE et du MTBE	69
IV – 1 – 2. Biodégradation des composés des essences (BTEXs et n-alcanes).....	74
IV – 2. SOUCHES BACTERIENNES ISOLEES A PARTIR DES DIFFERENTS ENRICHISSEMENTS.....	77
IV – 2 – 1. Étude des capacités de dégradation des souches bactériennes isolées.....	77
IV – 2 – 2. Capacités de dégradation de la souche <i>Pseudonocardia</i> sp. IFP 2050.....	84
IV – 2 – 3. Cas de commensalisme dans l'enrichissement US6-ETBE	85
IV – 3. COMPARAISONS DE LA DIVERSITE BACTERIENNE DANS LES ENRICHISSEMENTS ETBE/MTBE	87
IV – 3 – 1. Étude de la flore bactérienne par RISA (<i>Ribosomal Intergenic Spacer Analysis</i>).....	87
IV – 3 – 2. Étude de la flore bactérienne par la technique DGGE (<i>Denaturing Gel Gradient Electrophoresis</i>)	91
IV – 4. ÉTUDE APPROFONDIE DES ENRICHISSEMENTS OBTENUS SUR ETBE.....	102
IV – 4 – 1. Quantification par la technique qPCR des souches dégradeuses d'ETBE/TBA dans les enrichissements ETBE	102
IV – 4 – 2. Réalisation de banques de clones sur les enrichissements ETBE	104
IV – 5. ÉTUDE DES GENES IMPLIQUES DANS LA DEGRADATION DE L'ETBE ET DU MTBE	110
IV – 5 – 1. Recherche des gènes de dégradation.....	111
IV – 5 – 2. Étude de l'expression des gènes par RT-qPCR sur ETBE.....	118
V – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	131
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139
ANNEXES	153
RESUME	160
ABSTRACT.....	160

Liste des figures et tableaux

FIGURE 1.1. COMPOSES HYDROCARBURES ET NON HYDROCARBURES PRESENTS DANS LE PETROLE BRUT (SOLTANI ET AL. 2004).....	10
FIGURE 1.2. COMPOSITION D'UNE ESSENCE BRITISH PETROLEUM (BP) EN ESPAGNE EN MAI 2003 (ROSELL ET AL. 2006).....	11
TABLEAU 1.1. PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES ESSENCES ADDITIFS OXYGENES.....	12
(FOGG ET AL. 1998)	12
FIGURE 1.3. STRUCTURE DES ETHERS-CARBURANTS ET DES ALCOOLS ASSOCIES	13
TABLEAU 1.2. VARIATIONS DES EMISSIONS DES ECHAPPEMENTS DUES A L'EMPLOI DE CARBURANTS OXYGENEES (GUIBET 1997)	14
FIGURE 1.3. LES DIFFERENTS TYPES D'AQUIFERES (SOURCE: HTTP://WWW.BRGM.FR/)	17
FIGURE 1.4. DIMENSIONS RESPECTIVES DES PANACHES DE MTBE ET DE BENZENE.	18
(WILSON, 2003).....	18
FIGURE 1.5. MODES DE CONTAMINATION DES AQUIFERES PAR LES POLLUANTS DE TYPE HYDROCARBURES (COZZARELLI ET BAEHR, 2003).....	19
FIGURE 1.6. SOURCE DE POLLUTION DES SOLS DANS 16 PAYS EUROPEENS (HTTP://WWW.EEA.EUROPA.EU/DATA-AND-MAPS/DATA/SOIL-CONTAMINATION-1)	20
FIGURE 1.7. VOIE DE BIODEGRADATION AEROBIE DU MTBE (HYMAN 2012).....	24
FIGURE 1.8. VOIE DE BIODEGRADATION DE L'ETBE CHEZ <i>R. RUBER</i> IFP 2001 (LOPES FERREIRA ET AL. 2006)	26
FIGURE 1.9. STRUCTURE DE L'OPERON <i>ETH</i> CHEZ <i>R. RUBER</i> IFP 2001 (CHAUVAUX ET AL. 2001).....	27
FIGURE 1.10. COMPARAISON DE LA STRUCTURE DES LOCUS <i>ETH</i> CHEZ <i>R. RUBER</i> IFP 2001, <i>R. ZOPFII</i> IFP 2005 ET <i>GORDONIA</i> SP. IFP 2009 (BEGUIN ET AL., 2003).....	28
FIGURE 1.11. ORGANISATION ET ROLE DES GENES <i>MPD</i> DANS LE METABOLISME DU MTBE CHEZ <i>M. AUSTROAFRICANUM</i> IFP 2012 (LOPES FERREIRA ET AL. 2006).....	28
FIGURE 1.12. ORGANISATION DE L'OPERON <i>THM</i> (MASUDA ET AL. 2009)	29
TABLEAU 2.1. ÉCHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX D'ORIGINE ET ENRICHISSEMENTS EFFECTUES	37
TABLEAU 2.2. LISTE DES MICRO-ORGANISMES UTILISES DANS NOS ETUDES	38
TABLEAU 2.3. CARACTERISTIQUES DES COMPOSES ETUDIES.....	41
TABLEAU 2.4.1. PRESENTATION DES DIFFERENTS COUPLES D'AMORCES UTILISES	45
TABLEAU 2.4.2. PRESENTATION DES DIFFERENTS COUPLES D'AMORCES UTILISES (SUITE)	46
TABLEAU 2.5.1. CONDITIONS A UTILISER POUR LE PROGRAMME PCR AVEC LE COUPLE PA/PH.....	47
TABLEAU 2.5.2. CONDITIONS A UTILISER POUR LE PROGRAMME PCR AVEC LE COUPLE M13F/M13R	47
TABLEAU 2.5.3. CONDITIONS A UTILISER POUR LE PROGRAMME PCR AVEC LE COUPLE 341F/803R	47
TABLEAU 2.5.4. CONDITIONS A UTILISER POUR LE PROGRAMME PCR TOUCH DOWN.....	48
POUR LA PCR-DGGE	48
TABLEAU 2.5.5. CONDITIONS A UTILISER POUR LE PROGRAMME PCR	48
AVEC LE COUPLE RISA-F/RISA-R	48
TABLEAU 2.5.6. CONDITIONS A UTILISER POUR LE PROGRAMME PCR AVEC LES DIFFERENTS AUTRES COUPLES DES GENES.....	48
FIGURE 2.1. MESURE DES CONCENTRATIONS EN ACIDES NUCLEIQUES PAR QUBIT	49
TABLEAU 2.6. LISTE DES AMORCES UTILISEES EN qPCR ET RT-qPCR.....	50
TABLEAU 2.7.1. PREPARATION DES SOLUTIONS DE MIGRATION	57
TABLEAU 2.7.2. PREPARATION DU GEL DE CONCENTRATION (STACKING GEL).....	58
FIGURE 2.2. CARTE DU PLASMIDE pCR TM 4-TOPO [®]	59
TABLEAU 2.8. CONDITIONS D'ANALYSE PAR CPG/SPLIT/FID SUR COLONNE PONA	62
FIGURE 3.1. ORGANISATION ET DEMARCHE EXPERIMENTALE	66
FIGURE 4.1. CINETIQUES DE DEGRADATION DE L'ETBE PAR LES ENRICHISSEMENTS OBTENUS SUR ETBE (BE1-, GE1-, US6-, FR3- ET FR5-ETBE)	70
FIGURE 4.2. CINETIQUES DE DEGRADATION DU MTBE PAR LES ENRICHISSEMENTS OBTENUS SUR MTBE (GE1-, US2-, US3-, FR5-, FR6- ET BE1-MTBE)	71
TABLEAU 4.1. RECAPITULATIF DES DONNEES SUR LA BIODEGRADATION DES DIFFERENTS ENRICHISSEMENTS	72
TABLEAU 4.2. POURCENTAGES DE DEGRADATION DE DIFFERENTS SUBSTRATS PAR LES ENRICHISSEMENTS ETBE ET MTBE	75
TABLEAU 4.3. SOUCHES ISOLEES POSSEDANT DES CAPACITES DE DEGRADATION	78
FIGURE 4.2. CINETIQUES DE DEGRADATION DE L'ETBE PAR <i>RHODOCOCCLUS</i> SP. IFP 2040, IFP 2041, IFP 4042 ET IFP 2043 ET PAR LA SOUCHE DE <i>BETAPROTEOBACTERIA</i> IFP IFP 2047 ISOLEES A PARTIR DES ENRICHISSEMENTS ETBE	81

FIGURE 4.3. CINETIQUES DE DEGRADATION DU MTBE PAR <i>PSEUDOXANTHOMONAS</i> SP. IFP 2051 ET PAR LA SOUCHE DE <i>PROTEOBACTERIA</i> IFP 2052 ISOLEES A PARTIR DES ENRICHISSEMENTS SUR MTBE	82
FIGURE 4.4. CINETIQUE DE DEGRADATION DU TBA PAR <i>BRADYRHIZOBIUM</i> SP. IFP 2049 ISOLEE A PARTIR DE US6-ETBE	82
FIGURE 4.5. CINETIQUES DE DEGRADATION DE L'ETBE ET DU MTBE PAR <i>PSEUDONOCARDIA</i> SP. IFP 2050 ISOLEE A PARTIR DE FR5-ETBE.....	83
TABLEAU 4.3. CAPACITES DE DEGRADATION DE LA SOUCHE <i>PSEUDONOCARDIA</i> SP. IFP 2050	84
FIGURE 4.6. DEGRADATION DU THF PAR <i>PSEUDONOCARDIA</i> SP. IFP 2050.....	85
FIGURE 4.7. CINETIQUE DE DEGRADATION DE L'ETBE DU MELANGE DES SOUCHES <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2042 ET <i>BRADYRHIZOBIUM</i> SP. IFP 2049.....	86
FIGURE 4.8.1. RESULTATS RISA SUR LA PREMIERE PUCE AGILENT	88
FIGURE 4.8.2. RESULTATS RISA SUR LA SECONDE PUCE AGILENT	88
FIGURE 4.9. ACP REALISEE A PARTIR DES RESULTATS RISA SUR LES 19 ENRICHISSEMENTS (SUR ETBE, MTBE ET TBA).....	89
FIGURE 4.10. DGGE DES DIFFERENTS ENRICHISSEMENTS OBTENUS SUR ETBE OU SUR MTBE	91
FIGURE 4.11. PROFILS DE MIGRATION DGGE DES ENRICHISSEMENTS ETBE OU MTBE	92
FIGURE 4.12. ANALYSE PAR QPCR DES ENRICHISSEMENTS SUR ETBE.....	103
FIGURE 4.13. COMPOSITION DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DES ENRICHISSEMENTS ETBE AU NIVEAU TAXONOMIQUE PHYLUM/CLASSE.....	104
FIGURE 4.14. REPARTITIONS DES SEQUENCES GENES CODANT L'ARNr 16S POUR CHAQUE ENRICHISSEMENT....	106
TABLEAU 4.3. AMPLIFICATIONS PCR DES DIFFERENTS GENES DE DEGRADATIONS	112
FIGURE 4.15. ARBRES PHYLOGENETIQUES OBTENUS POUR LES GENES DE DEGRADATION ETUDIES.....	113
FIGURE 4.15 (SUITE). ARBRES PHYLOGENETIQUES OBTENUS POUR LES GENES DE DEGRADATION ETUDIES	114
TABLEAU 4.4. GENE DE L'OPERON <i>THM</i> RETROUVES CHEZ <i>PSEUDONOCARDIA</i> SP. IFP 2050	117
FIGURE 4.16. COURBE DE DEGRADATION DE L'ETBE POUR <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2040.....	118
TABLEAU 4.5. DO ET CONCENTRATIONS D'ADN ET D'ARN EXTRAITS DURANT LE SUIVI D'EXPRESSION	119
DES GENES <i>ETHB</i> ET <i>ETHR</i> CHEZ <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2040.....	119
FIGURE 4.17. EXPRESSION DES GENE <i>ETHB</i> ET <i>ETHR</i> CHEZ IFP 2040.....	119
FIGURE 4.18. EXPRESSION DES GENE <i>ETHB</i> ET <i>ETHR</i> CHEZ IFP 2040.....	120
FIGURE 4.19. COURBE DE DEGRADATION DE L'ETBE POUR <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2043.....	121
TABLEAU 4.6. DO ET CONCENTRATIONS D'ADN ET D'ARN EXTRAITS DURANT LE SUIVI D'EXPRESSION	121
DU GENE <i>ALKB</i> CHEZ <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2043	121
FIGURE 4.20. COURBE DE DEGRADATION DE L'ETBE POUR <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2041.....	122
TABLEAU 4.7. DO ET CONCENTRATIONS D'ADN ET D'ARN EXTRAITS DURANT LE SUIVI D'EXPRESSION	123
DU GENE <i>ALKB</i> CHEZ <i>RHODOCOCCUS</i> SP. IFP 2041	123
FIGURE 4.21. EXPRESSION DU GENE <i>ALKB</i> CHEZ IFP 2041	123
FIGURE 4.22. COURBE DE DEGRADATION DE L'ETBE POUR IFP 2047.....	124
TABLEAU 4.8. DO ET CONCENTRATIONS D'ADN ET D'ARN EXTRAITS DURANT LE SUIVI D'EXPRESSION	125
DU GENE <i>ETHB</i> CHEZ IFP 2047.....	125
FIGURE 4.23. EXPRESSION DU GENE <i>ETHB</i> CHEZ IFP 2047	125
FIGURE 4.24. COURBE DE DEGRADATION DE L'ETBE PAR <i>PSEUDONOCARDIA</i> SP. IFP 2050	126
FIGURE 4.25. EXPRESSION DU GENE <i>THMB</i> CHEZ IFP 2050	127
ANNEXE. A.1. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS LES ENRICHISSEMENTS ETBE.....	153
FIGURE. A.2. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS LES ENRICHISSEMENTS MTBE	154
FIGURE. A.3. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS L'ENRICHISSEMENT BE1-ETBE.....	155
FIGURE. A.4. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS L'ENRICHISSEMENT GE1-ETBE.....	156
FIGURE. A.5. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS L'ENRICHISSEMENT US6-ETBE.....	157
FIGURE. A.6. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS L'ENRICHISSEMENT FR3-ETBE.....	158
FIGURE. A.7. ARBRE PHYLOGENETIQUE DES SOUCHES RETROUVEES DANS L'ENRICHISSEMENT FR5-ETBE.....	159

Liste des travaux

Articles

- Y. Le Digabel, S. Demanèche, Y. Benoit, T.M. Vogel, F. Fayolle-Guichard (2013) Ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) biodegradation by a syntrophic association of *Rhodococcus* sp. IFP 2042 and *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 isolated from a polluted aquifer. Applied Microbiology and Biotechnology. DOI 10.2007/s00253-013-4803-3.
- Yoann Le Digabel, Sandrine Demanèche, Yves Benoit, Françoise Fayolle-Guichard, Timothy M. Vogel (2013) Ethyl *tert*-Butyl Ether (ETBE)-degrading microbial communities in polluted groundwater enrichments. **En cours de corrections.** (Soumission prévue dans "Journal of hazardous materials").
- Yoann Le Digabel, Sandrine Demanèche, Françoise Le Roux, Yves Benoit, Françoise Fayolle-Guichard, Timothy M Vogel (2013) Phylogenetic comparison of Ethyl *tert*-Butyl Ether (ETBE) and Methyl *tert*-Butyl Ether (MTBE) enrichments. **En cours de corrections** (Soumission prévue dans "ISME").

Poster

- Yoann Le Digabel, Yves Benoit, Charles W. Greer, Timothy M. Vogel, Françoise Fayolle-Guichard. Biodegradation of ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) by environmental bacteria (présenté à BAGECO-11)

Brevet

- Souches bactériennes *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 (dégradation ETBE/MTBE/TBA) CNCM I-4656 et *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 (dégradation MTBE/TBA) CNCM I-4657. Date de dépôt: 09 mai 2012. Référence DPI: 12/0078.

Liste abrégées

ACP: Analyse à Composante Principale
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
BRGM: Bureau de Recherches Géologiques et Minières
BTEX : Benzène Toluène Ethylbenzène Xylène
CEDRE: Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux
CPG: Chromatographie Phase gazeuse
DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
DHPLC: Denaturing High Performance Liquid Chromatography
DNA-SIP: DeoxyriboNucleic Acid – Stable Isotope Probing
EFOA: European Fuel Oxygenates Association
ETBE: Ethyl *tert*-butyl ether
EUSES : European Union System for the Evaluation of Substances
FID: Flame Ionization Detector
FISH: Fluorescent in situ Hybridization
GHG: Green House Gaz
MM: Milieu Minimum
MTBE: Methyl *tert*-butyl éther
NCBI: National Center for Biotechnology Information
PONA: Paraffins, Olefins, Naphthenes and Aromatics
RDP: Ribosomal Database Project
RISA: Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
RT-qPCR: Retro Transcriptase quantitative Polymerase Chain Reaction
SIMSISH: Secondary Ion Mass Spectrometry In Situ Hybridization
SSCP: Single Strand Conformation Polymorphism
TAME: *tert*-amyl methyl éther
TBA: *tert*-butyl Alcohol
THF: Tétrahydrofurane
T-RFLP: Terminal-Restriction-Fragment Length Polymorphism
TTGE: Temporal Temperature Gel Electrophoresis
USEPA: United States Environmental Protection Agency
USGS: United States Geological Survey
WGA: Whole Genome Analysis

Introduction

Introduction

Depuis les années 70 et la mise en place des pots catalytiques sur les véhicules automobiles, les alkyles de plomb, auparavant employés pour atteindre les spécifications sur les indices d'octane des essences, ont été remplacés par les éthers carburants tels que le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE), et plus récemment, l'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE). Ce remplacement était motivé par le fait que les alkyles de plomb étaient des poisons pour les catalyseurs. Or, outre le fait qu'ils permettent également d'atteindre l'indice d'octane requis, les éthers carburants ne sont pas nocifs pour les pots catalytiques et permettent même une meilleure combustion des essences, diminuant ainsi les rejets gazeux dans l'environnement. Néanmoins, malgré ces effets positifs, et du fait de la grande solubilité des éthers-carburants dans l'eau et de leur utilisation largement répandue, de nombreux cas de contamination des sols et des nappes phréatiques en raison de déversements accidentels (fuites de réservoirs,...), ont été répertoriés surtout pour le MTBE et principalement aux États-Unis, qui furent les premiers utilisateurs.

Les éthers-carburants, qui ne sont donc pas des composants natifs des essences, sont caractérisés par une grande solubilité dans l'eau et par une faible biodégradabilité naturelle. Du fait de ces caractéristiques, ils peuvent être retrouvés dans les aquifères en cas de déversements accidentels d'essences les contenant. Or ces composés dans l'eau ont un seuil de détection par le consommateur qui est très bas, rendant l'eau impropre à la consommation et, de plus, leur toxicité reste discutée. Un projet de législation européenne devrait proposer un seuil-limite autorisé de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le MTBE et l'ETBE dans l'eau afin d'en assurer la qualité. De plus, la publication d'un rapport sur l'évaluation des risques pour différentes substances, incluant le MTBE (mais pas l'ETBE) était prévue en France pour la première moitié de 2013 (Source : Ministère du Développement Durable). La question du devenir de ces molécules dans l'environnement et en particulier dans les aquifères, est donc critique. Au cours de précédentes études, en partie menées par l'IFP, la biodégradation de ces molécules a été étudiée et le rôle de certaines bactéries de l'environnement dans leur biodégradation aérobie a pu être mis en évidence. L'isolement de ces quelques micro-organismes, difficile à réaliser, a ensuite permis de mettre en évidence certains des intermédiaires de biodégradation, comme le *tert*-butanol (TBA), un intermédiaire commun au MTBE et à l'ETBE. Des voies de biodégradation ont pu être proposées (Lopes Ferreira et al., 2006 ; Hyman, 2012). Par la suite, la mise en évidence de gènes bactériens codant différentes enzymes impliquées dans la dégradation de l'ETBE ou du MTBE a permis de confirmer les schémas de ces voies métaboliques.

Néanmoins, les connaissances sur la toxicité et la biodégradabilité de l'ETBE et du MTBE restent encore incomplètes au regard de leur impact environnemental potentiel. En particulier, et bien que des études sur sites contaminés aient pu montrer (principalement aux États-Unis et dans le cas du MTBE) que l'atténuation naturelle de ces sites, c'est à dire, la disparition naturelle sans intervention humaine, était problématique, il n'existe pas à ce jour d'études globales sur la fréquence à laquelle les micro-organismes dégradeurs et les gènes de dégradation identifiés sont retrouvés dans l'environnement. Ces données sont pourtant fondamentales pour juger l'impact de ce polluant et pour proposer des techniques adaptées de

biorestauration des sites pollués. De ce point de vue, la situation vis-à-vis de l'ETBE, est encore moins claire. Pour deux raisons, principalement : (i) ce composé est utilisé de façon plus récente en Europe et au Japon en remplacement du MTBE et (ii) sa recherche systématique dans les aquifères contaminés par des essences n'a pas été rendue obligatoire en Europe ce qui fait qu'on ne connaît pas l'état de la pollution des aquifères. Malgré cela, l'ETBE est actuellement une des principales voies d'utilisation du bio-éthanol comme alternative à l'addition d'éthanol pur dans les essences (<http://www.biofuelstp.eu/etbe.html>) et en Europe la concentration d'ETBE maximale autorisée dans les essences est de 22% (v/v). La consommation globale d'ETBE a atteint 3 millions de tonnes, dont 2 millions de tonnes en Europe de l'Ouest et il existe environ 30 usines de production (France, Espagne, Pologne). Dans le même temps, la demande mondiale en MTBE reste élevée (12 millions de tonnes en 2011).

Au cours de précédents travaux, des échantillons d'aquifères contaminés par du MTBE et/ou de l'ETBE ont été incubés en présence d'ETBE, de MTBE ou de TBA afin d'obtenir des enrichissements en provenance de différents sites géographiques (USA, France, Allemagne et Belgique).

Les objectifs de ces travaux de thèse concernent plusieurs domaines. Le travail s'effectuera à partir des enrichissements sur ETBE et sur MTBE, obtenus à partir d'échantillons d'aquifères de plusieurs sites géographiques différents, et ayant été affectés par des pollutions par des éthers (ETBE, MTBE ou TAME). Plusieurs problématiques seront abordées:

- Quelles sont les capacités de dégradation de ces enrichissements pour les substrats leur servant de source de carbone (ETBE / MTBE), mais également, quelles vont être les capacités de dégradation de ces enrichissements pour des composés que l'on retrouve fréquemment dans les essences (BTEXs, *n*-alcane)?
- Quelles vont être les communautés bactériennes au sein de ces enrichissements ayant des origines variées et ayant été affectées par des pollutions différentes? Y'a-t-il des groupes bactériens en particulier qui vont émerger après cette pression de sélection, ou qui vont être spécifiques d'un substrat de croissance? Quelles vont être les souches bactériennes impliquées directement dans la dégradation des composés comme l'ETBE, le MTBE et le TBA?
- Quels vont être les gènes impliqués dans la dégradation de l'ETBE et du MTBE au sein de nos enrichissements? La recherche des gènes connus dans la littérature sera-t-elle suffisante pour expliquer les phénomènes de dégradation? De quelle façon seront exprimés ces gènes?

Ainsi, les capacités et performances de dégradation de l'ETBE et du MTBE des différents enrichissements obtenus sur ETBE (cinq) ou sur MTBE (six) seront évaluées, de même que leurs capacités de dégradation vis-à-vis d'autres composés des essences (composés monoaromatiques et *n*-alcane). La diversité microbienne dans les différents enrichissements sera étudiée en utilisant des méthodes classiques d'empreinte moléculaire (Ribosomal

Intergenic Spacer Analysis, ou RISA, ainsi que Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, ou DGGE) ou en réalisant des banques de clones des gènes codant l'ARNr 16S. Parallèlement, l'isolement de micro-organismes impliqués dans la dégradation de l'ETBE ou du MTBE sera effectué, puis les micro-organismes obtenus seront caractérisés et leurs capacités de dégradation étudiées, ainsi que leur rôle dans les enrichissements (qPCR). Les différents gènes connus impliqués dans la biodégradation de l'ETBE et du MTBE seront recherchés (PCR) dans les enrichissements et dans les micro-organismes isolés puis leur expression étudiée en présence de ces substrats (RT-qPCR).

La thèse est intégrée dans un projet ANR Blanc International France-Hongrie intitulé Biodégradabilité des composés oxygénés des essences (ETBE et MTBE) : Micro-organismes - Mono-oxygénases - Fonctionnalité (acronyme MiOxyFun). Le travail de thèse a été réalisé sur deux sites : l'équipe de Génomique Microbienne Environnementale du laboratoire Ampère de l'École Centrale de Lyon (ECL) à Écully et le département "Biotechnologie" d'IFPEN à Rueil-Malmaison, ces deux laboratoires étant partenaires du projet MiOxyFun.

Le professeur Timothy Vogel (ECL) est Professeur à l'université Claude Bernard Lyon1, et le Docteur Françoise Fayolle-Guichard, promotrice de la thèse à IFPEN, est Directrice de Recherche associée. Le Docteur Sandrine Demanèche (ECL) a encadré la partie de la thèse consacrée à l'étude des gènes et de leur expression.

I – Étude bibliographique

I – Étude bibliographique

Cette étude bibliographique a pour but la description de la connaissance actuelle de la biodégradation des additifs tels que le MTBE et l'ETBE. Cette dégradation, souvent considérée comme difficile, est en partie dépendante de la structure de ces molécules, mais les enzymes découvertes comme étant impliquées dans leur dégradation sont souvent les mêmes que pour la dégradation d'autres molécules pétrolières. La description de la composition du pétrole, ainsi que la dégradation de ces molécules sont donc importantes pour mieux comprendre l'évolution de la capacité microbienne à dégrader le MTBE et l'ETBE. L'état de l'art sur les connaissances acquises concernant la biodégradation du MTBE et de l'ETBE (micro-organismes, voies de dégradation, gènes/enzymes impliqués) sera également effectué. Une dernière partie de cette étude sera consacrée à un état des lieux des approches utilisées pour l'étude de communautés bactériennes environnementales, étant donné la dépendance de cette thèse vis à vis des techniques de biologie moléculaire mettant en évidence la diversité des micro-organismes dans les enrichissements, la caractérisation des isolats en termes d'identité, ainsi que l'expression des gènes impliqués dans la dégradation du MTBE et de l'ETBE.

I – 1. Composition des essences

I – 1 – 1. Les essences

Les produits composant le pétrole brut sont présentés dans la figure 1.1. Pour obtenir en produit final de l'essence de moteur, le premier traitement appliqué sur le pétrole brut dans les unités de fabrication d'une raffinerie est un fractionnement basé sur une distillation. On obtient ainsi différentes "coupes pétrolières" qui peuvent parfois être commercialisées ou utilisées dans la constitution de produits finis. Mais la plupart du temps, des traitements de raffinage doivent être effectués sur ces coupes pour améliorer leur qualité et ainsi mieux répondre aux exigences des spécifications demandées, ou pour les convertir nominativement afin de répondre quantitativement aux besoins du marché. Les composés oxygénés ne sont certes pas identiques aux additifs dont il est sujet dans cette thèse, mais leurs structures sont suffisamment proches pour attirer notre attention sur la possibilité de l'adaptation bactérienne.

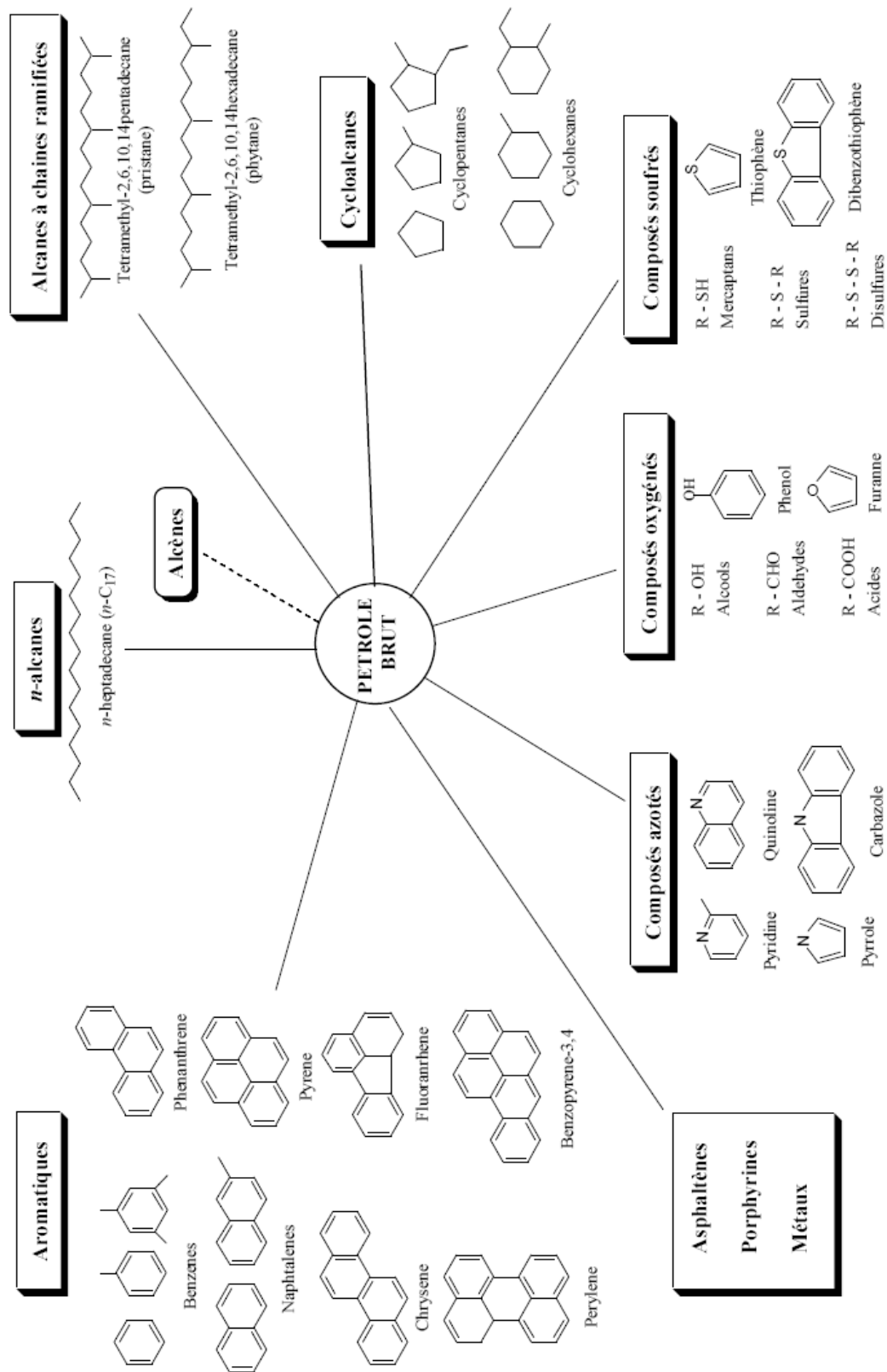


Figure 1.1. Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Soltani et al., 2004)

Par conséquent, quatre différents procédés de raffinage sont appliqués actuellement :

- Le reformage catalytique des essences lourdes transformant des *n*-alcanes et des alcanes cycliques en hydrocarbures aromatiques (réformât) ;
- L'isomérisation des essences plus légères qui permet la transformation des *n*-alcanes en iso-alcanes ;
- Le craquage catalytique transformant les fractions lourdes du pétrole brut en molécules plus légères ;
- L'alkylation produisant des iso-alcanes en C₈ à partir de butène et d'isobutane.

Ainsi, les différentes catégories d'essence sont confectionnées par les raffineurs à partir des différentes "bases" produites au cours du raffinage et une essence contient environ 300 substances chimiques différentes. Un exemple de composition d'essence est présenté ci-dessous (figure 1.2).

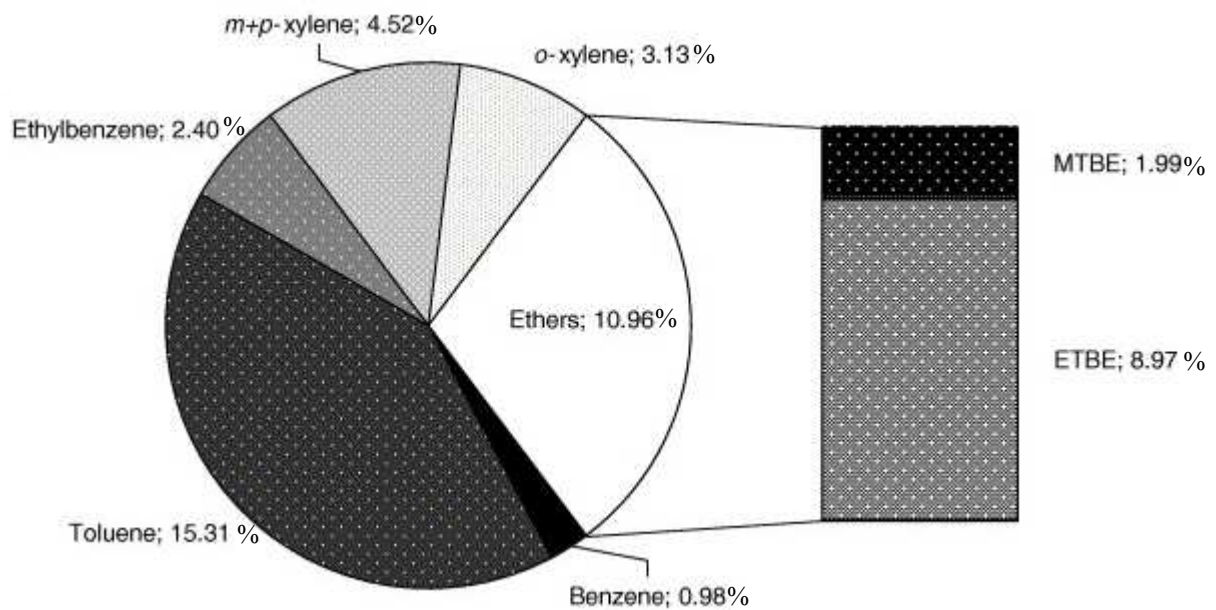


Figure 1.2. Composition d'une essence British Petroleum (BP) en Espagne en mai 2003 (Rosell et al., 2006)

I – 1 – 2. Additifs des essences

La combustion de l'essence requiert l'ajout d'additifs favorisant au mieux cette étape. Ces additifs inhibent les réactions d'oxydation des composés organiques et rallongent le délai d'auto-inflammation des carburants. Les alkyles de plomb étaient autrefois ajoutés aux essences afin d'obtenir la valeur d'indice d'octane requise.

Indice d'octane : Nombre d'une échelle conventionnelle, entre 0 et 100, exprimant la résistance à la détonation des carburants utilisés dans les moteurs à allumage commandé. L'indice d'octane d'un carburant est déterminé en comparant, dans un moteur monocylindre à compression variable, sa tendance à la détonation avec celles de mélanges de référence d'indices d'octane connus. Les carburants de référence sont deux hydrocarbures purs choisis pour leur comportement extrême au point de vue détonation: l'heptane normal, très détonant et affecté conventionnellement d'un indice d'octane égal à 0, et un iso-octane, le triméthyl 2-2-4 pentane, réfractaire à la détonation et affecté d'un indice d'octane égal à 100.

Néanmoins, l'obligation de produire des voitures disposant d'un pot catalytique à partir de 1970 a vu l'apparition de nouveaux composés. Les alkyles de plomb, néfastes pour les catalyseurs et l'environnement, ont de fait été remplacés par des éthers-carburants tels que le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE), dans un premier temps, puis l'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) en Europe (France, Espagne, Allemagne, Belgique...) (tableau 1.1 et figure 1.3).

Tableau 1.1. Principales caractéristiques des essences additifs oxygénés (Fogg et al., 1998)

Produits	Structure	Masse molaire	Point d'ébullition (°C)	Densité (kg.L ⁻¹) à 20 °C	Solubilité dans l'eau (g.L ⁻¹)	RON*
Essence	-	-	30-190	0,72-0,77	-	95
Méthanol	CH ₃ OH	32,04	64,7	0,79	totale	126
Éthanol	CH ₃ CH ₂ OH	46,07	78,3	0,79	totale	120
MTBE	CH ₃ OC(CH ₃) ₃	88,15	55,3	0,74	48	118
ETBE	CH ₃ CH ₂ O(CH ₃) ₃	102,18	72,8	0,74	12	117
TAME	CH ₃ O(CH ₃) ₂ CH ₂ CH ₃	102,18	86,3	0,77	12	114
TBA	(CH ₃) ₃ COH	74,12	82,8	0,79	totale	113

* Research Octane Number (RON) : caractérise la qualité de la combustion de l'essence, ainsi un indice RON de 95 est requis en Europe pour un supercarburant.

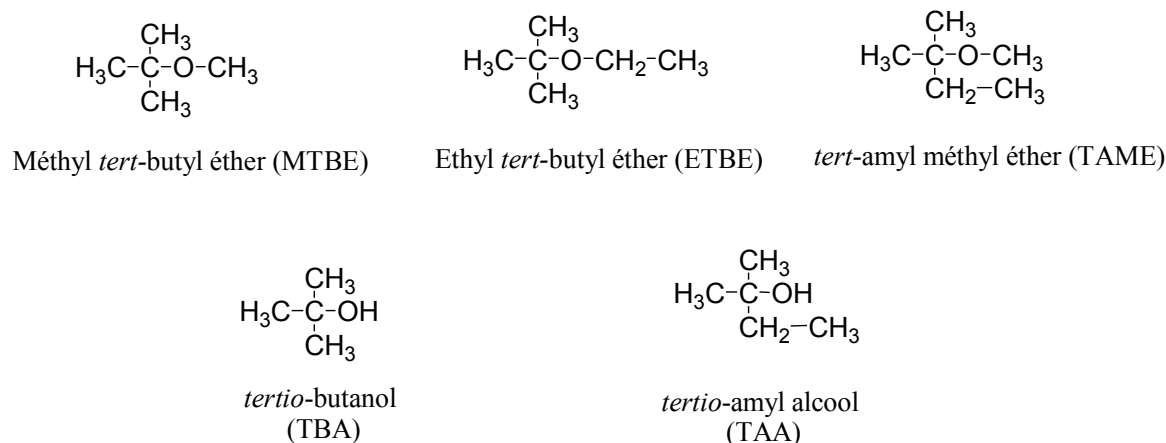


Figure 1.3. Structure des éthers-carburants et des alcools associés

L'ETBE est le produit d'une synthèse chimique avec ajout d'éthanol sur de l'isobutène, tandis que le MTBE est produit grâce à l'ajout de méthanol sur de l'isobutylène.

Ces composés oxygénés se caractérisent par des indices d'octane élevés (Research Octane Number: RON), supérieurs à 100 (tableau 1.1). Pour une même famille de produits, les indices d'octane diminuent avec le nombre d'atomes de carbone, mais augmentent avec la ramification des chaînes hydrocarbonées. Pour des gains en indice d'octane du même ordre, les éthers-carburants présentent des avantages par rapport aux alcools comme l'éthanol et le méthanol. Entre autres, l'addition d'éthers n'engendre pas de démixtion eau/essence ; étant donnée la masse volumique propre des éthers, leur addition ne modifie pas la masse volumique des essences. Enfin, la présence d'éthers ne provoque pas d'altérations des matériaux contrairement au méthanol et même à l'éthanol. Par ailleurs, l'addition dans les essences de MTBE, d'ETBE ou d'éthanol permet de réduire les taux de monoxyde de carbone à l'échappement et d'hydrocarbures imbrûlés (tableau 1.2).

Tableau 1.2. Variations des émissions des échappements dues à l'emploi de carburants oxygénés (Guibet, 1997)

Type de pollution	Variations des émissions avec les carburants oxygénés (%) relatives à l'essence sans additifs		
	Éthanol à 10 %	MTBE à 15 %	ETBE à 17 %
Hydrocarbures	-4,9	-6,5	-5,2
CO	-13,4	-9,3	-14,6
NO, NO ₂ (NOx)	+5,1	+3,6	+5,5
Formaldéhyde	+19,3	+15,8	+17,1
Acétaldéhyde	+159	-0,9	+256
Parking	+30,3	-5,8	-5,0
Arrêt*	+50,1	+13,0	+9,5

* Après fonctionnement

Certains pays européens ont fait le choix de l'ETBE pour remplacer le MTBE. Ceci permet en effet d'utiliser de l'éthanol produit à partir de la biomasse lors de la synthèse de l'ETBE et de lui conférer une qualification "biocarburant". En 2011, sa consommation totale était de 3 millions de tonnes. Malgré l'utilisation croissante d'éthanol dans les essences, le marché de l'ETBE montre toujours une tendance positive (<http://www.efoa.eu/>). La concentration en ETBE dans les essences peut aller jusqu'à 22 % (<http://www.biofuelstp.eu/etbe.html>). Ce composé présente de plus l'avantage par rapport à l'éthanol d'avoir un meilleur ratio hydrogène / carbone, permettant ainsi un rejet moindre de CO₂ par unité d'énergie et moins d'émissions de gaz à effet de serre GHG (Croezen et al., 2009).

Enfin, il a été montré que les émissions de gaz venant des moteurs à essence pouvaient être réduites en améliorant la combustion avec l'ajout de 2-15 % de composés oxygénés au pétrole (Holopainen et al., 2013), l'ETBE étant même reconnu comme ayant des capacités supérieures au MTBE concernant l'indice d'octane (Yee et al., 2013).

I – 2 – Toxicité et risques sanitaires dus aux éthers carburants (MTBE / ETBE)

Du fait de l'utilisation massive des éthers-carburants, il est indispensable d'estimer leur toxicité et leur écotoxicité afin de savoir s'ils peuvent représenter un danger sanitaire.

À l'heure actuelle, l'évaluation de la toxicité et du pouvoir cancérigène du MTBE est issue d'études de toxicité effectuées sur les rongeurs. Après inhalation à fortes doses, le MTBE, se

trouve réparti dans le cerveau, les reins et le foie, où il est métabolisé en TBA et formaldéhyde (Hong et al., 1997a ; Hong et al., 1997b ; Turini et al., 1998). L'effet de l'ingestion par les rats de TBA ajouté dans leur eau de boisson à des teneurs de 0 à 5 mg/L a été étudié sur une période de deux ans. Les rats mâles ont présenté des tumeurs rénales alors que rien n'a été observé chez les femelles (Cirvello et al., 1995).

D'autres études effectuées au cours d'expositions chroniques de rongeurs au MTBE suggèrent que ce produit est cancérigène pour ces animaux (Belpoggi et al., 1997 ; Bird et al., 1997). L'effet cancérigène sur les humains fait encore l'objet de débats, les mécanismes de cancérogenèse pouvant être différents chez l'homme et chez les rongeurs (Hartley et al., 1999). Par précaution, et en l'absence d'une estimation fiable des risques liés à une faible exposition au MTBE, l'USEPA a classé ce composé comme potentiellement cancérigène (Classe C, cancérigène pour l'homme : classification USEPA). Pour sa part, le «Comité Californien d'Identification des Produits Cancérigènes» a décidé de ne pas considérer le MTBE comme dangereux, compte tenu du fait qu'aucune recherche scientifique n'a pu mettre en évidence un effet du MTBE sur le développement humain ou sa reproduction (Ahmed et al., 2001). Ce composé est toutefois irritant pour la peau au cours d'exposition de longues durées (Malm et al., 2003) et une étude plus récente a montré que l'exposition au MTBE pouvait endommager l'ADN de fibroblastes de rats (Sgambato et al., 2009). Par ailleurs, une étude sur l'effet de l'exposition chronique d'organismes aquatiques au MTBE a conclu que les concentrations de ce composé dans les eaux de surface généralement détectées aux USA ($< 100 \mu\text{g.L}^{-1}$) ne représentent pas un risque pour ces organismes (Mancini et al., 2002).

Une étude d'évaluation des risques a été effectuée à la demande de la Communauté Européenne concernant spécifiquement le MTBE. Cette étude concernait tous les usages possibles du MTBE (comme additif des essences, comme intermédiaire dans la production d'isobutylène et comme solvant à usage spécifique). L'étude a été effectuée en utilisant le modèle mathématique "European Union System for the Evaluation of Substances" (EUSES) pour le calcul de prédiction des concentrations environnementales (Predicted Environmental Concentrations ou PEC) ainsi que de l'exposition humaine. Cette enquête a conclu que le risque environnemental de l'utilisation du MTBE était faible (Ahlberg et al., 2001). Du point de vue de la cancérogénicité du MTBE, l'Union Européenne a établi une classification "intermédiaire entre non classé et de catégorie 3" (<http://www.ineris.fr/>). En ce qui concerne le caractère génotoxique, le MTBE n'a pas fait l'objet d'une classification par l'Union Européenne, mais celle-ci a statué qu'au vu des données disponibles, le MTBE peut être considéré comme non mutagène.

Concernant la toxicité de l'ETBE, des études récentes ont montré qu'à des concentrations de l'ordre de 2500 ppm, chez des embryons de poissons zébra, l'ETBE pouvait perturber le fonctionnement de plusieurs organes comme le cœur, et pouvait également altérer significativement le niveau de transcription de gènes requis pour le développement (Bonventre et al., 2012). Une autre étude effectuée sur des rats a montré que l'ETBE pouvait avoir un pouvoir carcinogène sur le foie, et pouvait agir comme un inducteur de tumeurs sur la thyroïde, l'estomac, le colon, les reins et la vessie (Hagiwara et al., 2011). A l'heure actuelle, concernant la santé humaine, aucun effet significatif en termes de toxicité générale,

de neurotoxicité, de toxicité sur la reproduction ou de génotoxicité n'a été constaté. Toutefois, des études permettant d'évaluer cet effet carcinogène de l'ETBE sur les humains ne sont actuellement toujours pas disponibles (MacGregor, 2007).

L'exposition au *tert*-butanol (TBA), l'intermédiaire de dégradation du MTBE et de l'ETBE endommage l'ADN des fibroblastes de rat (Sgambato et al., 2009). Le TBA a été classé comme cancérigène de classe C, c'est-à-dire comme un cancérigène possible de l'homme.

Néanmoins, pour conclure, et malgré des données sur la toxicité qui sont parfois contradictoires, il reste que la présence de MTBE ou d'ETBE dans l'eau, même à de faibles concentrations, est détectable et que le goût désagréable associé rend l'eau impropre à la consommation. La pollution par les éthers-carburants pose donc le problème de la pérennité des ressources en eau. Il a été déduit de plusieurs études les chiffres suivants pour la détection du MTBE par le goût : 24-135 $\mu\text{g.L}^{-1}$, et par l'odorat : 15-180 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (<http://www.epa.gov/>). Aux USA et en Europe, il est maintenant admis qu'une teneur en MTBE inférieure ou égale à 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ permet d'éviter les risques pour la santé humaine et permet de ne pas avoir de détection par le consommateur par le goût et/ou l'odorat (<http://www.epa.gov/>). En Europe, une recommandation similaire a été faite concernant l'ETBE.

I – 3. Pollution des aquifères et impact environnemental

Dans l'environnement terrestre, les systèmes aquifères sont le principal compartiment à être impacté par les pollutions aux essences et par conséquent, aux éthers-carburants.

I – 3 – 1. Les aquifères

Les stocks d'eau mondiaux sont composés majoritairement d'eau salée (97%). Les réserves d'eau douce (38 millions de km^3), ou eaux de géosphère, sont contenues dans les glaces et neiges (80 %) et dans les eaux souterraines pour le reste (<http://www.usgs.gov/>). Le stockage via les cours d'eau et les lacs étant considéré comme négligeable, les aquifères représentent un réservoir d'eaux souterraines correspondant à un volume d'environ 8 millions de km^3 et constituent ainsi notre principale ressource en eau douce.

Un aquifère est un corps (couche, massif) de roches perméables à l'eau, à substrat et parfois à couverture de roches moins perméables, comportant une zone saturée et conduisant suffisamment l'eau pour permettre l'écoulement significatif d'une nappe souterraine et le captage de quantités d'eau appréciables. L'aquifère est l'ensemble du milieu solide (contenant) et de l'eau contenue. En fonction de son taux de remplissage, un aquifère peut comporter une zone non saturée en eau (Jamet et al., 2004).

L'eau des nappes aquifères est diversement utilisée en fonction de la zone géographique considérée. Ainsi, la France, qui est le premier pays européen pour les réserves d'eau dans les aquifères, est le 7^{ème} pour l'exploitation de l'eau stockée dans ces nappes mais la répartition est diverse sur le territoire car, en effet, 85 % des communes françaises utilisent l'eau provenant

de sources, de puits ou de captages (Jamet et al., 2004). Aux USA, les aquifères fournissent en eau potable la moitié des consommateurs (<http://www.groundwater.org/>).

La qualité de l'eau dépend entre autres de son renouvellement dans les aquifères qui est donc un facteur important et on distingue différents types de nappes souterraines avec des capacités de renouvellement différentes (figure 1.3) :

- les aquifères libres où l'eau fluctue dans le sol sans contrainte avec une zone non saturée ;
- les nappes alluviales qui sont contenues dans les sables et graviers des fleuves et des rivières (correspondant à 60 % des eaux souterraines captées en France) ;
- les nappes des roches dures fissurées ;
- les aquifères captifs où l'eau est confinée par une couche géologique imperméable (eau fossile).

Il existe 25 nappes captives et 175 nappes libres en France.

Outre leur système d'alimentation, un autre facteur qui influe sur le renouvellement de la nappe est la perméabilité de la roche qui est le reflet de la porosité. La vitesse de l'eau varie énormément selon le type de roches qui la contiennent.

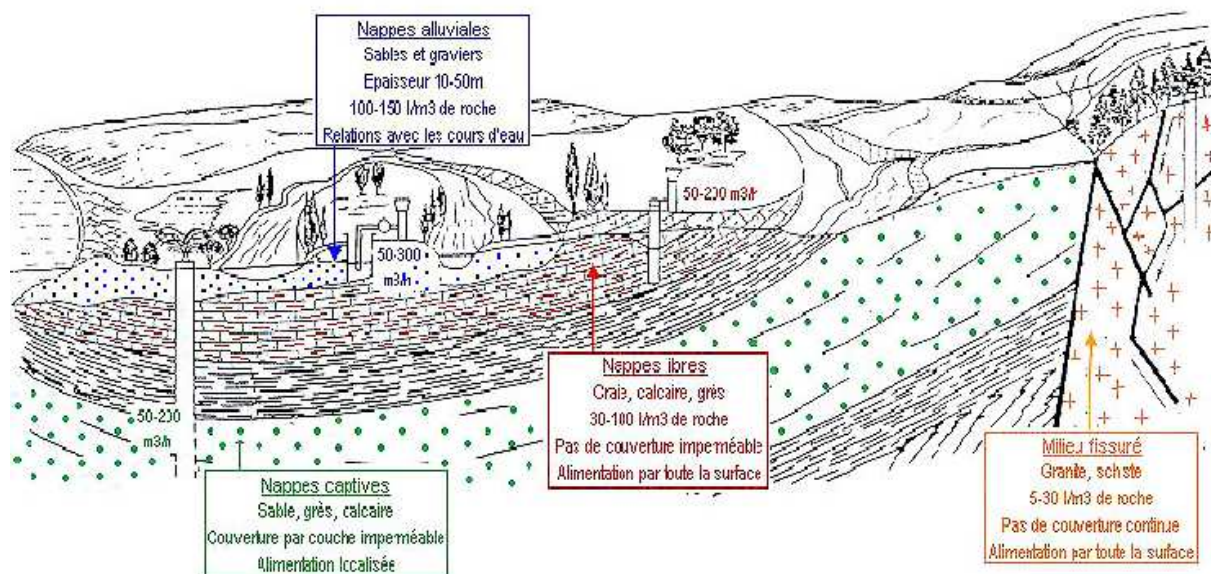


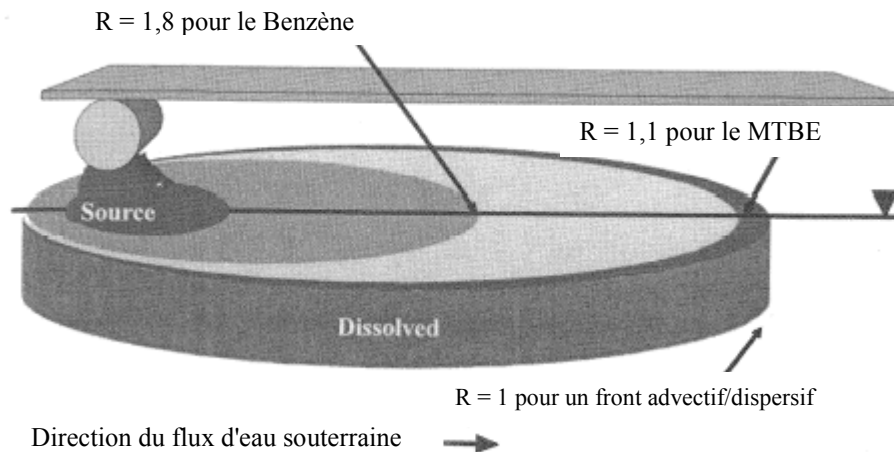
Figure 1.3. Les différents types d'aquifères (source: <http://www.brgm.fr/>)

Les temps de séjour de l'eau dans la nappe sont variables et les mouvements de l'eau peuvent aller de 300 km. an⁻¹ (sables verts du Bassin de Paris) à 0,5 km.an⁻¹ (alluvions du Rhône).

Les durées de renouvellement de l'eau vont de un mois pour un petit aquifère alluvial à dix ans pour un grand aquifère alluvial et même mille ans ou plus pour un grand aquifère captif (Davoust, 2007).

Ces valeurs soulignent bien la nécessité de protéger les aquifères des pollutions car la dispersion liée au taux de renouvellement dans l'aquifère est un des facteurs de la disparition

des pollutions dans les nappes. De plus, lorsque les polluants ne sont pas ou faiblement biodégradables, la dispersion est même le principal facteur permettant la baisse en concentration (Wilson, 2003) comme le montre la comparaison du comportement du benzène par rapport au MTBE (figure 1.4).



R: Retardation Factor (ratio entre la vitesse de diffusion d'une solution par rapport à un contaminant): sert à suivre la vitesse de diffusion d'un polluant dans l'eau.

Figure 1.4. Dimensions respectives des panaches de MTBE et de benzène (Wilson, 2003).

I – 3 – 2. Nature et origine des contaminations des aquifères

Les incidents mettant en cause des hydrocarbures pétroliers sont de loin les plus nombreux et dans certaines conditions les plus visibles (marées noires). De plus, l'origine de ces contaminations est très diverse et peut affecter tous les compartiments environnementaux (air, sol, eau et sédiment). Toutefois, le milieu aquatique et le sol sont fortement concernés par ce type de pollution (figure 1.5).

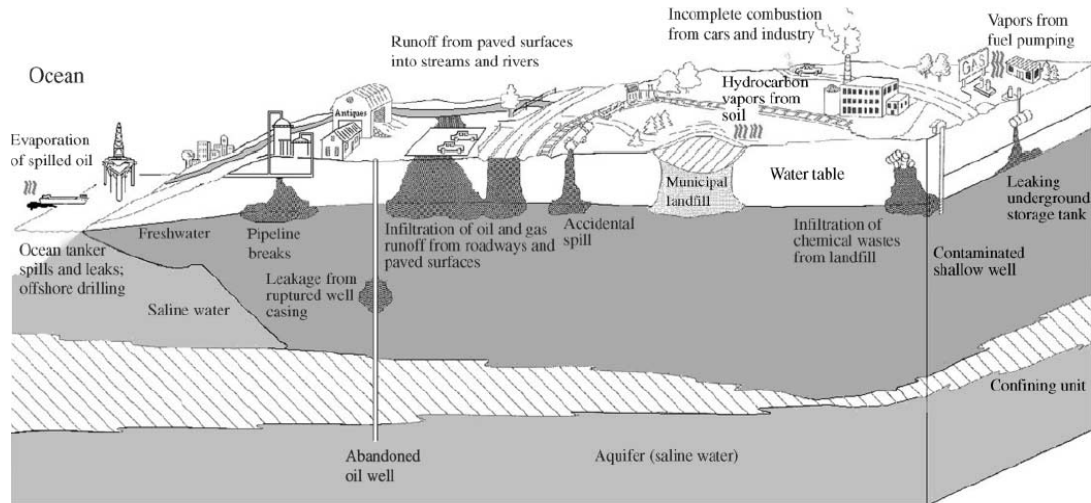


Figure 1.5. Modes de contamination des aquifères par les polluants de type hydrocarbures (Cozzarelli et Baehr, 2003)

Les hydrocarbures pétroliers sont donc une des sources de contamination des sols et des eaux terrestres ainsi que le montre une compilation (figure 1.6) effectuée par l'UE sur 16 pays membres et montrant le poids des hydrocarbures (industrie pétrolière et stations-services, principalement) dans les origines de pollution (<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/soil-contamination-1>).

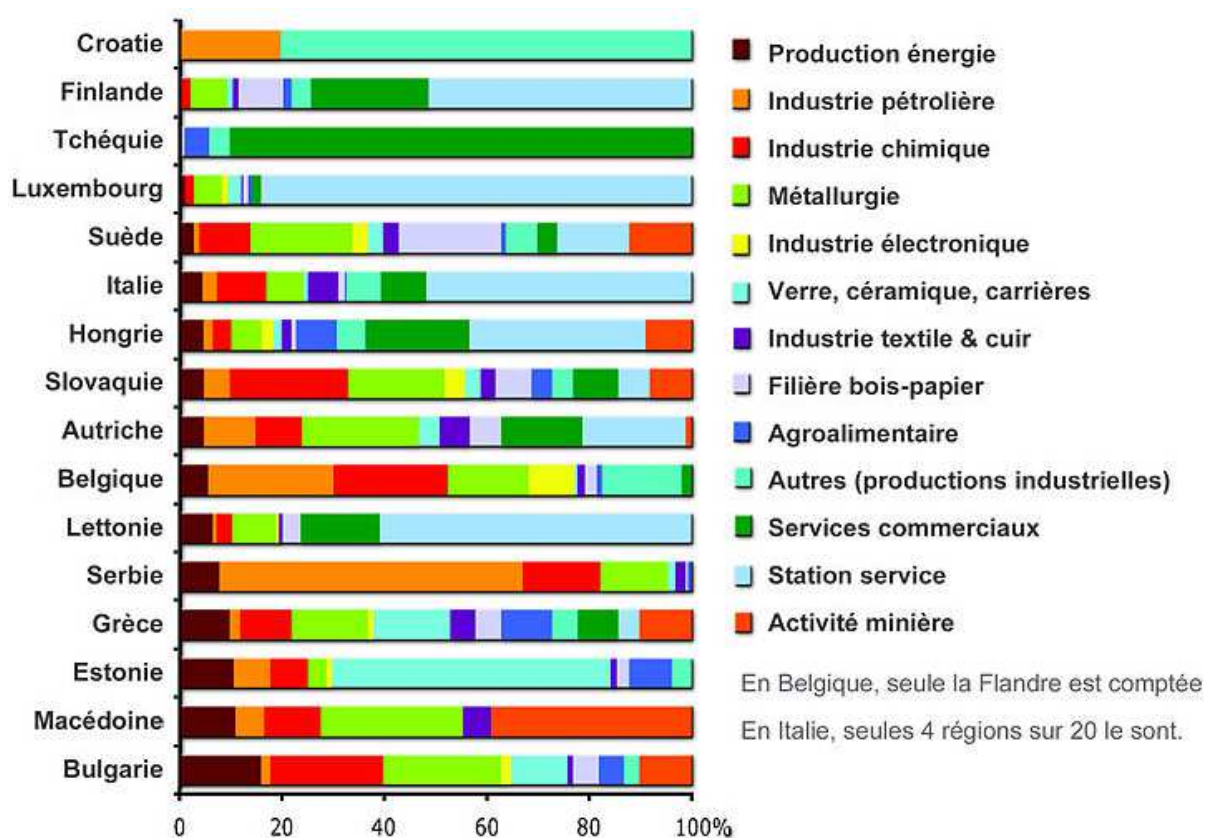


Figure 1.6. Source de pollution des sols dans 16 pays européens
<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/soil-contamination-1>

En France, d'après une mise à jour réalisée en 2013, les données du projet BASOL qui recense les sites pollués français (<http://basol.ecologie.gouv.fr/tableaux/home.htm#nature%20polluants>) montrent que 70 % des pollutions ont un impact sur les nappes aquifères à proximité et que parmi les pollutions constatées, 35 % sont dans la catégorie hydrocarbures ou BTEXs. Il faut souligner que cet inventaire est probablement sous-évalué car il ne recense pas les pollutions par le MTBE ou l'ETBE dont la mesure n'est pas obligatoire réglementairement en France en cas de pollution. Au contraire, les pollutions d'eaux souterraines par le MTBE sont bien documentées aux USA, où ce composé a été utilisé à partir des années 80 (Hatzinger et al., 2001 ; Streger et al., 2002). Le MTBE a d'ailleurs été reconnu comme étant le 3^{ème} composé organique volatil le plus souvent détecté dans les eaux souterraines aux USA (Carter et al., 2008) ; de plus, il est admis que le MTBE est également détecté en présence d'autres composés des essences tels que les BTEXs ou les *n*-alcanes (Jechalke et al., 2010). Récemment (avril 2013), la société Exxon Mobil a même été condamnée à une lourde compensation de 236 millions de \$ US à l'état du New Hampshire dans une affaire de contamination d'eaux souterraines par du MTBE (<http://www.bloomberg.com/news/2013-04-09/exxon-mobile-is-found-neligent-in-new-hampshire-mtbe-use.html>).

Malgré la grande quantité d'ETBE produite, transportée et stockée, l'impact environnemental de ce composé n'a pas été étudié avant son utilisation, et le niveau actuel de contamination des eaux souterraines n'est pas connu, sauf dans deux cas: le premier concernant une étude des teneurs en ETBE dans des échantillons d'eau potable aux Pays-Bas (Van Wezel et al., 2009), et le second concernant un aquifère contaminé en France (Fayolle-Guichard et al., 2012).

I – 4. Diversité bactérienne et génétique au sein des aquifères

Ce sont donc principalement les aquifères qui peuvent être impactés par les éthers-carburants. Même si la biodégradabilité de ces composés est faible, quelques micro-organismes ayant des capacités de biodégradation ont pu être isolés. Après avoir présenté quelle pouvait être cette biodiversité au sein d'aquifères non contaminés, les bactéries possédant des capacités de dégradation pour les éthers carburants et isolées à partir de sites pollués seront décrites, de même que les voies de biodégradation et les gènes connus codant pour des enzymes permettant d'assimiler ces composés.

I – 4 – 1. Diversité bactérienne des aquifères

Des nombreuses études ont montré la présence de micro-organismes dans les eaux souterraines de faible profondeur à des concentrations non négligeables (10^3 à 10^6 bactéries par g) et également dans le cas d'aquifères situés à des profondeurs importantes avec une large diversité bactérienne (Chapelle et al., 1987). La numération directe sans le biais de la mise en culture a mis en évidence que le nombre de cellules viables isolées à partir de tels environnements était bien inférieur au nombre obtenu par comptage direct après marquage à l'acridine (Rusterholtz et al., 1994). Ceci est dû au fait que l'on ne sait pas cultiver la plus grande partie des micro-organismes pour lesquels les méthodes de cultures utilisées ne sont pas adaptées (bactéries à croissance lente,...) et que la plus grosse partie des bactéries prélevées dans l'environnement ne sont pas cultivables sous conditions et sur milieux classiques (Keller et al., 2004 ; Streit et al., 2004).

En utilisant les méthodes d'énumération et de caractérisation classiques des bactéries, la présence majoritaire de bactéries aérobies ou chimiohétérotrophes facultatives a pu être mise en évidence (Balkwill et al., 1989). Une prédominance de bactéries gram-négatives (89 %) a été déterminée dans différents échantillons d'eaux prélevés dans un aquifère sableux du Pléistocène (Bas-Rhin). Ces échantillons présentaient moins de 11 % de bactéries gram-positives dans l'eau alors que les sables prélevés dans ce même aquifère présentait 3 à 4 fois plus de gram-positives (34,7 à 43 % de bactéries gram-positives) (Kölbel-Boelke et al., 1988). La prédominance de bactéries gram-négatives dans les sables d'aquifères n'est pas une généralité car cette proportion est inversée dans le cas des bactéries indigènes d'un aquifère karstique (Rusterholtz et al., 1994). La diversité bactérienne dans les aquifères est donc très variable d'un site à l'autre. Néanmoins, des traits généraux peuvent sans doute être décrits

puisqu'il a été montré que les profils de communautés bactériennes dépendaient de la nature des minéraux présents dans les roches associées à des aquifères non contaminés (Boyd et al., 2007). Par ailleurs, une étude réalisée sur la collection SMCC ("Subsurface Microbial Culture Collection") établie par l'US Department of Energy dont la classification a été réalisée d'après les séquences des gènes codant l'ARNr 16S disponibles a montré que les souches isolées d'environnements terrestres souterrains se situent majoritairement dans 6 grands groupes taxonomiques : (1) bactéries gram-positives à haut % G+C, (2) bactéries gram-positives à bas % G+C, (3) bactéries appartenant au groupe des *Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides*, (4, 5, 6) bactéries appartenant aux subdivisions *Alpha-*, *Beta-* et *Gamma-* des *Proteobacteria* (Balkwill et al., 1997).

I – 4 – 2. Micro-organismes dégradant les éthers carburants

a) Micro-organismes capables de croissance sur MTBE

Bien que les isollements de souches pures permettant la dégradation du MTBE soient longs et fastidieux, plusieurs bactéries G- et G+ capables de dégrader le MTBE ont été isolées. L'origine de ces souches est variable (biofiltres, échantillons d'aquifères pollués par le MTBE, etc.).

Une bactérie à gram négatif, isolée à partir d'un biofiltre, s'est montrée capable de dégrader le MTBE à des concentrations allant jusqu'à 500 mg.L⁻¹ (Hanson et al., 1999). Cette souche, PM1, a été identifiée comme *Methylibium petroleiphilum*, et fait partie de la classe des *Betaproteobacteria* (Nakatsu et al., 2006). Une souche similaire du point de vue des gènes codant l'ARNr 16S avait été identifiée dans un aquifère pollué par du MTBE (Hristova et al., 2003).

Une autre bactérie à gram négatif, *Hydrogenophaga flava* ENV 735, une *Alphaproteobacteria* capable de croissance sur MTBE, a été isolée (Hatzinger et al., 2001). Sa croissance lente sur MTBE est accélérée par l'addition d'extrait de levure (100 mg.L⁻¹). Le MTBE est dégradé (jusqu'à une concentration de 3 g.L⁻¹) en TBA qui s'accumule ensuite de façon transitoire dans le milieu.

La souche *Variovorax paradoxus* CL-8, de la classe des *Betaproteobacteria*, a été isolée dans un enrichissement effectué à partir de boues activées, et est capable d'utiliser le MTBE, le TBA, le 2-hydroxyisobutyrate, le lactate, le méthacrylate et l'acétate comme seules sources de carbone (Zaitsev et al., 2007).

La souche *Aquicola tertiaricarbonis* IFP 2003 ou CIP I-2052 (Piveteau et al., 2001), isolée à partir d'une boue activée de station d'épuration, et faisant partie des *Betaproteobacteria*, est capable de croissance sur TBA, intermédiaire de la dégradation du MTBE, mais pas sur MTBE. Une souche similaire (gènes codant l'ARNr 16S identiques), *Aquicola tertiaricarbonis* L108, a été isolée à partir d'un aquifère contaminé par du MTBE en Allemagne. Dans ce cas, cette souche est capable de croissance sur TBA mais aussi sur ETBE

et MTBE. Il est à noter que cette souche est décrite comme faisant également partie du cluster *Rubrivivax-Roseateles-Leptothrix-Idenella-Aquabacterium* (Rohwerder et al., 2006 ; Lechner et al., 2007).

Mycobacterium austroafricanum IFP 2012 est une bactérie aérobie à gram positif, appartenant au phylum *Actinobacteria*, et capable de pousser sur MTBE comme seule source de carbone et d'énergie (François et al., 2002). Une autre souche, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2015, a été isolée à partir de l'eau de ruissellement d'un bac de stockage d'essence supplémentée par du MTBE, et est également capable de croissance sur MTBE (Lopes Ferreira et al., 2005).

L'étude de la dégradation du MTBE a permis de détecter plusieurs intermédiaires de dégradation et, ainsi, de proposer les voies métaboliques possibles de ce composé (figure 1.7).

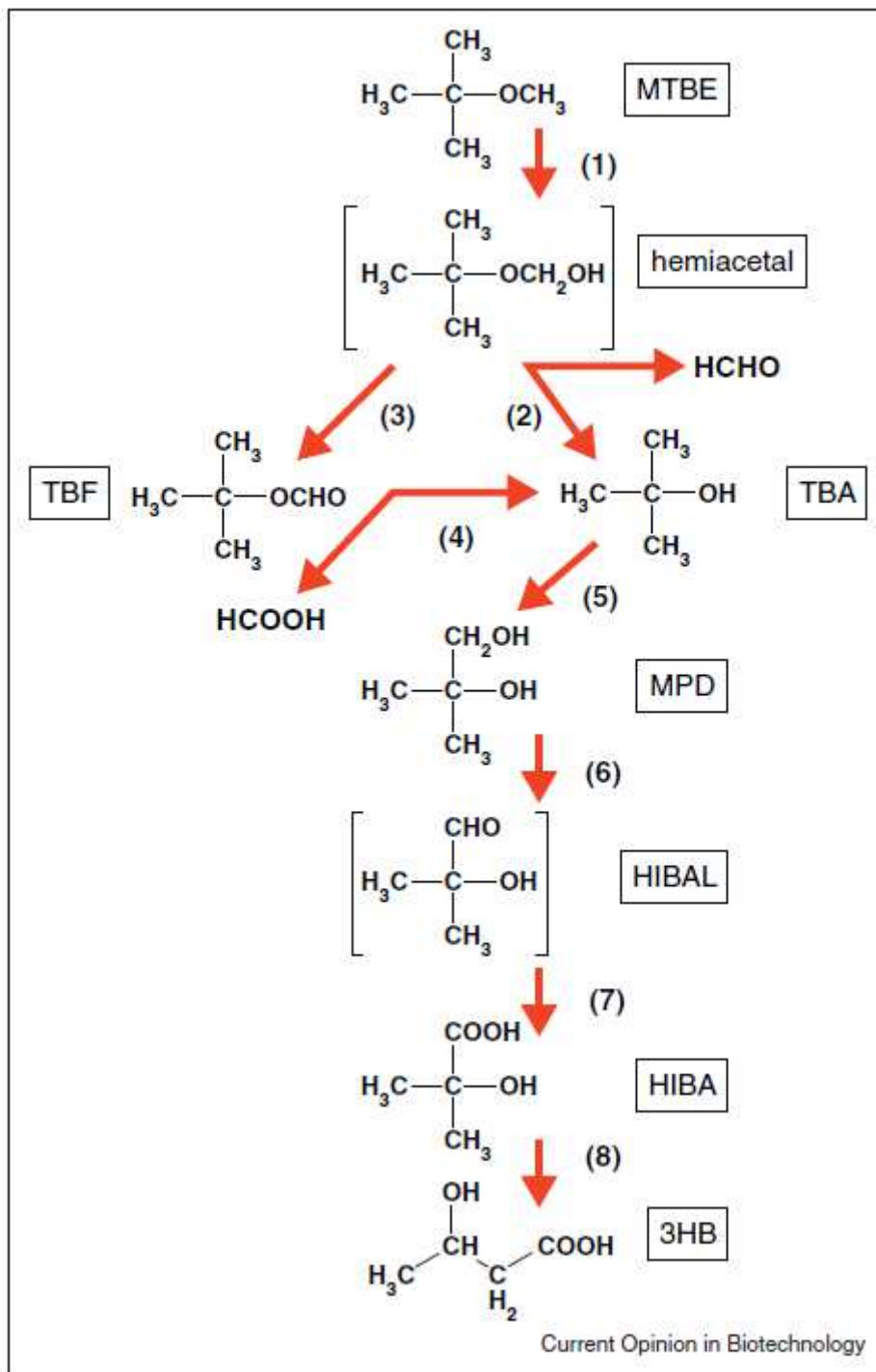


Figure 1.7. Voie de biodégradation aérobie du MTBE (Hyman, 2012)

Enzymes responsables des différentes étapes : (1) mono-oxygénase, (2) réaction abiotique, (3) alcool déshydrogénase, (4) estérase, (5) oxygénase, (6) alcool déshydrogénase, (7) aldéhyde déshydrogénase, (8) mutase.

b) Micro-organismes capables de croissance sur ETBE

De même que pour le MTBE, les isollements de souches permettant la dégradation de l'ETBE s'avèrent être longs et difficiles. Néanmoins, plusieurs bactéries possédant cette capacité de dégradation et appartenant au genre *Rhodococcus* (*Actinobacteria*) ont pu être isolées.

Rhodococcus ruber IFP 2001, isolée d'une boue activée de station d'épuration (Fayolle et al., 2001), et faisant partie du phylum *Actinobacteria*, est capable de se développer en utilisant l'ETBE comme seule source de carbone et d'énergie. L'ETBE est dégradé en TBA qui s'accumule dans le milieu car il n'est pas consommé par cette souche. L'oxydation initiale met en jeu une mono-oxygénase de type cytochrome P450 induite lors de la croissance sur ETBE (Hernandez-Perez et al., 2001). Cette souche est également capable de dégrader le MTBE par cométabolisme après croissance sur ETBE grâce à l'induction du même cytochrome P450 (Urios et al., 2002) mais le MTBE n'est pas substrat de croissance pour cette souche. Un mutant constitutif pour l'expression des gènes *eth*, IFP 2007, a de plus été obtenu (Chauvaux et al., 2001 ; Urios et al., 2002).

Rhodococcus zopfii IFP 2005 et *Gordonia* sp. 2009 (anciennement *Mycobacterium* sp.), isolées à partir de boues activées de stations d'épuration, possèdent également des capacités de croissance sur ETBE (Malandain et al. 2010).

De même, *Rhodococcus wratislaviensis* IFP 2016 et *Rhodococcus aetherivorans* IFP 2017, isolées à partir d'un consortium microbien démontrant des capacités de dégradation pour différents composés pétroliers ou additifs, peuvent également dégrader l'ETBE et le MTBE, mais pas le TBA (Auffret et al., 2009).

L'étude des intermédiaires de la voie de biodégradation de l'ETBE chez *R. ruber* IFP 2001 a permis de proposer une voie de dégradation (figure 1.8).

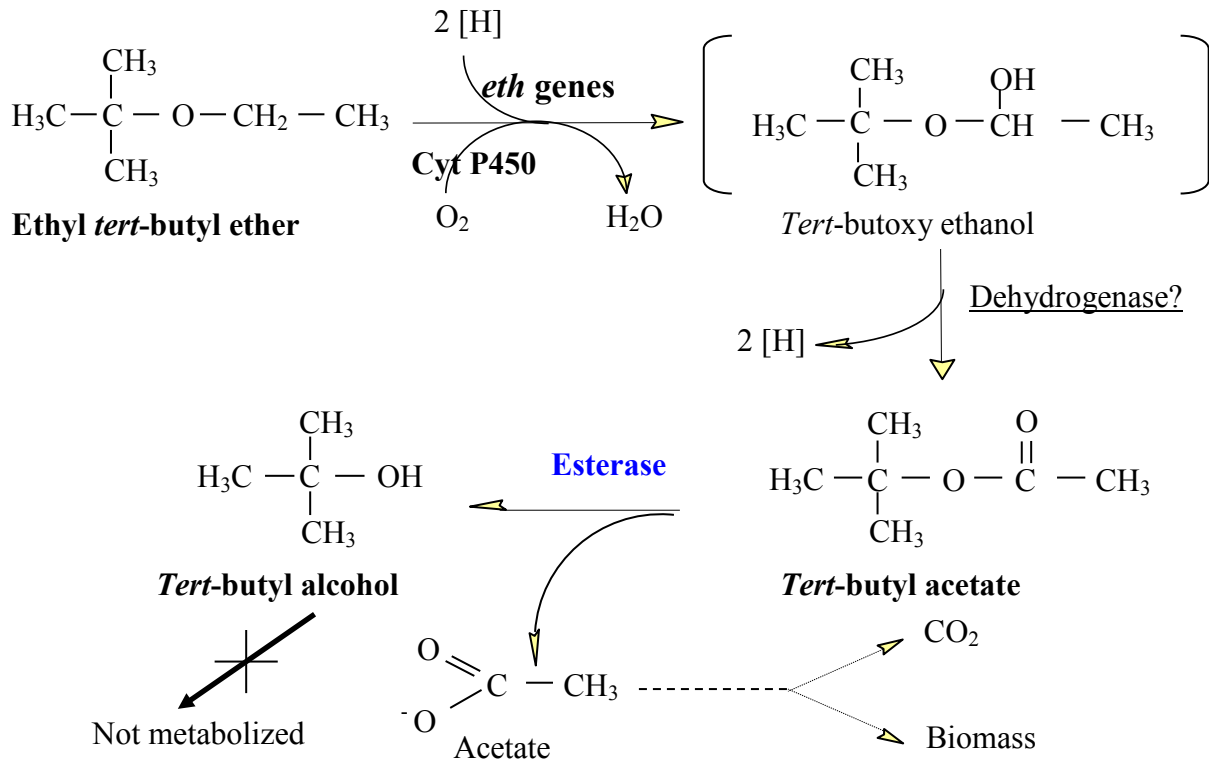


Figure 1.8. Voie de biodégradation de l'ETBE chez *R. ruber* IFP 2001 (Lopes Ferreira et al., 2006)

Enfin, dans une étude récente, l'ETBE semblerait avoir un impact sur la microflore du sol qui se traduirait par une augmentation de la respiration microbienne et l'analyse des acides gras des phospholipides extraits du sol (PFLA) montre une augmentation des bactéries gram-positives, et donc, probablement des *Actinobacteria* (Bartling et al., 2011).

c) Biodégradation des éthers-carburants par cométabolisme

Au début des études de biodégradation du MTBE, l'hypothèse principale était que le cométabolisme était le mode prioritaire de dégradation du MTBE. Ce cométabolisme du MTBE a pu être montré dans plusieurs cas de micro-organismes ayant la capacité d'oxyder les *n*-alcanes :

- *Mycobacterium austroafricanum* JOB5, après croissance sur alcanes, est capable d'oxyder le MTBE et le TBA (House et Hyman, 2010) ;
- *Pseudomonas putida* GPo1, et *Pseudomonas mendocina* KR1 (Smith et Hyman, 2010) qui possèdent le gène *alkB*. (Smith et Hyman, 2010) ;

Le cométabolisme du MTBE a été également montré par différentes souches possédant des monooxygénases de type cytochrome P450, après croissance sur ETBE, *R. ruber* IFP 2001, *R. zopfii* IFP 2005 and *Gordonia* sp. IFP 2009 (Malandain et al., 2010).

Enfin, *Pseudonocardia* sp. ENV478 (Vainberg et al., 2006) et *Pseudonocardia* sp. K1 (Thiemer et al., 2003) poussant sur tétrahydrofurane (THF) sont capables de dégrader le MTBE et l'ETBE après croissance sur THF.

I – 4 – 3. Gènes impliqués dans la dégradation des éthers

Grâce à l'isolement de ces micro-organismes, des études ont été menées afin de caractériser les gènes impliqués dans la biodégradation du MTBE et de l'ETBE. Le premier système caractérisé est le cytochrome P450, une monooxygénase soluble, codé par les gènes *ethRABCD* chez *R. ruber* IFP 2001 (figure 1.9). Ce cluster de gènes est impliqué dans la biodégradation de l'ETBE (Chauvaux et al., 2001). Le gène *ethR* code un activateur transcriptionnel de la famille *AraC/XylS*, *ethA* une ferredoxine réductase, *ethC* une ferredoxine et *ethD* une protéine de fonction encore inconnue inductible par l'ETBE, et nécessaire à la biodégradation. Le gène *ethB* code une monooxygénase de type cytochrome P450. Cette structure génétique est flanquée de deux copies identiques de 5,6 kpb d'un transposon de classe II, ce qui explique que le cluster de gènes peut être perdu aisément par recombinaison homologue. Ce cluster de gènes a également été mis en évidence chez deux autres souches poussant sur ETBE (figure 1.10), *R. zopfii* IFP 2005 et *Gordonia* sp. IFP 2009 (Malandain et al., 2010), où il est très conservé (Chauvaux et al., 2001), mais aussi chez *R. aetherivorans* IFP 2017 (Auffret et al., 2009). Un cluster de gènes similaires et très conservés mais sans le gène *ethR* est présent également dans *A. tertiaricarbonis* L108 (Schuster et al., 2013).

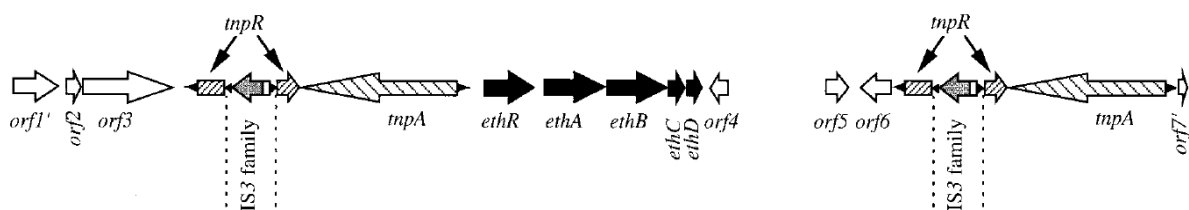


Figure 1.9. Structure de l'opéron *eth* chez *R.ruber* IFP 2001 (Chauvaux et al., 2001)
ethR (régulateur), *ethA* (ferredoxine réductase), *ethB* (cytochrome P450), *ethC* (ferredoxine), *ethD* (protéine de fonction inconnue mais indispensable à l'activité), *tnpA* (transposase), *tnpR* (résolvase)

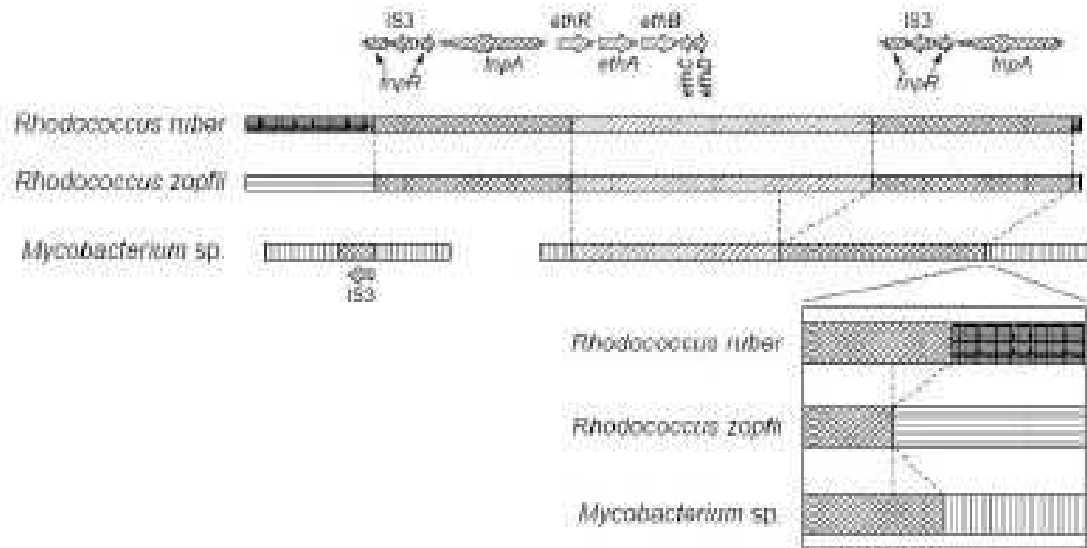


Figure 1.10. Comparaison de la structure des locus *eth* chez *R.ruber* IFP 2001, *R.zopfii* IFP 2005 et *Gordonia* sp. IFP 2009 (Béguin et al., 2003)

Des gènes impliqués dans le métabolisme du MTBE et plus précisément dans l'assimilation du produit d'oxydation du TBA (figure 1.11), le 2- methyl 1,2 propanediol (2-M1, 2-PD) ont par ailleurs été caractérisés (Lopes Ferreira et al., 2006). Il s'agit d'un cluster de gènes *mpd* qui comprend le gène *mpdB* codant un alcool déshydrogénase qui catalyse l'oxydation du 2-M1,2-PD en hydroxyisobutyraldéhyde, lui-même oxydé en acide hydroxyisobutyrique (HIBA) par action d'une aldéhyde déshydrogénase, produit du gène *mpdC* (figure 1.11).

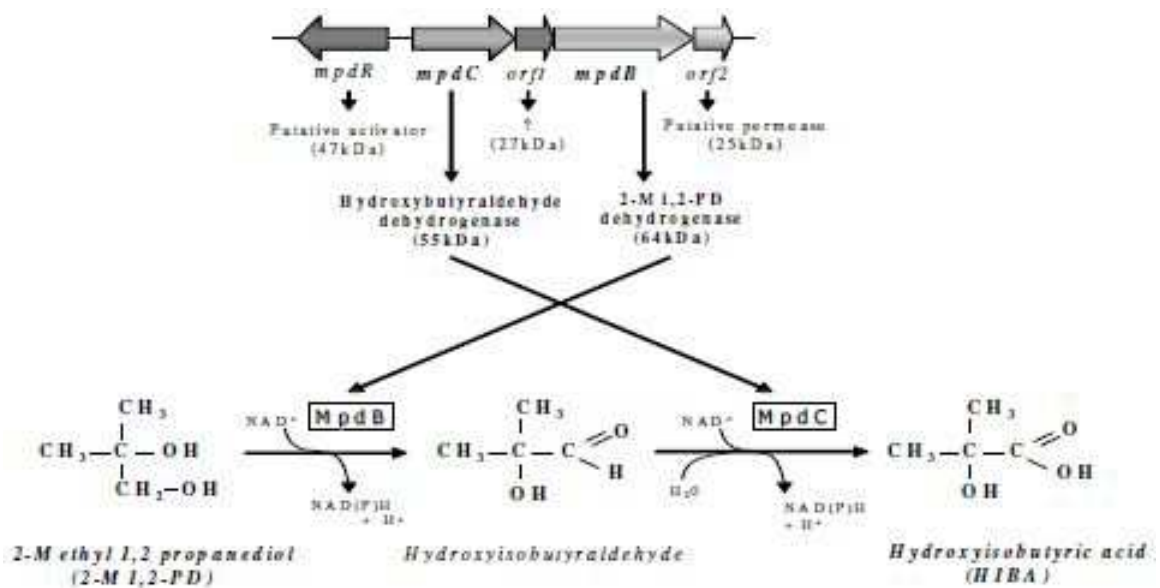


Figure 1.11. Organisation et rôle des gènes *mpd* dans le métabolisme du MTBE chez *M.austroafricanum* IFP 2012 (Lopes Ferreira et al., 2006)

L'implication d'une monooxygénase de type alcane hydroxylase, une monooxygénase membranaire, codée par le gène *alkB*, dans l'oxydation du MTBE et du TBA a été étudiée. Son expression en présence de MTBE, propane, hexane ou TBA, a été démontrée par RT-PCR chez *M. austroafricanum* IFP 2012, mais également chez *M. austroafricanum* IFP 2015 et JOB5 qui dégradent le MTBE et le TBA (Lopes Ferreira et al., 2007).

L'activité d'une autre monooxygénase, codée par le gène *mdpA*, et proche du groupe des alcane-hydroxylases actives sur les *n*-alcane à chaîne courte, a également été démontrée comme surexprimée en présence de MTBE chez *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Jechalke et al., 2010 ; Kane et al., 2007 ; Schmidt et al., 2008).

Concernant les autres enzymes impliquées dans la voie métabolique, il a également été démontré (Rohwerder et al., 2006) que chez les souches d'*Aquincola tertiaricarbonis* L10 et L108, ainsi que pour la souche IFP 2003, l'intermédiaire de dégradation du MTBE, le 2-HIBA (2-hydroxyisobutyric acid) pouvait être dégradé par une voie enzymatique cobalamine dépendante. Cette étape fait intervenir les gènes *icmA* et *icmB*, permettant la synthèse de petites sous unités d'isobutyryl coenzyme (CoA ou CoB) mutases. Enfin, chez la souche *A. tertiaricarbonis* L108, la présence d'une phtalate dioxygénase (gène *pdo/mdpJ*) a été détectée après croissance sur TBA et sur 2-HIBA. De même, après croissance sur TBA, la présence d'une sous-unité d'oxydoréductase putative fer-soufre (gène *piso*) a été détectée. Ces deux protéines induites en présence de TBA seraient impliquées dans l'oxydation de ce composé (Schäfer et al., 2007). Même si les connaissances des voies métaboliques impliquées dans la dégradation des éthers-carburants restent encore à approfondir, celles-ci s'enrichissent au fur et à mesure des recherches, et font l'objet de deux revues en particulier (Lopes Ferreira et al., 2006 ; Hyman et al., 2012).

Enfin, d'après la littérature, plusieurs souches de *Pseudonocardia* ont été décrites comme pouvant dégrader l'éther THF (tétrahydrofurane), notamment, *Pseudonocardia* sp. M1 (Daye et al., 2004), *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* K1 (Thiemer et al., 2003 ; Hyman, 2012), et *Pseudonocardia* sp. ENV478 (Vainberg et al., 2006). Les souches K1 et ENV478 notamment, ont fait l'objet d'une étude démontrant chez elles la présence d'un opéron (*thm*, figure 1.12), et leur capacité à dégrader le MTBE et l'ETBE après croissance sur THF a été montrée.

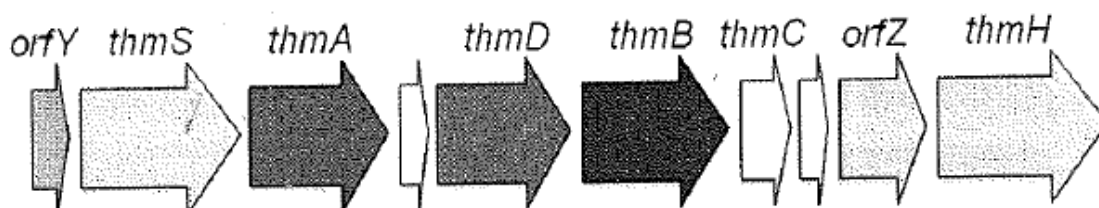


Figure 1.12. Organisation de l'opéron *thm* (Masuda et al., 2009)

Cet opéron est composé de plusieurs gènes : *thmS* (succinate semialdehyde), *thmA* (THF monooxygenase- α subunit), *thmD* (THF monooxygenase oxidoreductase), *thmB* (THF monooxygenase- β subunit), *thmC* (THF coupling protein), et *thmH* (putative 4-hydroxybutyrate dehydrogenase) (Masuda et al., 2009) chez *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* K1, qui, après croissance sur THF, peut dégrader par cométabolisme l'ETBE, le MTBE et le TAME en TBA, mais ne peut pas dégrader le TBA, ni le TAA.

I – 5. Les différentes approches de l'étude des communautés bactériennes en microbiologie environnementale

Plusieurs approches sont possibles afin d'étudier les différentes communautés bactériennes au sein d'un environnement, ainsi que le rôle de ces flores dans leur écosystème. Les apports de ces approches, qui se basent pour la plupart sur l'étude de l'ADN et de l'ARN bactérien, vont être liés aux techniques utilisées.

I – 5 – 1. Isolement de bactéries et cultures

Il est possible d'étudier la flore microbienne présente dans un milieu complexe en procédant à des étapes d'enrichissement et d'isolement sur milieu de culture. Cette approche de microbiologie classique a pour principal avantage de pouvoir isoler une souche en particulier afin de pouvoir l'étudier en culture pure par la suite (caractérisation taxonomique, caractéristiques phénotypiques, capacités de dégradation, etc...). Néanmoins, cette approche présente l'inconvénient majeur de ne pas rendre compte exhaustivement de la composition de la communauté bactérienne présente dans un écosystème donné. En effet, on estime qu'une faible proportion seulement des bactéries présentes dans l'environnement peuvent être obtenues grâce à des approches utilisant des étapes de culture (Akondi et al., 2013). Cette approche, bien que permettant d'obtenir des souches isolées, ne permet donc pas d'obtenir la totalité des souches bactériennes présentes dans un environnement donné, et un certain facteur aléatoire demeure du fait des conditions de culture spécifiques nécessaires à de nombreuses flores en particulier pour l'étape de culture sur boîtes de Petri (pH, température, métabolisme, type respiratoire, vitesses de croissance, etc.).

I – 5 – 2. Techniques d'empreintes moléculaires (fingerprinting)

La possibilité de détecter les séquences d'ADN codant l'ARN ribosomal 16S, séquences sur lesquelles repose la classification des micro-organismes en raison de sa très grande conservation, en est la base. La technique d'amplification par PCR pour la détection de séquences codant pour l'ARNr 16S a permis de s'abstraire de l'obligation de cultiver (Staley et Konopka, 1985), et de réaliser de grandes avancées, en particulier dans le diagnostic médical par la détection de micro-organismes pathogènes bien connus. La détection de séquences d'ADN est plus rapide et plus fiable que les techniques conventionnelles de mise en culture (Maukonen et Saarela, 2009). Une des objections majeures est le fait que ces techniques ne

font pas la différence entre l'ADN des cellules viables ou mortes, or, seules les cellules viables sont d'intérêt. Il a été démontré que l'ADN produit de la lyse cellulaire a une stabilité dans l'environnement importante (Nielsen et al., 2007).

La détection de l'ARNr 16S dans des environnements pollués a beaucoup d'intérêt car elle permet de mesurer l'impact écologique de la pollution et également la dynamique des populations présentes.

Les outils de biologie moléculaire permettent donc de rendre compte plus exhaustivement d'une population bactérienne complexe en utilisant la plupart du temps l'empreinte (fingerprint) des gènes codant l'ARNr 16S, et plusieurs techniques sont couramment utilisées : RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), réalisation de banques de clones et séquençage des gènes codant l'ARNr 16S, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Temporal Temperature Gel Electrophoresis (TTGE), Terminal-Restriction-Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism). Ce type d'approches permet une meilleure exhaustivité en passant outre l'étape de culture. L'utilisation de ces techniques a permis de faire passer le nombre de phylum décrit chez les bactéries en 20 ans de 11 à 52 (Woese et al., 1985 ; Rappe et al., 2003). Décrire la diversité de la microflore d'un environnement à l'aide de ces techniques permet d'avoir une image à un temps donné de la plupart des communautés présentes, mais ces approches doivent être combinées à d'autres techniques (consommation du substrat suivi par dosage par CPG, consommation d'O₂ ou production de CO₂, etc.) afin de pouvoir relier les changements dans une communauté à des facteurs environnementaux (Keller et al., 2004). En outre, ces approches ne sont pas exemptes de biais, notamment, si elles comportent des étapes de cultures liquides ou d'enrichissements (même soucis que lors de l'isolement de souches, voir paragraphe précédent), et si des amplifications par PCR sont requises (présences d'inhibiteurs de PCR dans l'environnement, amplifications préférentielles, etc.). D'autres biais sont de plus inhérents aux techniques employées. Par exemple, pour la technique DGGE, selon le gradient dénaturant utilisé, certaines bandes (correspondant à l'ADN de souches bactériennes) ne pourront pas être visualisées, de même que seules les flores majoritaires seront mises en évidence (la méthode étant qualifiée de semi-quantitative).

I – 5 – 3. Recherche des gènes fonctionnels

La caractérisation phylogénétique des micro-organismes présents dans un écosystème et montrant des capacités de dégradation est intéressante d'un point de vue écologique, mais ne rend pas compte des capacités de dégradation, et il n'est pas possible dans la grande majorité des cas de faire un lien entre appartenance phylogénétique et présence de gènes de dégradation. Pour cela, il faut s'intéresser à la détection de gènes de catabolisme ce qui est couramment effectué par PCR. Néanmoins, lorsqu'un fragment correspondant à un gène de dégradation est détecté dans l'environnement, il n'y a pas de garantie que la dégradation sera effectuée par la communauté bactérienne, soit parce que le gène peut être présent hors des cellules ou dans une cellule non viable, soit parce que le gène peut être présent dans une cellule sans être fonctionnel.

La détection est également souvent rendue difficile en raison de la conservation parfois faible des séquences génétiques, il faut alors utiliser des amorces dégénérées avec un succès plus ou moins grand, comme cela peut être le cas avec les gènes *alkB* séquencés, qui ont parfois une identité de seulement 40 % (Van Beilen et al., 2003). En effet, la plasticité des génomes bactériens due en partie aux transferts de gène horizontaux joue un rôle important dans l'évolution des micro-organismes.

Il est donc nécessaire de s'intéresser à l'expression des gènes pour permettre de conclure à la fois sur la présence et sur la viabilité des gènes. La molécule de choix pour cela est l'ARN messager (ARNm).

La transcription est un mécanisme nécessaire pour effectuer la synthèse des protéines via l'ARNm à partir d'ADN qui code un ou plusieurs polypeptides. Cette molécule informative a une durée de vie très courte, quelques minutes (Darnell et al., 1986 ; Miskin et al., 1999 ; Selinger et al., 2003 ; Wilson et al., 1999) et est ensuite dégradée par des enzymes cellulaires (ribonucléases). Cela implique un renouvellement rapide des ARNm qui peut se comparer à un moyen d'adaptation dans un environnement changeant. De plus, l'ARNm est dit polycistronique car une molécule va pouvoir coder plusieurs protéines.

Toutefois, l'étude et la manipulation des ARN comportent plusieurs difficultés. L'extraction des ARN exprimés dans un environnement donné est délicate. De plus, la contamination des échantillons par de l'ADN génomique est également une des difficultés rencontrées lors de l'extraction. Une fois l'ARN purifié, celui-ci peut être rétro-transcrit en ADNc, avant d'être quantifié (technique RT-qPCR), permettant ainsi de suivre le niveau d'expression d'un gène donné. Enfin, la courte durée de vie de l'ARN rend l'étude des transcrits plus difficile que la recherche de séquences d'ADN données.

I – 5 – 4. Puces à ADN

Parmi les outils prometteurs permettant de rendre compte de la biodiversité, les puces taxonomiques (microarrays) sont sensibles et peuvent permettre la mise en évidence même des bactéries minoritaires (8,4 %) dans une population ainsi que des bactéries non détectées par clonage direct des gènes codant l'ARNr 16S (Sanguin et al., 2006 ; DeSantis et al., 2007). Par ailleurs, les biopuces permettent une évaluation plus rapide des échantillons étudiés que l'établissement d'une banque de clones, ce qui est un avantage important dans des caractérisations de sites à dépolluer, par exemple. On peut déposer des fragments d'ADN (Dennis et al., 2003), d'ADNc (Roy, 2006) ou synthétiser des sondes de petites tailles (He et al., 2005) à partir de séquences génétiques répertoriées dans des banques de gènes (Genbank, RDP).

Dès lors que l'on veut étudier un système complexe, l'utilisation de la biopuce comme support d'étude est intéressante. Cet outil a été utilisé lors d'études d'écologie microbienne pour déterminer soit la phylogénie des populations présentes, soit les gènes fonctionnels

présents dans les conditions d'étude ou même l'expression de certains de ces gènes au cours d'activité de dégradation (Gentry et al., 2006).

Cette technique nécessitant une petite quantité d'échantillon, offre une efficacité et une spécificité élevée. On peut sur un même outil étudier plus de 10000 gènes au cours d'une même analyse. Mais elle peut requérir des connaissances sur les gènes à identifier. Elle détecte difficilement les gènes peu abondants et reste une technique coûteuse.

I – 5 – 5. Approches métagénomiques

Avec l'évolution des techniques de séquençage, les approches métagénomiques sont désormais de plus en plus utilisées afin d'étudier les communautés bactériennes au sein d'un environnement donné. Dans ce cas, l'ADN génomique total est extrait directement à partir d'un échantillon, sans étape de culture. Plusieurs techniques différentes pourront ensuite être appliquées afin d'analyser cet ADN, notamment la technique en séquençage 454 "shotgun" (Lautenschlager et al., 2013 ; Ercolini, 2013). Ici, le génome est découpé de façon aléatoire en fragments de petites tailles, sans étape préalable de PCR. Les extrémités d'une partie de ces fragments sont ensuite séquencées, puis ces séquences sont assemblées sur la base de leurs chevauchements grâce à des programmes informatiques pour essayer de produire une séquence complète. Au final, avec ce genre de techniques, il est possible en théorie et si la diversité n'est pas trop élevée, d'obtenir la totalité d'un métagénome, et couplé avec des techniques telles que la RT-qPCR, il est également possible de relier communautés bactériennes et fonctions (Yergeau et al., 2012), même si à l'heure actuelle, en pratique, cela reste encore impossible pour les communautés du sol.

Ce genre d'approche, bien que fournissant une quantité extrêmement importante d'information et passant outre des biais de culture ou d'amplification par PCR, est limité par le nombre de séquences de gènes connues pour lesquels la fonction de l'enzyme codée a été clairement identifiée vs. le nombre de séquences dont la fonction est inconnue. De plus, étant donné la quantité importante de données, le traitement de celles-ci requiert un équipement informatique spécifique et peut être délicat à analyser. Enfin, le coût de ces analyses reste encore important, même si du fait de leur utilisation de plus en plus courante, celles-ci deviennent moins onéreuses.

I – 5 – 6. Autres approches

D'autres techniques de marquage comme les études de marquage avec des isotopes stables (Stable Isotope Probing, SIP) (Rdajawski et al., 2000) peuvent être combinées aux observations par NanoSIMS utilisant la méthodologie SIMSISH (Secondary Ion Mass Spectrometry In Situ Hybridization) développées récemment (Li et al., 2008). Le principe repose sur l'utilisation de substrat marqué au ^{13}C pour déterminer les micro-organismes présents dans une communauté qui utilise activement le substrat marqué au ^{13}C . L'implication des micro-organismes dans la biodégradation est ensuite vérifiée par NanoSIMS (Nanoscale secondary ion mass spectrometry) qui permet de faire le lien entre la caractérisation phylogénétique et l'activité métabolique à l'échelle d'une cellule bactérienne.

II – Matériel et méthodes

II – Matériel et méthodes

II – 1. Origine des échantillons environnementaux

Afin d'étudier l'écologie microbienne en relation avec la dégradation de l'ETBE et du MTBE, différents enrichissements ont été effectués et caractérisés. Les caractéristiques des différents échantillons environnementaux utilisés pour réaliser ces enrichissements sont présentées dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1. Échantillons environnementaux d'origine et enrichissements effectués

Nom	Origine	Nature de la contamination	Substrat d'enrichissement	Nom des enrichissements obtenus
BE1	Sol, Belgique	MTBE (4,6 mg.kg ⁻¹ de sol)	ETBE	BE1-ETBE
			MTBE	BE1-MTBE
			TBA	BE1-TBA
GE1	Aquifère, Allemagne	- MTBE (29,3 mg.L ⁻¹) - TBA (0,4 mg.L ⁻¹) - TBF (0,7 mg.L ⁻¹) - Benzène (0,3 mg.L ⁻¹)	ETBE	GE1-ETBE
			MTBE	GE1-MTBE
			TBA	GE1-TBA
FR3 *	Aquifère, France	- MTBE (113,5 mg.L ⁻¹) - ETBE (4,2 mg.L ⁻¹) - TAME (8,1 mg.L ⁻¹) - TBA (16,4 mg.L ⁻¹) - TAA (1,7 mg.L ⁻¹)	ETBE	FR3-ETBE
			TBA	FR3-TBA
FR5	Aquifère, France	- MTBE (4,5 mg.L ⁻¹) - TBA (0,7 mg.L ⁻¹)	ETBE	FR5-ETBE
			MTBE	FR5-MTBE
			TBA	FR5-TBA
FR6 **	Aquifère, France	- ETBE (196 mg.L ⁻¹) - MTBE (1,5 mg.L ⁻¹) - TBA (4,2 mg.L ⁻¹) - BTEXs (37 mg.L ⁻¹)	MTBE	FR6-MTBE
			TBA	FR6-TBA
US2 **	Aquifère, USA	- MTBE (4,7 mg.L ⁻¹) - TBA (0,4 mg.L ⁻¹)	MTBE	US2-MTBE
			TBA	US2-TBA
US3 **	Aquifère, USA	- MTBE (19,3 mg.L ⁻¹) - TBA (0,6 mg.L ⁻¹)	MTBE	US3-MTBE
			TBA	US3-TBA
US6 *	Aquifère, USA	- MTBE (2,0 mg.L ⁻¹) - TBA (0,6 mg.L ⁻¹)	ETBE	US6-ETBE
			TBA	US6-TBA

* Dans ces cas la tentative d'enrichissement sur MTBE n'a pas permis d'obtenir la biodégradation de ce composé.

** Dans ces cas la tentative d'enrichissement sur ETBE n'a pas permis d'obtenir la biodégradation de ce composé.

II – 2. Techniques microbiologiques

II – 2 – 1. Micro-organismes utilisés

Bien que des micro-organismes aient été isolés à partir des enrichissements et feront en partie l'objet de ces travaux de thèse, différents autres micro-organismes ont été employés au cours de l'étude et sont présentés dans le tableau 2.2.

Tableau 2.2. Liste des micro-organismes utilisés dans nos études

Micro-organisme	Origine	Utilisation	Référence
<i>Rhodococcus ruber</i> IFP 2001	Boues activées (Achères)	Étude des gènes <i>eth</i>	Fayolle et al., 2001
<i>Aquicola tertiaricarbonis</i> IFP 2003	Boues activées	Étude de gènes <i>icmA</i> , <i>icmB</i> , <i>pdo/mdpJ</i> , <i>piso</i>	Piveteau et al., 2001
<i>Mycobacterium austroafrincanum</i> IFP 2015	Bac de stockage d'essence supplémenté au MTBE	Étude du gène <i>alkB</i>	Lopes-Ferreira et al., 2005
<i>Escherichia coli</i> TOP10	InVitrogen	Clonage (kit)	-

II – 2 – 2. Milieux de culture

Plusieurs milieux de culture ont été utilisés pendant ce travail, notamment, un milieu minéral afin d'effectuer les enrichissements, ainsi que des milieux complexes pour réaliser les isolements ou les clonages, entre autres. Ces milieux sont présentés ci-dessous.

a) Milieu minimum (MM)

Il contient : MgSO_4 , 7 H_2O (0.5 g.L^{-1}); NH_4NO_3 (1.5 g.L^{-1}); CaCl_2 , 2 H_2O (0.04 g.L^{-1}); solution d'oligo-éléments 1⁽¹⁾ (1 mL.L^{-1}); solution d'oligo-éléments 2⁽²⁾ (1 mL.L^{-1}); solution de FeSO_4 , 7 H_2O ⁽³⁾ (1 mL.L^{-1}) + solution de vitamines⁽⁴⁾ + solution de phosphate⁽⁵⁾

⁽¹⁾ La solution d'oligo-éléments 1 (stockée à 4°C) a la composition suivante : CoCl_2 , 6 H_2O (1 g.L^{-1}); MnSO_4 , H_2O (1 g.L^{-1}); ZnSO_4 , 7 H_2O (1 g.L^{-1}); AlCl_3 , 6 H_2O (0.4 g.L^{-1}); NiCl_2 , 6 H_2O (0.25 g.L^{-1}); H_3BO_3 (0.1 g.L^{-1}); CuSO_4 , 5 H_2O (0.1 g.L^{-1}); eau déminéralisée (qsp 1 L)

⁽²⁾ La solution d'oligo-éléments 2 (stockée à 4°C) a la composition suivante : NaMoO_4 , 2 H_2O (1 g.L^{-1}); NaWO_4 , 2 H_2O (1 g.L^{-1}); eau déminéralisée (qsp 1 L)

⁽³⁾ La solution de FeSO_4 , 7 H_2O (stockée à 4°C) est préparée à 1 g.L^{-1}

Ces solutions sont stérilisées (121 °C, 20 min).

Les solutions suivantes sont stérilisées par filtration (0,22 µm) et ajoutées avant utilisation du milieu :

solution de vitamines⁽⁴⁾ (1 mL.L⁻¹) ; solution de phosphate⁽⁵⁾ (10 mL.L⁻¹)

⁽⁴⁾ La composition de la solution de vitamines (stockée à -20°C) est la suivante : Biotine (200 mg.L⁻¹) ; Riboflavine (50 mg.L⁻¹) ; Acide nicotinamique (50 mg.L⁻¹) ; Panthoténate de calcium (50 mg.L⁻¹) ; Acide p-aminobenzoïque (50 mg.L⁻¹) ; Acide folique (20 mg.L⁻¹) ; Thiamine (15 mg.L⁻¹) ; Cyanocobalamine (Vitamine B12 ; 1.5 mg.L⁻¹), eau déminéralisée (qsp 1 L)

⁽⁵⁾ La composition de la solution de phosphate (stockée à 4°C) est la suivante : KH₂PO₄ (140 g.L⁻¹) ; K₂HPO₄ (170 g.L⁻¹) ; eau déminéralisée (qsp 1 L)

b) Milieux complets

a) Milieu riche Luria-Bertani (LB): Milieu préparé comme recommandé par le fournisseur (Duchefa Biochemie) à 30 g.L⁻¹. Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

b) Milieu riche Tryptic Soy Broth (TSB): Milieu préparé comme recommandé par le fournisseur (Bacto) à 30 g.L⁻¹. Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

c) Milieu riche Tryptic Soy Agar (TS1/10A): Milieu préparé à 3 g.L⁻¹ (TSB dilué au 1/10) additionné de 20 g.L⁻¹ d'agar (Bacto). Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

d) Milieu riche Luria-Bertani Agar (LBA): Même préparation que le milieu LB, avec 20 g.L⁻¹ d'agar. Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

II – 2 – 3. Méthodes de culture

a) Établissement des enrichissements et culture des enrichissements

Obtention des enrichissements : les échantillons environnementaux (tableau 2.1) dès leur réception au laboratoire avaient été utilisés comme inoculum (20 %) pour ensemercer du MM (150 mL) dans des fioles Schott (500 mL) équipées d'un bras latéral pour effectuer les prélèvements à la seringue. Le substrat désiré (MTBE, ETBE ou TBA) est alors ajouté (200 mg.L⁻¹) avant fermeture des flacons. La quantité d'oxygène dans le flacon est suffisante pour assurer des conditions aérobies. Les fioles sont incubées sous agitation (100 rpm) à 30 °C. La concentration en substrat résiduel était mesurée par CPG après prélèvement du milieu et filtration (0,22 µ) à t₀ puis au cours du temps. Lorsque le substrat était consommé, deux autres repiquages successifs étaient effectués dans les mêmes conditions pour confirmer la capacité de dégradation après repiquage et pour effectuer l'enrichissement. Après ces

3 repiquages, les cultures, considérées comme cultures d'enrichissement, étaient centrifugées et conservées à -80°C.

Remise en culture des enrichissements : un tube à -80 °C de chaque enrichissement obtenu sur ETBE ou sur MTBE a été remis en culture en juillet 2010 peu avant le début de la thèse dans les conditions décrites ci-dessus pour l'enrichissement. Après suivi et confirmation de leur capacité de dégradation de l'ETBE ou du MTBE, ces cultures ont été utilisées comme inoculum pour réaliser des cultures en plus grand volume permettant d'obtenir suffisamment de matériel biologique pour réaliser l'ensemble des expérimentations nécessaires (cinétiques de dégradation, extraction d'ADN...). Ces incubations ont donc été réalisées en fioles Schott de 2 ou 3 L contenant 350 mL de MMensemencé à haut taux (30 %) avec la totalité de la culture de vérification (soit 500 mL final). Le substrat est ajouté avant fermeture du flacon. Les concentrations en substrat étaient 200 mg.L⁻¹ pour l'ETBE et 100 mg.L⁻¹ pour le MTBE. L'incubation est réalisée dans des agitateurs (Infors) à 30 °C. Dans ces conditions il n'y a pas de limitation en oxygène. Chaque substrat est régulièrement dosé par CPG, et des ajouts sont faits quand la concentration résiduelle est nulle. Lorsque le substrat est consommé, la culture est transférée dans une fiole identique stérile (afin d'assurer le renouvellement en oxygène), une nouvelle addition de substrat est effectuée. Ceci permet d'obtenir les quantités de biomasse suffisantes pour effectuer les ensemencements nécessaires aux différentes expérimentations (détermination des capacités de dégradation réalisées en triplicata, extraction d'ADN...). Les prélèvements sont effectués selon les besoins dans la culture et du MM neuf est alors ajouté stérilement.

b) Détermination de la biodégradation de différents composés

Les capacités de biodégradation des enrichissements pour différents composés (ETBE, MTBE, TBA, BTEXs, *n*-alcanes, voir liste fournie dans le tableau 2.3) ont été étudiées.

Dans des fioles pénicillines de 125 mL contenant 19 mL de milieu MM, on introduit l'inoculum correspondant à l'enrichissement testé. Pour cela, on prélève 40 mL sur la culture d'enrichissement en cours. Cette culture est centrifugée et lavée une fois dans 30 mL de MM puis remise en suspension dans 35 mL de MM. Onensemence les fioles avec 1 mL de cette suspension. Les composés testés sont préalablement dissous dans du HMN (2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane) afin de diminuer leur toxicité pour les micro-organismes (à raison de 5 µL/0,5 mL HMN) et les 0,5 mL de cette solution ainsi préparée sont introduits dans chaque fiole. Après ensemencement et addition du substrat, les fioles sont immédiatement fermées avec un bouchon en butyl neuf et serties avec une capsule d'aluminium. Les témoins abiotiques de cette expérience sont constitués de fioles identiques contenant 20 mL de MM stérile additionné en substrat, et préparé (x3) dans les mêmes conditions que les fioles d'essai. Toutes ces fioles sont incubées à 30 °C sous agitation (150 rpm) pendant 4 semaines. Cette façon de procéder en fiole fermée est nécessaire car nous travaillons presque exclusivement avec des composés volatiles à très volatiles. Le travail en milieu fermé est donc incontournable pour pouvoir effectuer des bilans crédibles.

Par ailleurs, comme l'ensemble des tests est effectué en aérobiose, il est nécessaire de vérifier que la teneur en oxygène présente dans la fiole fermée est suffisante aux micro-organismes

pour dégrader la totalité du substrat fourni. Cette quantité d'oxygène est dépendante de la valeur de la demande théorique en oxygène (ou DThO) nécessaire pour la dégradation totale (biomasse, CO₂ et H₂O) du substrat. Pour éviter toute limitation en oxygène, on vérifie que la teneur en oxygène correspond à environ 3 fois la valeur de la DThO pour le produit considéré. La DThO d'un composé de formule C_c H_h Cl_{cl} N_n Na_{na} O_o P_p S_s, de masse moléculaire relative Mr, peut être calculée d'après la formule :

$$\text{DThO (mg d'O}_2 \text{ / mg du composé testé)} = \frac{16[2c + 0,5(h-cl-3n) + 3s + 2,5p + 0,5na - o]}{Mr}$$

Les valeurs de DThO des différents composés sont présentées dans le tableau 2.3.

Ce test est effectué en triplicata pour chaque substrat. Après incubation, les concentrations résiduelles en substrat sont mesurées directement par CPG/FID (TBE, MTBE ou TBA) et les autres composés sont analysés après extraction au pentane par CPG/split/FID sur colonne PONA pour les essais et pour les témoins abiotiques.

Tableau 2.3. Caractéristiques des composés étudiés

Composé	N°cas	Formule chimique brute	MM (g.mol ⁻¹)	Pe (°C)	D à 20°C	S dans l'eau à 20°C (g.L ⁻¹)	Demande théorique en oxygène ou D.Th.O (mg O ₂ .mg ⁻¹ composé)
ETBE	637-92-3	C ₆ H ₁₄ O	102,18	72,8	0,74	12	2,65
MTBE	1634-04-4	C ₅ H ₁₂ O	88,15	55,3	0,74	48	2,89
TBA	75-65-0	C ₄ H ₁₀ O	74,12	82,8	0,79	∞	2,79
Benzène	71-43-2	C ₆ H ₆	78,11	80,1	0,88	1,80*	3,07
Toluène	108-88-3	C ₇ H ₈	92,15	110,6	0,87	0,51	3,13
Ethylbenzène	100-41-4	C ₈ H ₁₀	106,16	136	0,87	0,15	3,24
<i>m</i> -xylène	108-38-3	C ₈ H ₁₀	106,16	139,1	0,86	0,15	3,16
<i>o</i> -xylène	95-47-6	C ₈ H ₁₀	106,16	144,4	0,88	0,17	3,16
<i>p</i> -xylène	106-42-3	C ₈ H ₁₀	106,16	138,4	0,86	0,19	3,16
Octane	111-65-9	C ₈ H ₁₈	114,23	125,6	0,7	0,4	3,5
Hexadécane	544-76-3	C ₁₆ H ₃₄	226	286,5	0,77	insoluble	3,46

MM : Masse Moléculaire ; Pe : point d'ébullition ; D : Densité ; S : Solubilité
<http://www.reptox.csst.qc.ca/RechercheProduits.asp#resultats>

*solubilité dans l'eau à 25°C

Les pourcentages de dégradation sont ensuite calculés de la façon suivante:

$$\frac{[(\text{conc. résiduelle dans contrôle abiotique} - \text{conc. résiduelle dans essai})/\text{conc. résiduelle dans contrôle abiotique}] \times 100$$

c) Détermination des cinétiques de dégradation des substrats

Différentes techniques ont été utilisées afin de déterminer les cinétiques de dégradation des substrats (ETBE, MTBE) pour chaque enrichissement ou culture de micro-organisme : dosage des concentrations résiduelles en substrats, mesure des quantités de CO₂ produites, et estimation de la biomasse par mesure du poids sec. Ce point permet de pouvoir calculer un rendement de production de biomasse et ainsi, rapporter les vitesses de dégradation observées à la biomasse de la culture. Quand cela est possible, des mesures de densité optique (DO_{660nm}) sont réalisées.

Un prélèvement (150 mL) est effectué sur les cultures d'enrichissements maintenues sur MM en présence d'ETBE ou de MTBE, puis centrifugé (10.000 x g, 10 min, température ambiante). Le culot obtenu est lavé une fois. Le culot final est remis en suspension dans 45 mL de MM. La biomasse initiale est estimée par détermination du poids sec de cette suspension après filtration (0,22µ) d'une partie (5 mL) de celle-ci (chaque filtre est pesé individuellement avant filtration). La biomasse récoltée est ensuite séchée à 100 °C pendant une nuit puis pesée et la concentration en biomasse initiale est calculée.

Pour les cultures de micro-organismes isolés, une préculture est préparée sur MM (150 mL) puis l'inoculum est préparé dans les conditions décrites ci-dessus.

Suivi de la consommation du substrat

Des fioles Schott 500 mL à bras latéral fermé avec un bouchon butyl contenant 150 mL de MM sont utilisées. Cinq mL de la suspension bactérienne lavée, ainsi que 40 µL de substrat (ETBE ou MTBE) sont introduits dans la fiole. L'expérience est réalisée en triplicata pour chaque culture. Les fioles sont incubées (120 rpm, 30 °C). Le témoin est constitué de 3 fioles identiques non ensemencées et incubées dans les mêmes conditions. Le dosage du substrat est effectué chaque jour par mesure CPG/ FID après filtration (0,22 µm).

Suivi de la production de CO₂

Des fioles ensemencées (x2) comme décrit ci-dessus sont préparées en parallèle avec le même inoculum qu'en a) et incubées dans les mêmes conditions. Deux cent cinquante µL sont prélevés dans la phase gazeuse et le CO₂ produit est dosé sur CPG/catharomètre.

Mesure du poids sec

Des fioles ensemencées (x2) comme décrit ci-dessus sont préparées en parallèle avec le même inoculum qu'en a) et incubées dans les mêmes conditions.

Lorsque la consommation du substrat est totale (incluant la re-consommation du TBA produit quand c'est nécessaire) et que la valeur de CO₂ produit n'évolue plus le poids sec est mesuré par filtration (0,22µ) de chacune des deux fioles indépendamment (chaque filtre est pesé individuellement avant filtration). La biomasse est ensuite séchée à 100 °C pendant une nuit puis pesée et la concentration en biomasse est calculée :

Biomasse produite (mg.L⁻¹) = [biomasse mesurée à l'issue des incubations (mg.L⁻¹) - biomasse initiale introduite à l'ensemencement (mg.L⁻¹)]

II – 2 – 4. Isolement des souches à partir des enrichissements

Des prélèvements sont effectués dans chacune des cultures en cours. Chaque échantillon de cultures est dilué par des dilutions en série dans du tampon phosphate (20 mM, pH 7,0). La culture initiale et les dilutions jusqu'à 10⁻⁷ sont ensuite étalées sur des boîtes de Petri (milieu TS au 1/10^{ème}). Les boîtes sont incubées à 30 °C pendant une semaine et les colonies ayant poussé sont prélevées et repiquées puis l'incubation est poursuivie pour permettre la croissance des micro-organismes à croissance lente. Les boîtes sont examinées à intervalles réguliers et les éventuelles nouvelles colonies reprises. Les étapes de repiquage et de purification sont réalisées de façon classique sur boîtes de Petri (milieu TS au 1/10^{ème} A).

Ces colonies sont ensuite testées pour leur capacité de dégradation par ensemencement (1 oese/fiole) à partir des cultures sur boîtes en fioles de MM (conditions décrites ci-dessus) contenant de l'ETBE ou du MTBE ou du TBA (150 mg.L⁻¹). Les fioles sont incubées pendant 4 semaines puis le substrat résiduel est mesuré par CPG /FID. La durée d'incubation peut être prolongée à 8 semaines en fonction des résultats obtenus.

II – 3. Techniques de biologie moléculaire

II – 3 – 1. Extraction d'ADN

a) Méthode d'extraction avec le PowerSoil DNA Isolation Kit

Les extractions d'ADN des enrichissements, ainsi que des souches isolées, sont réalisées en utilisant un kit spécifique (PowerSoil DNA Isolation Kit, MoBio laboratories), en suivant les instructions mentionnées dans le protocole mis à disposition par le fournisseur (<http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12888.pdf>). Le principe du kit repose sur une lyse à la fois mécanique et chimique. L'échantillon est déposé dans un tube contenant à la fois des micro grains ainsi qu'un tampon de lyse (éliminant également d'éventuels agents

inhibiteurs de PCR), qui est agité durant une dizaine de minutes afin d'homogénéiser le mix et de casser les cellules bactériennes. L'ADN génomique est ensuite recueilli et fixé sur une membrane en silice sur colonne, puis lavé, avant d'être élué pour la suite des applications.

Au final, l'ADN extrait est récupéré dans environ 100 μL de tampon d'éluion (Tris 10 mM). La concentration en ADN est contrôlée par mesure au NanoDrop (3 μL de dépôt, dosage acides nucléiques).

b) Méthode d'extraction par "Boiling Lysis" (pour PCR sur colonies)

Ce protocole d'extraction d'ADN est employé avant de pratiquer une étape d'amplification par PCR sur colonies. Une colonie est introduite dans un tube Eppendorf contenant un volume de 100 μL d'eau MilliQ stérile. Le tube est ensuite chauffé dans un bloc chauffant à 95 °C pendant 10 minutes (Pospiech et al., 1995). Après centrifugation (13000 rpm, 10 min, 4 °C), le surnageant est transféré dans un nouveau tube Eppendorf. Cinq μL de ce surnageant peuvent ainsi servir de matrice d'ADN pour une amplification par PCR.

III – 3 – 2. Amplification d'ADN par la technique PCR (Polymerase Chain Reaction)

La technique d'amplification de séquences d'ADN par PCR est utilisée à plusieurs reprises lors de cette étude afin de cibler et d'amplifier différents gènes. Les gènes ciblés, ainsi que les amorces utilisées et les références de celles-ci, sont présentés dans les tableaux 2.4.1 et 2.4.2.

La composition du mix pour effectuer l'amplification par PCR est la suivante :

Eau milliQ : qsp 50 μL

5x Herculase II Reaction Buffer : 10 μL

BSA (20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) : 2 μL

Amorce Forward (10 μM) : 1,25 μL

Amorce Reverse (10 μM) : 1,25 μL

dNTPs (0.25 mM de chaque) : 0,5 μL

Herculase II Fusion DNA Polymerase : 0,5-1 μL (selon taille du fragment attendue)

ADNg (concentration finale de 100-400 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) : 1-10 μL (selon concentration initiale)

Les conditions d'amplification (température de dénaturation et d'hybridation) à programmer dans le thermocycleur pour l'application de la technique PCR sont calculées dans chaque cas en prenant en compte la composition en nucléotides des amorces utilisées. Le nombre de cycles varie entre 20 et 35. Les conditions précises sont présentées dans les tableaux 2.5.1 à 2.5.6. Certains couples d'amorces ont également été dessinés à l'aide de l'outil Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tableau 2.4.1. Présentation des différents couples d'amorces utilisés

ADN ciblés	Couples d'amorces utilisés et séquences (5' – 3')	Taille du fragment attendu (bp)	Th (°C)	Référence
ARNr 16S (totalité)	pA/pH pA : AGAGTTTGATCCTGGCTCAG pH: AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	1500-1600	55	Edwards et al., 1989
ARNr 16S (V3-V4)	341F/803R 341F : CCT ACG GGA GGC AGC AG 803R: CTA CCA GGG TAT CTA ATC C	462	55	Labbé <i>et al.</i> , 2007
ARNr 16S (V3-V4)*	341F/803R 341F-GC : GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG 803R: CTA CCA GGG TAT CTA ATC C	462	*	Labbé <i>et al.</i> , 2007
IGS 16S-23S	RISA-F / RISA-R RISA-F: TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT RISA-R: CCG GGT TTC CCC ATT CGG	Variable	55	Ranjard <i>et al.</i> , 2000
Insert (vecteur de clonage)	M13F/M13R M13F : GTA AAA CGA CGG CCA G M13R: CAG GAA ACA GCT ATG AC	Variable	55	
<i>ethB</i>	EthB-F2 / EthB-R2 EthB-F2: CAC GCG CTC GGC GAC TGG CAG ACG TTC AGT EthB-R2: TCC GAC GCA CAT GTG CGG GCC GTA CCC GAA	881	68	Rapport IFP A.Babé, 2009
<i>ethR</i>	EthRfor / EthRrev EthRfor: ATG GGA ACG TCG ACG ACG AG EthRrev: CTA GGA GCG CAA GGT GTC CG	995	65	Jechalke <i>et al.</i> , 2011
<i>mdpA</i>	MdpA1F / MdpA1R (MdpA1F: CTT ACC GGG CTC AAC TAT GC MdpA1R: CGC TTC CCT GGA TCG ATG TT	796	65	Jechalke <i>et al.</i> , 2011
<i>mpdB</i>	MpdB-F1 / MpdB-R1 MpdB-F1: ACG GTC TCG TCG GCA AAT AC MpdB-R1: GCA CAT CCC AGG TCT GAT	590	50	Lopes Ferreira <i>et al.</i> , 2006
<i>mpdC</i>	MpdC-F2 / MpdC-R2 MpdC-F2: GTC AAC CTG GAA CTC GGC GGG AAG AGC CCG TTG MpdC-R2: CAC CGC TGT GAC GGG CCC GAA GAT CTC CTC	437	68	Rapport IFP A.Babé, 2009
<i>icmA</i>	ICMA-f / ICMA-r ICMA-f: ATG ACC TGG CTT GAG CCG CA ICMA-r : TCA GAA GAC CGG CGT CTC GC	1689	65	Rohwerder <i>et al.</i> , 2006
<i>icmB</i>	ICMB-f / ICMB-r ICMB-f: ATG GAC CAA ATC CCG ATC CGC ICMB-r : TCA GCG GGC GCC GCG CGC GG	411	64	Rohwerder <i>et al.</i> , 2006

Th: Température d'hybridation ; *couple pour DGGE avec GC-clamp sur amorce 341F ; PCR Touch Down.

Tableau 2.4.2. Présentation des différents couples d'amorces utilisés (suite)

ADN ciblés	Couples d'amorces utilisés et séquences (5' – 3')	Taille du fragment attendu (bp)	Th (°C)	Référence
<i>pdo</i>	1: PDO1-for / PDO1-rev (PDO1-for: TCA GAG GCT CGC TTC GAT CT PDO1-rev: ATG GGT AAC AGA GAG CCT TT	1413	62	Schäfer <i>et al.</i> , 2007
	2: PDO2-for / PDO2-rev PDO2-for: TGT TGT CGT CGG TCG GGT GC PDO2-rev: CGT CGA CGG CAA ACT GCT GG	379	66	Schäfer <i>et al.</i> , 2007
<i>piso</i>	1: PISO1-for / PISO1-rev PISO1-for: ATG TAT CAG TTG AGT CAC AC PISO1-rev: TCA AAG ATC CAG GAC CAG CG	1014	62	Schäfer <i>et al.</i> , 2007
	2: PISO3-for – PISO3-rev PISO3-for: CGC TGA ACC TGC GGG TCC GG PISO3-rev: CAC CTG CGC GAT CGA CTT GT	787	58	Schäfer <i>et al.</i> , 2007
<i>alkB</i>	1: Rhose2 / Rhoas1 Rhose2 : ACG GSC CAY TTC TAC RTC G Rhoas1: CCG TAR TGY TCG AGR TAG	343	52	Lopes Ferreira <i>et al.</i> , 2007
	2: alkB2012_for / alkB2012_rev alkB2012_for: ACG GGC ATT TCT ACG TCG AG alkB2012_rev: TCG AGG TAG TTG ACG GCC TC	334	58	Lopes Ferreira, personal communication
<i>thmS</i>	ThmS-F1 / ThmS-R1 ThmS-F1: TAT TGC GTG ACG ATG TGC AG ThmS-R1: GGC CAT ATC CGG ACT GCT TG	1410	57	Cette étude
<i>thmA</i>	ThmA-F1 / ThmA-R1 ThmA-F1: GGA AGT ACC CCA GCC GAT AC ThmA-R1: CCT GTG AGC GTC TTA CCG TC	1345	61	Cette étude
<i>thmD</i>	ThmD-F1 / ThmD-R1 ThmD-F1: AAC GTA AGG TTC GAG CCG ATT ThmD-R1: TCC ACC TGA TGT CTG AGC GT	989	57	Cette étude
<i>thmB</i>	ThmB-F1 / ThmB-R1 ThmB-F1: CGT CAC TAT CGA CGT CCA GC ThmB-R1: TCG ACT TGA GAC CGC ATT CC	926	59	Cette étude
<i>thmC</i>	ThmC-F1 / ThmC-R1 ThmC-F1: GCG ACG CCG CTT ATG ACT A ThmC-R1: TCA TTG CCA TCC GGC CAT AG	243	58	Cette étude
<i>thmH</i>	ThmH-F1 / ThmH-R1 ThmH-F1: ATT CTG GAT CGC AGG TCG TC ThmH-R1: AAG TCG TCC ATA GCT GAG CG	1383	59	Cette étude

Tableau 2.5.1. Conditions à utiliser pour le programme PCR avec le couple pA/pH

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	5	1
Dénaturation	94	0,5	35
Hybridation	55	0,5	
Elongation	72	2	
Elongation finale	72	8	1
Stand by	12	∞	1

Tableau 2.5.2. Conditions à utiliser pour le programme PCR avec le couple M13F/M13R

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	5	1
Dénaturation	95	0,5	30
Hybridation	55	0,5	
Elongation	72	2	
Elongation finale	72	8	1
Stand by	12	∞	1

Tableau 2.5.3. Conditions à utiliser pour le programme PCR avec le couple 341F/803R

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96	5	1
Dénaturation	94	1	30
Hybridation	55	1	
Elongation	72	1	
Elongation finale	72	10	1
Stand by	12	∞	1

Tableau 2.5.4. Conditions à utiliser pour le programme PCR Touch Down pour la PCR-DGGE

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96	5	1
Dénaturation	94	1	10
Hybridation	65 à 56*	1	
Elongation	72	3	
Dénaturation	94	1	20
Hybridation	55	1	
Elongation	72	3	
Elongation finale	72	10	1
Stand by	12	∞	1

* La température diminue de 1°C à chaque cycle

Tableau 2.5.5. Conditions à utiliser pour le programme PCR avec le couple RISA-F/RISA-R

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	94	3	1
Dénaturation	94	1	25
Hybridation	55	0,5	
Elongation	72	1	
Elongation finale	72	5	1
Stand by	10	∞	1

Tableau 2.5.6. Conditions à utiliser pour le programme PCR avec les différents autres couples des gènes

Etape	Température (°C)	Temps (min)	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	96	5	1
Dénaturation	94	1	30
Hybridation	Variable selon le couple testé	1	
Elongation	72	3	
Elongation finale	72	10	1
Stand by	10	∞	1

II – 3 – 3. PCR quantitative (qPCR)

Reprenant le principe de la technique PCR, cette variante a pour but de quantifier précisément le nombre de copies d'un fragment d'ADN au cours de l'amplification. Lors de cette réaction, des sondes fluorescentes (dans notre cas, de type SYBR Green) se fixent sur les ADNs double-brins synthétisés, et émettent un signal lumineux. Cette fluorescence est ensuite comptabilisée au fur et à mesure des amplifications si elle dépasse une certaine valeur seuil Ct (Cycle threshold). La taille des fragments amplifiés est généralement plus petite que lors d'une PCR classique (entre 150 et 200 bp). La plupart des amorces utilisées ont été dessinées à partir des séquences cibles, à l'aide de l'outil Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), et après vérification *in silico* de la spécificité de ces amorces (tableau 2.6).

Pour chaque gène à quantifier, une PCR est effectuée sur l'ADN de la souche pure correspondante, puis, les bandes d'ADN sont découpées et purifiées à l'aide du kit GFX PCR and gel DNA purification kit (GE Healthcare), selon les instructions du fournisseur. Les calculs des concentrations en ADN des échantillons sont réalisés avec l'appareil Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen), avec le kit High Sensitivity (Qubit® dsDNA HS Assay Kit), selon les instructions du fournisseur, et présentées sur la figure 3.1. Pour chaque quantification, une gamme étalon (1.0^{E10} à 1.0^{E03} copies) est réalisée à partir de l'ADN purifié.

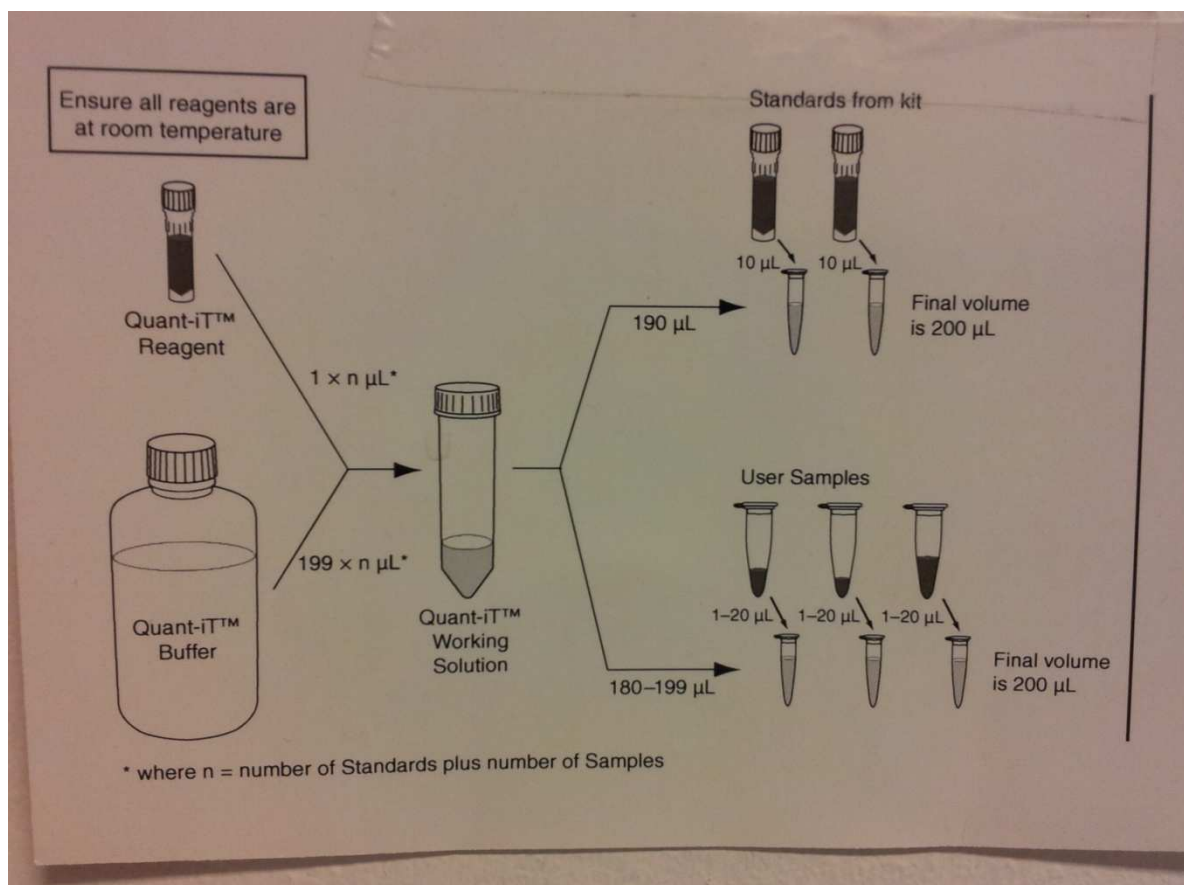


Figure 2.1. Mesure des concentrations en acides nucléiques par Qubit

L'étape de qPCR est réalisée avec le Sensimix SYBR No-Rox (Bioline), sur l'appareil Rotor-Gene (Corbett), employant le logiciel Rotor-Gene 6000. Chaque échantillon est dosé en triplicata.

Tableau 2.6. Liste des amorces utilisées en qPCR et RT-qPCR

Gènes ciblés	Couples d'amorces utilisés et séquences (5' – 3')	Taille du fragment attendu (bp)	Th (°C)	Référence
16S (qPCR)	Eub338/ Eub518 Eub338: ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG Eub518: ATT ACC GCG GCT GCT GG	variable	53	Fierer <i>et al.</i> , 2005
16S (qPCR, <i>Rhododoccus</i> sp. spécifique)	Rhodo2F/Rhodo2R Rhodo2F : AGTACCGACGAAGCGCGAGT Rhodo2R : GCTGCGGGTTTTACAGACG	158	57	Cette étude
16S (qPCR, <i>Rubrivivax</i> sp. spécifique)	Rubri1F/Rubri1R Rubri1F : TGAGTGCGGCAGAGGGGGAT Rubri1R : TGCTCCCCACGCTTTCGTGC	128	59	Cette étude
16S (qPCR, <i>Bradyrhizobium</i> sp. spécifique)	Brady3F/Brady3R Brady3F : GATCCAGCCATGCCGCGTGA Brady3R: AAGACCCGCCTACGCACCT	181	59	Cette étude
<i>alkB</i>	Rhose2 / Rhoas1 Rhose2 : ACG GSC CAY TTC TAC RTC G Rhoas1 : CCG TAR TGY TCG AGR TAG	343	52	Lopes Ferreira <i>et al.</i> , 2007
<i>ethB</i>	ethB_P8_F / ethB_P8_R ethB_P8_F: GACTGGCAGACGTTTCAGTTC ethB_P8_R: CTGCTGGATCTTCTCCTTGT	174	57	(Demanèche, communication personnelle)
<i>ethR</i>	ethR_P6_F / ethR_P6_R ethR_P6_F: CTGAAGAAGCTGGAGGAGTC ethR_P6_R: AGACCTCGCTGTTGTAGTCC	157	55	(Demanèche, communication personnelle)
<i>thmA</i>	ThmA-F2 / ThmA-R2 ThmA-F2: GCTGGAACGAGAAGTTCGGT ThmA-R2: ACTCCGGCGAGCAATAGAAC	198	59	Cette étude
<i>thmB</i>	ThmB-F2 / ThmB-R2 ThmB-F2: GGCTCAGGCACTTGTCTCT ThmB-R2: AATGAGCGGTTCTGAAGCAGA	193	57	Cette étude
<i>thmD</i>	ThmD-F2 / ThmD-R2 ThmD-F2: TCATCAAGCAGTATCCGGGC ThmD-R2: GAACCACCGCGATGAGTAA	151	59	Cette étude
<i>thmH</i>	ThmH-F2 / ThmH-R2 ThmH-F2: GTCTAGACTCGGCGTTTGCT ThmH-R2: CGATAGCTCGGAACATCCCC	145	59	Cette étude
<i>thmS</i>	ThmS-F2 / ThmS-R2 ThmS-F2: CAAGGTCGTGGAGGGTATCG ThmS-R2: GCTGAATGAAGTAGCCCCCA	200	59	Cette étude

II – 3 – 4. Extraction des ARN totaux

a) Phases de préculture et de culture

Afin de pouvoir suivre dans le temps l'éventuelle induction de gènes au cours de la dégradation d'un substrat donné par la technique RT-qPCR, il est nécessaire d'obtenir tout d'abord une biomasse importante pour la culture qui sera suivie. Pour ce faire, une phase de préculture est effectuée. Cette phase sera variable selon la nature de la culture étudiée (souche isolée ou enrichissement).

i) Enrichissements BE1-ETBE, GE1-ETBE, FR5-ETBE, GE1-MTBE, US2-MTBE, US3-MTBE, et souche *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051

Les précultures initiales sont réalisées en fiole Schott (500 mL) sur du MM (50 mL) contenant de l'ETBE ou du MTBE (10 µL) et ensemencées à partir d'un cryotube de conservation à -80 °C de l'enrichissement original, la concentration en substrat est mesurée par CPG/FID au cours du temps et l'ETBE et le MTBE avec ajout successif d'ETBE ou de MTBE jusqu'à obtention d'une culture dense. Cette préculture est repiquée dans 200 mL de MM contenant 40 µL de substrat. Après épuisement total du substrat, les cultures liquides sont alors réparties en 4 tubes Falcon de 50 mL ($\approx 2 \times 45 \text{ mL} + 2 \times 50 \text{ mL}$ de culture /tube). Ces tubes sont centrifugés à 8000 x g pendant 10 minutes à 22 °C et les culots sont lavés deux fois avec 4 x 30 mL de milieu MM et incubés à 29 °C sous agitation (150 rpm) sans substrat pendant 3 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 8000 x g pendant 10 minutes et les culots sont lavés deux fois avec 4 x 30 mL de milieu MM et le culot final est repris dans 150 mL milieu MM (reprise des culots par 4 x 30 mL de MM, puis mélange dans une bouteille de 500 mL stérile et ajout de 30 mL de MM).

Culture : 2 bouteilles Schott de 1 L contenant 350 mL de MM sont ensemencées par 50 mL de préculture. Le reste de la préculture est centrifugé ($2 \times 25 \text{ mL} = \text{inoculum}$) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 2 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans l'une et 100 µL d'ETBE 99 % ou de MTBE dans l'autre. A différents temps (BE1E : 0, 6h, 24h, 4j, 7j ; GE1E : 0, 2j, 7j, 14j, 18j ; FR5E : 0, 24h, 2j, 7j, 15j ; GE1M : 0, 2j, 7j, 15j, 29j ; US2M : 0, 24h, 4j, 7j et 14j ; US3M : 0, 2j, 7j, 10j et 7j ; C5LM : 0, 2j, 7j, 14j, 22j ; US3M3 : 0, 3j, 7, 10j et 14j ; M48 : 0, 2j, 7j, 14j et 18j), 100 mL sont prélevés dont 3 x 1 mL pour le dosage d'ETBE ou de MTBE et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL) et congelé à -80 °C.

Les expérimentations pour les enrichissements BE1-ETBE et FR5-ETBE ont été réalisées deux fois (une fois à l'ECL par Sandrine Demanèche, une fois à IFPEN par moi-même), dans les mêmes conditions de préculture et de culture.

ii) Rhodococcus sp. IFP 2040

Préculture : La souche estensemencée dans 5 mL de TSB à partir de 100 µL de culture conservée en glycérol 25 % à -20 °C et cultivée 3 j à 29 °C sous agitation. Cent cinquante mL de TSB sontensemencés par 1,5 mL de BE1E F1 et cultivés 16 h à 29 °C (DO = 2). La culture est alors répartie en 6 tubes Falcon de 50 mL (6 x 25 mL) et centrifugée à 5000 x g pendant 10 minutes, et les culots lavés deux fois avec 6 x 25 mL de milieu MM, repris dans 6 x 25 mL de milieu MM, et incubés sans substrat à 29 °C sous agitation (150 rpm) pendant 2 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes et les culots sont lavés deux fois avec 6 x 25 mL de milieu MM et le culot final est repris dans 150 mL milieu MM (reprise des culots par 6 x 25 mL de MM, puis mélange dans une bouteille de 500 mL stérile), à DO = 1,424 (dilution extrapolée).

Culture : 4 bouteilles de 1 L contenant 250 ml de MM sontensemencées par 25 mL de préculture (DO = 0,135). Le reste de la préculture est centrifugé (2x25 mL = inoculum) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 1,5 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans 2 bouteilles et 75 µL d'ETBE 99 % dans les 2 autres. A différents temps (0, 2h, 4h, 6h et 24h pour le 1er essai et 0, 3h, 6h, 24h et 4j pour le 2ème essai), 100 mL sont prélevés dont 2 x 2 mL pour le dosage d'ETBE et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL) et congelé à -80 °C.

Cette expérimentation a été réalisée deux fois (une fois à l'ECL par Sandrine Demanèche, une fois à IFPEN par moi-même), avec une excellente reproductibilité. Les conditions de préculture et de culture ont été identiques dans les deux cas.

iii) Rhodococcus sp. IFP 2043

Préculture : La souche estensemencée dans 5 mL de TSB à partir de 50 µL de culture conservée en glycérol 25 % à -20 °C et cultivée 3 j à 29 °C sous agitation. 200 mL de TSB sontensemencés par 0,5 mL de la culture de 3j et cultivés 24 h à 29 °C. La culture est alors répartie en 4 tubes Falcon de 50 mL (4 x 50 mL) puis centrifugée à 5000 x g pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 4 x 30 mL de milieu MM, repris dans 4 x 30 mL de milieu MM et incubés sans substrat à 29 °C sous agitation (150 rpm) pendant 6 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes et les culots sont lavés deux fois avec 4 x 30 mL de milieu MM et le culot final est repris dans 100 mL milieu MM (reprise des culots par 4 x 25 mL de MM, puis mélange dans une bouteille de 500 mL stérile), à DO = 2,36 (dilution extrapolée).

Culture: 2 bouteilles de 1 L contenant 250 mL de MM sontensemencées par 25 mL de préculture (DO = 0,2). Le reste de la préculture est centrifugé (2 x 25 mL = inoculum) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 1,5 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans une bouteille et 100 µL d'ETBE 99 % dans l'autre. A différents temps (0, 6h, 24h, 3j, 4j et 7j), 100 mL sont prélevés, dont 3 x 1 mL pour le dosage d'ETBE et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL), et congelé à -80 °C.

Cette expérimentation a été réalisée deux fois (une fois à l'ECL par Sandrine Demanèche, une fois à IFPEN par moi-même), avec une excellente reproductibilité. Les conditions de préculture et de culture ont été les mêmes dans les deux cas.

iv) **Betaproteobacteria IFP 2047**

Préculture : La souche estensemencée dans 7 mL de TSB ^{1/10} à partir de 100 µL de culture liquide en MM et cultivée 3 j à 29°C sous agitation. Deux Erlen de 250 mL de TSB 1/10 sontensemencés par 2,5 mL de GE1E d2 à DO = 0,600, et cultivés 3 j à 29 °C jusqu'à obtention d'une DO de 0,576 dans un Erlen, et de 0,546 dans l'autre Erlen. Les précultures ont alors été centrifugées successivement en plusieurs étapes afin de concentrer la culture dans 6 tubes Falcon à 5000 x g pendant 10 minutes. Les culots fragiles de couleur jaune intense ont été lavés deux fois avec 6 x 30 mL de milieu MM, puis repris dans 6 x 30 mL de milieu MM et incubés sans substrat à 29 °C sous agitation (150 rpm) pendant 4 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes et les culots sont lavés deux fois avec 6 x 30 mL de milieu MM, et le culot final est repris dans 180 mL de milieu MM (reprise des culots par 6 x 30 mL de MM), à DO = 1,036.

Culture : 2 bouteilles de 1 L contenant 450 mL de MM sontensemencées par 50 mL de préculture (DO = 0,097 dans une bouteille et 0,132 dans l'autre, mais la présence d'agrégats fausse probablement cette mesure). Le reste de la préculture est centrifugé (2 x 40 mL = inoculum) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 2,5 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans une et 130 µL d'ETBE 99 % dans l'autre. A différents temps (0, 3h, 6h, 24h, 7j et 10j), 100 mL sont prélevés, dont 3 x 1 mL pour le dosage d'ETBE, et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL) et congelé à -80 °C.

v) **Rhodococcus sp. IFP 2041**

Préculture : La souche estensemencée dans 5 mL de TSB à partir de 50 µL de culture conservée en glycérol 25 °C à -20 °C et cultivée 3 j à 29 °C sous agitation. 150 mL de TSB sontensemencés par 2 mL de préculture et cultivés 24 h jusqu'à obtention d'une DO de 7 (dilution extrapolée). La culture est alors répartie en 3x15 mL en tubes Falcon de 50 mL, et centrifugée à 5000 x g pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 3 x 30 mL de milieu MM, puis repris dans 3 x 30 mL de milieu MM, et incubés sans substrat à 29 °C sous agitation (150 rpm) pendant 5 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes et les culots sont lavés deux fois avec 3 x 30 mL de milieu MM, et le culot final est repris dans 90 mL milieu MM (reprise des culots par 3 x 30 mL de MM, puis mélange dans une bouteille de 500 mL stérile), à DO = 4,4 (dilution extrapolée).

Culture : 2 bouteilles de 1 L contenant 400 mL de MM sontensemencées par 8 mL de préculture (DO = 0,1). Le reste de la préculture est centrifugé (2 x 35 mL = inoculum) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 2 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans une et 100 µL d'ETBE 99 % dans l'autre. A différents temps (0, 6h, 24h, 3j et

7j), 100 mL sont prélevés dont 3x1 mL pour le dosage d'ETBE et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL) et congelé à -80 °C.

Cette expérimentation a été réalisée deux fois (une fois à l'ECL par Sandrine Demanèche, une fois à IFPEN par moi-même), avec une excellente reproductibilité. Les conditions de préculture et de culture ont été les mêmes dans les deux cas.

vi) Rhodococcus sp. IFP 2042

Préculture : 200 mL de MM ont étéensemencés à partir d'un cryotube de culture de la souche conservée à -80 °C avec ajout successif d'ETBE ou MTBE jusqu'à obtention d'une culture dense. Après épuisement total du substrat, la culture a alors été répartie en 3 tubes Falcon de 50 mL (2 centrifugations successives de 3 x 30 mL de culture /tube). Ces tubes sont centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 3 x 30 mL de milieu MM et incubés à 29 °C sous agitation (150 rpm) sans substrat pendant 3 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 3 x 30 mL de milieu MM, et le culot final est repris dans 150 mL de milieu MM (reprise des culots par 3 x 30 mL de MM, puis mélange dans une bouteille de 500 mL stérile et ajout de 60 mL de MM) de DO = 0,414.

Culture : 2 bouteilles de 1 L contenant 350 mL de MM sontensemencées par 50 mL de préculture (DO = 0,047 dans l'une et 0,052 dans l'autre). Le reste de la préculture est centrifugé (2 x 25 mL = inoculum) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 2 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans l'une et 100 µL d'ETBE 99 % dans l'autre. A différents temps (0, 5h, 24h, 2j et 4j), 100 mL sont prélevés dont 3 x 1 mL pour le dosage d'ETBE ou de MTBE et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL) et congelé à -80 °C.

vii) Proteobacteria IFP 2051

Préculture : La souche estensemencée dans 5 mL de TSB 1/10 à partir de 50 µL de culture conservée en glycérol 25 °C à -20 °C et cultivée 3 j à 29°C sous agitation. 200 mL de MM+TSB 1/10 sontensemencés par 1 mL de la préculture et cultivés 3 j à 29°C sous agitation. La culture est alors répartie en 6 tubes Falcon de 50 mL (4 x 35 mL + 2 x 30 mL de culture /tube) et centrifugée à 5000 x g pendant 10 minutes. Les culots sont lavés deux fois avec 6 x 30 mL de milieu MM, puis repris dans 3 x 30 mL de milieu MM et incubés sans substrat à 29 °C sous agitation (150 rpm) pendant 2 jours. Ces tubes sont à nouveau centrifugés à 5000 x g pendant 10 minutes et les culots sont lavés deux fois avec 3 x 30 mL de milieu MM et le culot final est repris dans 120 mL milieu MM (reprise des culots par 3 x 30 mL de MM, puis mélange dans une bouteille de 500 mL stérile et ajout de 30 mL MM), DO = 1,352 (dilution extrapolée).

Culture: 2 bouteilles de 1 L contenant 400 mL de MM sontensemencées par 35 mL de préculture (DO = 0,107). Le reste de la préculture est centrifugé (2 x 25 mL = inoculum) et les culots conservés à -80 °C. Les substrats sont alors ajoutés dans les bouteilles : 2 mL de TSB 30 g.L⁻¹ dans une et 100 µL de MTBE 99 % dans l'autre. A différents temps (0, 1j, 4j, 7j, 14j),

100 mL sont prélevés dont 3 x 1 mL pour le dosage d'ETBE et 0,5 mL pour la DO, le reste est culoté (dans 2 tubes Falcon de 50 mL) et congelé à -80 °C.

b) Extraction des acides nucléiques

Les extractions sont réalisées à partir des kits RNA PowerSoil[®] Total RNA Isolation Kit et RNA PowerSoil[®] DNA Elution Accessory Kit (MoBio). Tout comme pour le kit dédié à l'extraction d'ADN, ce kit permet d'effectuer à la fois une lyse mécanique ainsi qu'une lyse chimique, tout en protégeant les acides nucléiques des inhibiteurs de RT-PCR, des RNases et DNases. Les culots conservés à -80 °C sont repris dans 2,5 mL (2 tubes Falcon pour chaque temps sont regroupés pour l'extraction) de Bead solution et transférés dans les Bead tubes. Le reste de l'extraction est réalisé selon le protocole du fournisseur (<http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12866-25.pdf> et <http://www.mobio.com/images/custom/file/protocol/12867-25.pdf>). Les ARNs et les ADN sont finalement élués et précipités grâce à deux solutions salines différentes. Après précipitation finale, les ARN sont repris par 40 µL de solution SR7 et les ADN par 100 µL de solution SR8.

c) Traitement de l'ARN à la DNase

Deux traitements différents ont été testés afin de se débarrasser des ADN contaminants dans les ARNs extraits :

- Traitement au chlorure de lithium : Aux 40 µL d'ARN sont ajoutés 65 µL de LiCl 4 M et incubés la nuit à 4 °C. Après une nuit à 4 °C, les ARN sont précipités après une centrifugation de 15 min à 15000 rpm, 4 °C. Le culot d'ARN est traité à la DNase I (2,5 µL de DNase «RNase-free» (Qiagen) 2,7 U.µL⁻¹ + 2 µL de tampon + 11 µL d'H₂O «RNase-free») pendant 30 min à 29 °C. Les ARN sont précipités dans 2 vol d'isopropanol froid 30 min à -20 °C, centrifugés 8 min à 15000 rpm, 4 °C et lavés par 1 vol d'éthanol 70 % froid. L'extrait brut d'ARN est séché sous vide (15 min à 35 °C) puis repris dans 30 µL d'eau «RNase-free».
- Traitement à la DNase : le kit TURBO DNA-free[™] Kit (Invitrogen) est utilisé selon les recommandations du fournisseur (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms_055740.pdf).

L'ADN et l'ARN après traitement sont dosés par fluorométrie avec le Qubit.

II – 3 – 5. Retro-Transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR)

Cette technique, reprenant le principe de la qPCR, comporte une étape préliminaire qui permet de rétro transcrire l'ARN extrait des échantillons en ADN, dans le but de pouvoir les quantifier.

Les RT-qPCR ont été réalisées sur 60 cycles avec le sensimix one-step (Gentaur) selon les recommandations du fournisseur. Les amorces sont utilisées à 100 nM final (10 μ M initial), 18 μ L de mélange réactionnel sont introduits dans chaque tube et 2 μ L d'échantillons purs ou dilués sont ajoutés de façon à avoir une concentration en ADN ou ARN inférieure à 20 ng.L⁻¹.

Les programmes d'amplification sont :

20 min à 42 °C, 10 min à 95 °C, puis les cycles comprenant 15 s à 95°C, puis 15 s à Th, puis Te à 72 °C et enfin la dénaturation finale de Th à 99 °C. L'appareil utilisé est le Rotor-Gene de chez Corbett avec le rotor à 72 tubes et le logiciel pour l'analyse des résultats est la version 1.7.87 du fournisseur. Seules les amplifications avec un $R^2 > 0,99$ et $E > 0,7$ sont validées. La normalisation dynamique des tubes est utilisée.

D'autres RT-qPCR ont également été effectuées au sein d'IFPEN. Dans ce cas, le kit iScript™ cDNA Synthesis Kit a été utilisé pour l'étape de rétro-transcription de l'ARN en ADNc selon les indications du fournisseur (<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106228C.pdf>), avec une étape de 5 min à 25 °C, puis une étape de 30 min à 42 °C, et enfin, une étape de 5 min à 85 °C. Les qPCR, quant à elles, ont été réalisées en microplaques avec le kit iQ SYBR Green Supermix (Biorad: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/4106212B.pdf>). Les programmes d'amplification sont les mêmes que ceux cités précédemment. L'appareil utilisé est le MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Biorad), et le logiciel iQ5 (Biorad).

II – 3 – 6. Électrophorèse sur gel d'agarose

Après chaque réaction d'amplification par PCR, les produits PCR obtenus sont vérifiés sur gel d'agarose 1,5 % par électrophorèse. 5 μ L de produit PCR sont mélangés à 1 μ L de tampon de charge (contenant du SybrSafe, marquant l'ADN). Après migration (90 V, 1 h), les bandes d'ADN sont observées en plaçant le gel sur un transilluminateur (longueur d'onde des UV : 530 nm).

II – 3 – 7. Technique RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

La technique RISA permet d'étudier la biodiversité d'un échantillon en réalisant une étape d'amplification par PCR sur les régions IGS 16S-23S de l'ADN des micro-organismes (régions de différentes tailles selon les micro-organismes) avec les amorces RISA-F / RISA-R (Ranjard et al., 2000), puis séparation par électrophorèse capillaire après dépôt sur puce (Bioanalyser Agilent). Ainsi, plusieurs fragments d'ADN de différentes tailles sont observables, et donnent une première idée de la biodiversité des consortia. Le protocole

détaillé est décrit par le fournisseur (Agilent DNA 1000 Kit Guide). Des analyses statistiques sont effectuées sur les résultats obtenus (logiciel R) sur la base des tailles des fragments obtenus et sont présentées sous la forme d'une analyse en composante principale (ACP).

II – 3 – 8. Technique DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Cette technique engendre des profils de bandes d'ADN sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (gradient d'urée/formamide), caractérisant ainsi les communautés bactériennes majoritaires présentes dans l'environnement étudié. La dénaturation des doubles brins d'ADN s'effectue selon le pourcentage de bases GC dans le fragment étudié. Plus une séquence sera riche en GC, plus la dénaturation exigera des conditions dénaturantes, plus le fragment d'ADN migrera loin dans le gel. Après extraction des ADNs totaux, ceux-ci doivent être soumis à une amplification par PCR. Le couple d'amorces 341F/803R a été choisi pour sa capacité à amplifier la région V3-V4 des gènes codant l'ARNr 16S, une région suffisamment hypervariable chez les procaryotes pour espérer obtenir des profils de migration distincts en DGGE. Le GC-clamp associé à l'amorce «forward» du couple permet aux deux brins d'ADN appariés de ne pas totalement se séparer lors de la migration. Afin d'obtenir suffisamment d'ADN, il est possible de préparer plusieurs amplifications par PCR pour chaque échantillon et de les purifier/concentrer (QIAquick PCR purification kit, Qiagen) ensuite dans un seul tube (volume final : 50 µL).

La technique a été décrite pour l'analyse des produits laitiers (Ogier et al., 2004) ou des échantillons de l'environnement (Muyzer et al., 1993). Le système utilisé au cours de cette étude est le système Ingeny phorU (INRA Jouy en Josas, unité Micalis). Les données pour la préparation des gels (gradient 20-70 %) sont exposées dans les tableaux 2.7.1 et 2.7.2.

Tableau 2.7.1. Préparation des solutions de migration

Produit	Solution à 20 %	Solution à 70 %
Urée	2,0 g	7,0 g
Formamide	1,9 mL	6,65 mL
TAE 50X	480 µL	480 µL
Acrylamide	4,8 mL	4,8 mL
Eau	Qsp 24 mL	Qsp 24 mL
APS 10 %	100 µL	100 µL
TEMED	5 µL	5 µL

Tableau 2.7.2. Préparation du gel de concentration (stacking gel)

TAE 50X	100 µL
Acrylamide	1 mL
Eau	Qsp 5 mL
APS 10 %	100 µL
TEMED	5 µL

La cuve de migration contient 17 L de tampon TAE (Tris Acétate EDTA) 1,25X, à 60 °C. Pour chaque échantillon, 10 µL d'ADN sont mélangés à 5 µL de tampon de charge. 10 µL de marqueur sont également déposés dans plusieurs puits du gel afin de permettre ensuite une bonne normalisation avec le logiciel GelCompar II (BioNumerics, Applied Maths). La migration dure 16 h (120 V, 150 mA, 50 W, pour deux gels).

Après migration, les gels sont colorés au SybrSafe (10-15 µL/gel, 30 min) puis révélés à l'aide du dispositif Safe Imager (Invitrogen). Les bandes sont découpées au scalpel, puis l'ADN est dissout dans 60 µL d'eau MilliQ stérile pendant une nuit à 4 °C. L'ADN ainsi obtenu est utilisé pour effectuer des amplifications PCR (couple 341F/803R, sans GC-clamp) dont les produits sont envoyés au séquençage.

II – 3 – 9. Clonage

Une étape de clonage a été réalisée dans certains cas afin de s'assurer de la pureté d'une souche ou dans le but de créer une banque de clones à partir des enrichissements. A cet effet, le kit TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen) a été employé. Il est utilisé selon les préconisations du fournisseur (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/topotaseq_man.pdf), en employant les cellules bactériennes *E.coli* TOP10 chimio-compétentes pour l'étape de transformation. Nous avons suivi pour les différentes étapes de ce protocole les préconisations du fabricant.

Dans le cas de la vérification de la pureté de souches, une fois les clones obtenus sur milieu LBA + kanamycine, 5 à 10 clones sont repiqués. Une PCR sur colonie est ensuite réalisée, en utilisant le couple d'amorces M13 afin d'amplifier le plasmide TOPO, présenté sur la figure 2.2 (<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/K457502>).

LacZα initiation codon

	M13 Reverse priming site	LacZα initiation codon		T3 priming site
201	CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTCA GAATTAACCC TCACTAAAGG			
	GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTTCGAGT CTTAATTTGGG AGTGATTTC			
261	GACTAGTCCT GCAGGTTTAA ACGAATTCGC CCTT	PCR Product	AAGGGC GAATTCGCGG	
	CTGATCAGGA CGTCCAAATT TGCTTAAGCG GGAA		TTCCCG CTTAAGCGCC	
311	CCGCTAAATT CAATTCGCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC GTCGTTTAC	T7 priming site	M13 Forward (-20) priming site	
	GGCGATTTAA GTTAAGCGGG ATATCACTCA GCATAATGTT AAGTGACCGG CAGCAAAATG			



**Comments for pCR™4-TOPO®
3956 nucleotides**

- lac* promoter region: bases 2-216
- CAP binding site: bases 95-132
- RNA polymerase binding site: bases 133-178
- Lac repressor binding site: bases 179-199
- Start of transcription: base 179
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- LacZα-*ccdB* gene fusion: bases 217-810
 - LacZα portion of fusion: bases 217-497
 - ccdB* portion of fusion: bases 508-810
- T3 priming site: bases 243-262
- TOPO® Cloning site: bases 294-295
- T7 priming site: bases 328-347
- M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
- Kanamycin promoter: bases 1021-1070
- Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
- Ampicillin (*b/a*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
- Ampicillin (*b/a*) promoter: bases 3064-3160 (c)
- pUC origin: bases 3161-3834
- (c) = complementary strand

Figure 2.2. Carte du plasmide pCR™4-TOPO®

La PCR permet de vérifier que le plasmide présent chez les bactéries ayant poussé sur ce milieu a bien incorporé un fragment d'ADN de la taille attendue avant envoi au séquençage.

Des banques de clones ont également été faites sur les 5 enrichissements ETBE (BE1, GE1, FR3, FR5, US6), en amplifiant les gènes codant l'ARNr 16S à l'aide des amorces pA/pH (Edwards et al., 1989). Une fois les clones obtenus, et pour chaque enrichissement, 96 d'entre eux sont repiqués sur microplaques en conditions stériles, dans 200 µL de LB + kanamycine,

et incubés une nuit à 37 °C sous agitation. Ces plaques sont ensuite préparées afin d'être envoyées au séquençage (Beckman Coulter Genomics: <http://www.beckmangenomics.com/>).

Enfin, étant donné la probable diversité des gènes *alkB* et *mdpA*, du clonage a également été effectué pour ces deux gènes, avec respectivement les couples Rhose2/Rhoas1 et MdpA1F / MdpA1R. Ces clonages ont été réalisés dans l'enrichissement US6-ETBE, dans les souches IFP 2041, IFP 2042 et IFP 2043 pour le gène *alkB*, et dans la souche IFP 2051 pour le gène *mdpA*.

II – 3 – 10. Séquençage

Le séquençage des échantillons d'ADN est réalisé par la société GATC (<http://www.gatc-biotech.com/fr/index.html>). Il est possible d'envoyer directement des produits d'amplification par PCR (20 µL/échantillon à une concentration comprise entre 10 et 50 ng.µL⁻¹). Une fois les résultats du séquençage disponibles, le chromatogramme de chaque séquence doit être étudié (logiciels Chromas Lite ou SeqMan). Les séquences obtenues avec les amorces forward et les amorces reverse sont alors assemblées afin de former une séquence consensus (logiciel Seqman, suite Lasergene). Cette séquence d'ADN est comparée aux séquences des bases de données en ligne, notamment en utilisant l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>), faisant appel à la base de données du NCBI (National Center for Biotechnology Information), ou, pour les gènes codant l'ARNr 16S, la fonction Classifier de RDP (Ribosomal Database Project: <http://rdp.cme.msu.edu/>), afin de permettre de caractériser les souches auxquelles appartiennent les ADNs extraits, et ainsi, de leur désigner une assignation taxonomique. En dessous de 95 %, il est possible de lui affilier un nom de genre, voire même d'espèce, si ce taux monte à au moins 98 %. En deçà, le niveau taxonomique généralement gardé s'arrête au phylum ou à la classe.

II – 3 – 11. Arbres phylogénétiques

Les séquences d'ADN obtenues sont utilisées pour dessiner des arbres phylogénétiques pour les gènes codant l'ARNr 16S ainsi que des dendrogrammes pour les autres gènes étudiés. Les arbres obtenus permettent de faire des rapprochements de populations et de mettre en évidence des groupes (clusters). La première étape nécessaire pour dessiner des arbres phylogénétiques est de procéder à un alignement des séquences que l'on souhaite retrouver ensuite dans l'arbre. Ces alignements peuvent être faits à l'aide de l'outil "Align" du site Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) pour les gènes codant l'ARNr 16S, ou bien à l'aide du logiciel Seaview (Gouy et al., 2010) pour les autres gènes. En plus des séquences d'ADN résultant de nos séquençages, des séquences dites de référence sont généralement incluses afin de permettre une meilleure caractérisation taxonomique. L'arbre en lui-même est ensuite réalisé en utilisant le logiciel Seaview, selon le principe de la méthode de vraisemblance ML (Maximum Likelihood). La séquence du gène codant l'ARNr 16S de la souche *Aquifex pyrophilus* est généralement ajoutée afin de servir d'outgroup, pour permettre un enracinement des arbres.

II – 4. Techniques analytiques

II – 4 – 1. Analyse par CPG des composés très solubles

L'ETBE, le MTBE et le TBA sont analysés sur un chromatographe VARIAN 3400 équipé d'un passeur automatique Varian 8200 Cx, d'un détecteur à ionisation de flamme (FID) et d'une colonne capillaire CP Porabond Q (0,32 mm x 25 m ; épaisseur de phase : 5 µm). Le gaz vecteur est l'hélium à 1,6 mL.min⁻¹. La température de l'injecteur, initialement de 110 °C, augmente de 10 °C.min⁻¹ jusqu'à une température finale de 250 °C maintenue pendant une minute. La température de la colonne est initialement de 105 °C, puis elle atteint 210 °C en utilisant un gradient de température à deux étapes : de 105 °C à 210 °C à la vitesse de 10 °C.min⁻¹, la température étant ensuite maintenue à 210 °C pendant 20 minutes. La température du détecteur à ionisation de flamme est maintenue constante à 280 °C. 1 µL d'échantillon, préalablement filtré (0,22 µm), est injecté en mode on-colonne. Des étalons externes (MTBE, ETBE ou TBA) préparés par pesée sont dosés en parallèle afin de calculer les concentrations.

II – 4 – 2. Détermination des teneurs en CO₂

Le CO₂ est dosé sur un chromatographe en phase gazeuse (CPG) Varian 3800 équipé d'un détecteur de type catharomètre et d'une colonne capillaire Porapak Q (long 1,83 m, diam 2 mm). Le gaz vecteur est l'hélium à 30 mL.min⁻¹. Les températures du four et du détecteur sont respectivement de 100 °C et de 130 °C. L'alimentation du filament est de 181 mA. Les températures de l'injecteur, du détecteur et de la colonne sont fixées à 100°C. Les valeurs de concentration sont évaluées par rapport à un gaz étalon contenant 4,82 % de CO₂. L'échantillon à doser (250 µL) est prélevé directement dans la phase gazeuse de la fiole de culture avec une seringue étanche au gaz.

II – 4 – 3. Analyse des autres composés utilisés

Les BTEXs (Benzène, Toluène, Ethylbenzène, *m*-xylène, *o*-xylène, *p*-xylène) et les *n*-alcanes (octane et hexadécane) sont analysés après extraction au pentane. Des fioles de contrôle, non ensemencées sont incubées dans les mêmes conditions afin de déterminer la perte abiotique pour les composés.

5 mL de *n*-pentane contenant du 1,1,2-trichloroéthane (1,1,2-TCA, 600 mg.L⁻¹), qui sert d'étalon interne sont ajoutés dans chaque fiole (mesure par pesée). Les fioles sont agitées (une nuit) puis décantées à 4 °C. Le *n*-pentane surnageant est prélevé pour dosage par CPG/split/FID sur colonne PONA (voir tableau 3.8). Les concentrations résiduelles sont calculées par rapport au standard interne. Les résultats sont exprimés en pourcentages de dégradation calculés par rapport à la concentration en composé mesurée dans les fioles de contrôle.

Tableau 2.8. Conditions d'analyse par CPG/split/FID sur colonne PONA

Section	Paramètres du chromatographe	Valeurs
Caractéristiques	Colonne	Pona
	Longueur	50 m
	Diamètre intérieur	0,2 mm
	Phase	Crosslinked methyl siloxane
	Epaisseur de la phase	0,5 μm
Méthode colonne	1 ^{er} palier	
	Température initiale	35°C
	Température finale	114°C
	Pente	1,1°C.min ⁻¹
	2 ^{ème} palier	
	Température initiale	114°C
	Température finale	280°C
	Pente	1,7°C.min ⁻¹
Détecteur	Température	280°C
Injecteur (non programmé)	Température initiale	250°C
	Split	50 mL.min ⁻¹
Méthode d'injection	Volume	1 μL
	Vitesse	5 $\mu\text{L.s}^{-1}$
	Temps de séjour de l'aiguille	0 s
	Débit de fuite	0
Gaz vecteur (hélium)	Pression d'entrée	25 psi
	Débit	0,5 mL.min ⁻¹
Autres gaz	Make up (N ₂)	23 mL.min ⁻¹
	Air	290 mL.min ⁻¹
	Hydrogène	35 mL.min ⁻¹

III – Objectifs de l'étude et démarche expérimentale

III – Objectifs de l'étude et démarche expérimentale

Les objectifs de ces travaux de thèse concernent plusieurs domaines. Le travail s'effectuera à partir des enrichissements sur ETBE et sur MTBE, obtenus à partir d'échantillons d'aquifères de plusieurs sites géographiques différents, et ayant été affectés par des pollutions par des éthers (ETBE, MTBE ou TAME). Plusieurs problématiques seront abordées:

- Quelles sont les capacités de dégradation de ces enrichissements pour les substrats leur servant de source de carbone (ETBE / MTBE), mais également, quelles vont être les capacités de dégradation de ces enrichissements pour des composés que l'on retrouve fréquemment dans les essences (BTEXs, *n*-alcanes) ?
- Quelles vont être les communautés bactériennes au sein de ces enrichissements ayant des origines variées et ayant été affectés par des pollutions différentes ? Y'a-t-il des groupes bactériens en particulier qui vont émerger après cette pression de sélection, ou qui vont être spécifiques d'un substrat de croissance ? Quelles vont être les souches bactériennes impliquées directement dans la dégradation des composés comme l'ETBE, le MTBE et le TBA ?
- Quels vont être les gènes impliqués dans la dégradation de l'ETBE et du MTBE au sein de nos enrichissements ? La recherche des gènes connus dans la littérature sera-t-elle suffisante pour expliquer les phénomènes de dégradation ? De quelle façon seront exprimés ces gènes ?

Plusieurs techniques appartenant à des domaines scientifiques différents, tels que l'analytique (dosage par CPG), la microbiologie (culture et isolement des micro-organismes) ou encore la biologie moléculaire (RT-qPCR, etc.), ont été mises en œuvre. La démarche expérimentale suivie est résumée sur la figure 3.1.

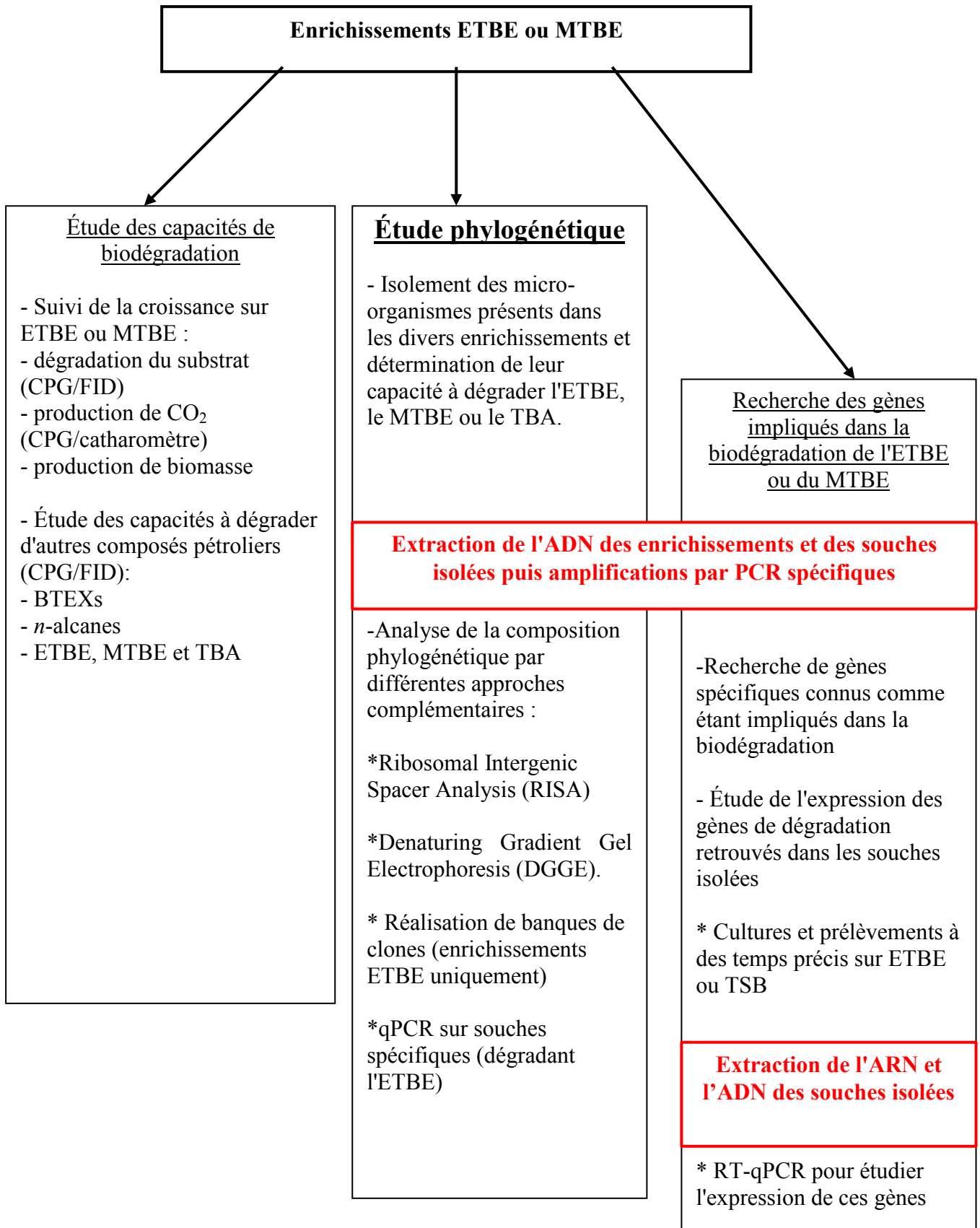


Figure 3.1. Organisation et démarche expérimentale

IV – Résultats et discussion

IV – Résultats et discussion

IV – 1. Capacités de dégradation des différents enrichissements

Cette partie de l'étude est consacrée à l'évaluation des capacités de dégradation des différents enrichissements présentés dans le tableau 2.1 (Matériel et Méthodes) et obtenus sur MTBE ou sur ETBE. Nous avons étudié les capacités de ces différents enrichissements tout d'abord pour l'ETBE ou le MTBE ainsi que pour le TBA qui est le principal intermédiaire de dégradation de l'ETBE et du MTBE, puis pour les autres composés solubles naturellement présents dans les essences que sont les composés mono-aromatiques (BTEXs) ou pour les *n*-alcane (octane, hexadécane), composés dont la présence pourrait avoir un impact sur la dégradation des éthers-carburants du fait de contaminations simultanées.

IV – 1 – 1. Biodégradation de l'ETBE et du MTBE

Les capacités de dégradation pour l'ETBE et/ou pour le MTBE ont été testées sur MM pour chaque enrichissement avec comme seule source de carbone l'ETBE ou le MTBE, par suivi CPG de l'ETBE ou du MTBE résiduel ainsi que de la production de CO₂. Un calcul du rendement de production de biomasse est également effectué par mesure de poids sec au début et à la fin de la biodégradation quand cela était possible. Par contre, il n'a pas été possible de suivre la croissance en mesurant l'évolution de la densité optique car la biomasse présente dans les enrichissements adopte la plupart du temps la forme de floculats hétérogènes. Les résultats obtenus pour ces cinétiques de dégradation sont présentés sur les figures 4.1 et 4.2. Les écarts types représentent les différences de quantité de substrat mesurées entre chaque triplicata.

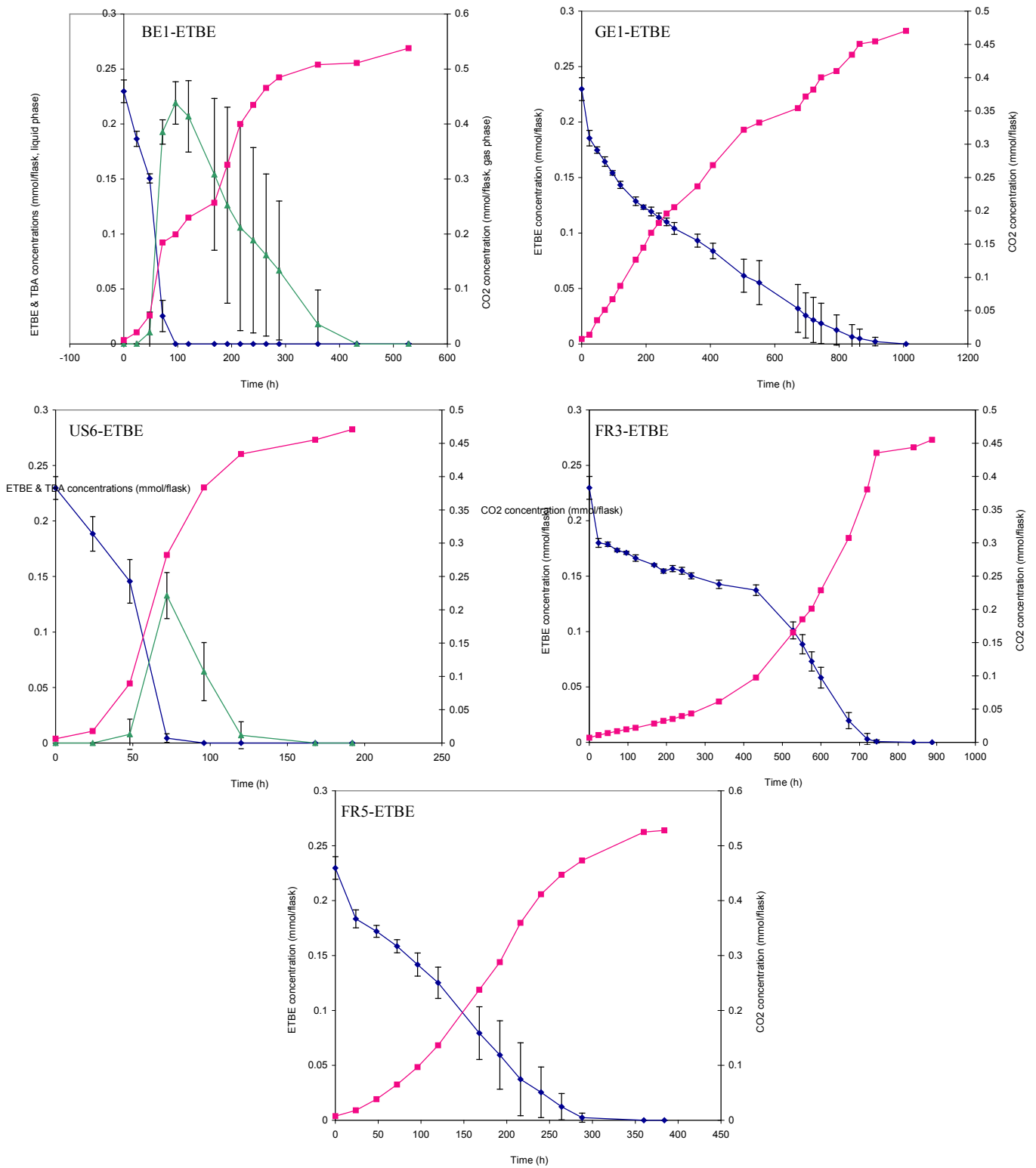


Figure 4.1. Cinétiques de dégradation de l'ETBE par les enrichissements obtenus sur ETBE (BE1-, GE1-, US6-, FR3- et FR5-ETBE)

◆-◆ : concentration en ETBE ; ■-■ : concentration en CO₂ ; ▲-▲ : concentration en TBA
 Dans le cas du CO₂, la courbe présentée est la moyenne de deux mesures.

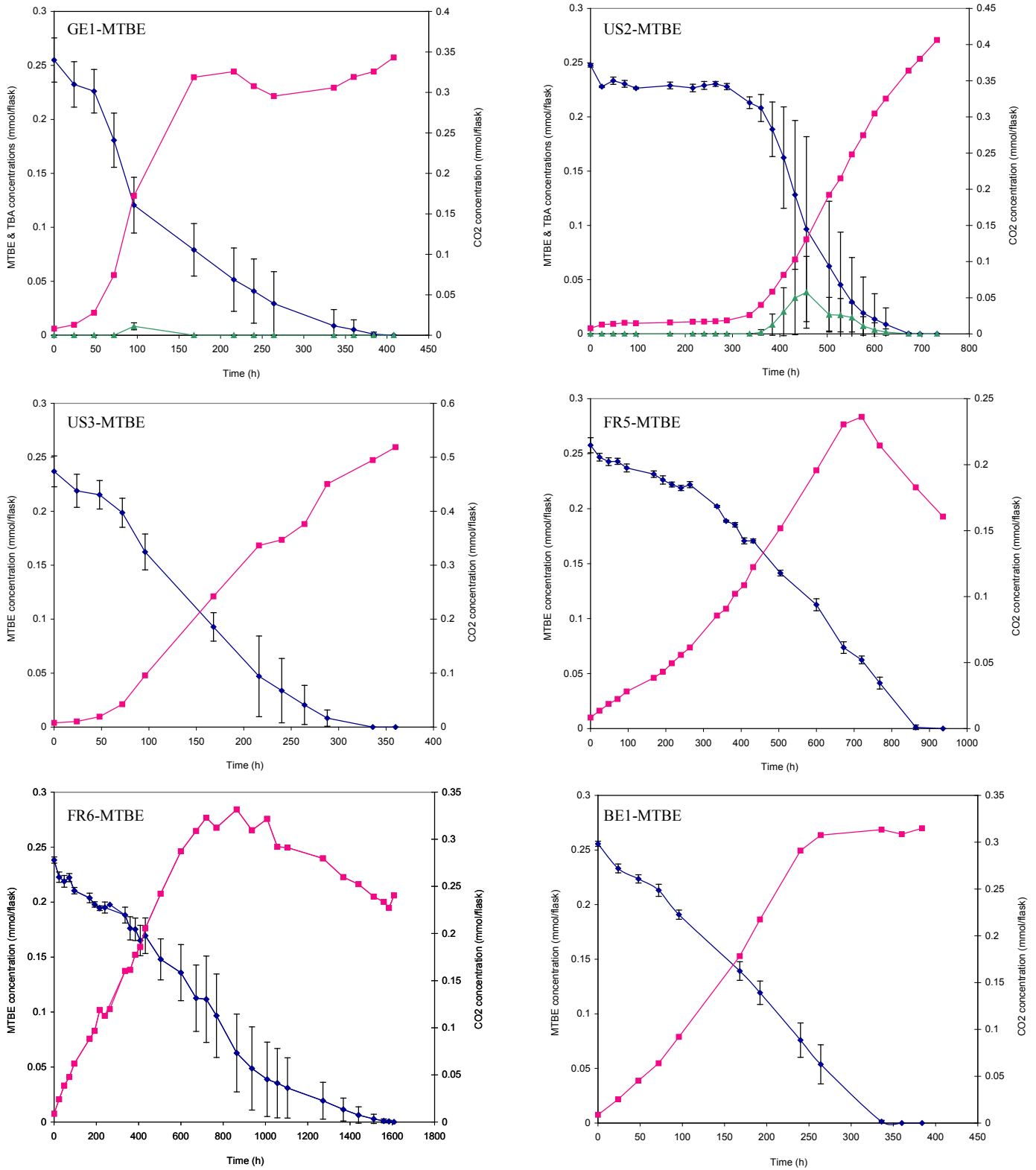


Figure 4.2. Cinétiques de dégradation du MTBE par les enrichissements obtenus sur MTBE (GE1-, US2-, US3-, FR5-, FR6- et BE1-MTBE)

◆-◆: concentration MTBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA
 Dans le cas du CO₂, la courbe présentée est la moyenne de deux mesures.

Les bilans de ces cinétiques de dégradation ont été regroupés dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1. Récapitulatif des données sur la biodégradation des différents enrichissements

Nom de l'enrichissement	Durée totale de la dégradation (heures)	Quantité de CO ₂ produite à la fin de la dégradation (mmoles/fioles, phase gazeuse)	Vitesse maximale de dégradation de l'ETBE ou du MTBE (mg de substrat. h ⁻¹ .mg ⁻¹ biomasse initiale)	Biomasse initiale (mg.L ⁻¹)	Rendement biomasse (mg de biomasse produite.mole ⁻¹ de substrat consommé)
BE1-ETBE	408	0,302	0,42	8,5	43,9 ± 12,2
GE1-ETBE	1008	0,481	0,02	20	11,2 ± 4,1
US6-ETBE	168	0,466	0,08	51,6	37,7 ± 8,2
FR3-ETBE	768	0,456	0,02	25,6	19,4 ± 1,0
FR5-ETBE	360	0,537	0,02	30,8	33,7 ± 10,2
GE1-MTBE	408	0,351	0,22	6,7	16,7 ± 2,6
US2-MTBE	696	0,389	0,02	38,2	7,9 ± 0,9
US3-MTBE	336	0,506	0,05	17,2	15,0 ± 3,5
FR5-MTBE	936	0,355	0,03	11,3	28,2 ± 6,2
FR6-MTBE	1608	0,531	0,002	ND	ND
BE1-MTBE	360	0,681	0,02	26,7	30,8 ± 21.1

Concentrations initiales en ETBE ou MTBE : 0,25 mmoles/fioles

ND: Non Déterminé

Les témoins abiotiques de ce test n'ont présenté aucune dégradation du substrat

Au vu des cinétiques de dégradation, nous avons pu constater que pour chaque enrichissement réalisé sur ETBE, les cinétiques de dégradation sont différentes. Dans certains cas, une production intermédiaire de TBA est observée (BE1-ETBE et US6-ETBE). La production de TBA est particulièrement forte dans le cas de BE1-ETBE qui a la vitesse maximale de dégradation de l'ETBE la plus élevée montrant que dans ce cas, c'est la dégradation du TBA qui est l'étape limitante. La production de TBA est par elle-même une donnée importante à prendre en compte car cela montre que dans les aquifères, où les conditions peuvent souvent être limitantes (oxygène,...) par rapport à des études en fioles en conditions contrôlées, la biodégradation de l'ETBE peut conduire à l'accumulation de TBA qui est un composé en lui-même problématique (Rasa et al., 2011 ; Shih et al., 2004). La possibilité d'une dégradation incomplète avec accumulation de TBA avait été évoquée dans le cas du MTBE sur des sites contaminés et attribuée, en effet, à des conditions spécifiques de limitations (Schmidt et al., 2004 ; Wei and Finneran, 2011). La présence de TBA dans les aquifères due à une dégradation limitée d'un des éthers est un problème important, essentiellement pour deux

raisons : (i) il s'agit d'un alcool dont la solubilité est infinie et dont l'extraction à partir de l'eau d'un site contaminé sera encore plus difficile à réaliser par les moyens classiques physico-chimiques ("purge and stripp", essentiellement) ; (ii) ce composé est considéré comme "weak carcinogen" (Chen, 2006). La durée totale de la dégradation de l'ETBE est très variable et peut aller de 168 h (7 jours) pour US6-ETBE, jusqu'à 1008 h (42 jours) pour GE1-ETBE. Dans le cas de FR3-ETBE, nous avons obtenu un profil de dégradation très particulier où la dégradation de l'ETBE n'atteignait sa vitesse maximale qu'après plus de 400 heures d'incubation. Ce point sera discuté plus loin en liaison avec la composition phylogénétique de l'enrichissement. La production de CO₂, ainsi que les rendements en termes de production de biomasse au cours de la dégradation, sont eux aussi variables d'un enrichissement à l'autre. Concernant les enrichissements réalisés sur MTBE, nous avons constaté que, tout comme pour l'ETBE, les cinétiques de dégradation sont différentes d'un enrichissement à l'autre. Dans certains cas, une production intermédiaire de TBA, bien que moindre que sur ETBE, est également observée (GE1-MTBE et US2-MTBE) posant potentiellement les mêmes problèmes soulignés plus haut. La durée totale de la dégradation du MTBE est très variable et peut aller de 360 h (15 jours) pour BE1-MTBE, jusqu'à 1608 h (67 jours) pour FR6-MTBE et dans ce cas la production de biomasse n'était pas quantifiable. C'est pour l'enrichissement GE1-MTBE que la vitesse maximale de dégradation la plus élevée a été observée (0,22 mg de MTBE consommé.h⁻¹.mg⁻¹ de biomasse initiale). La production de CO₂, ainsi que les rendements en termes de production de biomasse au cours de la dégradation, sont eux aussi variables et dépendants de l'enrichissement considéré.

D'une façon générale les rendements en biomasse que nous avons pu mesurer sont faibles mais ceci est plus particulièrement vrai dans le cas des enrichissements sur MTBE pour lesquels la moyenne des valeurs de rendement (19,7 mg de biomasse produite.mole⁻¹ de MTBE consommé) est plus basse que la moyenne des valeurs de rendement mesurées sur ETBE (29,2 mg de biomasse produite.mole⁻¹ de MTBE consommé). Néanmoins, comme dans le cas du MTBE, les rendements en biomasse sur ETBE restent faibles et ceci n'avait pas été montré auparavant. Des valeurs faibles de rendement en biomasse ont été également constatées pour la biodégradation de composés polluants par des échantillons d'aquifères (Gomez et Alvarez, 2010). De façon intéressante, lorsque ces auteurs comparent les rendements obtenus sur *n*-butanol ou iso-butanol (c'est-à-dire un composé linéaire vs. un composé branché), ils obtiennent en conditions aérobies des valeurs respectives de 78,4 et 9,6 mg de biomasse produite.mole⁻¹ de substrat consommé ce qui montre bien que l'assimilation des composés branchés pose un problème spécifique.

Dans certains cas, il est possible de lier une croissance plus lente à un rendement en biomasse faible (GE1-ETBE, FR3-ETBE, US2-MTBE et FR6-MTBE). Une telle constatation avait été faite préalablement en étudiant les paramètres de croissance sur MTBE des différentes souches pures à l'aide d'un modèle (Müller *et al.*, 2008). Les résultats que nous avons obtenus pour ces enrichissements sont en accord avec les calculs effectués d'après le modèle montrant que dans les cas de croissance lente, la production de biomasse, fortement limitée par les flux de substrat entrant dans les voies métaboliques, est faible. Nos résultats confirment donc bien les limitations déjà rapportées et qui ont des conséquences sur l'atténuation naturelle du

MTBE sur sites pollués: faible biomasse produite, et donc faible teneur en micro-organismes dégradeurs dans la population, et en conséquence, lenteur de la biodégradation. Ils montrent également que la situation vis-à-vis de l'ETBE est probablement similaire comme observé, d'ailleurs, lors du traitement d'un site pollué par ETBE (Fayolle-Guichard et al., 2012). Il reste néanmoins que dans le cas de BE1-ETBE, les systèmes enzymatiques présents semblent suffisamment efficaces pour alimenter le métabolisme des micro-organismes et permettre une bonne croissance sur ETBE.

IV – 1 – 2. Biodégradation des composés des essences (BTEXs et *n*-alcanes)

Étant donné que les contaminations d'eaux souterraines par l'ETBE ou le MTBE sont souvent associées à des contaminations par d'autres composés des essences, il était important de connaître les capacités de dégradation de chaque enrichissement obtenu sur ETBE ou MTBE vis-à-vis des possibles co-contaminants qui peuvent leur être associés. C'est pourquoi les capacités de dégradation ont également été testées individuellement pour 11 composés, préalablement dissous dans du HMN pour obtenir une concentration initiale de l'ordre de 200 mg.L⁻¹. Ces composés sont les suivants: ETBE, MTBE, TBA, Benzène, Toluène, Éthylbenzène, *m*-Xylène, *o*-Xylène, *p*-Xylène, Octane et Hexadécane. Après une incubation de 4 semaines, les dosages par CPG des concentrations résiduelles ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2. Pourcentages de dégradation de différents substrats par les enrichissements ETBE et MTBE

Composés	Capacités de dégradation (%) des différents enrichissements ^a										
	FR3-ETBE	US6-ETBE	FR5-ETBE	GE1-ETBE	BE1-ETBE	GE1-MTBE	US2-MTBE	US3-MTBE	BE1-MTBE	FR5-MTBE	FR6-MTBE
ETBE	55,7 ± 14,4	100	100	100	100	100	3,0 ± 1,9	0	0	100	100
MTBE	0	0	100*	89,1 ± 18,9	16,3 ± 2,7	100	100	100	100	79,5 ± 18,6	25,6 ± 8,4
TBA	91,9 ± 14,0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Benzène	100	99,0 ± 0,8	100	100	61,0 ± 11,0	99,0 ± 0,6	0	100	71,0 ± 5,4	100	56,0 ± 9,0
Toluène	100	0	99,0 ± 0,1	0	0	98,0 ± 0,2	0	80,0 ± 25,2	98,0 ± 0,3	99,0 ± 0,3	80,0 ± 10,6
Éthylbenzène	23,0 ± 14,4	0	100	0	100	0	0	0	98,0 ± 0,4	100	53,0 ± 9,4
<i>m</i>-xylène	100	99,0 ± 0,1	71,0 ± 41,7	0	100	100	0	0	0	100	100
<i>p</i>-xylène	100	97,0 ± 1,8	100	0	97,0 ± 1,7	100	0	0	0	100	99,0 ± 0,3
<i>o</i>-xylène	0	0	99,0 ± 0,1	0	0	0	0	0	0	98,0 ± 1,0	24,0 ± 17,2
Octane	100	99,0 ± 0,3	100	36,0 ± 13,3	100	99,0 ± 0,1	100	83,0 ± 14,8	93,0 ± 10,1	100	100
Hexadécane	100	100	100	100	78,0 ± 20,0	61,0 ± 36,0	100	96,0 ± 4,0	86,0 ± 17,0	98,0 ± 0,3	93,0 ± 0,3

^a Les valeurs indiquées sont les moyennes basées sur les données obtenues pour chaque triplicata.

* MTBE entièrement dégradé en TBA

Les concentrations initiales (en mg.L⁻¹) pour chacun des composés sont les suivantes: TBA: 276,8 ; MTBE: 279,3 ; ETBE: 276,9 ; Benzène: 277,2 ; Toluène: 283,3 ; Ethylbenzène: 237,3 ; *m*-xylène: 227,1 ; *p*-xylène: 204,6 ; *o*-xylène: 239,9 ; octane: 282,8 ; hexadécane: 226,3

Les témoins abiotiques incubés dans des conditions similaires ont été utilisés pour effectuer les calculs des pourcentages de dégradation.

Chaque enrichissement possède des capacités de dégradation qui lui sont propres pour les différents composés étudiés. Seuls le TBA et l'hexadécane ont été dégradés dans tous les cas, tandis que le *o*-xylène n'a été dégradé que dans trois cas (complètement par FR5-ETBE et FR5-MTBE, et partiellement par FR6-MTBE).

C'est l'enrichissement US2-MTBE qui a les capacités les moins importantes, dégradant uniquement le MTBE, le TBA, l'octane et l'hexadécane.

Les enrichissements possédant les capacités de dégradation les plus larges sont FR5-ETBE et FR5-MTBE. Dans le cas de FR5-ETBE, seul le *m*-xylène n'est dégradé qu'à 71 % au terme des 4 semaines d'incubation. Le MTBE est aussi dégradé par cet enrichissement mais la dégradation est plus lente car, dans ce cas, au bout de 4 semaines tout le MTBE a été converti en TBA qui n'est que partiellement reconstitué. Pour FR5-MTBE, tous les composés sont également dégradés de façon totale, mise à part le MTBE, qui n'est dégradé qu'à 79,5 % au terme des 4 semaines. Globalement dans le cas des enrichissements issus de l'échantillon FR5, les capacités sont similaires, que le substrat d'enrichissement soit le MTBE ou l'ETBE. Ceci n'est pas le cas pour les enrichissements effectués à partir de GE1, pour lesquels nous avons montré que GE1-MTBE a des capacités supérieures à GE1-ETBE. De même, les profils de dégradation sont différents pour BE1-ETBE et BE1-MTBE. La sélection de micro-organismes lors de l'enrichissement sur un substrat donné a un impact sur la capacité à dégrader d'autres substrats. Ces résultats seront discutés en liaison avec la composition phylogénétique des enrichissements.

Le cas de l'impact des co-contaminations d'aquifères par du MTBE et par des BTEXs a été étudié dans le cas de *M. petroleiphilum* PM1 (Deeb et al., 2001) montrant que cette souche était capable de dégrader également certains BTEXs: le benzène, le toluène et un des isomères du xylène (non précisé) et que la présence de MTBE retardait la dégradation du benzène et du toluène. Ceci a été montré également pour *R. aetherivorans* IFP 2017 pour lequel la présence de BTEXs avait un effet négatif sur la capacité de dégradation de l'ETBE et du MTBE (Auffret et al., 2009). Par ailleurs, une étude en biofiltre avec une culture dégradant le MTBE a également montré, comme dans plusieurs des cas étudiés ici, des capacités intéressantes de dégradation du TBA, de l'éthylbenzène et du toluène ainsi que partiellement du benzène et des xylènes (Wang et Deshusses, 2007). Dans certains cas de co-contamination, les effets peuvent être inverses selon le co-contaminant comme cela a été montré dans un aquifère avec l'éthanol ayant un effet négatif sur la dégradation des BTEXs et l'iso-butanol ayant un effet positif sur la dégradation des BTEXs (Schaefer et al., 2010).

En conclusion de cette partie de l'étude, nous avons montré que quel que soit le substrat d'enrichissement utilisé, les cinétiques de dégradation varient au cas par cas, mais les limitations déjà notées pour la croissance des micro-organismes sur MTBE (durée et faible croissance) sont retrouvées dans le cas de l'ETBE et peuvent conduire aux mêmes conséquences quant à la remédiation de sites pollués. La production de TBA, qui a toujours été re-constitué dans les conditions du laboratoire, a été observée dans plusieurs cas mettant en évidence le problème qui peut se poser de son accumulation dans les sites contaminés par du MTBE ou de l'ETBE, problème déjà signalé à plusieurs reprises pour le MTBE et dans un cas de pollution par de l'ETBE.

Le substrat d'enrichissement jouant un rôle sur la sélection de certains micro-organismes, il a aussi un impact sur les capacités des microflores enrichies à dégrader des composés des essences qui ne sont pas des éthers-carburants tels que les BTEXs ou les alcanes. Dans le cas de la dégradation de ces composés, nous avons également observé de grandes variabilités et montré que pour les microflores qui avaient pu être enrichies à la fois sur ETBE et sur MTBE, les capacités des enrichissements obtenus vis-à-vis de ces différents composés pouvaient différer.

Les différences quant aux compositions microbienne et génétique présentes dans ces enrichissements peuvent seules permettre d'expliquer les différences de comportement observées d'un enrichissement à l'autre. Cette étude a fait l'objet de la suite du travail.

IV – 2. Souches bactériennes isolées à partir des différents enrichissements

À partir des différents enrichissements, des isolements ont été réalisés afin d'identifier les micro-organismes qui les composent et, qui possèdent des capacités de dégradation pour l'ETBE, le MTBE ou le TBA. Une fois ces capacités confirmées, une caractérisation de ces souches a été effectuée par extraction d'ADN et séquençage des gènes *rrs* codant l'ARNr 16S.

IV – 2 – 1. Étude des capacités de dégradation des souches bactériennes isolées

Des étalements en dilution sur boîte de milieu gélosé ont été réalisés à partir des enrichissements sur ETBE ou MTBE. Après croissance, les différentes colonies obtenues ont été isolées et leur pureté a été vérifiée. Chaque colonie a ensuite été repiquée en fioles de milieu liquide contenant le substrat d'origine de l'enrichissement (MTBE ou ETBE) ainsi que sur TBA en parallèle afin de déterminer ses éventuelles capacités de dégradation.

Nous avons ainsi isolé différents micro-organismes à partir des enrichissements sur ETBE et des enrichissements sur MTBE. Il faut noter que l'isolement de certaines des souches obtenues a été difficile du fait de croissance lente sur boîte qui rend plus difficile l'étape de vérification de pureté du fait de la durée d'incubation nécessaire pour obtenir des colonies bien identifiables. Chaque souche ayant des capacités de biodégradation vis-à-vis d'un des substrats testés (MTBE, ETBE ou TBA) a ensuite été caractérisée après extraction, clonage et séquençage de gènes codant l'ARNr 16S (couple d'amorces pA/pH, voir tableau 3.4.1). Les séquences ont ensuite été annotées sur les sites RDP et NCBI en les comparant aux séquences répertoriées dans les bases de données. L'ensemble de ces résultats est synthétisé dans le tableau 4.3.

Il est à noter que parmi tous les isolements réalisés, plusieurs n'ont pas montré de capacités de dégradation des substrats testés malgré des durées d'incubation prolongées. Ces micro-organismes n'ont donc pas été caractérisés. Leur rôle dans les enrichissements n'est donc pas connu, toutefois, il est possible de supposer qu'ils subsistent en utilisant des produits de la lyse bactérienne, entre autres.

Tableau 4.3. Souches isolées possédant des capacités de dégradation

Enrichissement d'origine	Numéro IFPEN	Access Number	Phylum/Ordre	Genre	Capacités de dégradation	Durée de la dégradation (h)**	Vitesse maximale de dégradation (mg de substrat L ⁻¹ .h ⁻¹)**
BE1-ETBE	IFP 2040	JX049414 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	23	13,1
GE1-ETBE	IFP 2041	KC758856 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	30	5,2
US6-ETBE	IFP 2042	JX049415 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	100	3,5
BE1-ETBE	IFP 2043	KC785086 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	(ETBE en TBA) + biomasse + CO ₂	30	7,8
GE1-ETBE	IFP 2047	JX049412 (full 16s)	<i>Betaproteobacteria</i>	*	ETBE en biomasse + CO ₂	1800	0,2
US6-ETBE	IFP 2049	JX049416 (full 16s)	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	TBA en biomasse + CO ₂	190	6,1
FR5-ETBE	IFP 2050	JX049417 (full 16s)	<i>Actinobacteria</i>	<i>Pseudonocardia</i> sp.	ETBE ou MTBE en biomasse + CO ₂	130 (ETBE) 160 (MTBE)	1,6 (ETBE) 1,1 (MTBE)
US3-MTBE	IFP 2051	JX402119 (full 16S)	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp.	MTBE en biomasse + CO ₂	336	0,7
GE1-MTBE	IFP 2052	JX402118 (full 16S)	<i>Proteobacteria</i>	*	MTBE en biomasse + CO ₂	400	1,4

*: le pourcentage d'identité est inférieur à 95 % et ne permet pas d'associer un nom de genre à la souche.

** : ces données proviennent des figures 4.1 et 4.2

Ainsi, parmi les souches isolées ayant des capacités de dégradation, cinq sont des *Actinobacteria*, et quatre des *Proteobacteria*. Il n'a pas été possible d'isoler des micro-organismes ayant des capacités de biodégradation à partir des enrichissements FR3-ETBE, US2-MTBE, FR5-MTBE, FR6-MTBE et BE1-MTBE. Concernant l'enrichissement FR5-MTBE, nous supposons au vu des résultats de biodégradation que la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050, isolée -avec difficulté- à partir de l'enrichissement sur ETBE, et pouvant dégrader les deux substrats, est également présente et impliquée dans la dégradation du MTBE. Nous reviendrons sur ce point dans l'analyse phylogénétique des enrichissements. Des conditions d'isolement spécifiques permettraient peut-être d'isoler certains autres micro-organismes responsables de la dégradation à condition de savoir vers quel type de micro-organisme orienter les conditions. Ce point particulier sera discuté plus loin. Mais on sait par ailleurs que la très grande majorité des micro-organismes sont considérés comme non cultivés/cultivables (Rappe et Giovannoni, 2003).

- *Actinobacteria* : les capacités de dégradation de l'ETBE par les *Actinobacteria*, et en particulier *Rhodococcus* et *Pseudonocardia* sont connues. D'autres *Rhodococcus* avec ces capacités ont été préalablement isolés (Auffret et al., 2009 ; Hernandez-Perez et al., 2001 ; Malandain et al., 2010). Il a également été montré par une analyse PFLA que l'addition d'ETBE à des sols se traduisait par une prédominance des bactéries Gram-positives (Bartling et al., 2011). De plus, plusieurs souches de *Pseudonocardia* ont été préalablement décrites comme pouvant dégrader l'ETBE et le MTBE par cométabolisme après croissance sur THF (Thiemer et al., 2003 ; Vainberg et al., 2006).

- *Proteobacteria* : D'après les données du site RDP, la souche IFP 2047, capable de dégrader l'ETBE et isolée à partir de GE1-ETBE, peut seulement être caractérisée à 100 % comme appartenant à l'ordre des *Burkholderiales* (*Betaproteobacteria*), et comporte seulement 86 % d'identité avec le genre *Ideonella*. Néanmoins, lorsque cette séquence est soumise à un BLAST dans la base de données NCBI, cette séquence possède 98 % d'identité par rapport à différentes souches du cluster *Rubrivivax-Roseateles-Leptothrix-Ideonella-Aquabacterium*, auquel appartient la souche *A. tertiaricarbonis* L108, dégradant le MTBE (Lechner et al., 2007) et l'ETBE (Schuster et al., 2013). Il faut préciser que GE1 est un échantillon prélevé au site de Leuna en Allemagne, site dont avait été isolée il y a quelques années *A. tertiaricarbonis* L108.

Également, d'après les données du site RDP, la souche IFP 2052, dégradant le MTBE, peut seulement être caractérisée à 91 % comme appartenant à l'ordre des *Gammaproteobacteria* et le pourcentage d'identité le plus élevé est seulement de 91 % d'identité avec le genre *Rhizobacter*. Néanmoins, dans ce cas, lorsque cette séquence est soumise à un BLAST dans la base de données NCBI, cette séquence présente 97 à 98 % d'identité avec des souches des genres *Methylibium*, *Piscinibacter* (*Betaproteobacteria*), mais également *Rhizobacter* (*Gammaproteobacteria*), et serait donc proche de *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Kane et al., 2006).

Pour la première fois, *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 (*Gammaproteobacteria*) a été isolée pour ses capacités à dégrader le MTBE. Du fait de cette capacité, cette souche a fait l'objet

d'un brevet pour son utilisation éventuelle dans des opérations de bioremédiation de sites pollués.

C'est également la première fois que la capacité de dégradation du TBA par une bactérie du genre *Bradyrhizobium* est décrite (Le Digabel et al., 2013). Dans le cas de cette bactérie, également, l'isolement a été fastidieux car elle a été isolée à partir de cultures sur boîtes de *Rhodococcus* sp. IFP 2042 dont il a été difficile de la dissocier étant donné les différences de durée nécessaire à la croissance respective de ces deux souches. Le sous-groupe *Bradyrhizobium* (*Alphaproteobacteria*) correspond à des bactéries Gram-négatives du sol qui appartiennent à la famille des *Rhizobiaceae*. Les bactéries du sous-groupe *Bradyrhizobium* ont surtout été étudiées pour leur capacité à induire sur les racines des plantes des nodules dans lesquels elles effectuent la fixation de l'azote atmosphérique en symbiose avec la plante. Du fait de ces effets bénéfiques, il y a un grand nombre d'études sur *Bradyrhizobium*, son rôle dans la croissance des plantes et sa distribution écologique dans l'environnement (Gage DJ, 2004, Galiana et al., 1994, Martinez-Romero E 2009, Sachs et al., 2009, Torres et al., 2011). *B. japonicum*, dont *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 est très proche (99 % d'identité) n'était semble-t-il, pas présent en Europe avant son introduction pour permettre la culture du soja qui a des besoins spécifiques en azote (Revellin et al., 2005). Il est intéressant de noter que la souche isolée provient justement d'un échantillon d'un site américain où cette souche est naturellement détectée. L'étude des capacités de dégradation de composés xénobiotiques par ces souches est assez réduite et s'est intéressée principalement à la détection de gènes de dégradation dans les génomes séquencés de telles souches.

Nous avons ensuite étudié les cinétiques de dégradation de l'ETBE ou du MTBE pour chacune des souches isolées. Ces résultats sont présentés dans les figures 4.2 et 4.3, respectivement. Le cas de la dégradation du TBA par *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 est présenté dans la figure 4.4. Le cas particulier de la dégradation de l'ETBE et du MTBE par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 est présenté dans la figure 4.5.

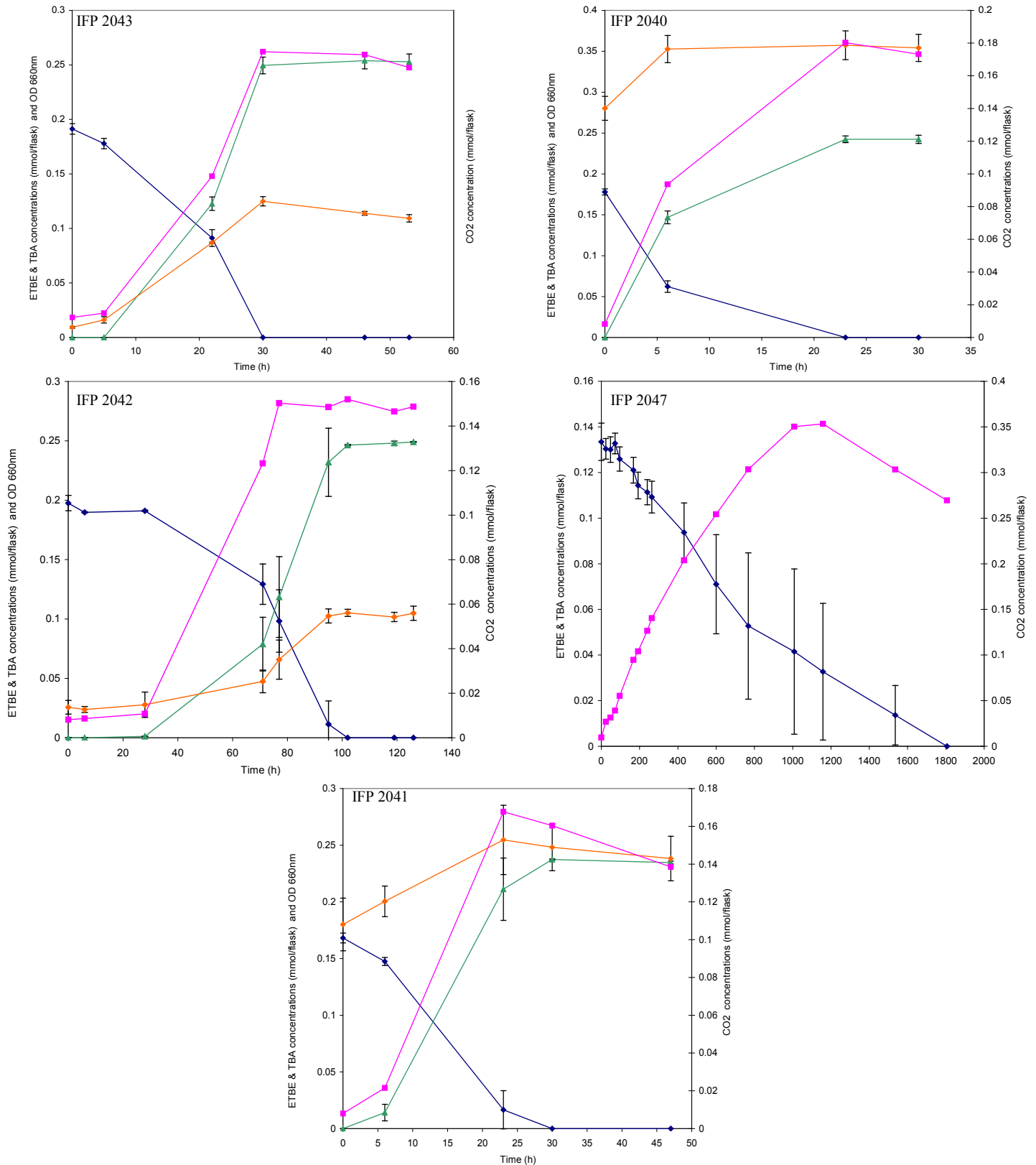


Figure 4.2. Cinétiques de dégradation de l'ETBE par *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 4042 et IFP 2043 et par la souche de *Betaproteobacteria* IFP IFP 2047 isolées à partir des enrichissements ETBE

◆-◆: concentration ETBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA ; ◆-◆: DO600nm

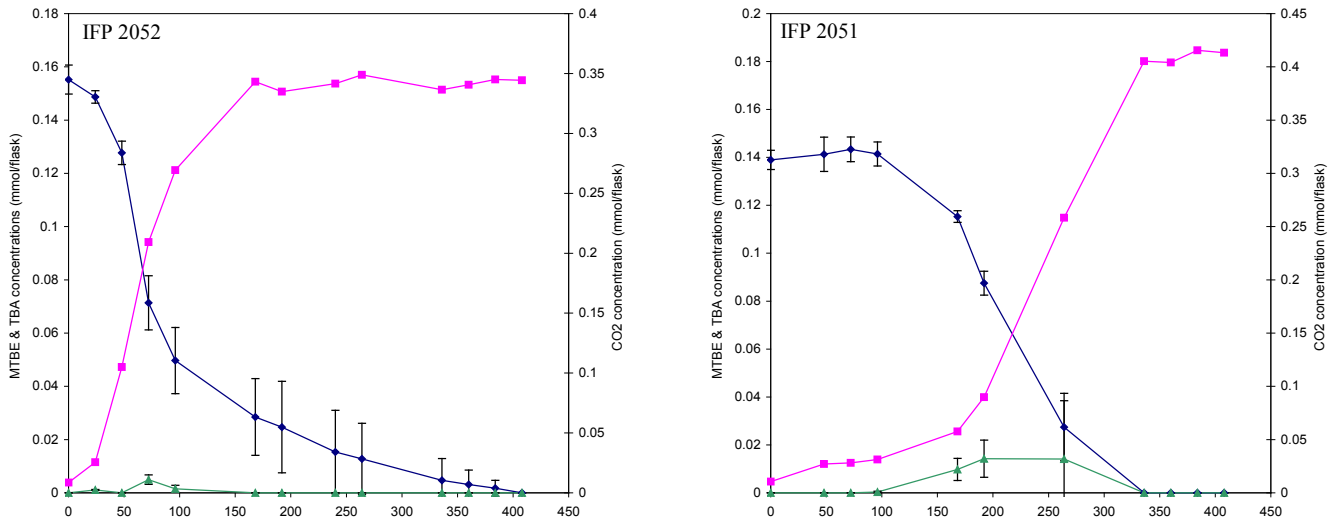


Figure 4.3. Cinétiques de dégradation du MTBE par *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 et par la souche de *Proteobacteria* IFP 2052 isolées à partir des enrichissements sur MTBE
 ◆-◆: concentration MTBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA ;

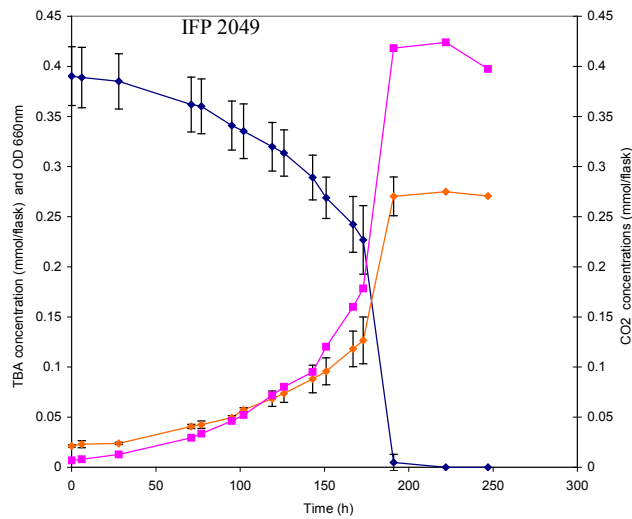


Figure 4.4. Cinétique de dégradation du TBA par *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 isolée à partir de US6-ETBE
 ◆-◆: concentration TBA ; ■-■: concentration CO₂ ; ◆-◆: DO660nm

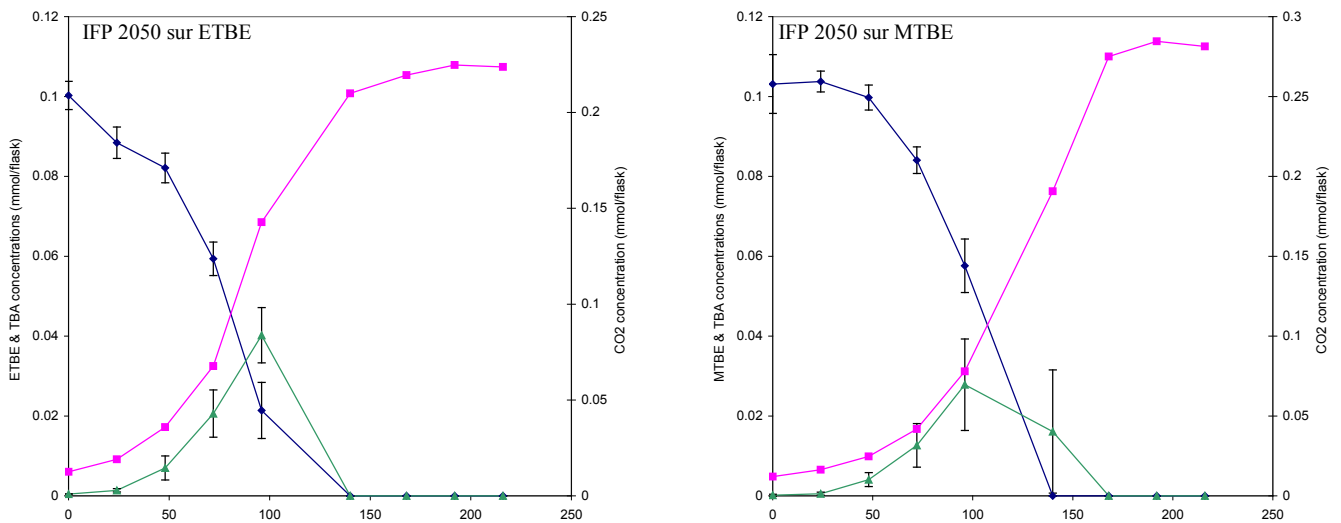


Figure 4.5. Cinétiques de dégradation de l'ETBE et du MTBE par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 isolée à partir de FR5-ETBE

◆-◆: concentration ETBE/MTBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA

Les bilans concernant les durées et vitesses de dégradation sont présentés dans le tableau 4.1. Il n'a pas été possible d'obtenir dans la plupart des cas des mesures de biomasse à l'issue de ces cinétiques de dégradation. Néanmoins dans plusieurs cas nous avons pu suivre l'évolution de la biomasse par mesure de la DO₆₀₀ ce qui n'était pas possible dans l'enrichissement de départ : c'est le cas des quatre souches de *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042 et IFP 2047. Néanmoins, on voit que la croissance est faible du fait que la souche ne pousse qu'au dépend de la partie en C2 de la molécule d'ETBE libérée par la coupure de la liaison éther comme cela a été montré précédemment (Malandain et al., 2010) et qu'elle est donc nécessairement limitée.

Dans le cas de la dégradation du TBA par *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, on voit que la vitesse est lente au début puis s'accélère quand la concentration diminue. Cela pourrait traduire une faible affinité du système enzymatique impliqué pour le TBA.

Du fait que les vitesses de dégradation n'ont pas pu être exprimées dans les mêmes unités, il n'est pas possible de comparer les valeurs obtenues à partir des souches pures (mg de substrat.h⁻¹.L⁻¹) à celles obtenues à partir des enrichissements (mg de substrat.h⁻¹.mg⁻¹ de biomasse). On peut, par contre, comparer les durées nécessaires pour réaliser la biodégradation. Il est ainsi possible de constater pour les deux souches IFP 2051 et IFP 2052, isolées respectivement à partir des enrichissements US3-MTBE et GE1-MTBE, que ces durées coïncident. La comparaison est difficile pour les souches de *Rhodococcus* isolées à partir des enrichissements sur ETBE car elles dégradent l'ETBE jusqu'en TBA et leur "poids relatif" dans les enrichissements est, de ce fait, probablement limité.

D'autres expériences mettant en œuvre la qPCR que nous présenterons plus loin nous permettront de juger pour certaines de ces souches de leur prépondérance dans la population des enrichissements.

IV – 2 – 2. Capacités de dégradation de la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

Au vu des résultats présentés ci-dessus, la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 présente un intérêt particulier, du fait de sa capacité à dégrader l'ETBE et également le MTBE. Du fait de ces capacités, son utilisation éventuelle dans des opérations de bioremédiation de sites pollués a fait l'objet d'un brevet. Des souches appartenant au même genre et possédant des capacités de dégradation des éthers-carburants ont déjà été décrites : *Pseudonocardia tetrahydrofuranoxydans* K1, dégradant le MTBE, l'ETBE et le *tert*-amyl méthyl éther (TAME) par cométabolisme (Thiemer et al., 2003) après croissance sur tétrahydrofuran (THF), mais ne dégradant ni le TBA, ni le TAA ; et *Pseudonocardia* sp. ENV478 dégradant le MTBE après croissance là aussi sur THF (Vainberg et al., 2006).

Afin de connaître plus en détail le potentiel de cette souche, nous avons déterminé ses capacités de dégradation pour les BTEXs et les *n*-alcane. En outre, un premier essai de cinétique de dégradation sur le composé éther THF a été effectué. Les résultats obtenus sont présentés sur le tableau 4.3 et la figure 4.6.

Tableau 4.3. Capacités de dégradation de la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

Composés	Croissance	Dégradation (%)
ETBE	++	100
MTBE	++	100
TBA	++	100
Benzène	-	0
Toluène	++	100
Ethylbenzène	-	71,0 ± 16,4
<i>m</i> -xylène	-	55,0 ± 5,1
<i>p</i> -xylène	-	58,0 ± 6,5
<i>o</i> -xylène	-	0
Octane	±	44,0 ± 1,8
Hexadécane	-	41,0 ± 1,7

++: croissance ; ±: croissance faible ; -: pas de croissance

Pseudonocardia sp. IFP 2050, outre la capacité à dégrader l'ETBE, le MTBE et le TBA, peut donc également dégrader entièrement le toluène, et partiellement l'éthylbenzène, le *m*- et *p*- xylène, l'octane et l'hexadécane. Seuls le benzène et le *o*-xylène n'ont pas été dégradés du

tout durant les 4 semaines d'incubation. Il faut noter que, dans plusieurs cas (éthylbenzène, *m*-xylène, *p*-xylène, hexadécane, voire octane), quand la dégradation du composé n'est que partielle, la croissance bactérienne observée est inexistante ou très faible. On peut donc supposer qu'il s'agit de cas de cométabolisme. Ce mécanisme de biodégradation est bien connu chez les micro-organismes et a été montré, en particulier, dans le cas de la dégradation des BTEXs (Attaway et Schmidt, 2002 ; Auffret et al., 2009 ; Zhou et al., 2011).

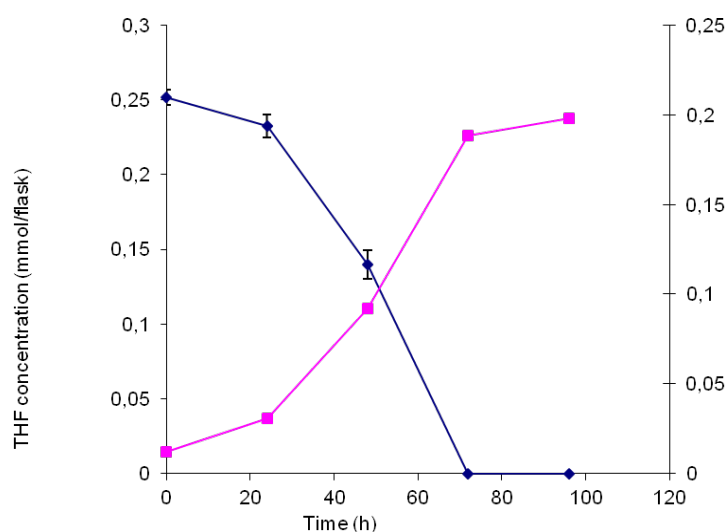


Figure 4.6. Dégradation du THF par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

◆-◆: concentration THF ; ■-■: concentration CO₂

La totalité du THF a été dégradée (concentration initiale d'environ 200 mg.L⁻¹). Néanmoins, ce suivi ne constitue qu'un premier essai de dégradation, et une étude plus précise de la dégradation sera nécessaire. Cependant ce premier essai montre que la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 possède également la capacité à dégrader le THF comme K1 et ENV478.

IV – 2 – 3. Cas de commensalisme dans l'enrichissement US6-ETBE

À partir de l'enrichissement US6-ETBE, deux souches ont pu être isolées : *Rhodococcus* sp. 2042, ainsi que *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049. La première de ces souches peut dégrader l'ETBE jusqu'au TBA, alors que la seconde peut dégrader le TBA entièrement (en biomasse et CO₂).

Nous avons donc étudié la dégradation de l'ETBE en co-culture avec *Rhodococcus* sp. 2042, et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049. Le résultat est présenté sur la figure 4.7.

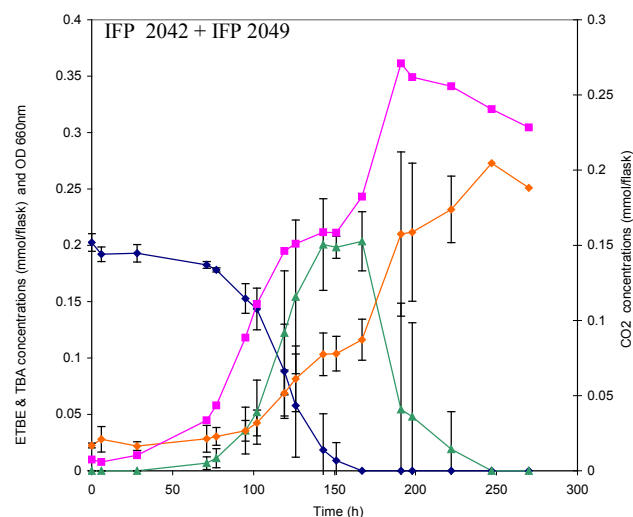


Figure 4.7. Cinétique de dégradation de l'ETBE du mélange des souches *Rhodococcus* sp. IFP 2042 et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049

◆-◆: concentration ETBE ; ■-■: concentration CO₂ ; ▲-▲: concentration TBA ; ◆-◆: DO600nm

Ce consortium reconstitué de deux souches isolées est capable de dégrader la totalité de l'ETBE en 250 h environ. L'ETBE est dégradé en TBA en environ 170 h puis le TBA est lui-même utilisé comme source de carbone et d'énergie. Contrairement à l'enrichissement d'origine, US6-ETBE, il a été possible de suivre la croissance par mesure de la densité optique. La vitesse maximale de dégradation mesurée est de 2,96 mg.L⁻¹.h⁻¹. Il s'agit d'un cas illustrant un autre mécanisme de dégradation de composés xénobiotiques par les micro-organismes : le commensalisme dans lequel deux souches associées entre elles, et présentes dans le même environnement, arrivent à dégrader entièrement un composé à l'aide de leurs enzymes respectives. L'association de micro-organismes présents naturellement dans un même environnement (commensalisme) et permettant la biodégradation de composés xénobiotiques n'a été décrite que dans quelques cas (Rieger et al., 2002, Brune and Bayer, 2012). La dégradation du fenitrothion est ainsi réalisée par *Sphingomonas* sp. et *Burkholderia* sp. (Katsuyama et al., 2009).

Ce cas particulier a fait l'objet d'un article (Le Digabel et al., 2013).

En conclusion à cette partie du travail, nous avons pu isoler à partir des enrichissements étudiés différents micro-organismes. Parmi ceux-ci, plusieurs ne possèdent aucune capacité de dégradation pour l'ETBE, le MTBE ou le TBA. Parmi les souches isolées et qui possèdent ces capacités de dégradation, cinq sont des *Actinobacteria*, et quatre des *Proteobacteria*. Les capacités de dégradation de ces souches sont variables. Les quatre souches de *Rhodococcus* sp. dégradent l'ETBE en TBA avec une faible croissance liée à la consommation du composé en C₂ libéré par la coupure de la liaison éther. Une souche de *Pseudonocardia* avec des capacités intéressantes, aussi bien vis-à-vis de l'ETBE que du MTBE, a pu être obtenue. En ce qui concerne les *Proteobacteria*, une souche apparentée à *A. tertiaricarbonis*, IFP 2047, et capable de dégrader l'ETBE a été isolée de GE1-ETBE ; une souche IFP 2052 apparentée à

Methylibium sp. a été isolée de GE1-MTBE. *Pseuxanthomonas* sp. IFP 2051 capable de dégrader le MTBE a été isolée de US3-MTBE et le rôle d'une telle souche dans la dégradation du MTBE n'avait pas été montré auparavant. Enfin, nous avons pu mettre en évidence un cas de commensalisme à partir de deux micro-organismes isolés d'un même enrichissement, US6-ETBE. Il s'agit de *Rhodococcus* sp. IFP 2042 dégradant l'ETBE en TBA et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 poussant sur TBA. Le rôle de *Bradyrhizobium* dans la dégradation des éthers-carburants n'avait pas été montré auparavant et cette partie du travail a fait l'objet d'une publication dans la revue internationale "Applied Microbiology and Biotechnology".

IV – 3. Comparaisons de la diversité bactérienne dans les enrichissements ETBE/MTBE

Lors de l'étude des capacités de dégradation des différents enrichissements obtenus sur ETBE et sur MTBE, de réelles différences ont été observées, non seulement en ce qui concerne la dégradation de ces substrats, mais également celles d'autres composés, les BTEXs et des *n*-alcane. De telles différences de capacités de dégradation font supposer que la composition phylogénétique varie au sein de ces enrichissements. Afin d'étudier cette diversité bactérienne, et hormis l'isolement de micro-organismes ayant des capacités de dégradation décrites ci-dessus, des approches d'empreinte moléculaire ont été mises en œuvre afin de comparer les populations obtenues sur un substrat donné. Ces approches sont la RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis) et la DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis).

IV – 3 – 1. Étude de la flore bactérienne par RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis)

Cette technique a permis d'avoir une première image de la diversité bactérienne au sein des enrichissements étudiés. Pour cette analyse et afin d'effectuer le traitement statistique qui suit l'analyse par électrophorèse, il est nécessaire de travailler sur au moins trois groupes de micro-organismes ayant des capacités différentes. Hormis les enrichissements obtenus sur ETBE ou sur MTBE, nous avons donc ajouté à cette étude les enrichissements de même origine obtenus sur TBA (soient, BE1-TBA, GE1-TBA, FR3-TBA, FR5-TBA, FR6-TBA, US2-TBA, US3-TBA et US6-TBA (voir tableau 2.1, Matériel et Méthodes). Après extraction de l'ADN des différents enrichissements et amplification par PCR de la zone IGS 16S-23S de l'ADN, une série d'électrophorèses sur puces à ADN d'Agilent a été réalisée afin de visualiser la totalité des 19 échantillons (enrichis sur ETBE, MTBE et TBA). Le résultat de ces électrophorèses est présenté sur les figures 4.8.1 et 4.8.2.

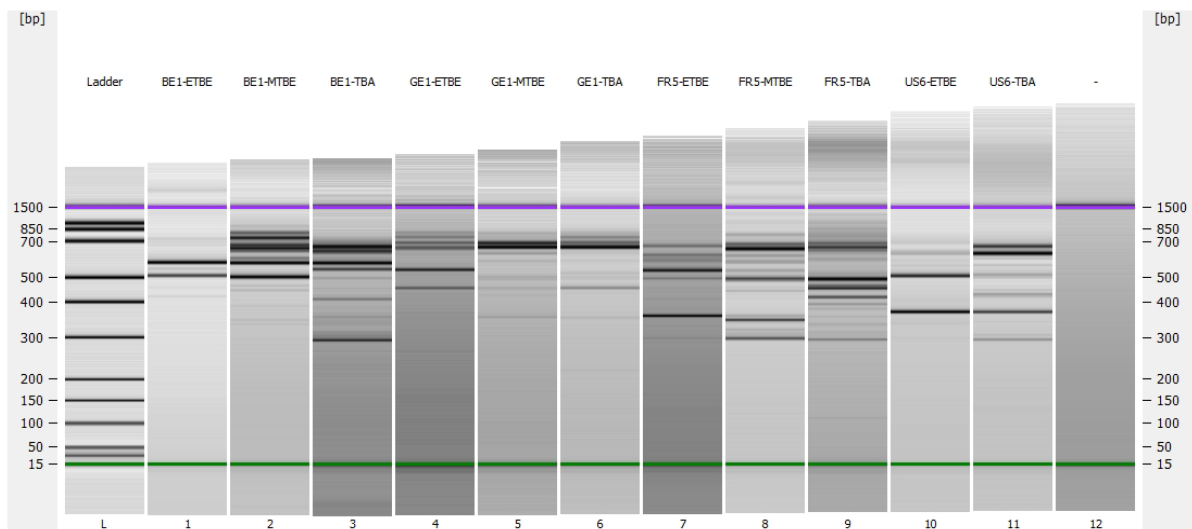


Figure 4.8.1. Résultats RISA sur la première puce Agilent

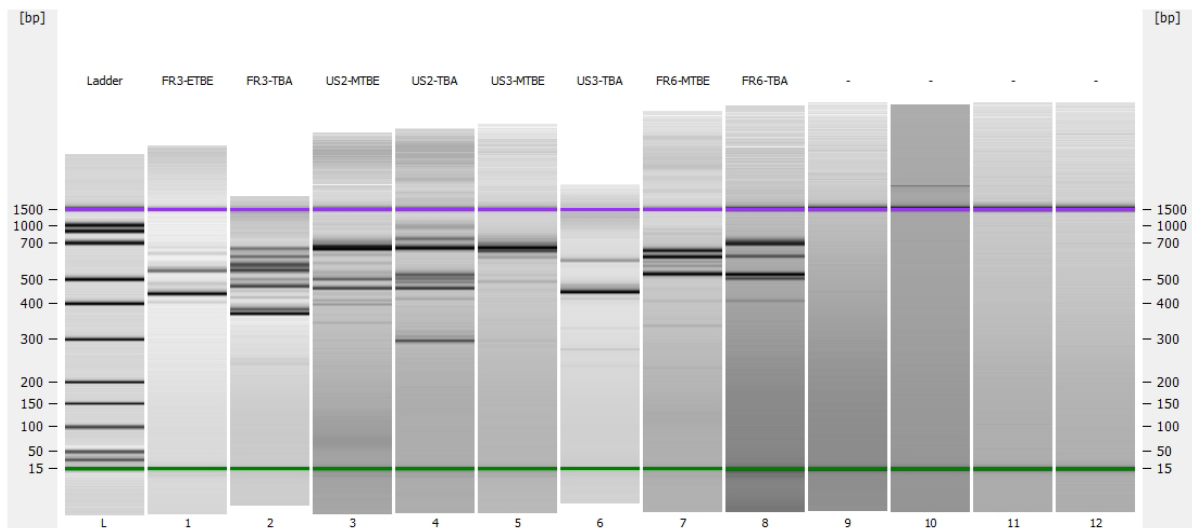


Figure 4.8.2. Résultats RISA sur la seconde puce Agilent

Chaque piste correspond à l'électrophorèse de l'ADN d'un enrichissement donné dont le nom est indiqué au-dessus de la piste.

Les tailles sont calculées par rapport à un standard contenant des fragments d'ADN de tailles connues (Ladder : piste à gauche)

Cette approche via la technique RISA, nous permet, au vu de ces gels, d'avoir une première idée de la biodiversité des enrichissements. En effet, pour chaque échantillon, on observe plusieurs bandes, ce qui implique la présence de micro-organismes différents, particulièrement pour les enrichissements sur TBA, où la biodiversité semble plus importante (nombre de bandes supérieur). La quasi-totalité des bandes se situe entre 300 et 900 pb environ. De plus, plusieurs bandes semblent redondantes d'un échantillon à l'autre, plus ou moins visibles en fonction de l'enrichissement. Afin de compléter ces observations, des analyses statistiques sur la base des tailles des fragments obtenus sur gel Agilent ont été

effectuées grâce au logiciel R. Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée afin d'analyser les données (figure 4.9).

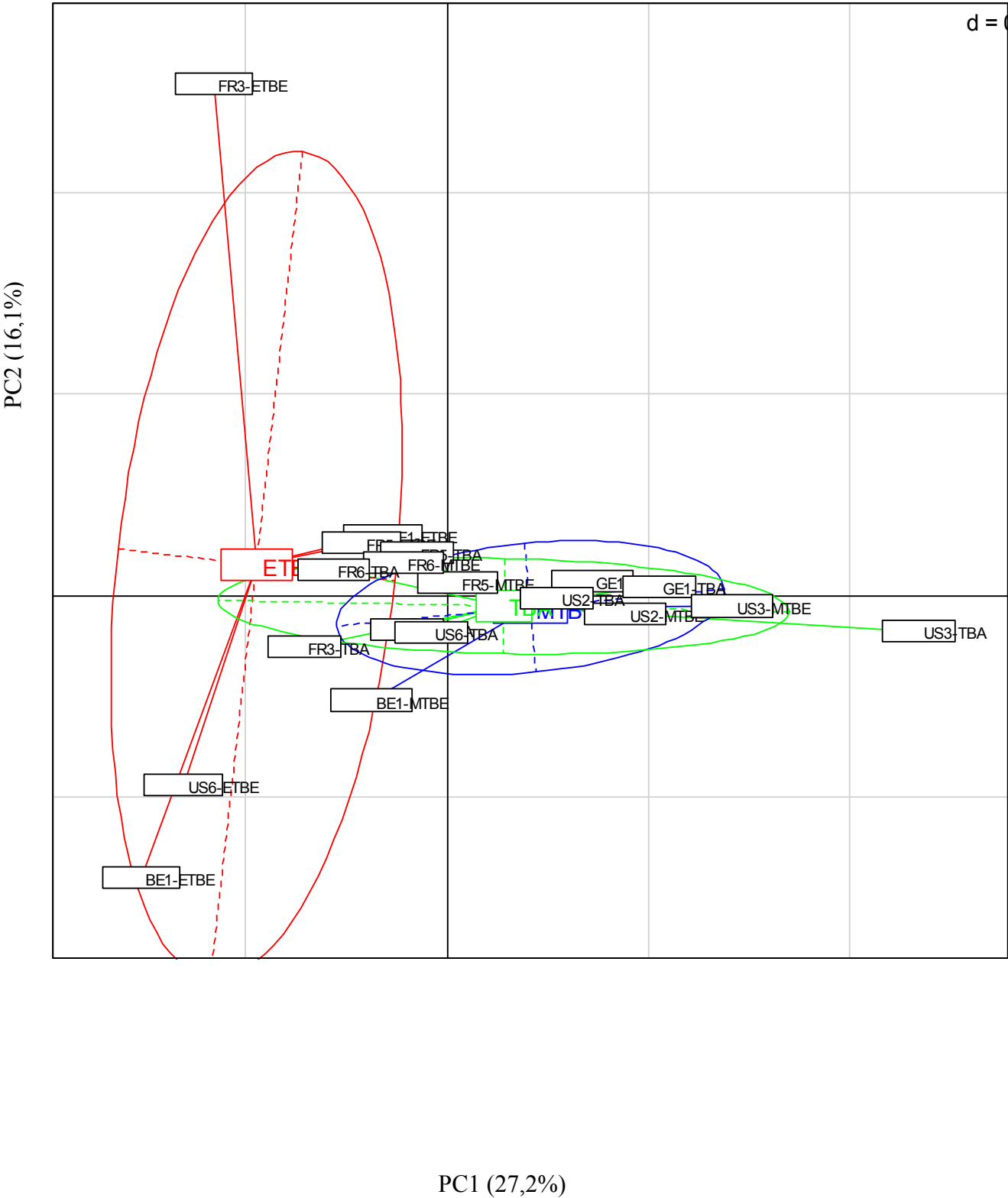


Figure 4.9. ACP réalisée à partir des résultats RISA sur les 19 enrichissements (sur ETBE, MTBE et TBA)

La visualisation des échantillons en fonction du substrat dans l'analyse en composante principale (ACP) des données de RISA montre une forte dispersion concernant les profils microbiens présents dans les enrichissements sur ETBE comparés à ceux obtenus sur TBA ou sur MTBE. Ceci laisse supposer une diversité plus importante, avec des populations de micro-organismes très diverses malgré le même substrat d'enrichissement. Les enrichissements FR3, US6 et BE1 sont particulièrement différents des autres. L'autre point remarquable de cette analyse est le fait que les enrichissements cultivés sur MTBE sont superposés avec ceux sur TBA, ce qui implique que les profils des régions intergéniques des communautés microbiennes des enrichissements obtenus sur MTBE et sur TBA ne sont pas statistiquement différenciables, tout comme les profils des enrichissements obtenus sur ETBE et sur TBA, ou même entre les enrichissements obtenus sur ETBE et sur MTBE, à l'exception des enrichissements FR3, US6 et BE1 sur ETBE qui sont séparés des autres enrichissements à la fois selon le premier axe, mais surtout selon le 2ème axe de l'ACP qui explique 16 % de la variation observée entre les échantillons. Cette analyse confirme que la diversité des micro-organismes présents dans certains enrichissements ETBE (FR3, US6 et BE1) est différente de celle observée pour les enrichissements MTBE. Hormis les micro-organismes utilisant le MTBE comme source de carbone et d'énergie et qui ont par conséquent la capacité de pousser sur TBA - *Hydrogenophaga flava* ENV 735 (Hatzinger et al., 2001), *Aquicola tertiaricarbonis* L108 (Lechner et al., 2007), *Variovorax paradoxus* CL-8 (Zaitsev et al., 2007) et *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 (François et al., 2001) - d'autres micro-organismes capables de pousser uniquement sur TBA ont été isolés comme *A. tertiaricarbonis* I-2152 (Piveteau et al., 2001 ; Rohwerder et al., 2006). Cependant, l'écologie des micro-organismes dégradant le TBA est peu connue (Schmidt et al., 2004). Une autre étude disponible (Aslett et al., 2011) réalisée sur des populations bactériennes présentes dans des bioréacteurs pour la dégradation du TBA couplée à une identification des micro-organismes dégradant le TBA par marquage au ¹³C de leur ADN (¹³C-DNA-stable isotope probing ou SIP) montre en effet que les organismes utilisant le TBA sont des *Betaproteobacteria* appartenant à l'ordre des *Burkholderiales* comme *Methylibium*. Ceci va bien dans le sens du résultat que nous avons obtenu. En fonction de ces résultats, il reste que la nature de la plupart des micro-organismes dégradant le TBA dans les enrichissements réalisés sur ETBE est différente. Nous en avons d'ailleurs eu la preuve en isolant une *Alphaproteobacteria*, *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, de l'enrichissement US6 cultivé sur ETBE.

Enfin, étant donné que la variation observée dans les échantillons selon les deux premiers axes de l'ACP représente 43 % de l'inertie totale, le substrat utilisé pour réaliser les enrichissements n'est pas le seul facteur influençant la nature des microflores présentes (caractéristiques physico-chimiques des sites d'origine, etc...).

IV – 3 – 2. Étude de la flore bactérienne par la technique DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis)

La seconde approche employée afin d'étudier la flore bactérienne présente dans les enrichissements sur ETBE et sur MTBE est la technique DGGE qui présente l'avantage de permettre l'identification des micro-organismes pour lesquels une bande est obtenue après électrophorèse puis découpage, amplification PCR, purification et séquençage. Après extraction de l'ADN des enrichissements et amplifications PCR, réalisées sur la région hypervariable V3-V4 des gènes codant l'ARNr 16S, les échantillons ont été déposés sur gel d'acrylamide, avec un gradient dénaturant d'urée/formamide 20-70 %. Le résultat de cette migration est présenté sur la figure 4.10.

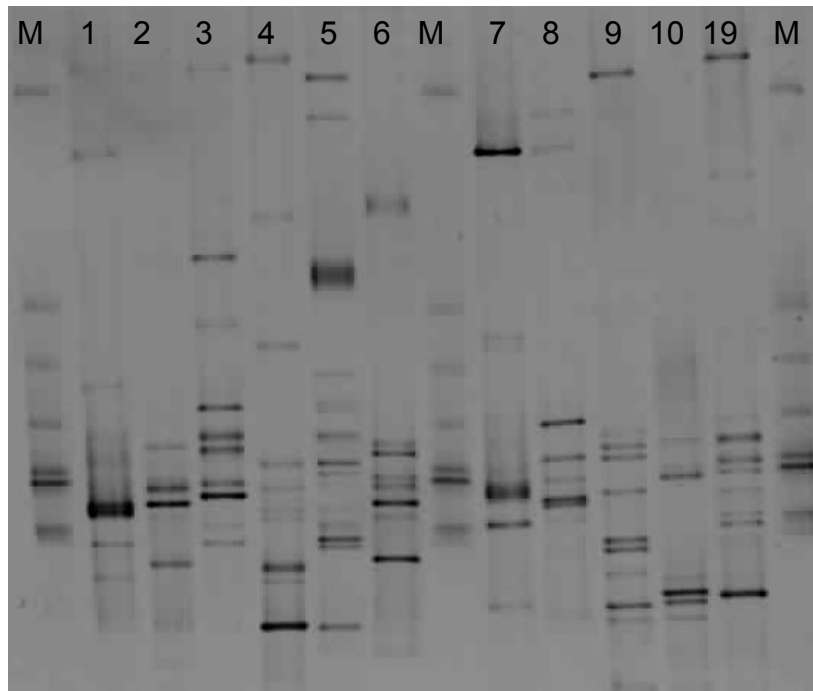


Figure 4.10. DGGE des différents enrichissements obtenus sur ETBE ou sur MTBE
M: Marqueur; 1: BE1-ETBE; 2: GE1-ETBE; 3: US6-ETBE; 4: FR3-ETBE; 5: FR5-ETBE; 6: GE1-MTBE;
7: US2-MTBE; 8: US3-MTBE; 9: FR5-MTBE; 10: FR6-MTBE; 19: BE1-MTBE

Les profils de migration des enrichissements ont également été analysés plus en détail grâce au logiciel GelCompar 2 (Applied Maths) et sont présentés sur la figure 4.11.

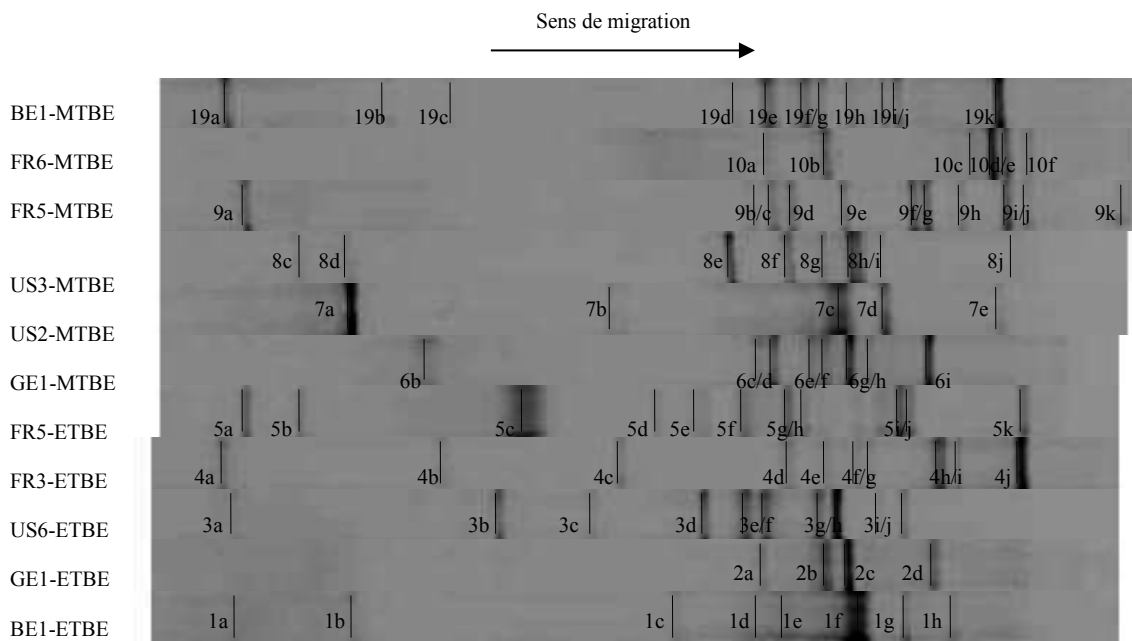


Figure 4.11. Profils de migration DGGE des enrichissements ETBE ou MTBE

Chaque bande bien identifiable obtenue sur le gel a ensuite été découpée, purifiée puis amplifiée par PCR avec le même couple d'amorces (sans les GC-clamp), afin d'être séquencée. Les séquences des gènes codant l'ARNr 16S obtenues (400-500 bp) ont été comparées à celles de la base de données du site RDP afin d'identifier les micro-organismes correspondants. De même, des alignements de ces séquences ont été effectués en utilisant l'outil en ligne du site Greengenes. Ces alignements ont enfin été analysés avec le logiciel Seaview afin de réaliser des arbres phylogénétiques regroupant l'ensemble des micro-organismes présents dans les enrichissements sur ETBE ou dans les enrichissements sur MTBE. Ces arbres sont présentés en annexes sur les figures A.1 et A.2, respectivement.

Les résultats de l'analyse DGGE sont discutés ci-dessous au cas par cas.

a) Analyse comparative des enrichissements BE1-ETBE et BE1-MTBE



Assignation des bandes correspondant à l'enrichissement BE1-ETBE :

1a: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Sediminibacterium*[89 %]

1b: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Hydrotalea*[100 %]
 1c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[99 %] *Alphaproteobacteria*[99 %] *Rhizobiales*[88 %] *Bradyrhizobiaceae*[64 %] *Agromonas*[41 %]
 1f: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Comamonadaceae*[100 %] *Comamonas*[85 %]
 1g: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[100 %] *Actinobacteria*[100 %] *Actinobacteridae*[100 %] *Actinomycetales*[100 %] *Corynebacterineae*[100 %] *Nocardiaceae*[100 %] *Rhodococcus*[100 %]

Assignment des bandes correspondant à l'enrichissement BE1-MTBE:

19a: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Sediminibacterium*[99 %]
 19b: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Flavisolibacter*[24 %]
 19c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Parasegetibacter*[41 %]
 19d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Alphaproteobacteria*[100 %] *Sphingomonadales*[99 %] *Sphingomonadaceae*[96 %] *Sphingomonas*[93 %]
 19e: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Alphaproteobacteria*[100 %] *Rhizobiales*[100 %] *Bradyrhizobiaceae*[100 %] *Afipia*[53 %]
 19f: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Alphaproteobacteria*[100 %] *Rhizobiales*[100 %] *Hyphomicrobiaceae*[100 %] *Hyphomicrobium*[100 %]
 19g: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %] *Xanthomonadales*[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Rhodanobacter*[91 %]
 19h: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %] *Xanthomonadales*[99 %] *Xanthomonadaceae*[99 %] *Rudaea*[58 %]
 19j: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Alcaligenaceae*[49 %] *Azohydromonas*[49 %]
 19k: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[100 %] *Actinobacteria*[100 %] *Actinobacteridae*[100 %] *Actinomycetales*[100 %] *Pseudonocardineae*[100 %] *Pseudonocardaceae*[100 %] *Pseudonocardia*[100 %]

L'étude des capacités de dégradation a montré que pour BE1, celles-ci étaient différentes selon le substrat d'enrichissement. D'un côté, le toluène n'est pas dégradé par BE1-ETBE alors qu'il l'est par BE1-MTBE, et de l'autre côté, BE1-ETBE a démontré sa capacité à dégrader le *m*-xylène et le *p*-xylène, contrairement à BE1-MTBE. Ces différences sont le reflet des différences de composition phylogénétique de ces enrichissements. En effet, la comparaison des profils de migration DGGE entre les deux enrichissements montre une composition bactérienne différente malgré une origine commune. Huit bandes sont visibles dans BE1-ETBE, tandis que onze sont visibles dans BE1-MTBE. L'analyse des séquences et de leurs assignations montre également que parmi ces bandes, aucune n'est commune aux deux enrichissements, bien que les assignations correspondent aux mêmes phyla (*Bacteroidetes*,

Alpha-, Beta-, Gamma- Proteobacteria, et *Actinobacteria*). Une souche en particulier, présente uniquement dans BE1-ETBE (bande 1g), correspond à *Rhodococcus*. Or, les souches *Rhodococcus* sp. IFP 2040 et IFP 2043, dégradant toutes deux l'ETBE, ont été isolées de BE1-ETBE. Des souches du même genre bactérien ont été étudiées pour leurs capacités au cours de différentes études passées (Auffret et al., 2009 ; Hernandez-Perez et al., 2001 ; Malandain et al., 2010), et la souche *Rhodococcus wratislaviensis* IFP 2016, pouvant dégrader l'ETBE et le MTBE, a été montrée responsable de la dégradation de plusieurs composés, notamment les BTEXs et des *n*-alcanes (Auffret et al., 2009). Il est donc probable que ces souches jouent un rôle important dans les capacités de dégradation de l'enrichissement BE1-ETBE.

b) Analyse comparative des enrichissements GE1-ETBE et GE1-MTBE)

GE1-MTBE	6b	6c/d	6e/f	6g/h	6i
GE1-ETBE		2a	2b	2c	2d

Assignation des bandes correspondant à GE1-ETBE :

2a: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Alphaproteobacteria*[96 %] *Rhizobiales*[77 %] *Phyllobacteriaceae*[44 %] *Nitratireductor*[23 %]

2b: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Burkholderiales_incertae_sedis*[93 %] *Rubrivivax*[91 %]

2c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %] *Xanthomonadales*[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Dokdonella*[68 %]

2d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Burkholderiales_incertae_sedis*[100 %] *Piscinibacter*[100 %]

Assignation des bandes correspondant à GE1-MTBE:

6b: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[94 %] "*Sphingobacteriales*"[94 %] *Chitinophagaceae*[88 %] *Filimonas*[26 %]

6d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Caldiserica*"[14 %] *Caldisericia*[14 %] *Caldisericales*[14 %] *Caldiseriaceae*[14 %] *Caldisericum*[14 %]

6f: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Alphaproteobacteria*[100 %] *Rhizobiales*[100 %] *Bradyrhizobiaceae*[100 %] *Bradyrhizobium*[77 %]

6g: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[91 %] *Gammaproteobacteria*[54 %] *Xanthomonadales*[51 %] *Xanthomonadaceae*[51 %] *Fulvimonas*[31 %]

6h: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[71 %] *Pseudomonadales*[71 %] *Pseudomonadaceae*[71 %] *Rhizobacter*[71 %]

6i: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Burkholderiales_incertae_sedis*[99 %] *Piscinibacter*[99 %]

Les résultats précédents ont montré que GE1-MTBE avait un spectre de dégradation pour les différents substrats testés plus important, notamment concernant la dégradation du toluène, et du *m*- et *p*-xylène, qui ne sont pas dégradés par GE1-ETBE, dégradant uniquement le benzène. Les capacités concernant les *n*-alcanes sont elles aussi différentes dans les deux cas. Ces différences sont là aussi le reflet d'une composition phylogénétique différente. En effet, la comparaison des profils de migration DGGE entre ces enrichissements montre une composition bactérienne différente malgré une origine commune. Seules quatre bandes ont été obtenues en DGGE pour GE1-ETBE, tandis que GE1-MTBE en présente huit. Néanmoins, deux bandes sont communes aux deux enrichissements: les bandes 2c et 6g, dont les séquences d'ADN partagent 84 % d'identité (2c: *Gammaproteobacteria* avec 100 % d'identité, et 6g: *Proteobacteria* avec 91 % d'identité), et les bandes 2d et 6i, dont les séquences d'ADN partagent 99 % d'identité (*Piscinibacter* sp., avec respectivement 99 % et 100 % d'identité). En outre, seules des bandes correspondant à des *Proteobacteria* sont visibles sur GE1-ETBE, tandis qu'une diversité plus importante est observée dans GE1-MTBE. Il faut noter que la souche *Betaproteobacteria* IFP 2047, capable de dégrader entièrement l'ETBE, et isolée à partir de GE1-ETBE, correspond bien à la bande 2b (99 % d'identité au niveau des séquences des gènes codant l'ARNr 16S). Il est donc probable que cette souche joue un rôle important dans la dégradation de ce substrat dans cet enrichissement. Nous ne retrouvons pas de bande correspondant à *Rhodococcus* alors que nous avons isolé *Rhodococcus* sp. IFP 2041 de GE1-ETBE. Il est possible qu'elle soit minoritaire dans la population.

Concernant GE1-MTBE, la séquence de la souche de *Proteobacteria* IFP 2052 comporte 96 % d'identité avec la séquence de la bande 6i (*Piscinibacter*), il est donc probable que cette souche joue bien un rôle dans la dégradation du MTBE dans cet enrichissement. Néanmoins, le problème de sa caractérisation reste posé au vu des résultats présentés précédemment (RDP: *Gammaproteobacteria* ; NCBI *Beta*- et/ou *Gamma*- *Proteobacteria*). Le phylum *Gammaproteobacteria* est par ailleurs largement représenté, avec 4 bandes. Plusieurs souches appartenant à ce phylum ont été décrites dans la littérature pour leur capacité à dégrader les BTEXs, notamment *Pseudomonas putida* (Mazzeo et al., 2010) ou *Pseudoxanthomonas spadix* BD-a59 (Lee et al., 2012). La présence de micro-organismes appartenant à ce même phylum dans cet enrichissement pourrait expliquer les capacités de dégradation accrues pour les BTEXs par rapport à son homologue enrichi sur ETBE.

c) Analyse comparative des enrichissements FR5-ETBE et FR5-MTBE

FR5-MTBE	9a					9b/c	9d	9e	9f/g	9h	9i/j	9k
FR5-ETBE	5a	5b	5c	5d	5e	5f	5g/h	5i/j	5k			

Assignation des bandes correspondant à l'enrichissement FR5-ETBE:

5a: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Sediminibacterium*[30 %]

5b: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %]
 "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Niabella*[56 %]
5c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Chlorobi*"[100 %] *Ignavibacteria*[100 %]
Ignavibacteriales[100 %] *Ignavibacteriaceae*[100 %] *Ignavibacterium*[100 %]
5d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %]
Xanthomonadales[95 %] *Sinobacteraceae*[95 %] *Steroidobacter*[95 %]
5f: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[96 %] *Alphaproteobacteria*[95 %]
Rhizobiales[83 %] *Rhodobiaceae*[20 %] *Tepidamorphus*[18 %]
5g: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Deltaproteobacteria*[100 %]
Myxococcales[99 %] *Sorangineae*[99 %] *Polyangiaceae*[77 %] *Chondromyces*[52 %]
5h: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Deltaproteobacteria*[100 %]
Myxococcales[100 %] *Sorangineae*[100 %] *Polyangiaceae*[73 %] *Chondromyces*[40 %]
5i: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[99 %]
Burkholderiales[99 %] *Burkholderiales_incertae_sedis*[79 %] *Rivibacter*[28 %]
5j: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %]
Burkholderiales[100 %] *Burkholderiales_incertae_sedis*[69 %] *Rivibacter*[35 %]
5k: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[100 %] *Actinobacteria*[100 %]
Actinobacteridae[100 %] *Actinomycetales*[100 %] *Pseudonocardineae*[100 %]
Pseudonocardiaceae[100 %] *Pseudonocardia*[100 %]

Assignment des bandes correspondant à l'enrichissement FR5-MTBE:

9a: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %]
 "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Sediminibacterium*[26 %]
9c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Deltaproteobacteria*[100 %]
Myxococcales[100 %] *Sorangineae*[100 %] *Polyangiaceae*[82 %] *Sorangium*[58 %]
9d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Deltaproteobacteria*[100 %]
Myxococcales[100 %] *Sorangineae*[100 %] *Phaselicystidaceae*[56 %] *Phaselicystis*[56 %]
9e: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Acidobacteria*"[100 %] *Acidobacteria_Gp1*[100 %] *Gp1*[99 %]
9f: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %]
Xanthomonadales[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Dokdonella*[94 %]
9g: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[100 %] *Actinobacteria*[100 %]
Actinobacteridae[100 %] *Actinomycetales*[100 %] *Pseudonocardineae*[100 %]
Pseudonocardiaceae[100 %] *Pseudonocardia*[100 %]
9h: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Acidobacteria*"[100 %] *Acidobacteria_Gp1*[100 %] *Gp1*[98 %]
9i: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %]
Xanthomonadales[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Dokdonella*[74 %]
9j: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[86 %] *Actinobacteria*[86 %]
Actinobacteridae[85 %] *Actinomycetales*[83 %] *Pseudonocardineae*[44 %]
Pseudonocardiaceae[44 %] *Goodfellowiella*[13 %]

Le cas de ces deux enrichissements est particulier. Les résultats précédemment cités ont montré que les capacités de dégradation des différents composés testés étaient dans les deux cas très proches, et étaient de plus les plus étendues observées parmi tous nos enrichissements, avec la dégradation de tous les composés testés. En outre, l'étude DGGE a permis de montrer que la biodiversité était dans ces deux cas la plus importante parmi les enrichissements. Onze bandes ont pu être observées dans chacun de ces deux enrichissements, et trois bandes sont communes : les bandes 5a et 9a, dont les séquences des gènes codant l'ARNr 16S ont 99 % d'identité (*Bacteroidetes*, avec 100 % d'identité dans les deux cas), les bandes 5g et 9d, dont les séquences des gènes codant l'ARNr 16S partagent 97 % d'identité (*Deltaproteobacteria*, avec 100 % d'identité dans les deux cas) et les bandes 5k et 9j, dont les séquences des gènes codant l'ARNr 16S partagent 86 % d'identité (5k: *Pseudonocardia* sp., avec 100 % d'identité, et 9j: *Actinobacteria*, avec 86 % d'identité). La séquence des gènes codant l'ARNr 16S de la bande 5k en particulier montre 99 % d'identité avec la séquence de la souche *Pseudonocardia* sp. IFP 2050, pouvant dégrader entièrement l'ETBE et le MTBE et isolée à partir de l'enrichissement ETBE. Il est donc probable que cette souche soit l'un des acteurs principaux impliqués dans la dégradation des éthers dans ces deux enrichissements.

d) Analyse de l'enrichissement US6-ETBE

Assignation des bandes correspondant à l'enrichissement US6-ETBE:

3a: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhizobiales[100 %] Phyllobacteriaceae[99 %] Mesorhizobium[97 %]

3b: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Bacteroidetes"[100 %] "Sphingobacteria"[100 %] "Sphingobacteriales"[100 %] Chitinophagaceae[100 %] Terrimonas[89 %]

3c: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[100 %] Actinobacteria[100 %] Actinobacteridae[100 %] Actinomycetales[100 %] Corynebacterineae[100 %] Nocardiaceae[100 %] Rhodococcus[100 %]

3d: Root[100 %] Bacteria[100 %] Firmicutes[36 %] Clostridia[34 %] Clostridiales[33 %] Ruminococcaceae[17 %] Acetanaerobacterium[13 %]

3e: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhizobiales[100 %] Hyphomicrobiaceae[100 %] Hyphomicrobium[58 %]

3f: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhizobiales[100 %] Bradyrhizobiaceae[100 %] Bradyrhizobium[100 %]

3g: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhizobiales[100 %] Phyllobacteriaceae[87 %] Aminobacter[54 %]

3h: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[100 %] Actinobacteria[100 %] Rubrobacteridae[100 %] Solirubrobacterales[82 %] Solirubrobacteraceae[65 %] Solirubrobacter[65 %]

3j: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[99 %] Actinobacteria[99 %] Actinobacteridae[99 %] Actinomycetales[99 %] Corynebacterineae[94 %] Corynebacterineae_incertae_sedis[89 %] Tomitella[89 %]

Concernant cet enrichissement, les larges capacités de dégradation précédemment observées sont probablement à mettre en relation avec la large diversité bactérienne montrée par l'analyse DGGE. Neuf bandes ont pu être analysées, et appartiennent à plusieurs phyla (trois *Actinobacteria*, une *Bacteroidetes*, une *Firmicutes*, quatre *Alphaproteobacteria*). Les bandes 3c et 3f correspondent aux souches *Rhodococcus* et *Bradyrhizobium* (séquences des gènes codant l'ARNr 16S avec 100 % d'identité dans les deux cas). La séquence de la bande 3c partage 99 % d'identité avec la séquence de la souche *Rhodococcus* sp. IFP 2042 (Le Digabel et al., 2013), capable de dégrader l'ETBE en TBA, et isolée à partir de cet enrichissement, tandis que la séquence de la bande 3f partage 99 % d'identité avec la souche *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 (Le Digabel et al., 2013), dégradant le TBA et également isolée à partir de cet enrichissement. Il est donc très probable que ces deux bactéries précédemment citées (cas de commensalisme) soient impliquées dans la dégradation totale de l'ETBE par cet enrichissement.

e) Analyse de l'enrichissement FR3-ETBE

Assignment des bandes correspondant à l'enrichissement FR3-ETBE:

4a: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhizobiales[100 %] Brucellaceae[100 %] Brucella[98 %]

4b: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[100 %] Actinobacteria[100 %] Actinobacteridae[100 %] Actinomycetales[100 %] Corynebacterineae[100 %] Nocardiaceae[100 %] Rhodococcus[100 %]

4c: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Sphingomonadales[100 %] Sphingomonadaceae[100 %] Sphingopyxis[100 %]

4d: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhizobiales[99 %] Rhizobiaceae[42 %] Sinorhizobium[22 %]

4e: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Gammaproteobacteria[100 %] Xanthomonadales[100 %] Xanthomonadaceae[100 %] Rhodanobacter[99 %]

4f: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[78 %] Gammaproteobacteria[56 %] Xanthomonadales[49 %] Xanthomonadaceae[49 %] Fulvimonas[23 %]

4h: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Proteobacteria"[100 %] Alphaproteobacteria[100 %] Rhodospirillales[74 %] Acetobacteraceae[36 %] Stella[36 %]

4j: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[100 %] Actinobacteria[100 %] Actinobacteridae[100 %] Actinomycetales[100 %] Pseudonocardineae[50 %] Pseudonocardaceae[50 %] Thermocrispum[36 %]

Cet enrichissement possède de larges capacités de dégradation bien que l'analyse DGGE, montre que parmi les huit bandes analysées seuls trois phyla sont représentés (quatre bandes correspondant à des *Alphaproteobacteria*, deux bandes correspondant à des *Gammaproteobacteria*, et deux bandes correspondant à des *Actinobacteria*). Aucune souche possédant des capacités de dégradation pour l'ETBE ou le TBA n'a pu être isolée dans le cas de cet enrichissement. Néanmoins, d'après l'analyse DGGE, l'une des bandes correspond à une

bactérie appartenant au genre *Rhodococcus* (bande 4b ; séquence des gènes codant l'ARNr 16S possédant 100 % d'identité avec le genre *Rhodococcus*, d'après RDP). Nous n'avons pas pu isoler une telle souche de cet enrichissement, ce qui pose donc la question du rôle de la souche identifiée par DGGE, toutes les souches de *Rhodococcus* ne possédant pas, évidemment, des capacités de dégradation de l'ETBE.

f) Analyse de l'enrichissement US2-MTBE

Assignation des bandes correspondant à l'enrichissement US2-MTBE:

7a: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Flavisolibacter*[53 %]

7c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Comamonadaceae*[100 %] *Acidovorax*[64 %]

7d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Betaproteobacteria*[100 %] *Burkholderiales*[100 %] *Burkholderiales_incertae_sedis*[94 %] *Methylibium*[92 %]

7e: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %] *Xanthomonadales*[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Lysobacter*[64 %]

D'après les résultats observés précédemment, les capacités de dégradation de cet enrichissement sont les plus faibles parmi tous les enrichissements étudiés avec seulement la dégradation du MTBE, du TBA et des *n*-alcane. Ceci est sans doute à mettre en relation avec l'apparente faible diversité bactérienne montrée par l'analyse DGGE, où seulement quatre bandes ont été analysées : une bande correspondant au phylum *Bacteroidetes*, et trois bandes correspondant au phylum *Proteobacteria* (dont deux *Beta*- et une *Gamma*-). Aucune souche n'a pu être isolée à partir de cet enrichissement, néanmoins, on peut mentionner que les gènes codant l'ARNr 16S de l'une des bandes (7d) possèdent 92 % d'identité avec *Methylibium petroleiphilum* PM1.

g) Analyse de l'enrichissement US3-MTBE

Assignation des bandes correspondant à l'enrichissement US3-MTBE:

8c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Niabella*[82 %]

8d: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Bacteroidetes*"[100 %] "*Sphingobacteria*"[100 %] "*Sphingobacteriales*"[100 %] *Chitinophagaceae*[100 %] *Sediminibacterium*[95 %]

8e: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %] *Xanthomonadales*[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Pseudoxanthomonas*[100 %]

8f: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[92 %] *Gammaproteobacteria*[34 %] *Xanthomonadales*[29 %] *Xanthomonadaceae*[29 %] *Aquimonas*[22 %]

8g: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Alphaproteobacteria*[100 %] *Rhizobiales*[100 %] *Phyllobacteriaceae*[66 %] *Aminobacter*[56 %]

8h: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[100 %] *Xanthomonadales*[100 %] *Xanthomonadaceae*[100 %] *Dokdonella*[73 %]

8i: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[100 %] *Actinobacteria*[100 %] *Actinobacteridae*[100 %] *Actinomycetales*[100 %] *Micrococcineae*[100 %] *Microbacteriaceae*[100 %] *Herbiconiux*[37 %]

D'après les résultats observés précédemment, cet enrichissement possède également des capacités de dégradation relativement importantes, puisque parmi les composés testés, seuls l'ETBE, l'éthylbenzène et les trois isomères du xylène ne sont pas dégradés. Ces capacités peuvent là aussi s'expliquer par la diversité bactérienne présente dans cet enrichissement. Ainsi, parmi les sept bandes analysées, deux bandes correspondent au phylum *Bacteroidetes*, une bande au phylum *Actinobacteria*, et quatre bandes au phylum *Proteobacteria* (dont une *Alpha*-, et au moins deux *Gamma*-). Il est intéressant de noter que la séquence des gènes codant l'ARNr 16S de la bande 8e, correspondant à la souche *Pseudoxanthomonas*, possède 99 % d'identité avec la séquence des gènes codant l'ARNr 16S de la souche *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051, pouvant dégrader le MTBE, et isolée à partir de cet enrichissement confirmant l'implication de ce micro-organisme dans la dégradation du MTBE. Les résultats de cette analyse DGGE sont assez différents de ceux obtenus précédemment via une banque de clones (Bastida et al., 2010) où *Methylibium* avait été identifié.

h) Analyse de l'enrichissement FR6-MTBE

Assignation des bandes correspondant à l'enrichissement FR6-MTBE:

10b: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Proteobacteria*"[100 %] *Gammaproteobacteria*[98 %] *Xanthomonadales*[94 %] *Xanthomonadaceae*[94 %] *Aquimonas*[84 %]

10c: Root[100 %] *Bacteria*[100 %] "*Actinobacteria*"[99 %] *Actinobacteria*[99 %] *Actinobacteridae*[99 %] *Actinomycetales*[99 %] *Pseudonocardineae*[96 %] *Pseudonocardiaceae*[96 %] *Actinomycetospora*[62 %]

10d: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[100 %] Actinobacteria[100 %]
Actinobacteridae[100 %] Actinomycetales[100 %] Pseudonocardineae[100 %]
Pseudonocardiaceae[100 %] Pseudonocardia[100 %]

10e: Root[100 %] Bacteria[100 %] "Actinobacteria"[100 %] Actinobacteria[100 %]
Actinobacteridae[100 %] Actinomycetales[100 %] Pseudonocardineae[95 %]
Pseudonocardiaceae[95 %] Actinomycetospora[43 %]

Les résultats observés précédemment montrent que les capacités de cet enrichissement sont très riches, avec notamment la dégradation complète ou partielle de tous les composés testés. Néanmoins, d'après l'analyse DGGE, la diversité bactérienne au sein de cet enrichissement n'est pas particulièrement importante, avec seulement six bandes, dont quatre ont pu être analysées. Une bande correspond à une *Gammaproteobacteria*, tandis que les trois autres correspondent à des *Actinobacteria*. Aucune souche possédant des capacités de dégradation n'a pu être isolée à partir de cet enrichissement. Toutefois, il est intéressant de noter que la séquence des gènes codant l'ARNr 16S de la bande 10d, correspondant au genre bactérien *Pseudonocardia*, possède 95 % d'identité avec la séquence des gènes codant l'ARNr 16S de *Pseudonocardia* sp. ENV478 (Vainberg et al., 2006) et avec celle des gènes codant l'ARNr 16S de *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 capable de dégrader à la fois l'ETBE et le MTBE.

En conclusion, l'étude RISA a notamment permis de mettre en avant le fait que les populations présentes dans les enrichissements ETBE étaient différentes et particulières, en comparaison de celles présentes dans les enrichissements sur MTBE ou sur TBA qui montrent pour une partie de ces dernières une proximité plus grande avec les populations des enrichissements sur MTBE.

L'analyse DGGE a permis de mettre en évidence la grande majorité des micro-organismes avec des capacités de dégradation de l'ETBE, du MTBE ou du TBA préalablement isolés et étudiés dans la 2^{ème} partie de l'étude. Néanmoins, nous savons que cette technique d'analyse ne rend pas nécessairement compte de l'intégralité des micro-organismes présents dans une population donnée. En outre la DGGE a également permis de mettre en évidence d'autres micro-organismes, dont les capacités de dégradation sont inconnues et dont le rôle n'est actuellement pas identifié, ce qui est en accord avec les résultats des isollements de micro-organismes (partie 2). De plus, la technique DGGE n'est basée que sur une partie des gènes codant l'ARNr 16S (environ 400 pb), ce qui ne permet pas une identification optimale des micro-organismes correspondants. Par ailleurs, elle ne permet pas d'avoir des données quantitatives concernant l'éventuelle prépondérance des souches identifiées, ni non plus comme souligné sur leur rôle réel dans la dégradation par l'enrichissement.

IV – 4. Étude approfondie des enrichissements obtenus sur ETBE

Les techniques RISA et DGGE ainsi que les isolements de micro-organismes effectués ont permis d'avoir une première idée de la diversité bactérienne au sein des enrichissements obtenus sur ETBE ou sur MTBE. Nous avons ensuite décidé d'étudier plus spécifiquement et précisément les enrichissements obtenus sur ETBE, en employant tout d'abord la technique qPCR afin de quantifier certaines des souches isolées à partir des enrichissements sur ETBE possédant des capacités de dégradation pour l'ETBE ou le TBA dans les enrichissements correspondants, puis en réalisant des banques de clones à partir de l'ADN extrait des cinq différents enrichissements sur ETBE.

IV – 4 – 1. Quantification par la technique qPCR des souches dégradées d'ETBE/TBA dans les enrichissements ETBE

Le but de cette étude est d'essayer de quantifier au sein des enrichissements sur ETBE la proportion de souches spécifiques que nous avons isolées qui possèdent des capacités de dégradation (ETBE et/ou TBA). Pour cela, la PCR quantitative a été utilisée en employant des amorces spécifiques conçues en se basant sur les gènes codant l'ARNr 16S des souches isolées et recherchées: *Rhodococcus* sp. (IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043), *Betaproteobacteria* IFP 2047, *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, et *Pseudonocardia* sp. IFP 2050. Après dessin des amorces avec Primer BLAST, le logiciel en ligne du centre national d'information en biotechnologie (NCBI, USA), test *in-silico* et PCR classique afin de s'assurer de la spécificité de ces amorces, des couples ont pu être obtenus dans les trois premiers cas de figure. Néanmoins, dans le dernier cas, pour quantifier *Pseudonocardia* sp. IFP 2050, aucun couple suffisamment spécifique n'a pu être obtenu et l'étude n'a pas pu être effectuée pour cet isolat.

En parallèle, les gènes codant l'ARNr 16S totaux ont également été quantifiés en utilisant un couple d'amorces universelles (Fierer et al., 2005). Ainsi, ce sont les ratios ARNr 16S spécifique / ARNr 16S total ont été calculés pour étudier la répartition de ces souches dans les enrichissements ETBE. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.12.

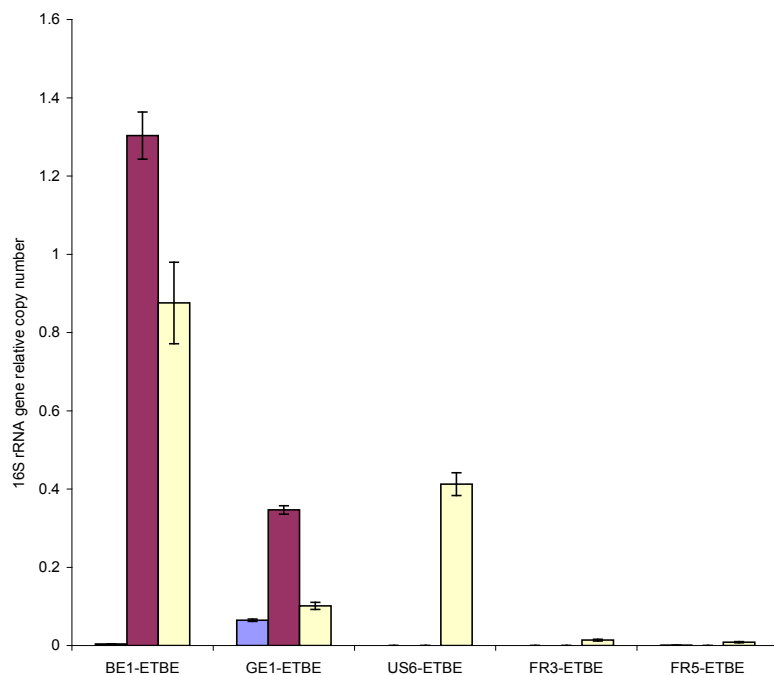


Figure 4.12. Analyse par qPCR des enrichissements sur ETBE

- Nombre de copies relatifs pour *Betaproteobacteria* IFP 2047
- Nombre de copies relatifs pour *Rhodococcus* sp. (IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043)
- Nombre de copies relatifs pour *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049

Des bactéries du genre *Rhodococcus* (apparentées aux souches IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042 et IFP 2043) sont particulièrement présentes dans les enrichissements BE1- et GE1-ETBE (dont on a isolé 3 souches de *Rhodococcus*), contrairement aux autres enrichissements, où elles semblent être sous-représentées, voire absentes.

Les micro-organismes du genre *Bradyrhizobium* (apparentées à la souche IFP 2049) sont, quant à eux, largement représentés dans les enrichissements BE1- et US6-ETBE (c'est de ce dernier qu'a été isolée *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049), peu représentés dans l'enrichissement GE1-ETBE, et extrêmement peu représentés dans les enrichissements FR3- et FR5-ETBE. Paradoxalement, nous n'avons pas pu mettre en évidence par qPCR la présence de *Rhodococcus* dans US6-ETBE malgré le fait que nous avons pu isoler *Rhodococcus* sp. IFP 2042 de cet enrichissement. Il est possible que dans ce cas, sa croissance sur le composé en C2 soit vraiment limitée ce qui ne lui permettrait pas de prendre une place prépondérante dans la population bien qu'il puisse y jouer un rôle métabolique dans la dégradation partielle de l'ETBE en TBA.

Enfin, les souches de bactéries apparentées à la souche *Betaproteobacteria* IFP 2047 ne semblent être présentes que dans l'enrichissement GE1-ETBE (dont on a isolé la *Betaproteobacteria* IFP 2047).

Aucune souche apparentée à une des souches dégradables n'a été mise en évidence dans l'enrichissement FR3-ETBE, confirmant le caractère particulier de cet enrichissement que nous avons déjà signalé.

Les résultats obtenus au cours de cette étude vont également être corrélés avec l'analyse des banques de clones obtenus pour les enrichissements ETBE.

IV – 4 – 2. Réalisation de banques de clones sur les enrichissements ETBE

Des banques de clones ont été réalisées pour chacun des cinq enrichissements obtenus sur ETBE. Quand un nombre suffisant de clones a été obtenu, 96 d'entre eux (sauf pour BE1-ETBE, où seulement 85 clones ont été obtenus) ont été sélectionnés aléatoirement et repiqués sur microplaque avant envoi au séquençage. Un récapitulatif général de la répartition des populations est présenté sur la figure 4.13, après que les séquences de chaque clone aient été analysées et triées selon leur phylum ou leur classe.

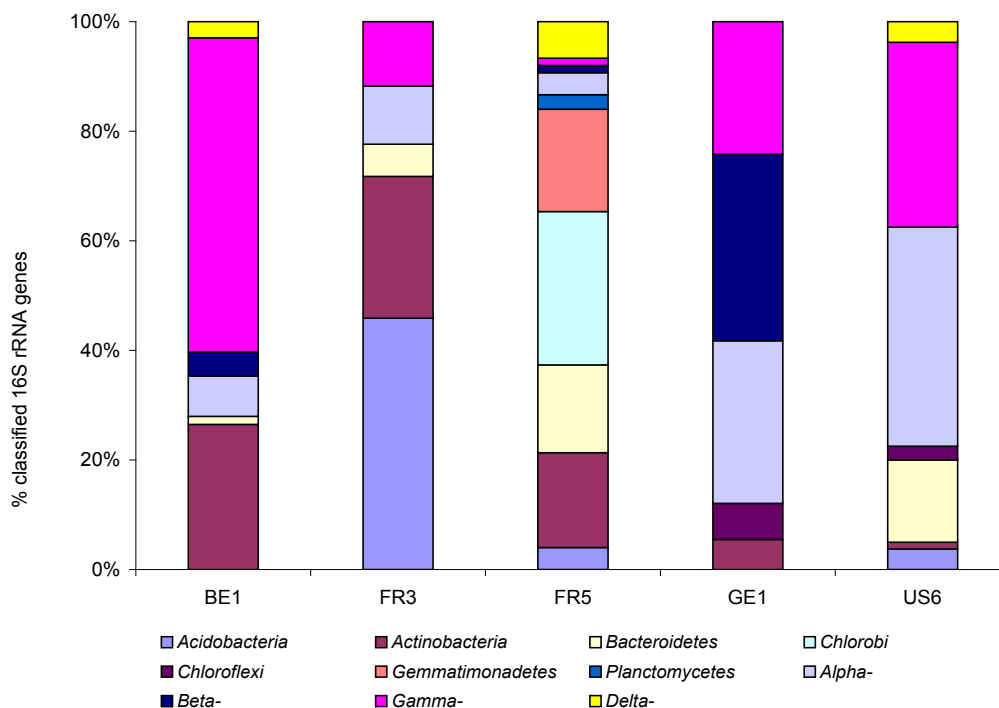


Figure 4.13. Composition des communautés bactériennes des enrichissements ETBE au niveau taxonomique phylum/classe

La diversité des gènes codant l'ARNr 16S dans les cinq banques de clones réalisées démontre qu'il y a bel et bien une communauté bactérienne différente dans chaque cas, bien que pour les enrichissements BE1-, GE1- et US6-ETBE, une prédominance de bactéries appartenant au phylum *Proteobacteria* (respectivement 78 %, 72 % et 88 %) soit observée, tandis que les enrichissements FR3- et FR5-ETBE en possèdent moins de 30 %. Ceci a déjà été observé dans d'autres communautés microbiennes dans des environnements contaminés aux

hydrocarbures, comme pour le cas d'un consortium dégradant le MTBE (Bastida et al., 2010), un sol alpin contaminé aux hydrocarbures (Labbé et al., 2007), ou encore dans des boues de traitement des eaux usées de raffinerie pétrolière (Silva et al., 2012). Les cas des enrichissements FR3-ETBE et FR5-ETBE sont différents avec, dans le premier cas, une majorité d'*Acidobacteria* (46 % des séquences) et d'*Actinobacteria* (26 % des séquences), et, dans le second cas, une répartition plus homogène de la flore, avec néanmoins trois phyla plus importants (*Chlorobi* : 28 % ; *Gemmatimonadetes* : 18,7 % ; *Actinobacteria* : 17,3 %).

Il est à noter que les *Actinobacteria* ainsi que les *Gammaproteobacteria* sont représentées dans tous les enrichissements ETBE. Concernant les *Actinobacteria*, nous avons vu précédemment (isolements et résultats de qPCR) que des souches appartenant à ce phylum avaient un rôle dans la dégradation de l'ETBE.

Les analyses plus détaillées de la répartition des différentes populations pour chaque enrichissement sont présentées sur la figure 4.14. Les séquences des gènes codant l'ARNr 16S possédant au moins 95 % d'identité par rapport aux séquences références rencontrées sur le site RDP ont pu se voir assignées un nom de genre. Quand ce pourcentage d'identité n'atteignait pas ce seuil, seul un nom de classe, voire de phylum, a pu être attribué (catégorie "unassigned"). Des arbres phylogénétiques ont été réalisés (Figures A.3 à A.7) et sont présentés en annexe.

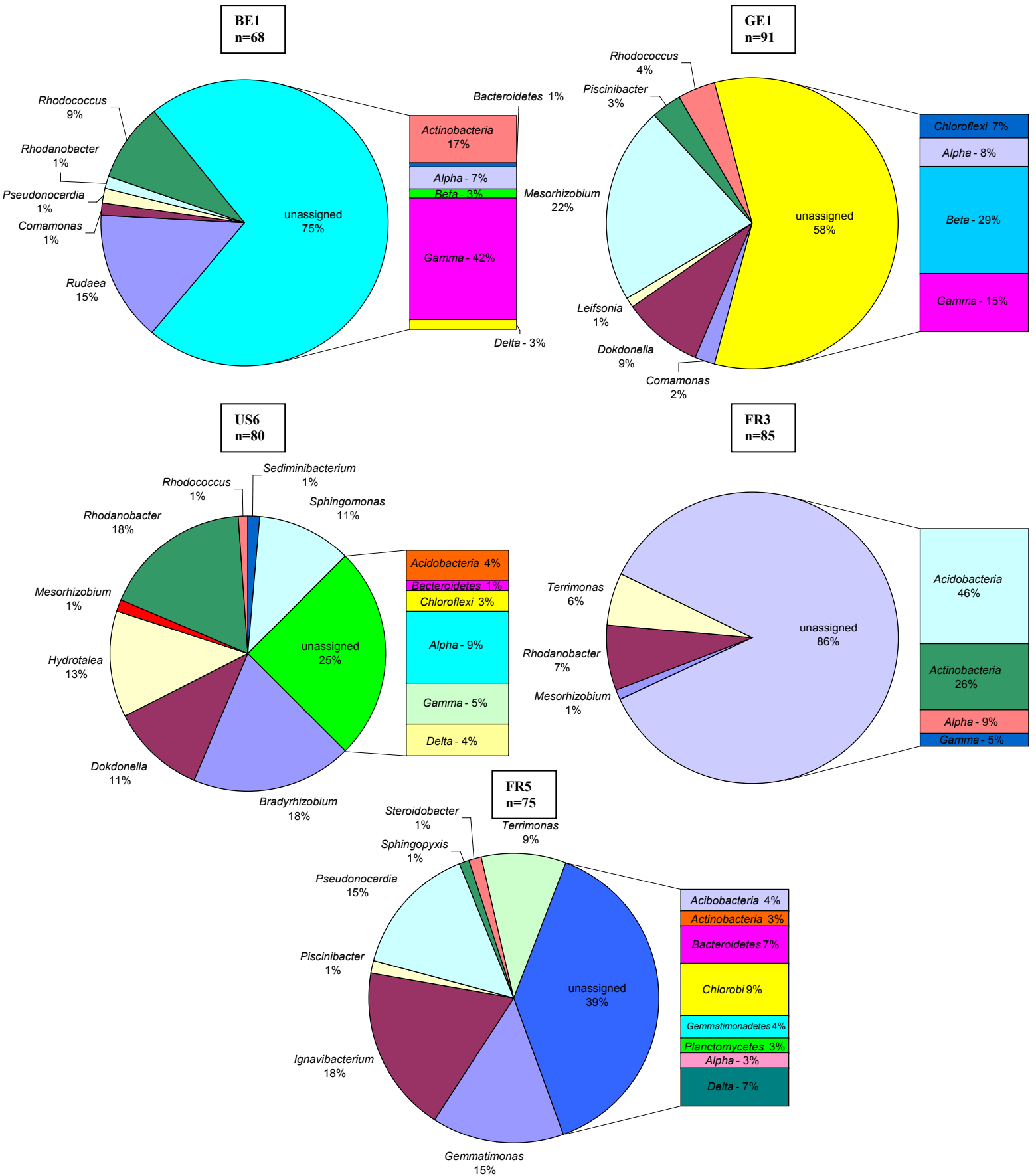


Figure 4.14. Répartitions des séquences gènes codant l'ARNr 16S pour chaque enrichissement

a) Cas de l'enrichissement BE1-ETBE

Deux phyla sont largement représentés dans cet enrichissement. Le phylum *Actinobacteria* (26,5 % des séquences obtenues), et le phylum *Proteobacteria* (dont 57,4 % de *Gamma*-, 7,4 % d'*Alpha*-, et 4,4 % de *Beta*-). L'analyse DGGE avait permis de mettre en évidence également cette tendance, avec notamment des bandes correspondant aux *Actinobacteria*, aux *Alpha*- et aux *Beta-Proteobacteria*.

La présence notable d'*Actinobacteria* de type *Rhodococcus* dans la banque de clones (9 % des séquences), ainsi que l'isolement de deux souches de *Rhodococcus* sp. (IFP 2040 et IFP 2043) possédant des capacités de dégradation pour l'ETBE nous permet de supposer que ces souches sont en partie responsables de la dégradation de l'ETBE dans cet enrichissement. Les résultats de l'analyse qPCR en apporte d'ailleurs une confirmation, en montrant une abondance relative de ce type de souches dans cet enrichissement. De même, une étude faite précédemment (Bartling et al., 2011) va dans le sens de ce résultat en montrant, dans un sol contaminé artificiellement par de l'ETBE, une hausse de la flore à Gram-positif (donc potentiellement des *Actinobacteria*).

D'autres bactéries ont été identifiées dans cet enrichissement, notamment des bactéries appartenant au genre *Rudaea* (*Gammaproteobacteria*), et qui représentent 15 % des clones obtenus. Des bactéries de ce genre ont notamment été décrites pour leur capacité de dégradation pour des composés tels que le benzoate ou le biphényle (Uhlik et al., 2012). Néanmoins, aucune souche appartenant à ce genre n'a pu être isolée, mais d'après la littérature, des conditions de croissance particulières sont requises pour parvenir à les isoler (Weon et al., 2009).

Enfin, lors de la dégradation de l'ETBE par cet enrichissement (figure 4.1), nous avons montré une accumulation transitoire de TBA, qui est ensuite dégradé. Étant donné l'abondance des bactéries appartenant à la classe des *Gammaproteobacteria*, il serait intéressant de déterminer si de tels micro-organismes ont un rôle dans la dégradation observée du TBA.

b) Cas de l'enrichissement GE1-ETBE

L'enrichissement GE1-ETBE comporte également une majorité de *Proteobacteria* (dont 43 % de *Betaproteobacteria*). Cette tendance avait déjà été observée avec l'analyse DGGE. Il est intéressant de constater que l'une des bactéries appartenant à cette classe, la souche de *Betaproteobacteria* IFP 2047, faisant partie du groupe de souches *Rubrivivax/Leptothrix/Ideonella* (Müller et al., 2008), et capable de pousser (lentement) sur ETBE sans production transitoire observable de TBA, a été isolée à partir de cet enrichissement. Cet isolat possède plus de 98 % d'identité avec les séquences des gènes codant l'ARNr 16S des souches *Rubrivivax gelatinosus* IL144, *Ideonella* NS1203, et *Leptothrix* sp. S1.1. Le potentiel de ces souches appartenant à l'ordre des *Burkholderiales* pour la dégradation de nombreux composés xénobiotiques est bien connu (O'Sullivan et al., 2005), et certaines de ces bactéries, comme *Methylibium petroleiphilum* PM1 (Kane et al., 2007) ou *Aquincola tertiaricarbonis* L108 (Lechner et al., 2007), ont démontré leur capacité à dégrader le MTBE et le TBA ainsi que l'ETBE dans le cas d'*A. tertiaricarbonis* L108.

D'autre part, et même si le phylum est seulement faiblement représenté (5 % des clones séquencés), les *Actinobacteria* sont tout de même présentes, avec 4 % des séquences correspondant à des bactéries de

type *Rhodococcus*. La souche *Rhodococcus* sp. IFP 2041 dégradant l'ETBE a d'ailleurs été isolée à partir de cet enrichissement et les *Rhodococcus* sont également détectés par qPCR.

La possibilité que, la souche IFP 2047 pousse plus vite sur TBA que sur ETBE, tandis que la souche *Rhodococcus* sp. IFP 2041 effectuerait la dégradation de l'ETBE en TBA, n'a pas été explorée, mais les résultats obtenus en qPCR confortent cette hypothèse étant donné la faible présence relative d'IFP 2047 par rapport à IFP 2041.

c) Cas de l'enrichissement US6-ETBE

D'après la banque de clones, deux des genres les plus représentés au sein de cet enrichissement appartiennent au phylum des *Proteobacteria* (*Bradyrhizobium* et *Rhodanobacter*, 18 % des séquences chacun). Les *Actinobacteria* ont une part très réduite dans la population de cet enrichissement, avec seulement 1 % de séquences correspondant au genre *Rhodococcus*, ce qui confirme le résultat obtenu en qPCR. Ceci est à mettre en relation avec le fait que la croissance des souches du genre *Rhodococcus* est faible sur ETBE, car ne poussant qu'aux dépens de la partie en C2 de la molécule libérée par la coupure de la liaison éther (Malandain et al., 2010). La proportion de ces souches dans la population globale restera donc nécessairement limitée.

Néanmoins, nous avons pu montrer l'association de *Rhodococcus* sp. IFP 2042, capable de dégrader l'ETBE en TBA, avec *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, capable d'utiliser le TBA, toutes deux isolées à partir de cet enrichissement (Le Digabel. et al., 2013). Ceci va dans le sens d'une probable implication des *Actinobacteria* dans la dégradation de l'ETBE et de la participation des *Proteobacteria* dans la dégradation de métabolites comme le TBA. Il est intéressant de constater que cette riche diversité bactérienne avait également été constatée avec l'analyse DGGE (notamment pour l'abondance des *Alphaproteobacteria*) et que des bandes correspondant aux souches *Rhodococcus* et *Bradyrhizobium* avaient été observées. En outre, la présence abondante des souches de type *Bradyrhizobium* sp. a été confirmée par qPCR.

d) Cas de l'enrichissement FR3-ETBE

Comme nous l'avons déjà dit, le cas de cet enrichissement est particulier. En effet, le phylum majoritaire d'après les résultats de la banque de clone est celui des *Acidobacteria* (46 %), suivi par les *Actinobacteria* (26 %). Aucune bande correspondant à des *Acidobacteria* n'avait été retrouvée en DGGE, néanmoins, cette analyse était cohérente avec la banque de clone concernant les autres phyla présents (bandes correspondant aux *Alpha-* et *Gamma-Proteobacteria*, ainsi qu'aux *Actinobacteria*, dont les séquences représentent respectivement 10,6 %, 11,8 %, et 25,9 % des séquences de la banque de clones).

La plupart des *Acidobacteria* sont désignées en tant que "non cultivées" dans les bases de données du fait que ce phylum est relativement nouveau et étudié depuis peu (Okamura et al., 2011). Certaines souches de ce phylum ont été décrites comme micro-aérophiles (Eichorst et al., 2011) et, si de telles souches sont impliquées dans la biodégradation de l'ETBE, cela pourrait expliquer le profil de

dégradation lent de l'ETBE par FR3-ETBE où la concentration en oxygène trop élevée aurait un effet inhibiteur durant les premières phases de l'incubation. Il faut mentionner d'ailleurs que sur un site contaminé par de l'ETBE, des conditions hypoxiques ont été montrées comme étant nécessaires pour la dégradation du TBA dans des échantillons provenant d'un aquifère contaminé à l'ETBE (Fayolle-Guichard et al., 2012).

Aucune bactérie possédant des capacités de dégradation pour l'ETBE ou le TBA n'a pu être isolée à partir de cet enrichissement. Cela pourrait être lié au fait que les *Acidobacteria* sont décrites comme ne pouvant pas pousser sur des milieux contenant de l'agar, et qu'il doit être remplacé par du gellane (Dedysh et al., 2011). Par ailleurs, la souche KBS83, micro-aérophile, requiert pour sa croissance une concentration optimale en O₂ de 8 % (v/v, en couple avec de l'hélium) et une concentration en CO₂ de 5 % (v/v) (Sait et al., 2006), conditions non présentes dans notre approche. Un autre paramètre à prendre en compte pour une croissance optimale des *Acidobacteria* est, évidemment, le pH, qui doit être inférieur à 6 (Sait et al., 2006), or le pH du MM que nous avons utilisé est de 6,8-7. Généralement, une durée de culture prolongée doit être employée pour permettre d'observer une croissance sur boîte de Petri (deux mois dans certains cas).

Concernant l'analyse par qPCR, aucun des couples d'amorces spécifiques testés n'a donné d'amplification significative, ce qui est cohérent avec les résultats observés grâce à la banque de clones, bien que 26 % des séquences obtenues correspondent à des *Actinobacteria*. Le couple d'amorces ciblant les *Actinobacteria* étant dessiné pour les *Rhodococcus*, on peut supposer que les *Actinobacteria* présentes au sein de cet enrichissement n'appartiennent pas à ce genre.

e) **Cas de l'enrichissement FR5-ETBE**

Le principal constat est le même que lors de l'analyse DGGE, à savoir que cet enrichissement se démarque des autres par sa plus grande diversité bactérienne mais, également, par une plus grande homogénéité dans la répartition des populations observées avec la banque de clones. Ici, trois genres bactériens sont particulièrement représentés : *Ignavibacterium* (18 % des séquences), faisant partie du phylum *Chlorobi*, *Gemmatimonas* (15 % des séquences), faisant partie du phylum *Gemmatimonadetes*, et *Pseudonocardia* (15 % des séquences), faisant partie du phylum *Actinobacteria*. *Pseudonocardia* sp. IFP 2050, décrite auparavant, et capable de dégrader l'ETBE, le MTBE et le TBA, a été isolée de cet enrichissement et avait aussi été identifiée par DGGE. Le fait qu'elle soit autant représentée dans la banque de clones suppose une réelle abondance et probablement un rôle important dans la dégradation de l'ETBE dans cet enrichissement.

Concernant les deux autres genres majoritaires identifiés dans la banque de clones, la majorité des séquences des gènes codant l'ARNr 16S présentes dans les bases de données sont classées en tant que "uncultured" (Debruyne et al., 2011). Concernant les *Chlorobi*, la plupart sont anaérobies (Liu et al., 2012) et leur persistance dans une culture toujours maintenue en aérobiose est surprenante. Enfin, peu de choses sont actuellement connues sur les bactéries appartenant au phylum *Gemmatimonadetes*, car peu de souches ont été isolées, notamment *Gemmatimonas aurantiaca* T27, capable d'accumuler les polyphosphates, et isolée à partir d'eaux usées (Zhang et al., 2003).

Enfin, concernant l'analyse qPCR, aucune amplification n'a pu être obtenue avec les couples testés, ce qui confirme que les souches impliquées dans la dégradation de l'ETBE sont différentes de celles présentes dans les enrichissements BE1-, GE1- et US6-ETBE.

En conclusion de cette partie de l'étude, nous avons pu confirmer par qPCR le rôle joué par certains des micro-organismes isolés dans trois enrichissements (BE1-, GE1- et US6-ETBE), quatre *Rhodococcus* sp. proches des souches préalablement isolées, un *Bradyrhizobium* sp. et une *Proteobacteria* proche d'*A. tertiaricarbonis*. Ces résultats sont cohérents avec la structure des populations mises en évidence grâce au séquençage des banques de clones. Le rôle de *Pseudonocardia* dans la population de FR5-ETBE bien que n'ayant pu être démontré par qPCR faute d'avoir pu dessiner des amorces suffisamment spécifiques, est montré par son poids dans la population via la banque de clones de cet enrichissement.

La banque de clones réalisée sur les enrichissements sur ETBE a permis de montrer également les rôles potentiels d'autres phyla dans la biodégradation de l'ETBE et /ou du TBA. Ce rôle est supputé en raison du poids important que les bactéries appartenant à ces phyla représentent dans la population. C'est le cas, par exemple, des *Acidobacteria* représentant 46 % des séquences de FR3-ETBE. Le profil très particulier de la dégradation de l'ETBE par FR3-ETBE, le pourcentage élevé d'*Acidobacteria* dans sa population, le fait que nous n'avons pas pu isoler des micro-organismes dégradeurs d'ETBE ou de TBA à partir de cet enrichissement dans des conditions assez "standard" font postuler leur rôle probable dans la biodégradation de l'ETBE. L'isolement de ces bactéries nécessiterait des conditions très particulières mais pourrait peut-être fournir l'accès à de nouvelles enzymes impliquées dans la voie de dégradation. Par ailleurs, d'après ces banques de clones, plusieurs genres identifiés sont peu ou très peu représentés. Hormis l'impact du facteur aléatoire de la sélection des clones repiqués lors de la préparation de la banque pour séquençage, cette faible représentativité peut s'expliquer, comme pour le cas des *Rhodococcus* dans US6-ETBE, par la faible croissance sur ETBE (composé en C2), ou par le caractère saprophyte de micro-organismes subsistant dans l'enrichissement aux dépens des micro-organismes poussant sur ETBE.

IV – 5. Étude des gènes impliqués dans la dégradation de l'ETBE et du MTBE

Si l'étude phylogénétique des enrichissements obtenus sur MTBE ou sur ETBE nous a apporté beaucoup d'informations sur les micro-organismes impliqués dans leur dégradation, il est également évident que ce type d'étude ne résout pas toutes les questions posées. C'est pourquoi, notre étude s'est également portée sur les quelques gènes connus codant pour des enzymes impliquées dans la dégradation de l'ETBE ou du MTBE. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, recherché les gènes connus pour leur implication dans la dégradation d'après la littérature puis, dans le cas où ils avaient été détectés, nous avons étudié l'expression de ces gènes.

Cette partie du travail a été réalisée sous la supervision du Dr. Sandrine Demanèche.

IV – 5 – 1. Recherche des gènes de dégradation

Cette partie du travail a pour but de rechercher les gènes de dégradation connus au sein des différents enrichissements, mais également, au sein des différentes souches que nous avons isolées et ayant démontré des capacités de dégradation pour l'ETBE, le MTBE ou le TBA.

Les gènes recherchés sont les suivants : *ethB* (cytochrome P450 monooxygénase), *ethR* (régulateur des gènes de l'opéron *eth*), *mdpA* (MTBE monooxygénase), *mpdB* (2M1,2PD alcool déshydrogénase), *mpdC* (hydroxybutyraldéhyde déshydrogénase), *icmA* (isobutyryl-coenzyme A mutase), *icmB* (isobutyryl coenzyme B mutase), *pdo/mdpJ* (phtalate 4,5-dioxygénase) et *alkB* (alcane hydroxylase). Dans cette optique, des couples d'amorces spécifiques à ces gènes ont été utilisés pour effectuer des amplifications PCR. Dans le cas où des amplifications ont été obtenues, avec des bandes de la taille attendue, elles ont été découpées, purifiées, et envoyées au séquençage. Des amplifications des gènes de dégradation ont été obtenues dans plusieurs cas, à la fois sur les enrichissements, mais également, sur des souches isolées. Le récapitulatif des résultats d'amplifications est présenté dans le tableau 4.3. De plus, pour chacun des gènes, des dendrogrammes ont été réalisés en se basant sur les séquences obtenues et incluant les séquences des gènes de référence afin de déterminer le degré de conservation de ces gènes. Dans le cas des gènes *mdpA* et *alkB*, étant donné les possibilités de variabilité bien connues des alcane hydroxylases, une étape de clonage a été effectuée pour une étude plus approfondie des séquences amplifiées. Les arbres sont présentés sur la figure 4.15.

Tableau 4.3. Amplifications PCR des différents gènes de dégradations

Nature de l'échantillon	Source	<i>ethB</i>	<i>ethR</i>	<i>mdpA</i>	<i>mpdB</i>	<i>mpdC</i>	<i>icmA</i>	<i>icmB</i>	<i>pdo/mdpJ</i>	<i>alkB</i>
Enrichissements	BE1-ETBE	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	GE1-ETBE	+	+	-	-	-	-	-	+	-
	US6-ETBE	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	FR3-ETBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FR5-ETBE	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	GE1-MTBE	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	US2-MTBE	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	US3-MTBE	-	-	+	-	-	-	-	+	-
	FR5-MTBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	FR6-MTBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	BE1-MTBE	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Souches isolées	<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2040	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2041	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2042	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Rhodococcus</i> sp. IFP 2043	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	<i>Betaproteobacteria</i> IFP 2047	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Bradyrhizobium</i> sp. IFP 2049	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudonocardia</i> sp. IFP 2050	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. IFP 2051	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	<i>Proteobacteria</i> IFP 2052	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Contrôles positifs: *ethB*: *R.ruber* IFP 2001; *ethR*: *R.ruber* IFP 2001; *alkB*: *M.austroafricanum* IFP 2012; *mdpA*: *Methylibium* sp. M48; *mpdB*: *M.austroafricanum* IFP 2012; *mpdC*: *M.austroafricanum* IFP 2012; *pdo/mdpJ*: *A.tertiaricarbonis* IFP 2003

+ : amplification par PCR positive

- : pas d'amplification par PCR

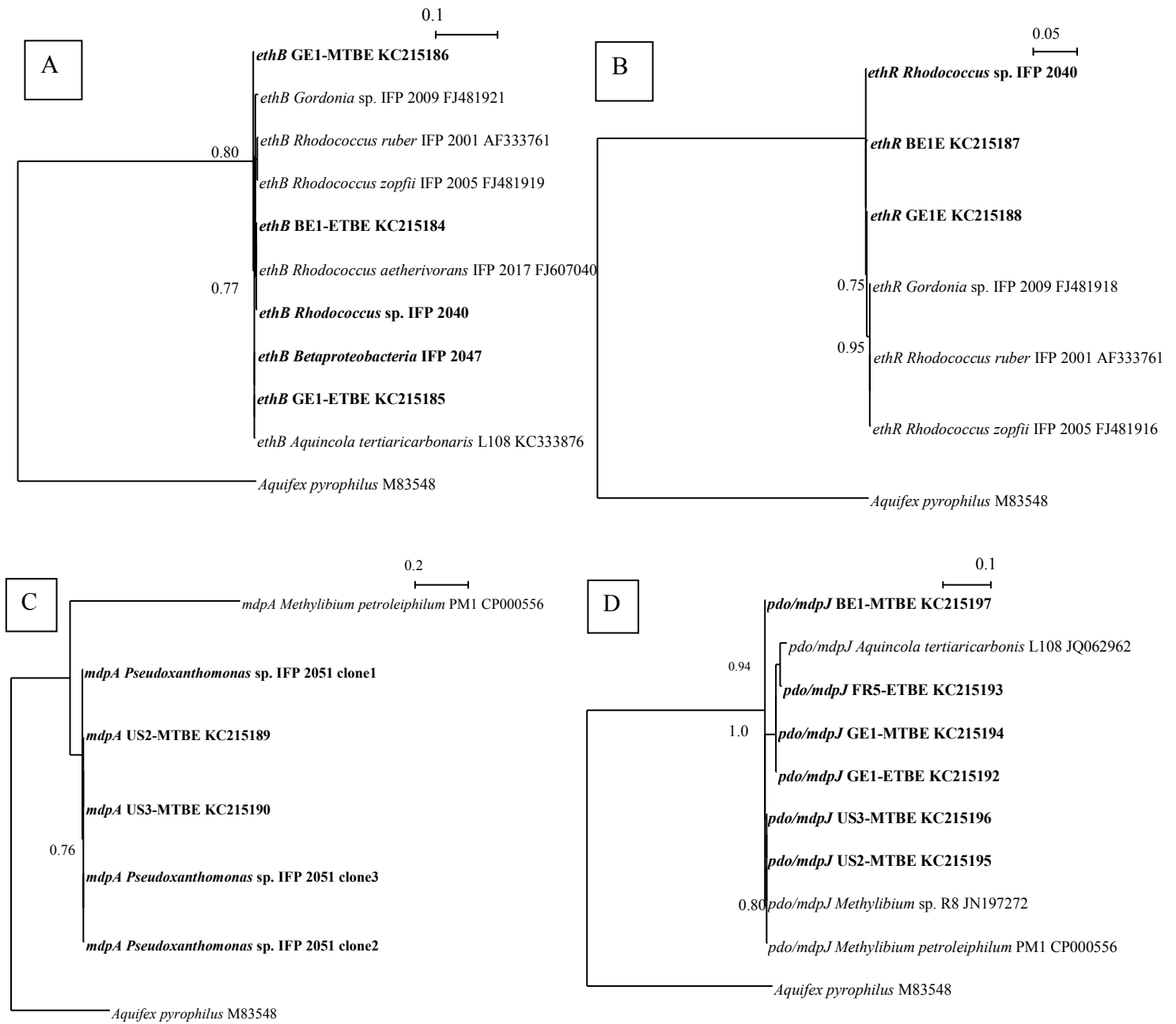


Figure 4.15. Arbres phylogénétiques obtenus pour les gènes de dégradation étudiés
 A: Arbre du gène *ethB* ; B: Arbre du gène *ethR* ; C: arbre du gène *mdpA* ; D: Arbre du gène *pdo/mdpJ* .

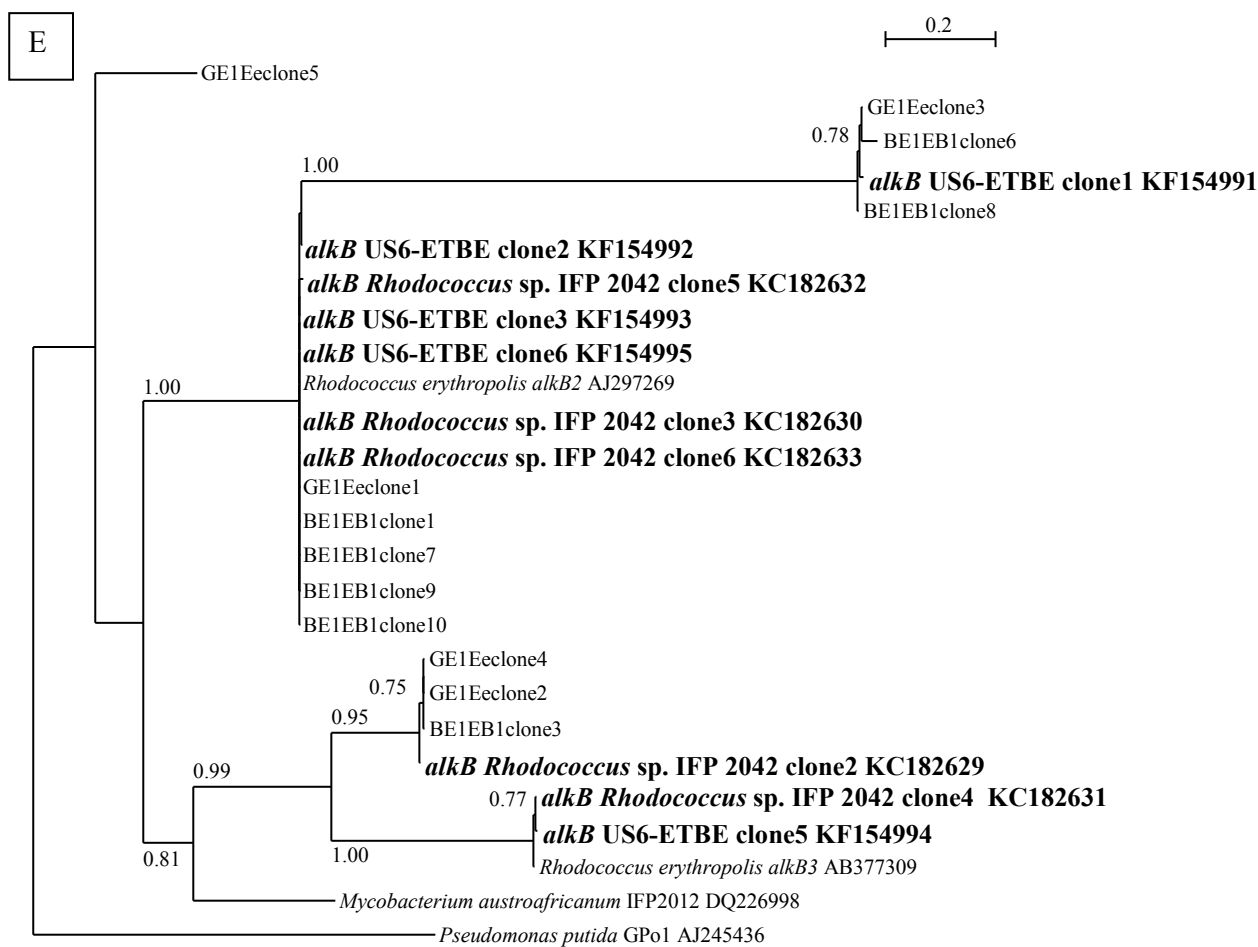


Figure 4.15 (suite). Arbres phylogénétiques obtenus pour les gènes de dégradation étudiés
E: Arbre du gène *alkB*

a) Gène *ethB*

Pour le gène *ethB* responsable de l'oxydation de l'ETBE ou du MTBE, nous avons obtenu une amplification par PCR sur BE1-ETBE, GE1-ETBE et GE1-MTBE, ainsi que sur *Rhodococcus* sp. IFP 2040 (isolée de BE1-ETBE) et la *Betaproteobacteria* IFP 2047 (isolée de GE1-ETBE) avec EthB-F2/EthB-R2. En revanche, le gène *ethB* n'a pas été retrouvé dans les autres enrichissements, ni dans les autres *Rhodococcus* pouvant dégrader l'ETBE. D'après le dendrogramme correspondant (figure 4.15-A), on constate que ce gène est très conservé, ce qui est logique étant donné que les amorces utilisées ciblaient spécifiquement ce gène, et que les séquences obtenues dans le cadre de cette étude possèdent plus de 98 % d'identité par rapport à la séquence du gène *ethB* de *R. ruber* IFP 2001 (Chauvaux et al., 2001 ; Malandain et al., 2010). Ce gène étant responsable de l'étape d'oxydation de l'ETBE, il est probablement impliqué dans la dégradation de l'ETBE dans les enrichissements et souches étudiés ici. La détection de *ethB* dans les deux enrichissements sur ETBE ou sur MTBE provenant de l'échantillon GE1 est intéressant car GE1 est le site allemand de Leuna dont a été isolé *A. tertiaricarbonis* L108 qui contient également *ethB* (Schuster et al., 2013).

b) Gène *ethR*

Pour le gène *ethR* responsable de la régulation de l'opéron *eth*, nous avons obtenu une amplification par PCR sur BE1-ETBE et GE1-ETBE ainsi que sur *Rhodococcus* sp. IFP 2040 avec EthRfor/EthRrev. En revanche, le gène *ethR* n'a pas été retrouvé dans les autres enrichissements ni dans les autres souches isolées dégradant l'ETBE où *ethB* était présent (voir ci-dessus). D'après le dendrogramme correspondant (figure 4.15 B), on constate que ce gène est très conservé, probablement à cause d'une très grande spécificité des amorces, et que les séquences obtenues dans le cadre de cette étude possèdent 99 % d'identité par rapport au gène *ethR* de *R. ruber* IFP 2001 (Chauvaux et al., 2001 ; Malandain et al., 2010). Il est intéressant de noter que ce gène n'est pas présent chez la *Betaproteobacteria* IFP 2047, alors que celle-ci possède pourtant le gène *ethB*. Cela n'exclue pas l'existence d'un autre régulateur dont la séquence ne serait pas reconnue par les amorces utilisées. Ce cas de figure a été observé également chez *A. tertiaricarbonis* L108 (Schuster et al., 2013) qui possède les gènes *eth ABCD* mais pas le gène régulateur *ethR*. Cela laisse supposer des événements de transfert horizontal des gènes *eth* avec des remaniements liés à leur insertion dans le génome.

c) Gène *mdpA*

Pour le gène *mdpA* responsable de l'oxydation du MTBE, nous avons obtenu une amplification par PCR sur US2-MTBE et US3-MTBE, ainsi que sur la *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 (isolée de US3-MTBE) avec MdpA1F/MdpA1R. En revanche il n'y a pas d'amplifications sur les autres enrichissements obtenus sur MTBE ni dans les autres souches isolées pouvant dégrader ce composé. D'après le dendrogramme correspondant, les séquences obtenues lors de cette étude sont très conservées (> 99 % d'identité) par rapport à la séquence référence de ce gène chez *M. petroleiphilum* PM1 (Kane et al., 2007). Malgré le fait que le gène *mdpA* code en réalité pour une alkane 1-monooxygénase (locus Mpe_B0606 sur le génome de PM1, d'après Hristova et al., 2007), et malgré la variabilité possible pour les produits des gènes *alkB*, les séquences d'ADN des trois clones réalisés ont montré également un très haut niveau d'identité, là encore probablement lié à la spécificité des amorces utilisées. Il est intéressant de noter que le rôle potentiel d'une enzyme codée par un gène *mdpA* avait déjà été montré lors d'une précédente étude de cet enrichissement par analyse isotopique (specific stable isotope analysis ou CSIA) (Bastida et al., 2010), le résultat que nous obtenons sur le gène présent est donc en accord avec ces résultats.

d) Gène *pdo/mdpJ*

Pour le gène *pdo/mdpJ* responsable de l'oxydation du TBA, nous obtenons une amplification par PCR sur GE1-ETBE, FR5-ETBE, GE1-MTBE, US2-MTBE, US3-MTBE et BE1-MTBE avec PDO2-for/PDO2-rev. En revanche, le gène *pdo/mdpJ* n'a pas été retrouvé dans les souches dégradeuses isolées de ces enrichissements. D'après le dendrogramme correspondant, les séquences obtenues avec ces amorces sont également très conservées (> 97 % d'identité) par rapport à la séquence de ce gène chez *A. tertiaricarbonis* L108 (Schäfer et al., 2007).

Dans le cas des enrichissements BE1, ce gène n'a été retrouvé que dans l'enrichissement obtenu sur MTBE, pas sur ETBE, malgré une dégradation du TBA dans les deux cas. De la même façon, dans le cas des enrichissements FR5, le gène *pdo/mdpJ* n'a été retrouvé que dans l'enrichissement obtenu sur ETBE et pas sur MTBE. Il est donc possible que dans ces deux cas, des voies de dégradation du TBA différentes sont empruntées selon le substrat d'enrichissement. Ceci va dans le sens des analyses RISA et DGGE, qui montrent des différences de communautés bactériennes et donc, potentiellement, des différences fonctionnelles.

e) **Cas du gène *alkB***

Pour le gène *alkB* responsable de l'oxydation du MTBE et du TBA, nous obtenons une amplification par PCR avec Rhose2/Rhoas1 sur US6-ETBE, ainsi que sur *Rhodococcus* sp. IFP 2041, IFP 2042 et IFP 2043. Étant donné la variabilité connue pour ce gène (Wang et al., 2010), des clones ont été réalisés à partir des ADNs de l'enrichissement et des souches isolées. D'après le dendrogramme correspondant, nous constatons que la diversité du gène *alkB* est confirmée, car au moins trois groupes sont visibles sur cette figure, et correspondent à différentes familles de gène *alkB* (*alkB2*, *alkB3*...). Même pour des clones provenant d'une même souche ou du même enrichissement, il peut y avoir des différences de regroupement, montrant ainsi que cette diversité peut se retrouver dans une même souche, lui conférant ainsi de meilleures capacités d'adaptation : plus d'enzymes différentes, donc, potentiellement, une plus grande gamme de substrats dégradables. La présence de plusieurs copies du gène *alkB* dans un même micro-organisme est connue (Whyte et al., 2002).

Des amplifications du gène *alkB* ont été obtenues pour les 3 *Rhodococcus* qui n'ont pas le gène *ethB*, alors qu'au contraire, *Rhodococcus* IFP 2040 possédant *ethB* ne semble pas avoir le gène *alkB* du moins en utilisant le couple d'amorces dégénérées Rhose2/Rhoas1. Ces quatre souches de *Rhodococcus* possèdent néanmoins une capacité de dégradation de l'ETBE. Dans une précédente étude, des variations dans la spécificité des substrats étaient remarquées, à savoir que les gènes *alkB* de *P.putida* Gp01 pouvaient attaquer seulement les éthers, tandis que des bactéries du genre *Mycobacterium* employant le gène *alkB* (Lopes-Ferreira et al., 2007) avaient une gamme de substrats plus large, incluant notamment les alcools TBA et TAA (Rosell et al., 2012).

Enfin, il faut souligner le fait que *alkB* n'a été retrouvé que dans un seul des enrichissements étudiés, alors que les alcanes sont dégradés dans tous les cas et il est probable que d'autres couples d'amorces permettraient sa détection (Heiss-Blanquet et al., 2005, Piccolo et al., 2011).

f) **Opéron *thm* chez *Pseudonocardia* sp. IFP 2050**

La recherche de l'opéron *thm* chez la souche IFP 2050 a été effectuée pour les raisons suivantes :

- aucun gène de dégradation connu de l'ETBE ou du MTBE n'a été retrouvé dans la souche IFP 2050 avec les couples d'amorces testés ;
- le THF est également un éther comme l'ETBE et le MTBE ;
- la souche IFP 2050 dégrade le THF (figure 4.6) ;

- l'opéron *thm*, responsable de la dégradation du THF chez les souches *Pseudonocardia* K1 et ENV478, a été caractérisé ;
- après croissance sur THF, K1 dégrade l'ETBE, le MTBE et le TAME par cométabolisme (Thiemer et al., 2003), de même que ENV478 dégrade le MTBE par cométabolisme (Vainberg et al., 2006).

Des amorces spécifiques ont été dessinées et synthétisées à partir des différents gènes de l'opéron *thm* décrit dans la littérature.

Après PCR et électrophorèse sur gel d'agarose, les gènes *thmB*, *thmS*, *thmD*, *thmA*, *thmH* ont été détectés. Le gène *thmC* n'a pas pu être amplifié, peut-être en raison d'un couple d'amorce non adapté. Les séquences des fragments amplifiés par PCR ont ensuite été découpées et séquencées, et sont présentées dans le tableau 4.4.

Tableau 4.4. Gènes de l'opéron *thm* retrouvés chez *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

Nom du gène chez <i>Pseudoconardia</i> sp. ENV478 (taille en bp)	Taille du fragment amplifié et séquencé (bp)	Pourcentage d'identité (par rapport à ENV478)
<i>thmB</i> (1040 bp)	887	96
<i>thmS</i> (1502 bp)	1306	95
<i>thmD</i> (1082 bp)	900	95
<i>thmA</i> (1637 bp)	1244	98
<i>thmH</i> (1439 bp)	259	93

Ces gènes apparaissent donc conservés (> 93 % d'identité) avec les amorces utilisées. Le fait d'avoir retrouvé ces gènes chez *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 explique la capacité à dégrader le THF qui a été précédemment montrée. Il est donc possible que ces gènes soient également impliqués dans la dégradation de l'ETBE et du MTBE chez IFP 2050, comme chez K1 et ENV478 (après croissance sur THF), des expériences complémentaires de mutagenèse dirigée permettraient de vérifier cette hypothèse.

En conclusion de cette partie de l'étude, nos résultats montrent que les gènes connus de dégradation de l'ETBE et du MTBE sont retrouvés dans un certain nombre de cas (*ethB*, *ethR*, *mdpA*, *pdo/mdpJ* et *alkB*) et ceci avec un haut degré de conservation par rapport aux gènes de référence et aux couples d'amorces utilisés. Il met aussi en évidence la possibilité de transferts horizontaux dans le cas du gène *ethB* codant pour le cytochrome P450 dégradant les éthers-carburants puisqu'on retrouve celui-ci à la fois chez *Rhodococcus* et chez une *Betaproteobacteria*. Un élément en faveur de ce transfert éventuel

de gènes est le fait que le régulateur généralement trouvé associé à *ethB* dans l'opéron *eth*, *ethR* (comme chez *Rhodococcus* sp. IFP 2040) n'est pas retrouvé dans la souche IFP 2047 dans laquelle l'expression des gènes doit donc être régulée différemment du fait de l'absence de *ethR*. Certains gènes n'ont jamais été amplifiés (gènes *mpd B* et *mpdC* ou *icmA/icmB*) et la raison peut en être une faible conservation par rapport aux gènes de référence qui empêcherait l'amplification avec les amorces utilisées ou l'existence de systèmes enzymatiques différents pour réaliser l'étape correspondante.

IV – 5 – 2. Étude de l'expression des gènes par RT-qPCR sur ETBE

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux obtenus à l'École Centrale de Lyon sous la direction du Dr. Sandrine Demanèche qui a mis au point le protocole pour effectuer cette étude. Une étude de l'expression des gènes qui avaient été préalablement détectés a été effectuée dans les souches concernées.

a) Rhodococcus sp. IFP 2040

Une culture de cette souche a été effectuée sur MM avec comme seule source de carbone le TSB ou l'ETBE, et dans ce cas, le dosage du substrat résiduel a été réalisé. En parallèle, à chaque point, un prélèvement était effectué sur les cultures afin d'extraire les ADN et les ARN. L'expression des gènes codant l'ARNr 16S, *ethB* et *ethR* a ensuite été recherchée chez *Rhodococcus* sp. IFP 2040.

Le dosage de la disparition de l'ETBE et de l'apparition de TBA montre une dégradation complète en 4 jours et une accumulation de TBA avec *Rhodococcus* sp. IFP 2040 (figure 4.16).

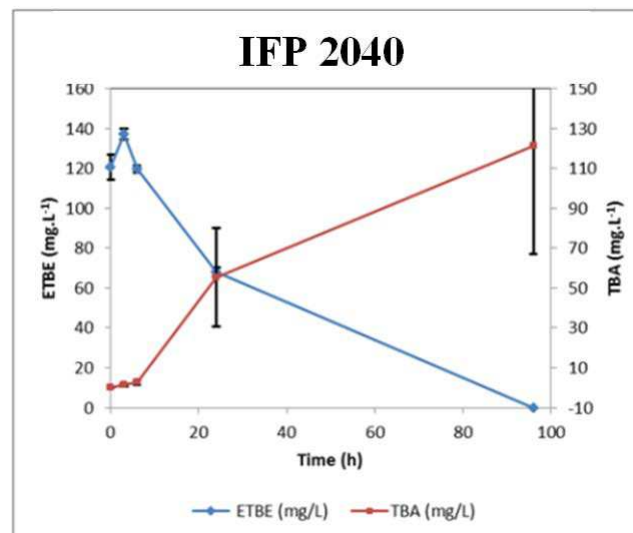


Figure 4.16. Courbe de dégradation de l'ETBE pour *Rhodococcus* sp. IFP 2040

L'ADN et l'ARN après traitement ont été dosés, le rendement d'extraction est très variable d'un échantillon à l'autre (tableau 4.5).

Tableau 4.5. DO et concentrations d'ADN et d'ARN extraits durant le suivi d'expression des gènes *ethB* et *ethR* chez *Rhodococcus* sp. IFP 2040

IFP 2040	DO ₆₀₀	ARN (ng.µL ⁻¹)	ADN (ng.µL ⁻¹)
t=0	0,135	-	-
Inoculum	1,424	8,07	176
TSB 6 h	0,242	<2	7
TSB 24 h	0,250	<2	2
TSB 4 j	0,276	<2	9
TSB 7 j	0,248	1,31	24,5
ETBE 6 h	0,152	<2	3
ETBE 24 h	0,136	<2	3,5
ETBE 4 j	0,233	4,77	56
ETBE 7 j	0,273	<2	2

La quantité de gènes d'intérêt présents a été mesurée par qPCR et le suivi d'expression de ces gènes (*ethB* et *ethR*) a ensuite été réalisé par RT-qPCR. Les résultats obtenus sont présentés par copie de 16S sur la figure 4.17.

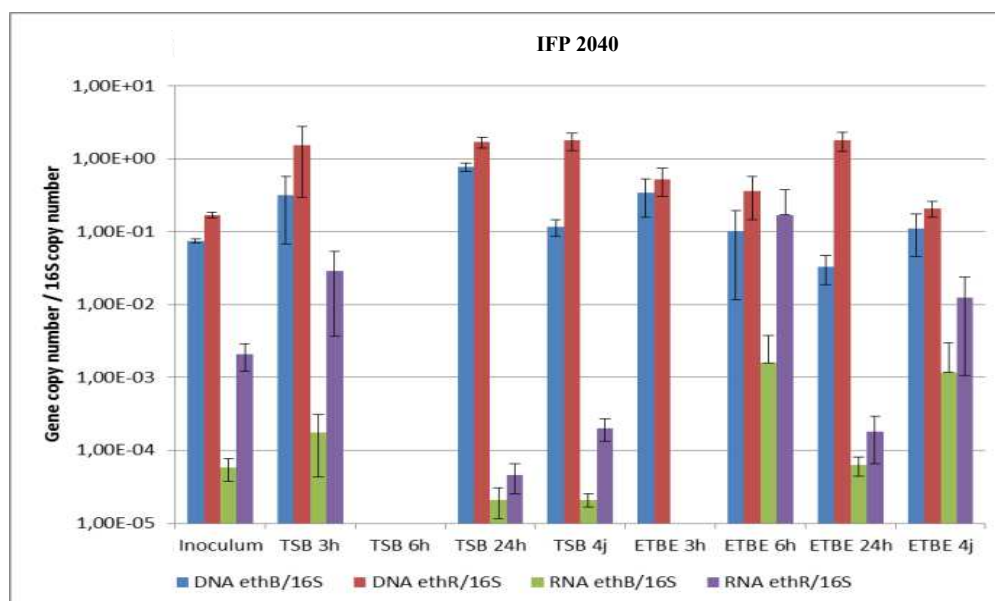


Figure 4.17. Expression des gènes *ethB* et *ethR* chez IFP 2040

Les gènes *eth* sont présents et exprimés dans l'inoculum en l'absence d'ETBE, de plus on les retrouve dans la culture avec le TSB comme substrat, il semble donc que les gènes *eth* sont constitutivement exprimés chez *Rhodococcus* sp. IFP 2040.

Le même résultat avait été obtenu précédemment en prélevant la culture sur 24h (0, 2h, 4h, 6h et 24h), mais la dégradation d'ETBE n'ayant pas été complète, l'expérience n'est pas présentée.

Un autre suivi d'expression des gènes *ethB* et *ethR* a été réalisé à IFPEN dans les mêmes conditions. Le résultat obtenu est présenté sur la figure 4.18.

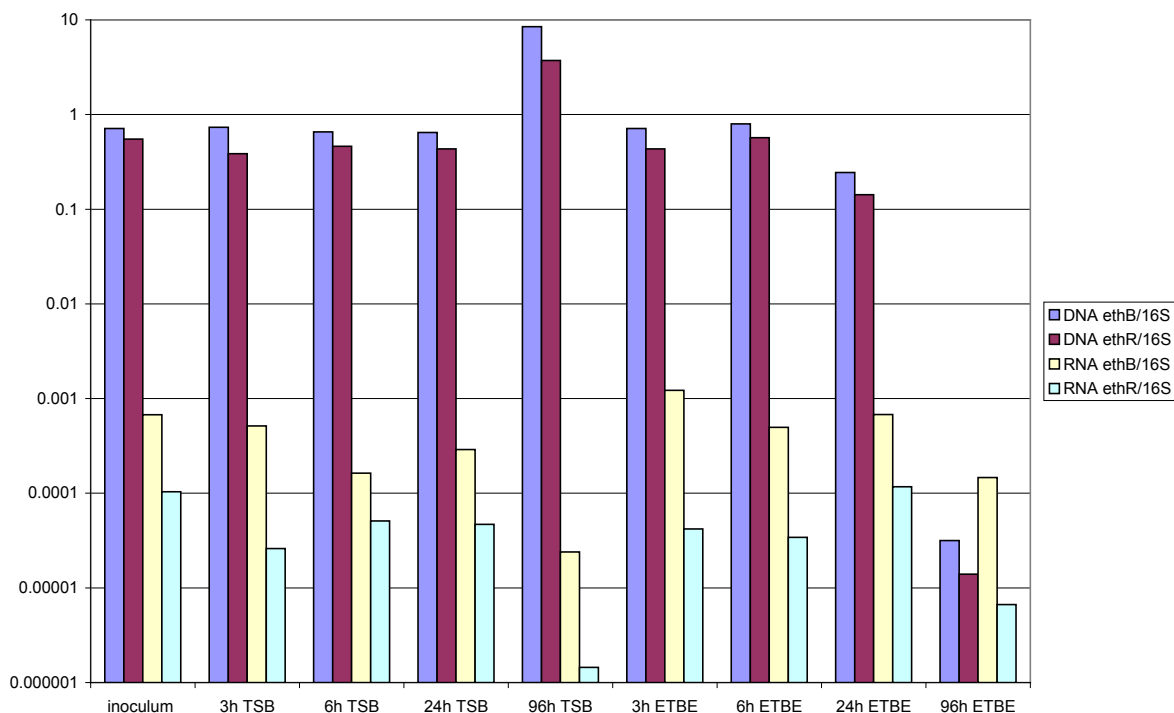


Figure 4.18. Expression des gènes *ethB* et *ethR* chez IFP 2040

Les résultats obtenus sont très proches de ceux obtenus précédemment, à savoir, que les gènes *ethB* et *ethR* semblent être exprimés de façon constitutive dans cette souche (présence sur TSB, et pas de différence notable d'expression au cours du temps sur ETBE).

Il est à noter que ces résultats sont différents de ce qui avait été observé pour l'expression de ces gènes chez la souche *R.ruber* IFP 2001, où une induction avait été mise en avant durant la phase de croissance sur ETBE (Malandain et al., 2010), néanmoins il faut mentionner qu'un mutant constitutif de *R. ruber* IFP 2001, IFP 2007, avait été facilement obtenu après une série de repiquage sur ETBE (Chauvaux et al., 2001). Chez *A. tertiaricarbonis* L108, il a été montré que l'expression des gènes de l'opéron *eth* était constitutive et indépendante du substrat (Schuster et al., 2013).

b) *Rhodococcus* sp. IFP 2043

Une culture de cette souche a été effectuée sur milieu minimum avec comme seule source de carbone le TSB ou l'ETBE, et dans ce cas, le dosage du substrat résiduel a été réalisé. En parallèle, à chaque

point, un prélèvement était effectué sur les cultures afin d'extraire les ADN et les ARN. L'expression des gènes codant l'ARNr 16S et *alkB* a ensuite été recherchée chez *Rhodococcus* sp. IFP 2043. Le dosage de la disparition de l'ETBE et de l'apparition de TBA montre une dégradation complète en 7 jours et une accumulation de TBA avec *Rhodococcus* sp. IFP 2043 (figure 4.19).

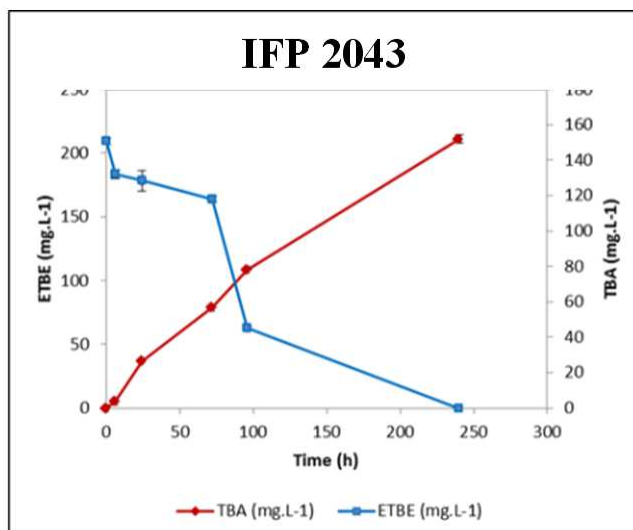


Figure 4.19. Courbe de dégradation de l'ETBE pour *Rhodococcus* sp. IFP 2043

Les quantités d'ADN et d'ARN extraits pour *Rhodococcus* sp. IFP 2043, sont très faibles (tableau 4.6).

Tableau 4.6. DO et concentrations d'ADN et d'ARN extraits durant le suivi d'expression du gène *alkB* chez *Rhodococcus* sp. IFP 2043

IFP 2043	DO ₆₀₀	ARN (ng.µL ⁻¹)	ADN (ng.µL ⁻¹)
t=0	0,266	-	-
Inoculum	2,360	< 2	2,74
TSB 6 h	0,364	< 2	3,4
TSB 24 h	0,375	< 2	2,49
TSB 3 j	0,304	3,99	2,66
TSB 4 j	0,320	< 2	178
TSB 7 j	0,281	< 2	2,7
ETBE 6 h	0,239	< 2	3,07
ETBE 24 h	0,227	< 2	2,39
ETBE 3 j	0,216	< 2	20,8
ETBE 4 j	0,336	< 2	< 2
ETBE 7 j	0,302	< 2	2,82

Les rendements d'extractions d'ADN et d'ARN de IFP 2043 sont trop faibles, empêchant de tirer des conclusions quant à l'expression du gène *alkB* présent dans cette souche, et ce, malgré une densité optique correcte dans les cultures. La lyse des cellules de *Rhodococcus* est reconnue comme étant difficile du fait de leur structure membranaire, ce qui pourrait expliquer ces rendements. Il faut également rester prudent sur la quantification de ce gène avec les amorces dégénérées (Rhoas1 et Rhose2) qui ne sont pas adaptées à la qPCR, leur efficacité d'amplification est trop faible et elles permettent d'amplifier plusieurs types de gènes *alkB*. En effet, la séquence du fragment d'*alkB* obtenu par PCR (343 bp) était trop courte pour nous permettre de dessiner un autre couple d'amorces plus efficace.

c) *Rhodococcus* sp. IFP 2041

Une culture de cette souche a été effectuée sur milieu minimum avec comme seule source de carbone le TSB ou l'ETBE, et dans ce cas, le dosage du substrat résiduel a été réalisé. En parallèle, à chaque point, un prélèvement était effectué sur les cultures afin d'extraire les ADN et les ARN. L'expression des gènes codant l'ARNr 16S et *alkB* a ensuite été recherchée chez *Rhodococcus* sp. IFP 2041. Le dosage de la disparition de l'ETBE et de l'apparition de TBA montre une dégradation complète en 7 jours et une accumulation de TBA (figure 4.20).

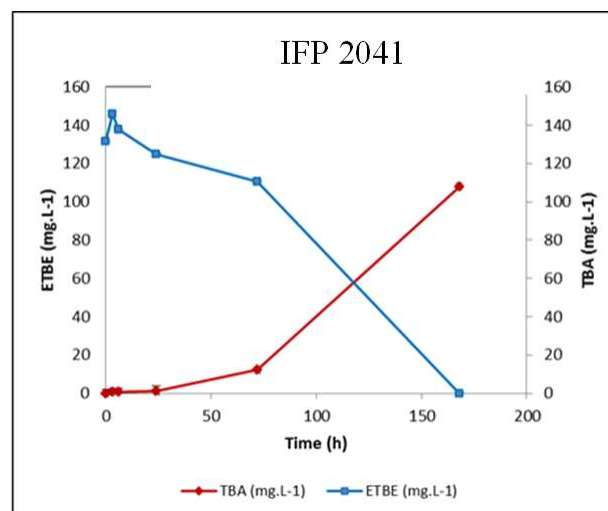


Figure 4.20. Courbe de dégradation de l'ETBE pour *Rhodococcus* sp. IFP 2041

Les quantités d'ADN et d'ARN extraits pour *Rhodococcus* sp. IFP 2041 sont variables (tableau 4.7).

Tableau 4.7. DO et concentrations d'ADN et d'ARN extraits durant le suivi d'expression du gène *alkB* chez *Rhodococcus* sp. IFP 2041

IFP 2041	DO ₆₀₀	ARN (ng.µL ⁻¹)	ADN (ng.µL ⁻¹)
Inoculum	4,4	75	680
t=0	0,102		
TSB 6 h	0,183	15	84,7
TSB 24 h	0,220	5,87	162
TSB 3 j	0,170	190	620
TSB 7 j	0,133	180	31,8
ETBE 6 h	0,080	2,3	38,2
ETBE 24 h	0,068	3,36	3,41
ETBE 3 j	0,045	140	2,96
ETBE 7 j	0,158	0	4,77

Le suivi d'expression du gène *alkB* a ensuite été réalisé par RT-qPCR. Le résultat obtenu est présenté sur la figure 4.21.

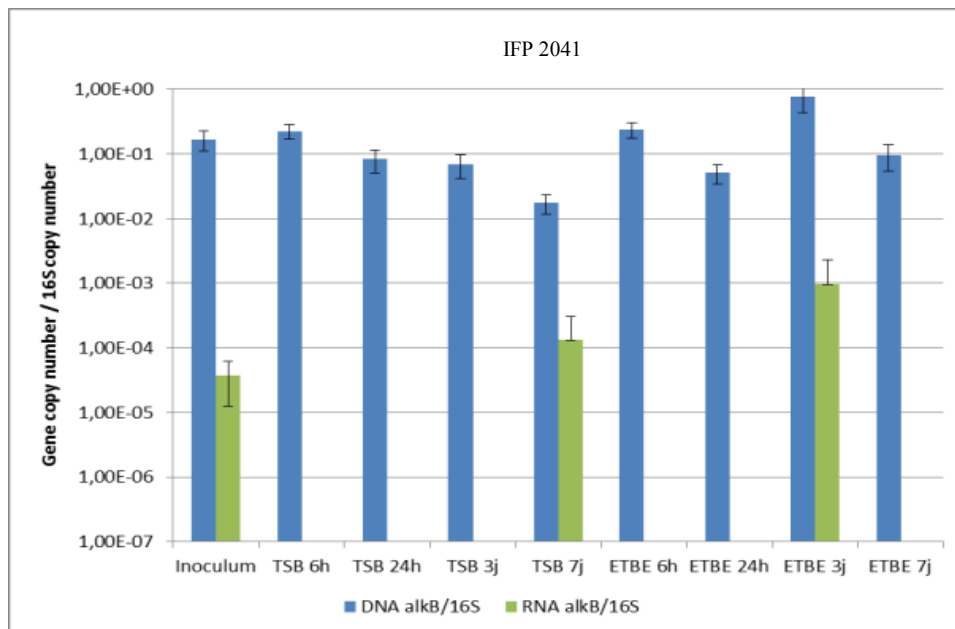


Figure 4.21. Expression du gène *alkB* chez IFP 2041

Le gène *alkB* est exprimé dans l'inoculum et sur TSB aux temps 3 et 7 jours, et au temps 3 jours en présence d'ETBE. Il ne semble donc pas induit en présence d'ETBE, mais il faut rester prudent pour l'étude de ce gène pour les mêmes raisons que précédemment.

d) Betaproteobacteria IFP 2047

Une culture de cette souche a été effectuée sur milieu minimum avec comme seule source de carbone le TSB ou l'ETBE, et dans ce cas, le dosage du substrat résiduel a été réalisé. En parallèle, à chaque point, un prélèvement était effectué sur les cultures afin d'extraire les ADN et les ARN. L'expression des gènes codant l'ARNr 16S et *ethB* a ensuite été recherchée chez la *Betaproteobacteria* IFP 2047.

La dégradation de l'ETBE est très lente chez IFP 2047, puisqu'au bout de 10 jours il reste encore 64 % d'ETBE. Lors de la première série d'expériences avec la souche sur 4 jours, la dégradation d'ETBE avait à peine commencée, seuls les résultats du 2ème essai sont donc présentés. Il y a une production transitoire de TBA par IFP 2047 pendant les 6 premières heures de culture (figure 4.22).

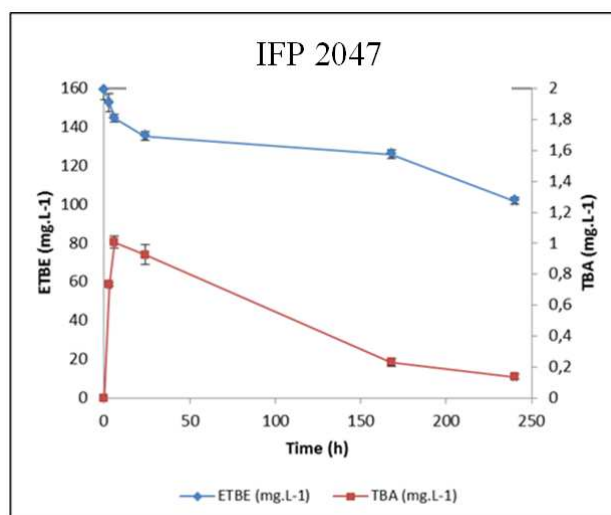


Figure 4.22. Courbe de dégradation de l'ETBE pour IFP 2047

L'ADN et l'ARN de la souche après traitement ont été dosés, mais là encore les rendements d'extraction sont très variables d'un échantillon à l'autre (tableau 4.8).

Tableau 4.8. DO et concentrations d'ADN et d'ARN extraits durant le suivi d'expression du gène *ethB* chez IFP 2047

IFP 2047	DO ₆₀₀	ARN (ng.µL ⁻¹)	ADN (ng.µL ⁻¹)
Inoculum	1,036	> 200	98,8
t=0	0,115		
TSB 3 h	0,125	< 2	< 0,1
TSB 6 h	0,146	16,6	< 0,1
TSB 24 j	0,176	> 200	97,8
TSB 7 j	0,176	160	177
TSB 10 j	0,168	190	145
ETBE 3 h	0,115	75	15,1
ETBE 6 h	0,127	190	50
ETBE 24 h	0,110	160	86
ETBE 7 j	0,109	200	49
ETBE 10 j	0,119	120	42

La présence et l'expression du gène *ethB* détecté dans les expériences préliminaires ont été recherchées. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 4.23.

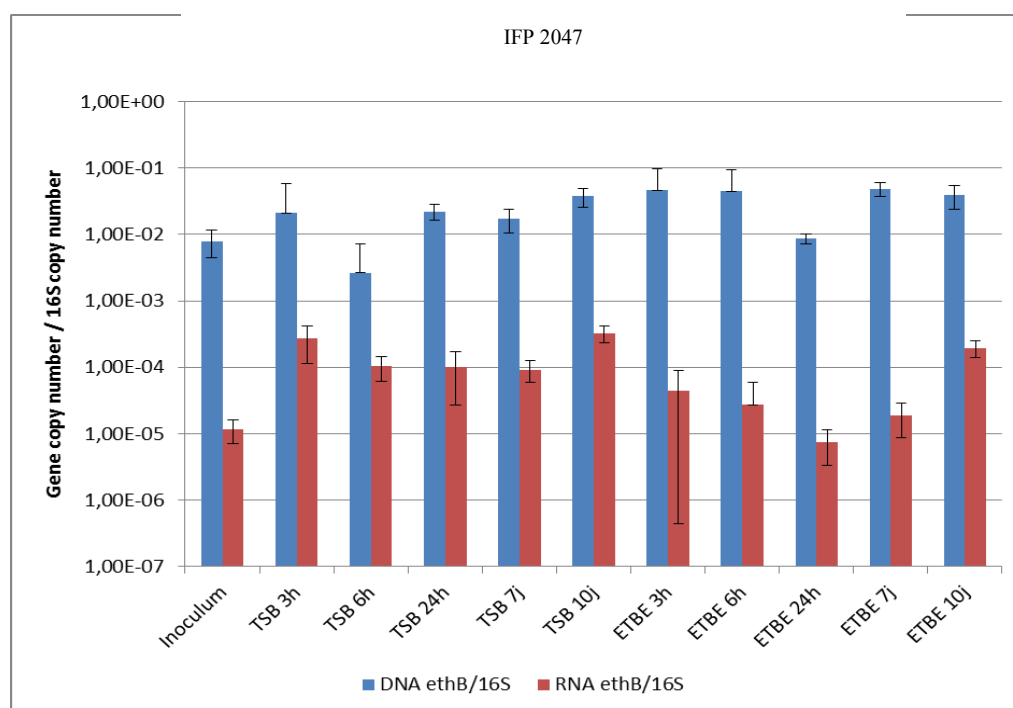


Figure 4.23. Expression du gène *ethB* chez IFP 2047

Le gène *ethB* a été détecté dans la souche de *Betaproteobacteria* IFP 2047, il s'exprime quelles que soient les conditions. Ces travaux doivent être répétés sur une plus longue échelle de temps pour arriver à la dégradation complète de l'ETBE pour cette souche, et ainsi, confirmer ces observations.

e) ***Pseudonocardia* sp. IFP 2050**

Un essai de suivi d'expression de l'un des gènes de l'opéron *thm* (gène *thmB*) a été effectué sur IFP 2050 sur 3 substrats différents (ETBE, THF et glucose). Lors des cultures, la totalité de l'ETBE a été dégradé en moins de 7 jours, avec une production transitoire de TBA, tandis que la totalité du THF a été dégradée en 3 jours (figure 4.24). Lors de ces cultures, une grande quantité de biomasse a pu être obtenue sur ETBE et sur THF lors des différents prélèvements, tandis que la quantité de biomasse obtenue sur glucose a été bien plus faible. Le résultat obtenu quant à l'expression du gène *thmB* est présentée sur la figure 4.25.

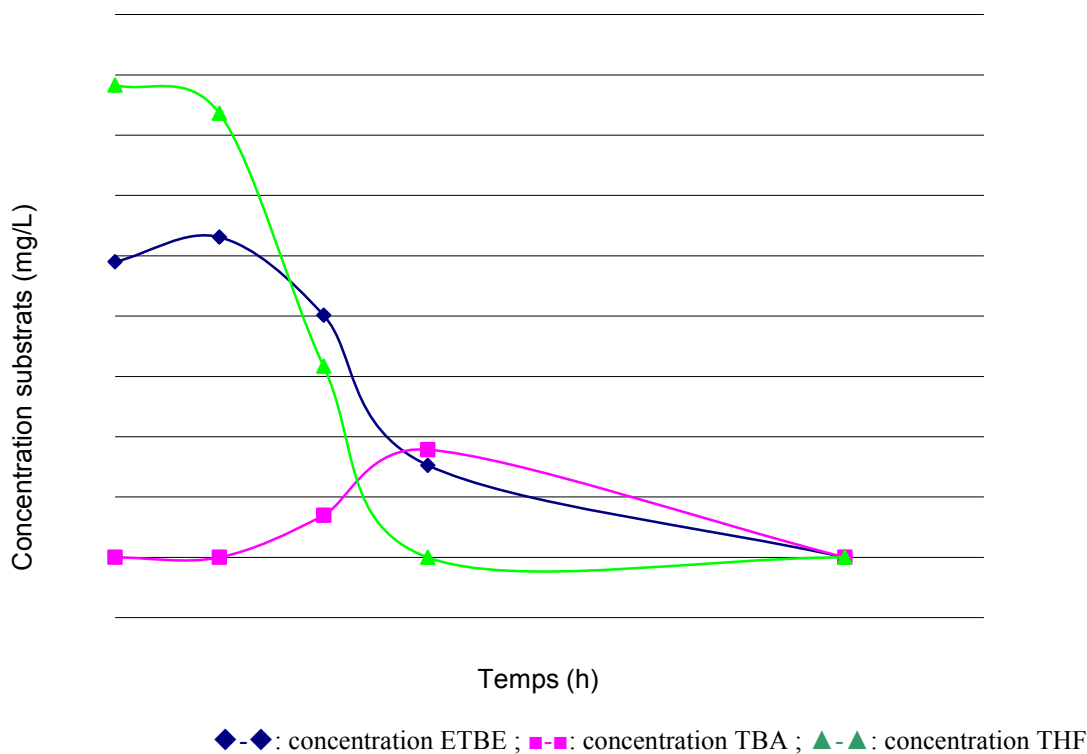


Figure 4.24. Courbe de dégradation de l'ETBE par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

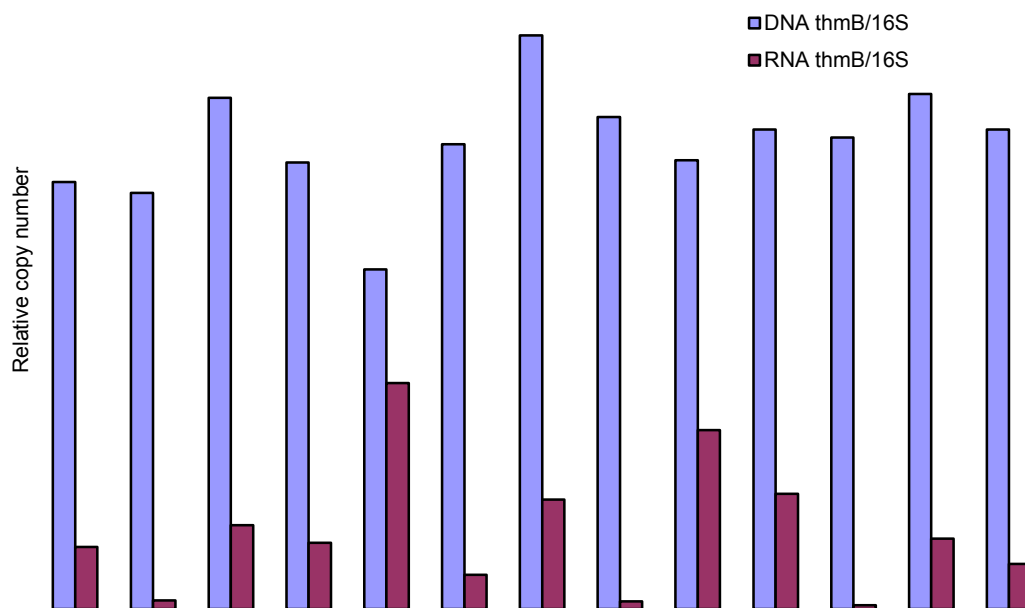


Figure 4.25. Expression du gène *thmB* chez IFP 2050

D'après le résultat obtenu, il semblerait qu'il n'y ait pas d'induction significative du gène *thmB* au cours de la dégradation de l'ETBE, du THF ou du glucose. L'expression du gène *thmB* semble donc être constitutive chez *Pseudonocardia* sp. IFP 2050. Par conséquent, il semble encore difficile de statuer quant au rôle éventuel du gène *thmB*, et de façon plus général, de l'opéron *thm*, dans la dégradation de l'ETBE chez cette souche.

Il est à noter que l'essai présenté ici a été effectué avec un nouveau kit d'extraction d'ARN dédié aux souches pures, et a permis d'obtenir des résultats bien plus exploitables qu'avec le précédent kit, notamment en termes de rendement d'extraction d'ARN.

Le bilan de cette partie de l'étude s'avère être mitigé. De nombreux problèmes expérimentaux sont survenus durant le travail effectué, notamment lors de la phase de mise au point de la méthode d'extraction d'ARN. En effet, dans la plupart des cas, de faibles rendements en biomasse sur ETBE n'ont pas permis d'obtenir des quantités de cellules suffisamment importantes pour chacun des prélèvements au cours de la dégradation de l'ETBE. En outre, la lyse cellulaire des *Actinobacteria* (*Rhodococcus* et *Pseudonocardia*) est difficile du fait de la structure de leur paroi cellulaire. De plus, les rendements d'extraction d'ARN et d'ADN sont mauvais, et une grande quantité d'acides nucléiques est perdue durant le processus. L'utilisation d'un autre kit dédié spécifiquement aux souches isolées pourrait être intéressante et permettrait probablement d'obtenir de meilleurs rendements (ex: <http://www.mobio.com/microbial-rna-isolation/ultraclean-microbial-rna-isolation-kit.html>, dédié aux souches pures, testé sur l'expression de *thmB* chez *Pseudonocardia* sp. IFP 2050). L'un des problèmes rencontrés également lors des premiers essais a été la purification des ARNs, étant donné les quantités

importantes d'ADN contaminant. Ce problème semble avoir été en partie résolu, avec la standardisation de l'utilisation de la TURBO DNase. Pour toutes ces raisons, il est impératif d'améliorer les conditions d'extraction des ARNs sur les souches que nous avons isolées et de refaire des suivis complémentaires afin de pouvoir conclure sur l'expression des gènes testés, et ensuite, de procéder aux tests sur les enrichissements.

V – Conclusions et perspectives

V – Conclusions et perspectives

Au cours de ce travail de thèse, nous avons effectué une caractérisation d'enrichissements sur ETBE ou sur MTBE obtenus à partir d'échantillons environnementaux d'origines géographiques diverses (USA, France, Belgique, Allemagne), pollués par ces composés, en utilisant diverses approches expérimentales, incluant la détermination de leurs capacités de dégradation ainsi que leur diversité bactérienne et génétique. Le but étant de tenter de mettre en relation les capacités de dégradation de ces enrichissements avec leur composition phylogénétique.

Dans un premier temps, des cinétiques de dégradation pour les enrichissements sur ETBE et sur MTBE ont été réalisées, puis nous avons déterminé leurs capacités vis-à-vis de composés tels que les BTEXs et les *n*-alcanes (octane et hexadécane).

Les études de cinétiques de dégradation montrent que la dégradation de l'ETBE et du MTBE est lente et peu efficace, confirmant ainsi la mauvaise biodégradabilité déjà connue du MTBE, et montrant que le cas de l'ETBE est assez similaire à cet égard. Nous avons pu souligner deux points importants pour la dégradation de ces composés, qui sont (i) le faible rendement en biomasse sur MTBE ou ETBE des enrichissements obtenus, et (ii) la production de TBA dans le milieu de dégradation dans certains cas.

Outre les capacités de dégradation de l'ETBE et/ou du MTBE, il ressort que chaque enrichissement possède des capacités de dégradation différentes des BTEXs et des *n*-alcanes qui sont très variables. Alors que les enrichissements FR5 (obtenus sur ETBE ou MTBE) dégradent tous les composés testés, à l'opposé, l'enrichissement US2-MTBE ne dispose que d'un faible spectre de dégradation. Dans deux autres cas où il a été possible d'obtenir des enrichissements à la fois sur ETBE et sur MTBE, BE1 et GE1, des différences notables de capacités ont été observées, mettant ainsi en avant l'impact de deux substrats d'enrichissement de structures chimiques pourtant extrêmement proches, ne variant que par un groupement $-CH_2$.

Dans plusieurs cas (10 enrichissements sur 11), nous avons observé une dégradation du benzène, le composé natif des essences qui est le plus soluble dans l'eau et qui est un cancérigène reconnu, par la microflore sélectionnée sur ETBE (totalement dans 4/5 cas et partiellement dans le dernier cas) ou sur MTBE (totalement dans 3/6 cas, partiellement dans 2/6 cas et pas du tout dans le dernier cas).

Ces différences de capacités de dégradation ne peuvent s'expliquer que par des compositions phylogénétiques différentes pour chaque enrichissement. Plusieurs approches ont donc été employées afin de connaître les communautés bactériennes au sein de ces enrichissements, mais également, d'étudier la présence et l'expression de gènes de dégradation connus.

Pour caractériser les enrichissements étudiés, certains micro-organismes ont été isolés. Une fois ces souches isolées, la croissance de chacune d'elles sur ETBE, MTBE ou TBA a été étudiée. Au final, plusieurs souches notables ont pu être mises en évidence. *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043 (dégradant l'ETBE jusqu'au TBA), une *Betaproteobacteria* IFP 2047 (dégradant complètement l'ETBE), *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 (dégradant le TBA), *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 (dégradant l'ETBE et le MTBE complètement, ainsi que le THF, un autre éther), *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 (dégradant complètement le MTBE), et une *Proteobacteria* IFP 2052 (dégradant complètement le MTBE). Les souches IFP 2050 et IFP 2051 ont fait l'objet de

deux brevets pour leur utilisation sur des sites pollués par les éthers-carburants. *Rhodococcus* sp. IFP 2042 et *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049, isolées à partir de l'enrichissement US6-ETBE, ont fait l'objet d'un article du fait de leur commensalisme pour la dégradation de l'ETBE. Les résultats des isolements montrent la prédominance de souches de *Rhodococcus* dans la dégradation de l'ETBE (en TBA) et le rôle des *Proteobacteria* dans la dégradation du MTBE.

Concernant l'analyse phylogénétique, l'utilisation de la technique RISA nous a tout d'abord permis d'avoir une première idée des différences de communautés bactériennes au sein des enrichissements étudiés. D'après cette analyse, il ressort clairement que la composition bactérienne des enrichissements obtenus sur ETBE est différente des communautés bactériennes au sein des enrichissements MTBE et TBA.

Ces différences de communautés entre nos enrichissements ont été confirmées grâce à l'utilisation de la technique DGGE. En effet, nous avons observé pour chaque enrichissement, des profils de migration spécifiques, reflétant des différences dans leur biodiversité. En comparant les profils obtenus dans les cas où l'enrichissement a pu être réalisé sur MTBE et sur ETBE, nous avons montré que la nature du substrat d'enrichissement avait un impact conséquent sur la composition de la flore en liaison avec les différences de capacités de dégradations observées précédemment. De même, la présence notable de bactéries appartenant au phylum *Actinobacteria* a été montrée dans les enrichissements obtenus sur ETBE en relation avec les isolements de souches effectués.

Les enrichissements sur ETBE en particulier ont fait l'objet d'une étude plus approfondie, avec réalisation de banques de clones de leur gène codant l'ARNr 16S. L'étude de ces résultats a permis là également de démontrer dans chaque cas une diversité bactérienne importante. Ainsi, il est intéressant de constater que les enrichissements BE1-, GE1- et US6-ETBE contenaient une majorité de *Proteobacteria*, tandis que les enrichissements FR3- et FR5-ETBE, quant à eux, étaient constitués de communautés nettement différentes (majorité d'*Acidobacteria* et d'*Actinobacteria* pour FR3-ETBE, et diversité plus importante pour FR5-ETBE, avec notamment une majorité de bactéries appartenant aux phyla *Chlorobi*, *Gemmatimonadetes*, et *Actinobacteria*, dont une majorité de *Pseudonocardia*).

Une recherche des souches dégradantes auparavant isolées a été réalisée par qPCR, et a permis d'appuyer les résultats observés précédemment, en soulignant par exemple l'implication probable des souches de *Rhodococcus* dans la dégradation par l'enrichissement BE1-ETBE, ou encore l'importance particulière des souches de type *Bradyrhizobium* dans la dégradation du TBA dans l'enrichissement US6-ETBE. Dans ce cas précis, le TBA provient de la dégradation de l'ETBE par *Rhodococcus* sp. 2042 (Le Digabel et al., 2013), pourtant faiblement représenté d'après les résultats de qPCR et d'après la banque de clones (1 % des clones séquencés), ce que nous expliquons par la faible croissance mesurée sur ETBE.

Il est intéressant de souligner la complémentarité des différentes techniques employées lors de ce travail afin d'étudier et de caractériser les microflores présentes. Chacune présente ses propres avantages ainsi que ses inconvénients.

Ainsi, la RISA est extrêmement rapide et simple à mettre en place, et permet d'avoir une première idée des différences de compositions bactériennes dans chaque échantillon. Néanmoins, la technique ne permet pas de caractériser les flores présentes.

La DGGE, quant à elle, est un outil efficace pour comparer des échantillons et faire un suivi au cours du temps afin de visualiser l'évolution de la composition des microflores. Celles-ci sont, en outre,

partiellement caractérisées, du fait du séquençage possible des bandes d'ADN observées sur gel. Toutefois, cette technique comporte une partie mise au point expérimentale parfois délicate, notamment concernant le choix du gradient de dénaturation ce qui peut avoir un impact sur la reproductibilité du résultat obtenu. De plus, la caractérisation des microflores n'est pas d'une précision élevée du fait que la séquence d'ADN analysée est partielle (environ 400 bp, selon les couples d'amorces), et ne permet donc pas une identification précise des différentes bactéries présentes. Enfin, la technique est qualifiée comme étant seulement semi-quantitative (quantification possible selon l'intensité des bandes), elle ne permet donc pas d'avoir une idée précise et fiable de la répartition des microflores dans un échantillon à cause de différents biais (amplifications PCR préférentielles, gradient, etc...). Il reste néanmoins que c'est la seule technique d'empreinte moléculaire permettant un séquençage de l'ADN après migration.

L'approche employée par la réalisation d'une banque de clones permet d'obtenir une caractérisation bien plus complète et précise des microflores étant donné l'obtention des séquences complètes des gènes codant l'ARNr 16S au sein de chaque échantillon. De plus, il est possible d'avoir une idée de la répartition de ces flores et donc, de visualiser celles qui sont majoritaires. Toutefois, cette approche plus longue et fastidieuse à mettre en place, comporte tout de même un caractère aléatoire lié au repiquage des clones avant envoi au séquençage.

Ainsi, chaque approche apporte un lot d'informations différentes et complémentaires, et la complémentarité des informations que chacune fournit permet d'avoir une meilleure connaissance des microflores impliquées dans la biodégradation des éthers-carburants.

L'étude et la recherche des gènes impliqués dans la dégradation de l'ETBE, du MTBE et du TBA déjà connus a également permis d'apporter des éléments de réponse quant aux capacités de dégradation de nos enrichissements ou des souches isolées. Ainsi, les gènes *ethB*, *ethR*, *mdpA*, *alkB* et *pdo/mdpJ* ont été retrouvés dans plusieurs cas et étaient très conservés par rapport aux séquences génétiques de référence. Ce point confirme que la recherche de ces gènes est importante à réaliser dans les cas de pollution. Il est intéressant de constater que dans certains cas, comme pour les enrichissements BE1 ou FR5, obtenus sur ETBE et sur MTBE, les gènes retrouvés n'étaient pas les mêmes (pour BE1, *pdo/mdpJ* retrouvé uniquement sur MTBE ; pour FR5: *pdo/mdpJ* retrouvé uniquement sur ETBE), et mettaient là encore en avant une différence de communautés bactériennes avec des voies métaboliques différentes. Par ailleurs, puisqu'aucun des gènes recherchés n'a été retrouvé dans certains cas, cela montre également qu'il y a soit (i) des gènes assez distants des gènes étudiés soit (ii) des gènes différents qui sont impliqués dans les voies de biodégradation de l'ETBE aussi bien que du MTBE. En particulier, les gènes codant pour les enzymes de type "oxygénase" connues comme étant responsables de l'attaque initiale de l'ETBE aussi bien que du MTBE n'ont pas été détectées chez FR3-ETBE, FR5-ETBE, FR5-MTBE, FR6-MTBE et BE1-MTBE. Enfin, la partie de l'étude concernant l'expression des gènes retrouvés dans les souches dégradeuses isolées ne nous permet pas de conclure en l'état actuel des recherches, notamment à cause des faibles biomasses obtenues et surtout, des faibles rendements d'extractions d'ARN. En l'état, il n'est pas possible de conclure sur l'induction ou l'expression constitutive des gènes retrouvés et étudiés durant la dégradation de l'ETBE ou du MTBE, et des expérimentations supplémentaires doivent être réalisées afin de confirmer les premières séries de résultats obtenus.

Même si les points évoqués précédemment ont permis d'apporter de nombreux éléments de réponse quant à la problématique initiale de cette thèse, il est évident que le sujet n'est pas épuisé et que de nouvelles recherches apporteront d'autres informations.

Tout d'abord, concernant l'isolement des souches, l'analyse des différentes communautés, notamment grâce aux banques de clones, a permis de montrer la présence de souches ou de phyla majoritaires mais qu'il n'a pas été possible d'isoler dans les conditions de notre étude. Il serait dès lors intéressant de tester d'autres milieux de culture et conditions de croissances très spécifiques de certaines catégories de bactéries (ex: les *Acidobacteria* sur FR3-ETBE, les *Gammaproteobacteria* sur BE1-, GE1- et US6-ETBE, etc...). Par ailleurs, il est possible d'effectuer simultanément l'identification des micro-organismes dégradeurs ainsi que leur caractérisation fonctionnelle dans une population par des techniques de marquage cellulaire de type NanoSIMS, des expérimentations dans ce sens sont prévues dans le cadre du projet MiOxyFun.

D'autre part, *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 a montré des capacités de dégradation larges et particulièrement intéressantes (ETBE, MTBE, TBA, THF, toluène, octane), bien que seuls des gènes de l'opéron *thm* aient pu être détectés par PCR. Il faudrait donc poursuivre l'étude de cette souche, avec notamment d'autres tests (préférences de substrat, conditions optimales de croissance, etc...), mais également, en essayant de voir si les gènes de l'opéron *thm* (par exemple *thmB*) sont impliqués dans la dégradation de l'ETBE ou du MTBE, en effectuant des essais de dégradation de l'ETBE ou du MTBE par des resting cells après croissance sur THF ou, bien sûr, un knock-out d'un gène de cet opéron pour voir si la souche perd sa capacité à utiliser ces substrats.

De plus, la recherche des gènes impliqués dans la dégradation de l'ETBE, du MTBE ou du TBA reste encore incomplète, et souffre de plusieurs biais. En effet, au vu de nos résultats de recherche de gènes, les enzymes impliquées dans les voies métaboliques permettant l'oxydation de ces substrats ne sont probablement pas encore toutes connues. D'autre part, certains gènes connus comme étant impliqués (par exemple le gène *alkB*) peuvent comprendre des séquences en acides nucléiques très variables. De fait, les approches classiques par recherche des gènes par PCR (avec des couples d'amorces spécifiques) ne permettent pas de recouvrir complètement toutes les possibilités. Dans un cas comme celui-ci, et en plus de passer outre différents biais (étape de culture sur milieux solides, amplifications PCR, notamment), une approche métagénomique serait particulièrement indiquée et utile afin d'obtenir une vision nettement plus exhaustive de la diversité bactérienne et génétique au sein de nos enrichissements.

En conclusion, le travail à réaliser reste vaste et la réponse à plusieurs questions posées devant ce type de pollution est encore à trouver. Un point montré lors de cette étude est déterminant quant au devenir de ces composés dans l'environnement : la concentration en micro-organismes dégradeurs va rester faible dans les environnements pollués et ne permettra pas d'obtenir des niveaux d'atténuation naturelle suffisant pour assurer la restauration des sites même si des injections d'oxygène sont effectuées. Bien sûr, plus le niveau de contamination est élevé, plus ce point est critique. Or, certains sites ont montré des concentrations élevées, en particulier site contaminé par l'ETBE en France (ETBE environ 200 mg.L⁻¹). Ceci pourra encore être amplifié par le fait que les enrichissements sont efficaces sur d'autres co-contaminants possibles (BTEXs, *n*-alcanes) qui pourront être dégradés prioritairement entraînant une baisse de l'oxygène disponible. Par ailleurs, la production de TBA observée dans

plusieurs cas de dégradation du MTBE ou de l'ETBE pose le problème de son accumulation dans les aquifères. Enfin, le diagnostic d'un site afin de déterminer si les micro-organismes avec des capacités de dégradation sont présents ou non ne peut, en l'état qu'être partiel car seulement une partie des gènes impliqués dans les voies de biodégradation sont identifiés.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- R. Ahlberg, J.P. Gennart, R.E. Mitchell, E. Schulte-Koerne, M.E. Thomas, H. Vahervuori, H. Vrijhof, C. Watts (2001) An Environmental Risk Assessment of MTBE Use in Europe.
- F.E. Ahmed (2001) Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. *Toxicol Lett.* 123(2-3): 89-113.
- K.B. Akondi, V.V. Akshmi (2013) Emerging trends in genomic approaches for microbial bioprospecting. *OMICS.* 17(2):61-70.
- D. Aslett, J. Haas, M. Hyman (2011) Identification of tertiary butyl alcohol(TBA)-utilizing organisms in BioGAC reactors using ¹³C-DNA stable isotope probing. *Biodegradation.* 22:961-972.
- H.H. Attaway, M.G. Schmidt (2002) Tandem biodegradation of BTEX components by two *Pseudomonas* sp. *Curr. Microbiol.* 54:30-36.
- M. Auffret, D. Labbé, G. Thouand, C.W. Greer, F. Fayolle-Guichard (2009) Degradation of a Mixture of Hydrocarbons, Gasoline, and Diesel Oil Additives by *Rhodococcus Aetherivorans* and *Rhodococcus Wratislaviensis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 75 (24): 7774–7782.
- D.L. Balkwill, J.K. Fredrickson, J.M. Thomas (1989) Vertical and Horizontal Variations in the Physiological Diversity of the Aerobic Chemoheterotrophic Bacterial Microflora in Deep Southeast Coastal Plain Subsurface Sediments. *Appl Environ Microbiol* 55(5): 1058-1065.
- D.L. Balkwill, R.H. Reeves, G.R. Drake, J.Y. Reeves, F.H. Crocker, M.B. King, D.R. Boone (1997) Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol Rev.* 20(3-4): 201-16.
- J. Bartling, J. Esperschütz, B-M. Wilke, M. Schloter (2011) ETBE (ethyl *Tert* Butyl Ether) and TAME (*tert* Amyl Methyl Ether) Affect Microbial Community Structure and Function in Soils. *Journal of Hazardous Materials.* 187 (1-3): 488–494.
- F. Bastida, M. Rosell, A.G. Franchini, J. Seifert, S. Finsterbusch, N. Jehmlich, S. Jechalke, M. von Bergen, H.H. Richnow (2010) Elucidating MTBE Degradation in a Mixed Consortium Using a Multidisciplinary Approach. *FEMS Microbiology Ecology.* 73 (2): 370–384.
- P. Beguin, S. Chauvaux, I. Miras, A. Francois, F. Fayolle, F. Monot (2003) Genes involved in the degradation of ether fuels by bacteria of the *Mycobacterium/Rhodococcus* group. *Oil & Gas Science and Technology-Revue De L Institut Francais Du Petrole.* 58(4): 489-495.
- F. Belpoggi, M. Soffritti, F. Filippini, C. Maltoni (1997) Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of methyl *tert*-butyl ether. *Ann N.Y. Acad Sci.* 837: 77-95.
- M.G. Bird, H.D. Burleigh-Flayer, J.S. Chun, J.F. Douglas, J.J. Kneiss, L.S. Andrews (1997) Oncogenicity studies of inhaled methyl *tertiary*-butyl ether (MTBE) in CD-1 mice and F-344 rats. *J Appl Toxicol.* 17 Suppl 1: S45-55.

- J.A. Bonventre, L.A. White, K.R. Cooper (2012) Craniofacial abnormalities and altered wnt and mmp mRNA expression in zebrafish embryos exposed to gasoline oxygenates ETBE and TAME. *Aquat Toxicol.* 120-121:45-53.
- E. Boyd, D. Cummings, G. Geesey (2007) Mineralogy Influences Structure and Diversity of Bacterial Communities Associated with Geological Substrata in a Pristine Aquifer. *Microbial Ecology.* 54(1): 170-182.
- K.D. Brune, T.S. Bayer (2012) Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Frontiers in microbiology.* doi: 10.3389/fmicb.2012.00203.
- F.H. Chapelle, J.L. Zelibor, D.J. Grimes, L.L. Knobel (1987) Bacteria in deep coastal plain sediments of Maryland: a possible source of CO₂ to groundwater. *Water Resour. Res.* 23: 1625-1632.
- S. Chauvaux, F. Chevalier, C. Le Dantec, F. Fayolle, I. Miras, F. Kunst, P. Beguin (2001) Cloning of a Genetically Unstable Cytochrome P-450 Gene Cluster Involved in Degradation of the Pollutant Ethyl *Tert*-butyl Ether by *Rhodococcus Ruber*. *Journal of Bacteriology* 183 (22): 6551–6557.
- M. Chen (2006) Amended final report of the safety assessment of t-butyl alcohol as used in cosmetics. *Int. J. Toxicol.* 2:1-20.
- J.D. Cirvello, A. Radovsky, J.E. Heath, D.R. Farnell, C. Lindamood, 3rd (1995) Toxicity and carcinogenicity of t-butyl alcohol in rats and mice following chronic exposure in drinking water. *Toxicol Ind Health* 11(2): 151-65.
- I. M. Cozzarelli, A. L. Baehr (2003) Volatile Fuel Hydrocarbons and MTBE in the Environment. In *Treatise on Geochemistry* vol. 9, pp. 433-472, Elsevier Ltd.
- H. Croezen, B. Kampman (2009) The impact of ethanol and ETBE blending on refinery operations and GHG-emissions. *Energy Policy.* 37:5226–38.
- J.E. Darnell, W.F. Doolittle (1986) Speculations on the early course of evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83:1271-1275.
- P. Davoust (2007) *Ressources et concepts en écologie et sciences de l'environnement*, Université de Bretagne-Sud.
- K.J. Daye, C. Groff, A.C. Kirpekar, R. Mazumder (2004) High efficiency degradation of tetrahydrofuran (THF) using a membrane bioreactor: identification of THF-degrading cultures of *Pseudonocardia* sp. strain M1 and *Rhodococcus ruber* isolate M2. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30: 705–714.
- J.M. DeBruyn, L.T. Nixon, M.N. Fawaz, A.M. Johnson, M. Radosevich (2011) Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6295–300.
- S.N. Dedysh (2011) Cultivating uncultured bacteria from northern wetlands: knowledge gained and remaining gaps. *Front Microbiol.* 2:184.

- R.A. Deeb, H.-Y. Hu, J.R. Hanson, K.M. Scow, L. Alvarez-Cohen (2001) Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environ. Sci. Technol.* 35:312-317.
- P. Dennis, E.A. Edwards, S.N. Liss, R. Fulthorpe (2003) Monitoring Gene Expression in Mixed Microbial Communities by Using DNA Microarrays. *Appl Environ Microbiol.* 69:769-778.
- T.Z. DeSantis, E.L. Brodie, J.P. Moberg, I.X. Zubietta, Y.M. Piceno, G.L. Andersen (2007) High-density universal 16S rRNA microarray analysis reveals broader diversity than typical clone library when sampling the environment. *Microb Ecol.* 53 (3): 371-83.
- U. Edwards, T. Rogall, H. Blöcker, M. Emde, E.C. Böttger (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 17:7843-53.
- S.A. Eichorst, C.R. Kuske, T.M. Schmidt (2011) Influence of plant polymers on the distribution and cultivation of bacteria in the phylum *Acidobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:586-96.
- D. Ercolini (2013) High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Appl Environ Microbiol.* 79 (10):3148-55.
- F. Fayolle, J.-P. Vandecasteele, F. Monot (2001) Microbial degradation and fate in the environment of methyl *tert*-butyl ether and related fuel oxygenates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:339-349.
- F. Fayolle-Guichard, J. Durand, M. Cheucle, M. Rosell, R.J. Michelland, J-P. Tracol, F. Le Roux, et al., (2012) Study of an Aquifer Contaminated by Ethyl *Tert*-butyl Ether (ETBE): Site Characterization and On-site Bioremediation. *Journal of Hazardous Materials.* 201-202: 236-243.
- N. Fierer, J.A. Jackson, R. Vilgalys, R.B. Jackson (2005) Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:4117-20.
- G.E. Fogg, E.M. LaBolle, G.S. Weissmann, (1998) Groundwater vulnerability assessment: hydrogeologic perspective and example from Salinas Valley, CA, in *Application of GIS, Remote Sensing, Geostatistical and Solute Transport Modeling to the Assessment of Nonpoint Source Pollution in the Vadose Zone.* AGU Monograph Series. 108: 45-61.
- A. François, H. Mathis, D. Godefroy, P. Piveteau, F. Fayolle, F. Monot (2002) Biodegradation of Methyl *Tert*-butyl Ether and Other Fuel Oxygenates by a New Strain, *Mycobacterium Austroafricanum* IFP 2012. *Applied and Environmental Microbiology.* 68 (6): 2754-2762.
- D.J. Gage (2004) Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *rhizobia* during nodulation of temperate legumes. *Micobiol Mol Biol Rev.* 68:280-300.
- A. Galiana, Y. Prin, B. Mallet, G-M. Gnahoua, M. Poitel, H.G. Diem (1994) Inoculation of *Acacia magnum* with alginate beads containing selected *Bradyrhizobium* strains under field conditions: long-term effect on plant growth and persistence of the introduced strains in soils. *Appl Environ Microbiol.* 60:3974-3980.
- T.J. Gentry, G.S. Wickham, C.W. Schadt, Z. He, J. Zhou (2006) Microarray Applications in Microbial Ecology Research. *Microbiol. Ecol.* 52:159-175.

- D.E. Gomez, P.J.J. Alvarez (2010) Comparing the effects of various fuel alcohols on the natural attenuation of benzene plumes using a general substrate interaction model. *J. Contam. Hydrol.* 113:66-76.
- M. Gouy, S. Guindon, O. Gascuel (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution.* 27 (2): 221–224.
- L. Guibet (1997) Carburants et moteurs : Technologie-Énergie-Environnement. Vol. 1. Editions OPHRYS.
- S. Holopainen, M. Nousiainen, M. Sillanpää (2013) Determination of Fuel Ethers in Water by Membrane Extraction Ion Mobility Spectrometry. *Talanta.* 106:448-53.
- A. Hagiwara, Y. Doi , N. Imai, H. Nakashima, T. Ono, M. Kawabe, et al., (2011) Medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay of ethyl tertiary-butyl ether in rats. *Toxicology.* 289(2-3):160-6.
- J.R. Hanson, C.E. Ackerman, K.M. Scow (1999) Biodegradation of Methyl *Tert*-butyl Ether by a Bacterial Pure Culture. *Applied and Environmental Microbiology.* 65 (11): 4788–4792.
- W.R. Hartley, A.J. Englande Jr., D.J. Harrington (1999) Health risk assessment of groundwater contaminated with methyl *tertiary* butyl ether (MTBE) *Water Science and Technology.* 39(10-11): 305–310.
- P.B. Hatzinger, K. McClay, S. Vainberg, M. Tugusheva, C.W. Condee, R.J. Steffan (2001) Biodegradation of Methyl *tert*-Butyl Ether by a Pure Bacterial Culture. *Applied and Environmental Microbiology.* 67 (12): 5601–5607.
- Z. He, L. Liyou Wu, M.W. Fields, J. Zhou (2005) Use of Microarrays with Different Probe Sizes for Monitoring Gene Expression. *Appl Environ Microbiol.* 71:5154-5162.
- S. Heiss-Blanquet, Y. Benoit, C. Maréchaux, F. Monot (2005) Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *J Appl Microbiol.* 99: 1392-1403.
- G. Hernandez-Perez, F Fayolle, J-P Vandecasteele (2001) Biodegradation of Ethyl *T*-butyl Ether (ETBE), Methyl *T*-butyl Ether (MTBE) and *T*-amyl Methyl Ether (TAME) by *Gordonia Terrae*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 55 (1): 117–121.
- J.Y. Hong, Y.Y. Wang, F.Y. Bondoc, C.S. Yang, M. Lee, W.Q. Huang (1997) Rat olfactory mucosa displays a high activity in metabolizing methyl *tert*-butyl ether and other gasoline ethers. *Fundam Appl Toxicol.* 40 (2): 205-10.
- J.Y. Hong, C.S. Yang, M. Lee, Y.Y. Wang, W.Q. Huang, Y. Tan, C.J. Patten, F.Y. Bondoc (1997) Role of cytochromes P450 in the metabolism of methyl *tert*-butyl ether in human livers. *Arch Toxicol.* 71 (4): 266-9.
- A. J. House, M. R. Hyman (2010) Effects of gasoline compounds on MTBE and TBA cometabolism by *Mycobacterium austroafricanum* JOB5. *Biodegradation.* 21:525-541.

- K.R. Hristova, R. Schmidt, A.Y. Chakicherla, T.C. Legler, J. Wu, P.S. Chain, K.M. Scow, S.R. Kane (2007) Comparative Transcriptome Analysis of *Methylibium Petroleiphilum* PM1 Exposed to the Fuel Oxygenates Methyl *Tert*-butyl Ether and Ethanol. *Appl Environ Microbiol.* 73 (22):7347-57.
- M. Hyman (2012) Biodegradation of Gasoline Ether Oxygenates. *Curr Opin Biotechnol.* 24 (3):443-50.
- P. Jamet (2004) Hydrogéologie. ENSPM. <http://www.ifp-school.com/accueil.asp>.
- S. Jechalke, C. Vogt, N. Reiche, A.G. Franchini, H. Borsdorf, T.R. Neu, H.H. Richnow (2010) Aerated Treatment Pond Technology with Biofilm Promoting Mats for the Bioremediation of Benzene, MTBE and Ammonium Contaminated Groundwater. *Water Res.* 44 (6):1785-96.
- S. Jechalke, M. Rosell, P. Martinez-Lavanchy, P. Pérez-Leiva, T. Rohwerder, C. Vogt, H. Richnow (2011) Linking Low-Level Stable Isotope Fractionation to Expression of the Cytochrome P450 Monooxygenase-Encoding *ethB* Gene for Elucidation of Methyl *tert*-Butyl Ether Biodegradation in Aerated Treatment Pond Systems. *Appl Environ Microbiol* 77: 1086-1096.
- S.R. Kane, A.Y. Chakicherla, P.S.G. Chain, R. Schmidt, M.W. Shin, T.C. Legler, K.M. Scow, F.W. Larimer, S.M. Lucas, P.M. Richardson, K.R. Hristova (2007) Whole-genome analysis of the methyl *tert*-butyl ether-degrading *Beta-Protobacterium Methylibium petroleiphilum* PM1. *J Bacteriol* 189:1931-1945.
- C. Katsuyama, S. Nakaoka, Y. Takeuchi, K. Tago, M. Hayatsu, K. Kato (2009) Complementary cooperation between two syntrophic bacteria in pesticide degradation. *J Theoretic Biol.* 256:644-654.
- M. Keller, K. Zengler (2004) Tapping into microbial diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2 (2): 141-50.
- J. Kölbl-Boelke, E.M. Anders, A. Nehr Korn (1988) Microbial communities in the saturated groundwater environment II: Diversity of bacterial communities in a Pleistocene sand aquifer and their in vitro activities. *Microbial Ecology.* 16 (1): 31-48.
- D. Labbé, R. Margesin, F. Schinner, L.G. Whyte, C.W. Greer (2007) Comparative Phylogenetic Analysis of Microbial Communities in Pristine and Hydrocarbon-contaminated Alpine Soils. *FEMS Microbiology Ecology.* 59 (2): 466–475.
- K. Lautenschlager, C. Hwang, W.T. Liu, N. Boon, O. Köster, H. Vrouwenvelder, T. Egli, F. Hammes (2013) A microbiology-based multi-parametric approach towards assessing biological stability in drinking water distribution networks. *Water Res.* 47 (9):3015-25.
- U. Lechner, D. Brodkorb, R. Geyer, G. Hause, C. Härtig, G. Auling, F. Fayolle-Guichard, P. Piveteau, R.H. Müller, T. Rohwerder (2007) *Aquicola Tertiariicarbonis* Gen. Nov., Sp. Nov., a Tertiary Butyl Moiety-degrading Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 57 (Pt 6): 1295–1303.
- Y. Le Digabel, S. Demanèche, Y. Benoit, T.M. Vogel, F. Fayolle-Guichard (2013) Ethyl *tert*-butyl ether (ETBE) biodegradation by a syntrophic association of *Rhodococcus* sp. IFP 2042 and *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 isolated from a polluted aquifer. *Applied Microbiology and Biotechnology.* DOI 10.2007/s00253-013-4803-3.

- S.H. Lee, H.Jin, H.J. Lee, J.M. Kim, C.O. Jeon (2012) Complete Genome Sequence of the BTEX-degrading Bacterium *Pseudoxanthomonas Spadix* BD-a59. *J Bacteriol.* 194 (2):544.
- T. Li, T-D. Wu, L. Mazéas, L. Toffin, J-L. Guerquin-Kern, G. Leblon, T. Bouchez (2008) Simultaneous analysis of microbial identity and function using NanoSIMS. *Environ. Microbiol.* 10:580-588.
- Z. Liu, N-U. Frigaard, K. Vogl, T. Iino, M. Ohkuma, J. Overmann, et al., (2012) Complete Genome of *Ignavibacterium album*, a Metabolically Versatile, Flagellated, Facultative Anaerobe from the Phylum *Chlorobi*. *Front Microbiol.* 3:185.
- N. Lopes-Ferreira, H. Maciel, H. Mathis, F. Monot, F. Fayolle-Guichard, C..W. Greer (2006) Isolation and Characterization of a New *Mycobacterium Austroafricanum* Strain, IFP 2015, Growing on MTBE. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 70 (3): 358–365.
- N. Lopes-Ferreira, C. Malandain, F. Fayolle-Guichard (2006) Enzymes and genes involved in the aerobic biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE). *Applied Microbiology and Biotechnology.* 72:252–62.
- N. Lopes-Ferreira, D. Labbe, F. Monot, F. Fayolle-Guichard, C.W. Greer (2006) Genes involved in the methyl *tert*-butyl ether (MTBE) metabolic pathway of *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Microbiology.* 152 (5): 1361-74.
- N. Lopes-Ferreira, H. Mathis, D. Labbe, F. Monot, C.W. Greer, F. Fayolle-Guichard (2007) *n*-Alkane assimilation and *tert*-butyl alcohol (TBA) oxidation capacity in *Mycobacterium austroafricanum* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 75 (4):909-19.
- C. Malandain, F. Fayolle-Guichard, T.M. Vogel (2010) Cytochromes P450-mediated Degradation of Fuel Oxygenates by Environmental Isolates. *FEMS Microbiology Ecology.* 72 (2): 289–296.
- J. Malm, A. Kultamaa, R. Leinonen (2003) Regulatory EU Risk Assessment of MTBE. Proceedings of the First European Conference on MTBE, Dresden, Germany.
- E.R. Mancini, A. Steen, G.A. Rausina, D.C. Wong, W.R. Arnold, F.E. Gostomski, T. Davies, J.R. Hockett, W.A. Stubblefield, K.R. Drottar, T.A. Springer, P. Errico (2002) MTBE ambient water quality criteria development: a public/private partnership. *Environ Sci Technol.* 36 (2): 125-9.
- R. Marchal, S. Penet, F. Solano-Serena, J.P. Vandecasteele (2003) Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology-Revue De L Institut Francais Du Petrole.* 58 (4): 441-448.
- E. Martinez-Romero (2009) Coevolution in *Rhizobium*-legume symbiosis? *DNA Cell Biol.* 28:361-370.
- H. Masuda (2009) Identification and characterization of monooxygenase enzymes involved in 1,4-dioxane degradation in *Pseudonocardia* sp. strain ENV478, *Mycobacterium* sp. strain ENV421, and *Nocardia* sp. strain ENV425. PhD: <http://gradworks.umi.com/33/79/3379118.html>.
- J. Maukonen, M. Saarela. (2009) Microbial communities in industrial environment. *Curr. Op. Microbiol.* 12:238-243.

- D.E.C. Mazzeo, C.E. Levy, D. de Franceschi de Angelis, M.A. Marin-Morales (2010) BTEX Biodegradation by Bacteria from Effluents of Petroleum Refinery. 408 (20): 4334–4340.
- D. McGregor (2007) Ethyl *tertiary*-butyl ether: a toxicological review. 37: 287–312.
- I.P. Miskin, P. Farrimond, I.M. Head (1999) Identification of novel bacterial lineages as active members of microbial populations in a freshwater sediment using a rapid RNA extraction procedure and RT-PCR. *Microbiology*. 145:1977-1987.
- R.H. Müller, T. Rohwerder, H. Harms (2008) Degradation of fuel oxygenates and their main intermediates by *Aquincola tertiaricarbonis* L108. *Microbiology* 154: 1414-1421.
- G. Muyzer, E.C. De Waal, A.G. Uitterlinden (1993) Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*. 59:695-700.
- C. H. Nakatsu, K. R. Hristova, S. Hanada, X.-Y. Meng, J. R. Hanson, K. M. Scow, Y. Kamagata (2006) *Methylibium petroleiphilum* PM1 gen. nov., sp. nov., a new methyl *tert*-butyl ether (MTBE) degrading methylotroph belonging to the beta-subclass of the *proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 56:983–989.
- K.M. Nielsen, P.J. Johnsen, D. Bensasson, D. Daffonchio (2007) Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ. Biosafety Res*. 6:37-53.
- J-C. Ogier, V. Lafarge, V. Girard, A. Rault, V. Maladen, A. Gruss, J.-Y. Leveau, A. Delacroix-Buchet (2004) Molecular Fingerprinting of Dairy Microbial Ecosystems by Use of Temporal Temperature and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (9): 5628–5643.
- K. Okamura, A. Kawai, T. Yamada, A. Hiraishi (2011) *Acidipila rosea* gen. nov., sp. nov., an acidophilic chemoorganotrophic bacterium belonging to the phylum *Acidobacteria*. *FEMS Microbiol. Lett*. 317:138–42.
- L.A. O’Sullivan, E. Mahenthalingam (2005) Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*. *Letters in Applied Microbiology*. 41:8–11.
- L. Lo Piccolo, C. De Pasquale, R. Fodale, A.M. Puglia, P. Quatrini (2011) Involvement of an Alkane Hydroxylase System of *Gordonia* sp. Strain SoCg in Degradation of Solid n-Alkanes. *Appl Environ Microbiol*. 77 (4):1204-13.
- P. Piveteau, F. Fayolle, J.-P. Vandecasteele, F. Monot (2001) Biodegradation of Tert -butyl Alcohol and Related Xenobiotics by a Methylotrophic Bacterial Isolate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55 (3): 369–373.
- A. Pospiech, B. Neumann (1995) A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet*. 11 (6):217-8.
- S. Radajewski, P. Ineson, N.R. Parekh, J.C. Murrell (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*. 403:646-649.

- L. Ranjard, E. Brothier, S. Nazaret (2000) Sequencing Bands of Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints for Characterization and Microscale Distribution of Soil Bacterium Populations Responding to Mercury Spiking. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (12): 5334–5339.
- M.S. Rappe, S. J. Giovannoni (2003) The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:369-394.
- E. Rasa, S.W. Chapman, B.A. Bekins, G.E. Fogg, K.M. Scow, D.M. Mackay (2011) Role of back diffusion and biodegradation reactions in sustaining an MTBE/TBA plume in alluvial media. *J Contam Hydrol.* 126:235-247.
- C. Revellin, X. Pinochet, P. Beauclair, G. Catroux (2005) Influence of soil properties and soya bean cropping history on the *Bradyrhizobium japonicum* population in some French soils. *Europ J Soil Sci.* 47:505-510.
- P-G. Rieger, H-M. Meier, M. Gerle, U. Vogt, T. Groth, H-J. Knackmuss (2002) Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *Journal of Biotechnology*. 94:101–123.
- T. Rohwerder, U. Breuer, D. Benndorf, U. Lechner, R.H. Müller (2006) The Alkyl *Tert*-butyl Ether Intermediate 2-hydroxyisobutyrate Is Degraded via a Novel Cobalamin-dependent Mutase Pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (6): 4128–4135.
- M. Rosell, S. Lacorte, D. Barceló (2006) Analysis, occurrence and fate of MTBE in the aquatic environment over the past decade. *Trends in Analytical Chemistry*. 25 (10): 1016-1029.
- M. Rosell, R. Gonzalez-Olmos, T. Rohwerder, K. Rusevova, A. Georgi, F-D. Kopinke, H. Richnow (2012) Critical Evaluation of the 2D-CSIA Scheme for distinguishing fuel oxygenate degradation reaction mechanisms. *Environ Sci Technol.* 46: 4757-4766.
- S. Roy, C.K. Sen (2006) cDNA microarray screening in food safety. *Toxicology*. 221:128-133.
- K.J. Rusterholtz, L.M. Mallory (1994) Density, activity, and diversity of bacteria indigenous to a karstic aquifer. *Microbial Ecology*. 28 (1): 79-99.
- J.L. Sachs, S.W. Kembel, A.H. Lau, E.L. Simms (2009) In Situ phylogenetic structure and diversity of wild *Bradyrhizobium* communities. *Appl Environ Microbiol.* 75:4727-4735.
- M. Sait, K.E.R. Davis, P.H. Janssen (2006) Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1852–7.
- H.B. Sanguin, A. Remenant, J. Dechesne, J. Thioulouse, T.M. Vogel, X. Nesme, Y. Moenne-Loccoz, G.L. Grundmann (2006) Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 72 (6): 4302-12.
- C. E. Schaefer, X. Yang, O. Pelz, D. T. Tsao, S. H. Streger, R. J. Steffan (2010) Aerobic biodegradation of iso-butanol and ethanol and their relative effects on BTEX biodegradation in aquifer materials. *Chemosphere*. 81:1104-1110.

- F. Schäfer, U. Breuer, D. Benndorf, M. von Bergen, H. Harms, R.H. Müller (2007) Growth of *Aquicola tertiarycarbonis* L108 on tert-Butyl Alcohol Leads to the Induction of a Phthalate Dioxygenase-related Protein and its Associated Oxidoreductase Subunit. *Engineering in Life Sciences*. 7: 512-519.
- T.C. Schmidt, M. Schirmer, H. Weiss, S.B. Haderlein (2004) Microbial degradation of methyl tert-butyl ether and tert-butyl alcohol in the subsurface. *J Contam Hydrol*. 70:173-203.
- R.Schmidt, V. Battaglia, K. Scow, S. Kane, K.R. Hristova (2008) Involvement of a Novel Enzyme, MdpA, in Methyl tert-Butyl Ether Degradation in *Methylibium petroleiphilum* PM1. *Appl Environ Microbiol*. 74 (21): 6631–6638.
- J. Schuster, J. Purswani, U. Breuer, C. Pozo, H. Harms, R.H. Müller, T. Rohwerder (2013) Constitutive expression of the cytochrome P450 EthABCD monooxygenase system enables degradation of synthetic dialkyl ethers in *Aquicola tertiarycarbonis* L108. *Appl Environ Microbiol*. 79 (7):2321-7.
- D.W. Selinger, R.M. Saxena, K.J. Cheung, G.M. Church, C. Rosenow (2003) Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res*. 13: 216-223.
- A. Sgambato, I. Iavicoli, B. De Paola, G. Bianchino, A. Boninsegna, A. Bergamaschi, A. Pietroiusti, A. Cittadini (2009) Differential toxic effects of methyl tertiary butyl ether and tert-butanol on rat fibroblasts in vitro. *Toxicol. Indus. Health*. 25:141.
- T. Shih, Y. Rong, T. Harmon, M. Suffet (2004) Evaluation of their impact of fuel hydrocarbons and oxygenates on groundwater resources. *Environ. Sci. Technol*. 38:42-48.
- C.C. Silva, H. Hayden, T. Sawbridge, P. Mele, R.H. Kruger, M.V.N. Rodrigues, G.G.L. Costa, R.O. Vidal, M.P. Sousa, A.P.R. Torres, V.M.J. Santiago, V.M. Oliveira (2012) Phylogenetic and functional diversity of metagenomic libraries of phenol degrading sludge from petroleum refinery wastewater treatment system. *AMB Express*. 2:18.
- C. A. Smith, M. R. Hyman (2010) Oxidation of gasoline oxygenates by closely related non-haem-iron alkane hydroxylases in *Pseudomonas mendocina* KR1 and other *n*-octane-utilizing *Pseudomonas* strains. *Environ Microbiol Rep*. 2 (3):426-32.
- M. Soltani (2004) Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Paris, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. Thèse de doctorat.
- J.T. Staley, A. Konopka (1985) Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol*. 39:321-346.
- S.H. Streger, S. Vainberg, H. Dong, P.B. Hatzinger (2002) Enhancing Transport of *Hydrogenophagaflava* ENV735 for Bioaugmentation of Aquifers Contaminated with Methyl tert-Butyl Ether. *Appl Environ Microbiol*. 68:5571–9.
- W.R. Streit, R.A. Schmitz (2004) Metagenomics-the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*. 7 (5): 492-8.

- B. Thiemer, J.R. Andreesen, T. Schröder (2003) Cloning and characterization of a gene cluster involved in tetrahydrofuran degradation in *Pseudonocardia* sp. strain K1. *Arch Microbiol.* 179 (4):266-77.
- M.J. Torres, E. Bueno, S. Mesa, E.J. Bedmar, M.J. Delgado (2011) Emerging complexity in the denitrification regulatory network of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem Soc Trans.* 39: 284-289.
- A. Turini, G. Amato, V. Longo, P.G. Gervasi (1998) Oxidation of methyl- and ethyl- tertiary-butyl ethers in rat liver microsomes: role of the cytochrome P450 isoforms. *Arch Toxicol.* 72 (4): 207-14.
- Uhlik, O., J. Wald, M. Strejcek, L. Musilova, J. Ridl, M. Hroudova, et al., 2012. Identification of Bacteria Utilizing Biphenyl, Benzoate, and Naphthalene in Long-Term Contaminated. *PLoS One.* 7: e40653.
- A. Urios, F. Fayolle, F. Monot, S. Chauvaux, P. Beguin (2002) Physiological comparison of an ETBE (MTBE)-degrading strain and some derived mutants. Remediation of chlorinated and recalcitrance compounds, Monterey. *PLoS One.* 7 (7): e40653.
- J.B. Van Beilen, F. Mourlane, M.A. Seeger, J. Kovac, Z. Li, T.H. Smits, U. Fritsche, B. Witholt (2003) Cloning of Baeyer-Villiger monooxygenases from *Comamonas*, *Xanthobacter* and *Rhodococcus* using polymerase chain reaction with highly degenerate primers. *Environ Microbiol.* 5 (3): 174-82.
- A. Van Wezel, L. Puijker, C. Vink, A. Versteegh, P. de Voogt (2009) Odour and Flavour Thresholds of Gasoline Additives (MTBE, ETBE and TAME) and Their Occurrence in Dutch Drinking Water Collection Areas. *Chemosphere.* 76 (5):672-6.
- S.Vainberg, K. McClay, H. Masuda, D. Root, C. Condee, G.J. Zylstra, R.J. Steffan (2006) Biodegradation of Ether Pollutants by *Pseudonocardia* sp. Strain ENV478. *Appl Environ Microbiol.* 72 (8):5218–5224.
- X. Wang, M. A. Deshusses (2007) Biotreatment of groundwater contaminated with MTBE: interaction of common environmental co-contaminants. *Biodegradation.* 18:37-50.
- L. Wang, W. Wang, Q. Lai, Z. Shao (2010) Gene diversity of CYP153A and AlkB alkane hydroxylases in oil-degrading bacteria isolated from the Atlantic Ocean. *Environ Microbiol.* 12 (5):1230-42.
- N. Wei, K.T. Finneran (2011) Microbial Community Composition during Anaerobic Mineralization of tert-Butyl Alcohol (TBA) in Fuel-Contaminated Aquifer Material. *Environ Sci Technol.* 45:3012–3018.
- H-Y. Weon, S-H. Yoo, Y-J. Kim, C-M. Lee, B-Y. Kim, Y-A. Jeon, et al., 2009. *Rudaea cellulositytica* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 59 (Pt 9): 2308-12.
- L.G. Whyte, T.H. Smits, D. Labbé, B. Witholt, C.W. Greer, J.B. van Beilen (2002) Gene cloning and characterization of multiple alkane hydroxylase systems in *Rhodococcus* strains Q15 and NRRL B-16531. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5933-42.

G.M. Wilson, G. Brewer (1999) The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 62: 257-291.

J.T. Wilson (2003) Fate and Transport of MTBE and other Gasoline Components. In: *MTBE Remediation Handbook.*(EE Moyer, PT Kostecki, Ed). Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA, USA, 19-61.

C.R. Woese, E. Stackebrandt, T.J. Macke, G.E. Fox (1985) A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Syst Appl Microbiol.* 6: 143-51.

K.F. Yee, A. R. Mohamed, S.H. Tan (2013) A Review on the Evolution of Ethyl *Tert*-butyl Ether (ETBE) and Its Future Prospects: 604–620.

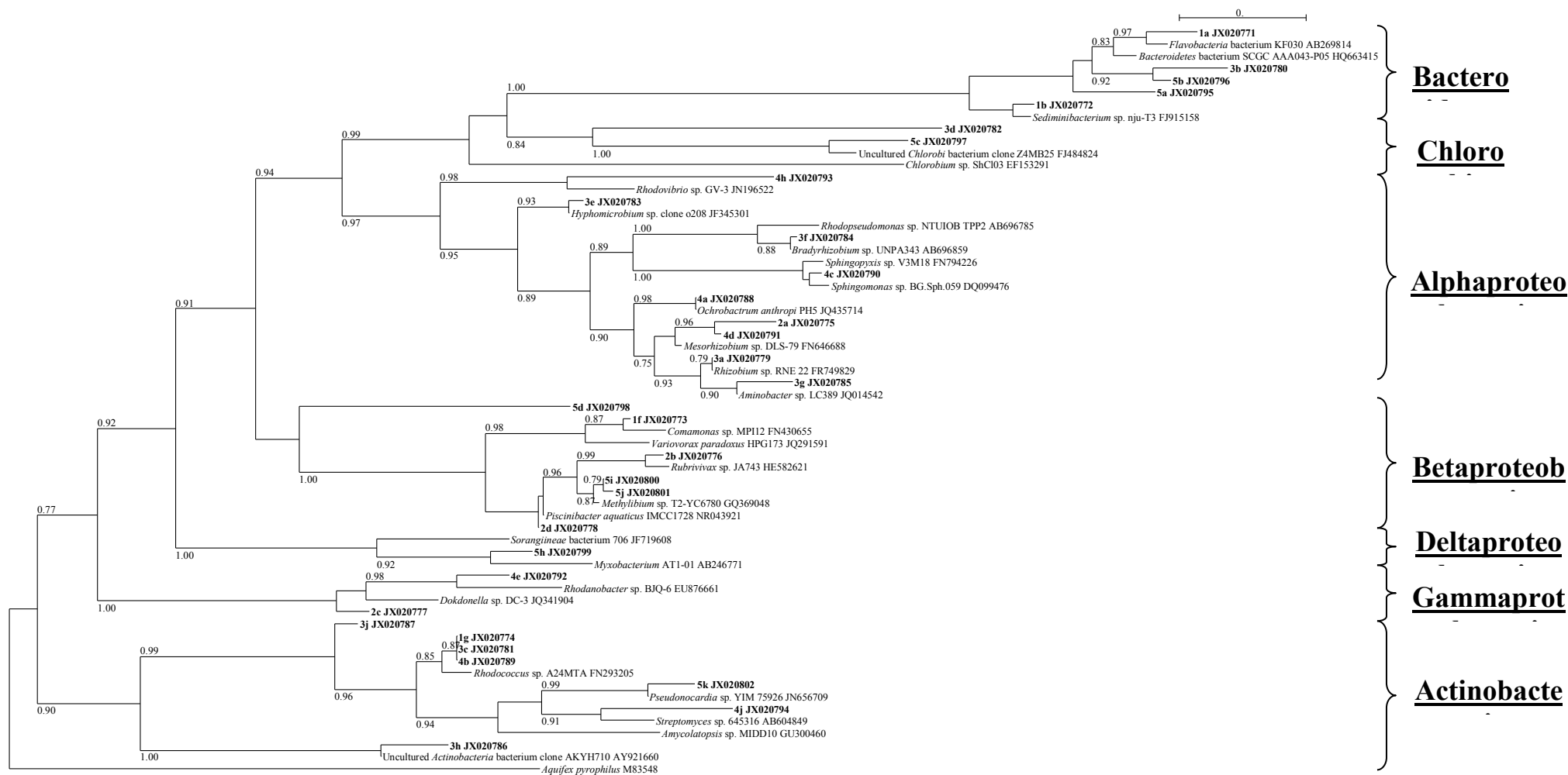
E. Yergeau, S. Sanschagrín, D. Beaumier, C.W. Greer (2012) Metagenomic Analysis of the Bioremediation of Diesel-Contaminated Canadian High Arctic Soils. *PLoS One.* 7 (1):e30058.

G.M. Zaitsev, J.S. Uotila, M.M. Häggblom (2006) Biodegradation of Methyl *Tert*-butyl Ether by Cold-adapted Mixed and Pure Bacterial Cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 74 (5): 1092–1102.

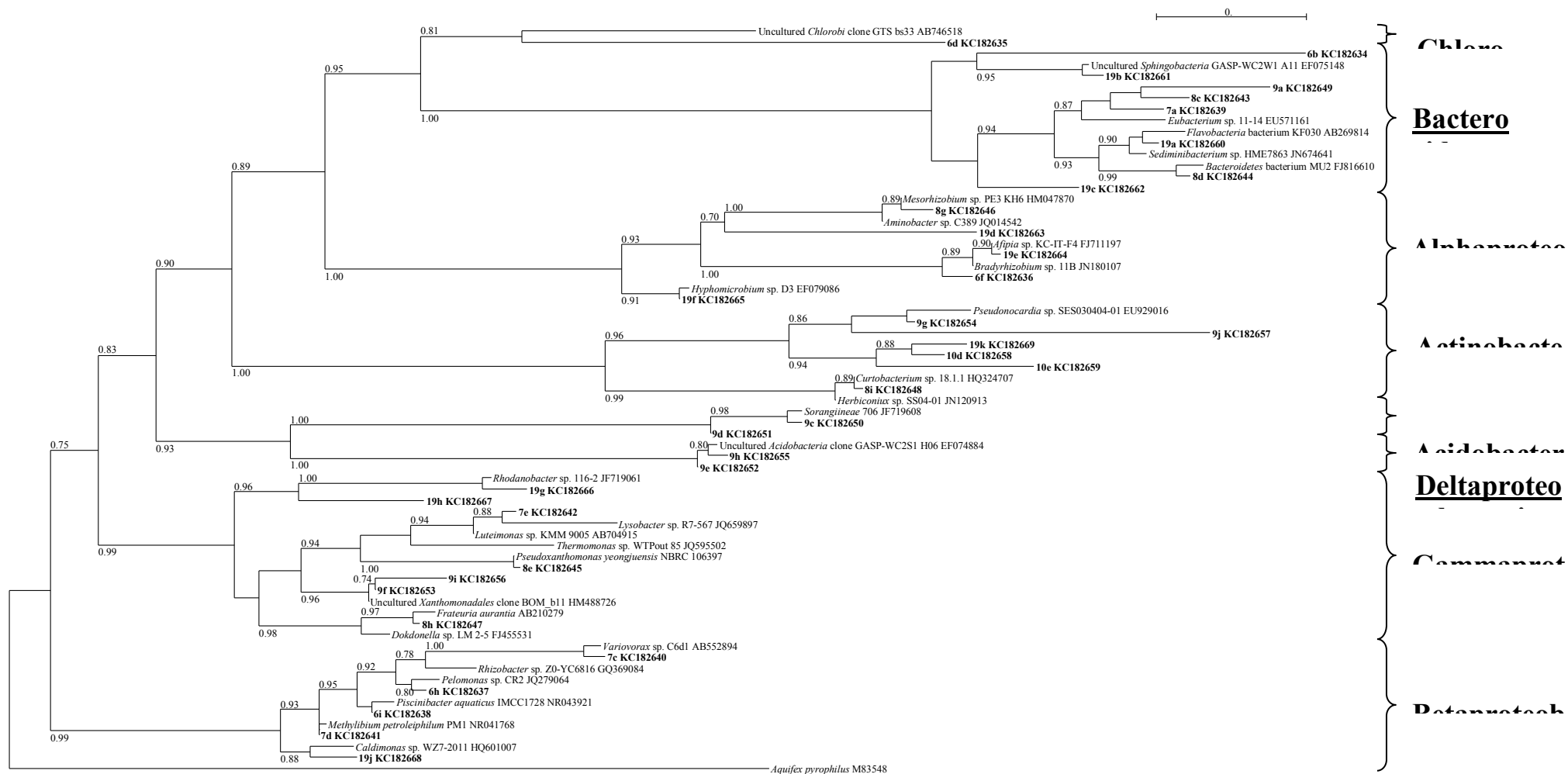
H. Zhang, Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholtz, H. Kim, Y. Kamagata, K. Nakamura (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 53 (Pt 4): 1155-63.

Y.-Y. Zhou, D.-Z. Chen, R.-Y. Zhu, J.-M. Chen (2011) Substrate interactions during the biodegradation of BTEX and THF mixtures by *Pseudomonas oleovorans* DT4. *Biores. Technol.* 102:6644-6649.

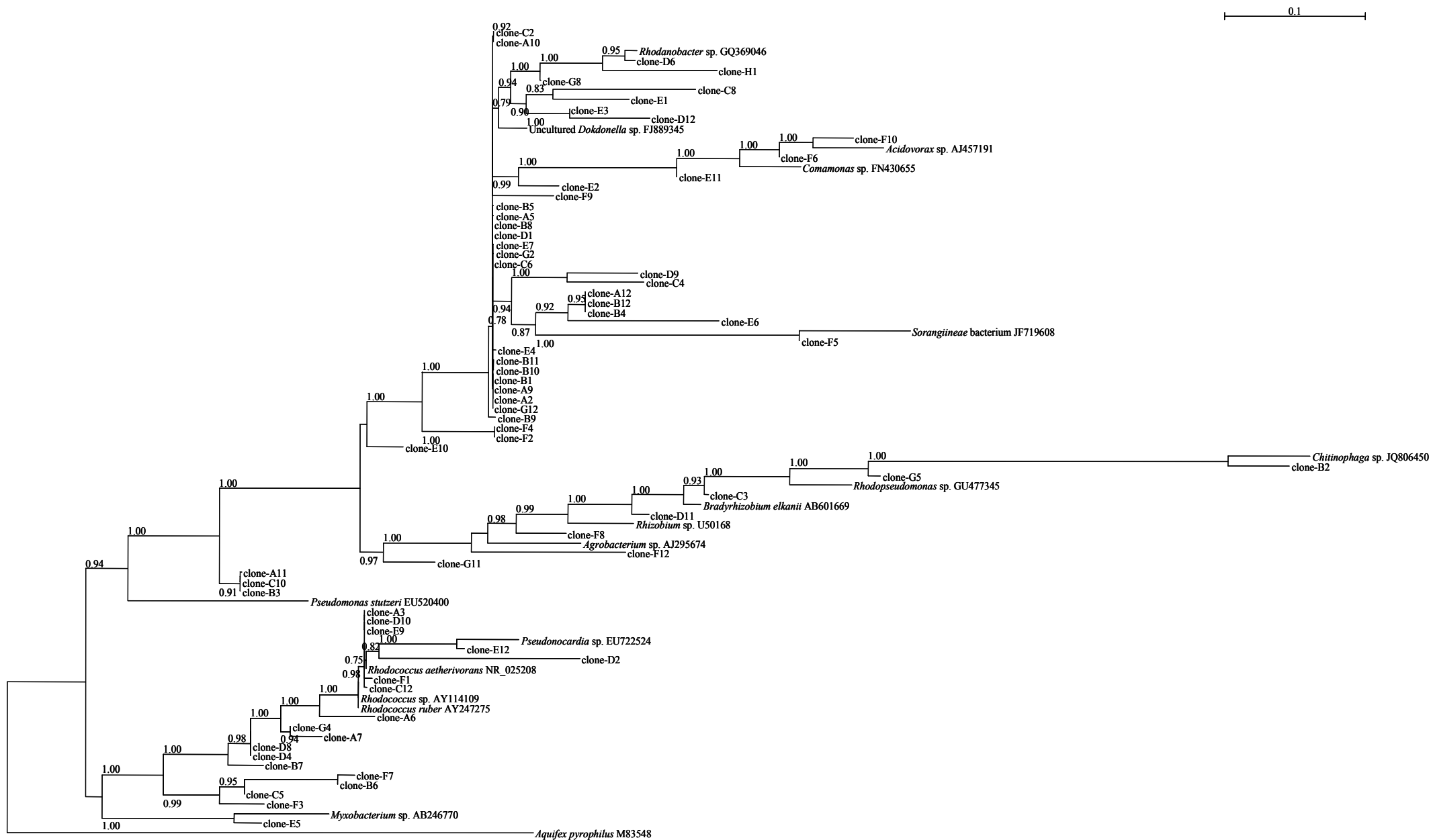
Annexes



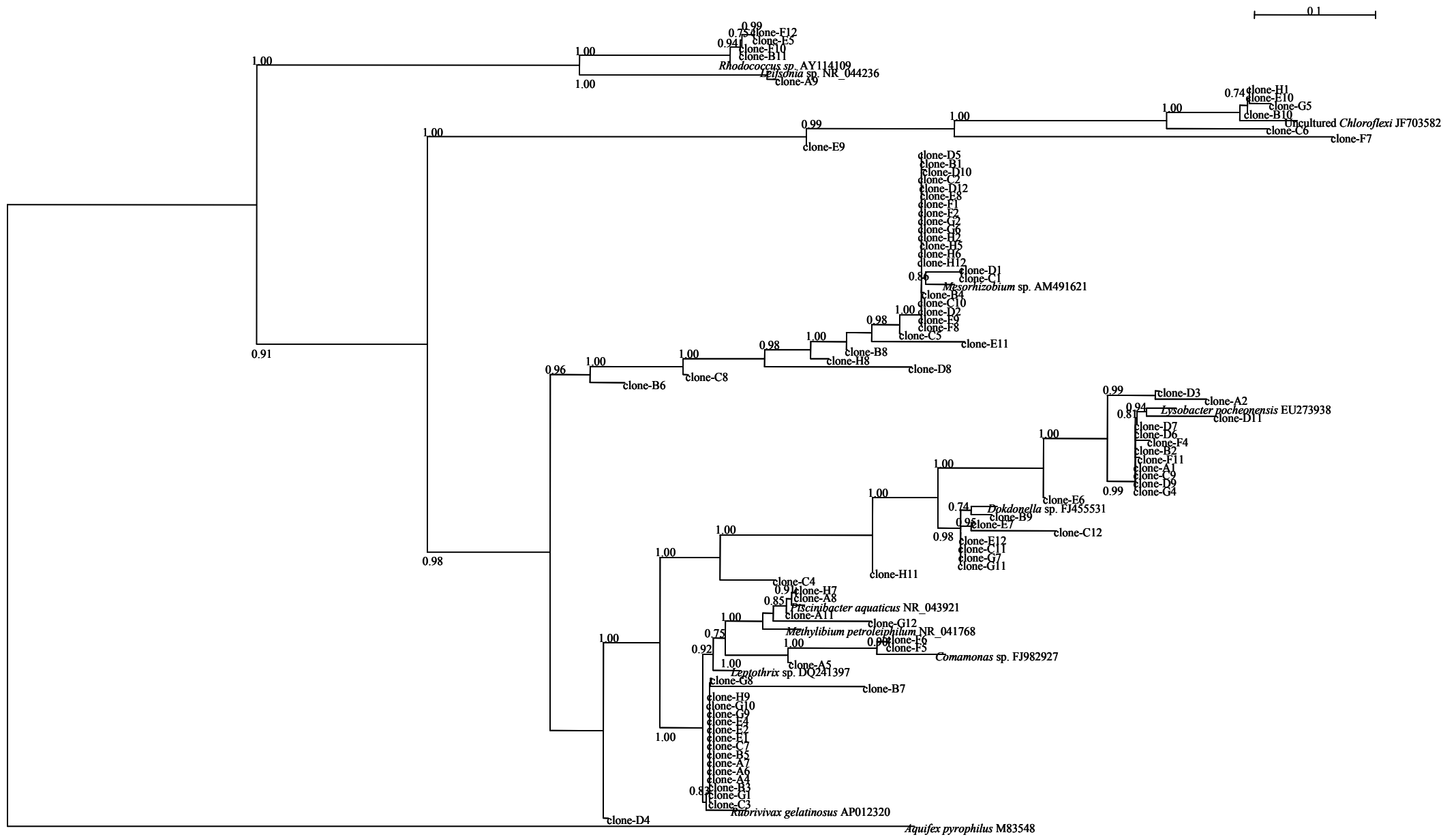
(fait à partir des séquences obtenues en DGGE)
Annexe. A.1. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans les enrichissements ETBE



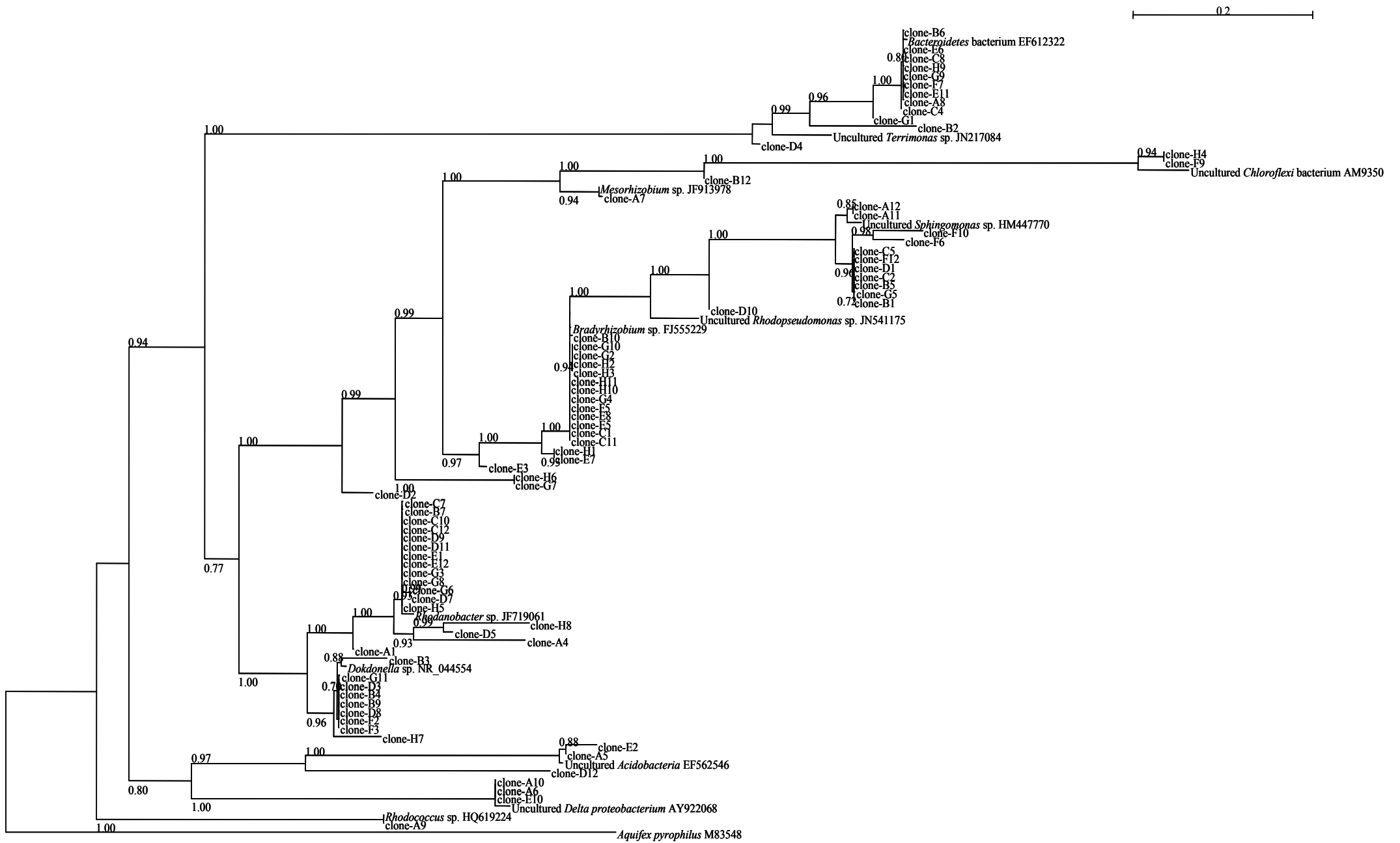
(fait à partir des séquences obtenues en DGGE)
Figure. A.2. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans les enrichissements MTBE



(fait à partir des séquences obtenues avec les banques de clones)
Figure. A.3. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans l'enrichissement BE1-ETBE

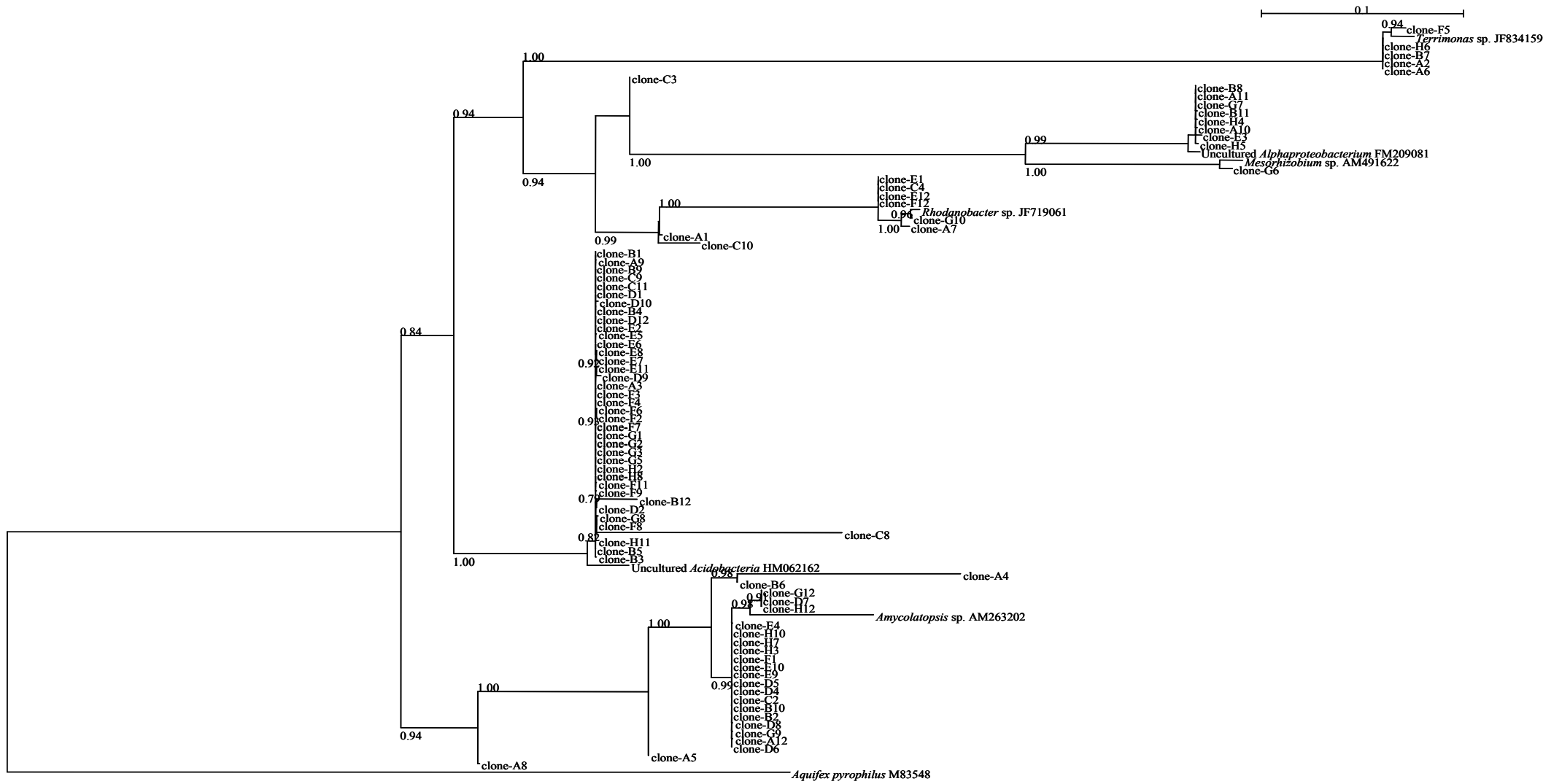


(fait à partir des séquences obtenues avec les banques de clones)
Figure. A.4. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans l'enrichissement GE1-ETBE



(fait à partir des séquences obtenues avec les banques de clones)

Figure. A.5. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans l'enrichissement US6-ETBE



(fait à partir des séquences obtenues avec les banques de clones)
Figure. A.6. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans l'enrichissement FR3-ETBE



(fait à partir des séquences obtenues avec les banques de clones)
Figure. A.7. Arbre phylogénétique des souches retrouvées dans l'enrichissement FR5-ETBE

Résumé

L'éthyl *tert*-butyl éther (ETBE) et le méthyl *tert*-butyl éther (MTBE) sont des éthers carburants utilisés comme additifs dans les essences sans plomb. Du fait de leur utilisation massive, de nombreux cas de pollutions d'aquifères ont été répertoriés, en particulier pour le MTBE, et ces composés représentent donc un risque sanitaire potentiel. Des travaux récents ont permis de mettre en évidence différents micro-organismes capables de dégrader ces composés malgré leur faible biodégradabilité dans l'environnement. Néanmoins, une meilleure compréhension de l'écologie et de la régulation de ces capacités de dégradation permettrait une meilleure gestion de la bioremédiation de sites contaminés par l'ETBE ou le MTBE.

L'objectif de la thèse, réalisée dans le cadre d'un projet ANR Blanc (MiOxyFun), est de mieux comprendre l'écologie des communautés microbiennes impliquées dans la dégradation de ces éthers et leur relation avec la régulation ainsi qu'avec les cinétiques de dégradation de ces composés par des membres spécifiques de ces communautés. Ainsi, à partir de différents échantillons environnementaux venant de sites pollués par l'ETBE ou le MTBE, des enrichissements ont pu être réalisés en laboratoire afin d'étudier leurs microflore. Ces enrichissements ont été étudiés notamment pour leurs cinétiques de dégradation, la composition de leurs communautés bactériennes, et pour l'isolement de souches bactériennes directement impliquées dans la dégradation de ces composés. L'étude des cinétiques de dégradation de l'ETBE ou du MTBE par différents enrichissements obtenus sur ETBE (cinq) et sur MTBE (six) a permis de montrer des profils de dégradation très différents. La dégradation était généralement lente et s'accompagnait d'un faible rendement en biomasse avec parfois accumulation transitoire de *tert*-butanol (TBA). Les capacités de dégradation d'autres composés des essences (BTEXs et *n*-alcane) étaient aussi différentes d'un enrichissement à l'autre, le benzène, entre autres, étant dégradé par 10/11 enrichissements. Des techniques d'empreinte moléculaire (RISA, DGGE) ont permis de constater que les communautés bactériennes présentes dans les cinq enrichissements sur ETBE étaient différentes de celles sur les enrichissements sur MTBE. Les enrichissements sur ETBE ont fait spécifiquement l'objet d'une étude par analyse de banques de clones réalisées à partir des gènes codant l'ARNr 16S de ces enrichissements. Cette étude a montré la prédominance des *Proteobacteria* dans trois enrichissements, la prédominance des *Acidobacteria* dans un autre ainsi qu'une composition plus hétérogène dans le cinquième. De plus, des *Actinobacteria* ont été détectées dans les 5 enrichissements.

En parallèle, plusieurs souches possédant des capacités de dégradation ont été isolées des enrichissements: *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043 (dégradant l'ETBE jusqu'au TBA), une *Betaproteobacteria* IFP 2047 (dégradant l'ETBE), *Bradyrhizobium* sp. IFP 2049 (dégradant le TBA), *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 (dégradant l'ETBE et le MTBE), *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 et une *Proteobacteria* IFP 2052 (dégradant le MTBE). Une étude par qPCR sur les gènes codant l'ARNr 16S a montré la prédominance de certaines souches isolées dans les enrichissements ETBE. Enfin, plusieurs gènes connus comme étant impliqués dans la dégradation des éthers carburants ont pu être mis en évidence dans les enrichissements et dans certaines des souches isolées.

Mots-clés: ETBE (ethyl *tert*-butyl éther), MTBE (méthyl *tert*-butyl éther), enrichissements, biodégradation, écologie microbienne, gènes de dégradation, RISA, DGGE, qPCR, RT-qPCR

Abstract

ETBE and MTBE are fuel oxygenates added to unleaded gasoline to improve combustion. Due to their extensive use, numerous aquifers have been contaminated, particularly by MTBE. The use of ETBE and MTBE is considered to represent an environmental risk. Recent research has uncovered a range of microorganisms capable of degrading these compounds, even though their environmental half-lives are long. Improved understanding of the ecology and regulation of this degradative ability could improve the management of the ETBE and MTBE contaminated site remediation.

The aim of this work, taking place in the framework of the ANR project MiOxyFun was to investigate the ecology of ETBE- and MTBE-degrading microbial communities and their relationship to the regulation and kinetics of ETBE- and MTBE-degradation by specific members of these communities. Several ETBE- and MTBE-degrading microbial communities were enriched in the laboratory from environmental samples from contaminated sites throughout the world. These enrichments were examined for their degradation kinetics, microbial community structure, and used to isolate specific community members actively degrading ETBE and/or MTBE. The ETBE or MTBE biodegradation kinetics of the five ETBE- and six MTBE-degrading enrichments demonstrated a diversity of biodegradation rates. Overall, biodegradation was generally slow and associated to a low biomass yield. *Tert*-butanol (TBA) was transiently produced in several cases. Biodegradation of other gasoline compounds (BTEXs and *n*-alkanes) was tested and varied among the enrichments studied. Benzene, however, was degraded in 10 out of the 11 enrichments. DNA fingerprinting techniques (RISA, DGGE) showed that the microflora present in the five ETBE enrichments were different from those of the MTBE enrichments. The ETBE enrichments were studied further by sequencing the 16S rRNA genes extracted, amplified and cloned from these enrichments. *Proteobacteria* dominated three of the ETBE enrichments, *Acidobacteria* in another one, and a more heterogeneous composition was found in the fifth ETBE enrichment. *Actinobacteria* were detected in all five enrichments.

Several strains with ETBE or MTBE degradation capacities were isolated: *Rhodococcus* sp. IFP 2040, IFP 2041, IFP 2042, IFP 2043 (degrading ETBE to TBA), a *Betaproteobacteria* IFP 2047 (degrading ETBE), *Bradyrhizobium* sp. IFP 2047 (degrading TBA), *Pseudonocardia* sp. IFP 2050 (degrading ETBE and MTBE), *Pseudoxanthomonas* sp. IFP 2051 and a *Proteobacteria* IFP 2052 (degrading MTBE). Quantification of the 16S rRNA gene confirmed the relatively high number of these isolates in some of the ETBE enrichments. Several genes involved in ETBE and/or MTBE biodegradation were detected in some of the enrichments and in some of the isolated strains

Key words: ETBE (ethyl *tert*-butyl ether), MTBE (methyl *tert*-butyl ether), biodegradation capacities, microbial ecology, biodegradation genes, RISA, DGGE, qPCR, RTqPCR