

## 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.

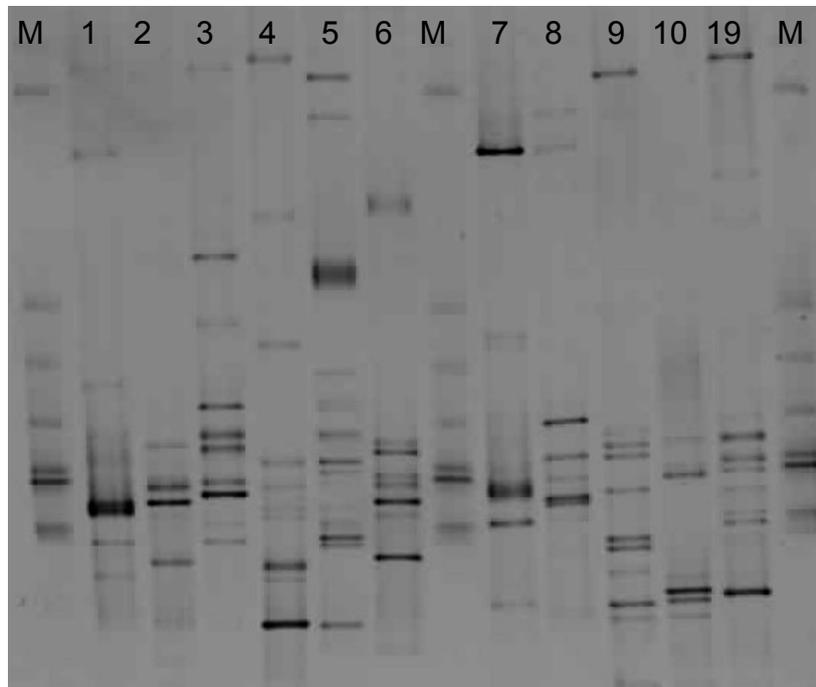


Figure 4.10. DGGE des différents enrichissements obtenus sur ETBE ou sur MTBE  
M: Marqueur; 1: BE1-ETBE; 2: GE1-ETBE; 3: US6-ETBE; 4: FR3-ETBE; 5: FR5-ETBE; 6: GE1-MTBE;  
7: US2-MTBE; 8: US3-MTBE; 9: FR5-MTBE; 10: FR6-MTBE; 19: BE1-MTBE

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.

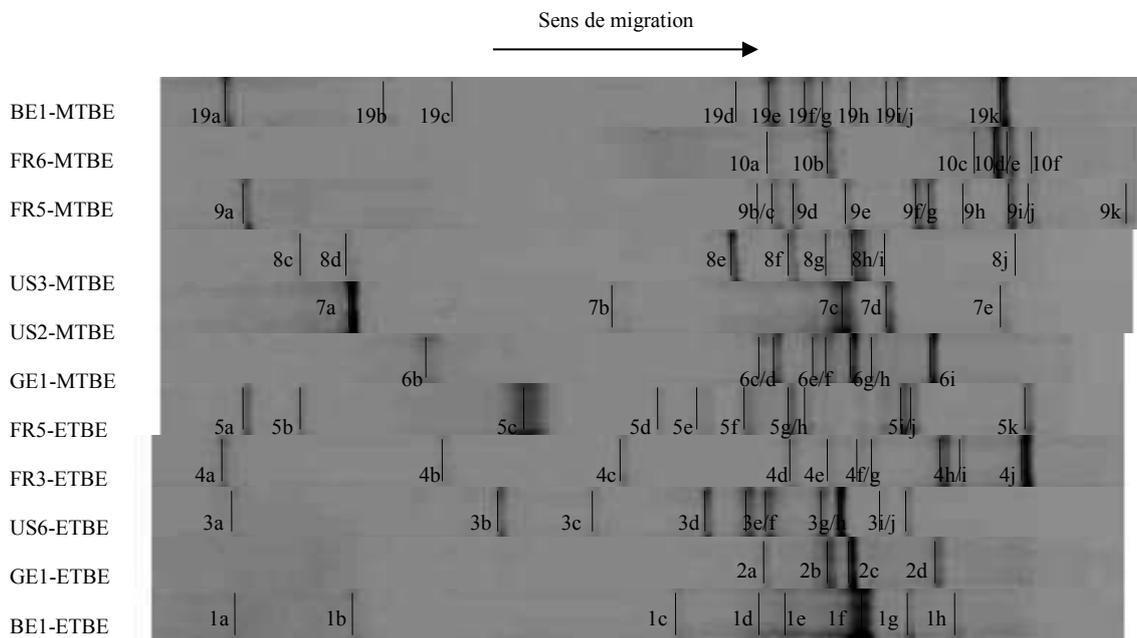


Figure 4.11. Profils de migration DGGE des enrichissements ETBE ou MTBE

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 %] *Hydrothalea*[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 %] Pseudonocardiaceae[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 %] *Actinomycetospira*[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<sup>ème</sup> 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.

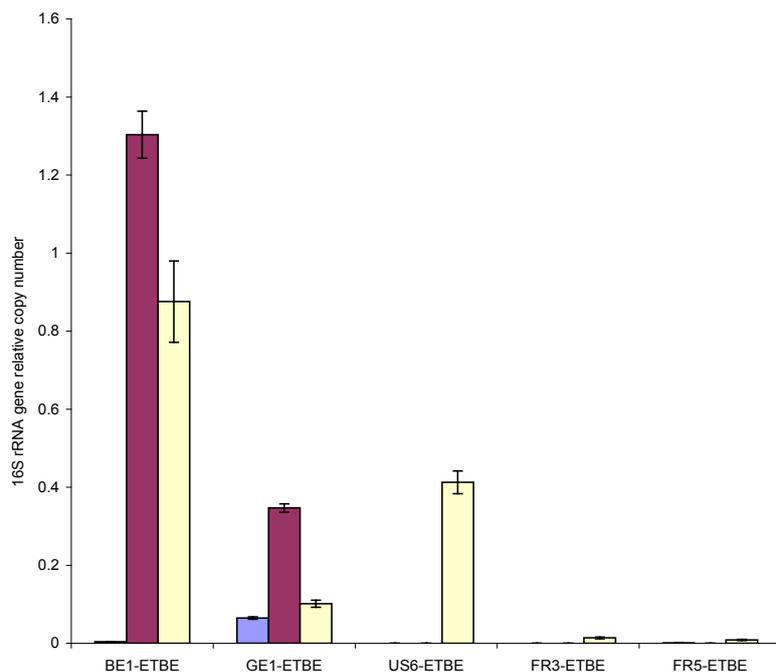


Figure 4.12. Analyse par qPCR des enrichissements sur ETBE

- 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.

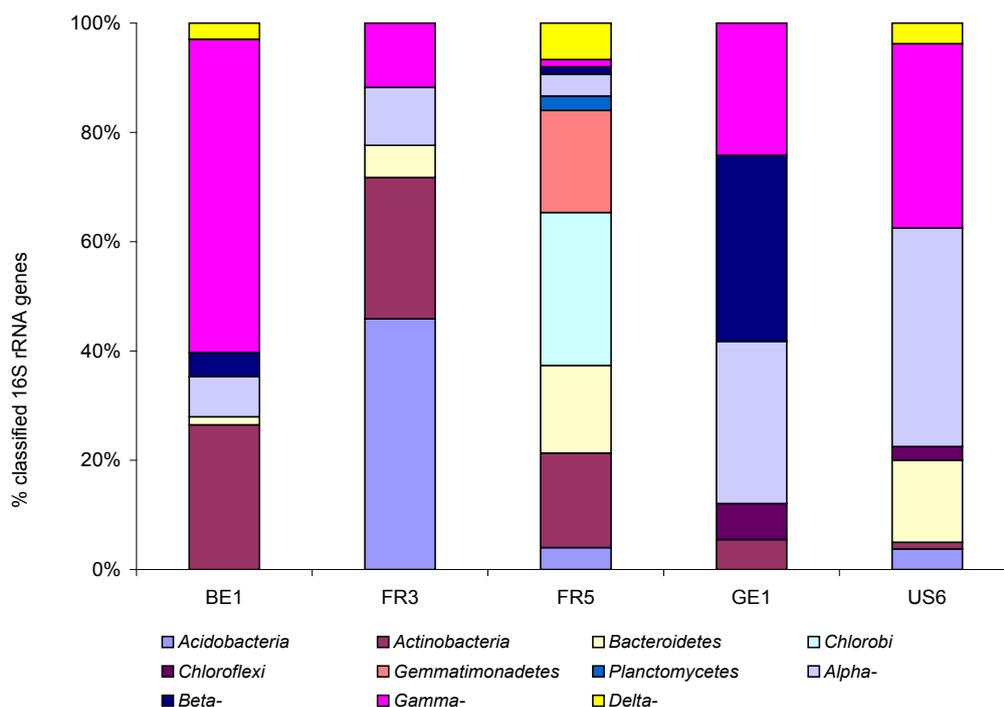


Figure 4.13. Composition des communautés bactériennes des enrichissements ETBE au niveau taxonomique phylum/classe

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.

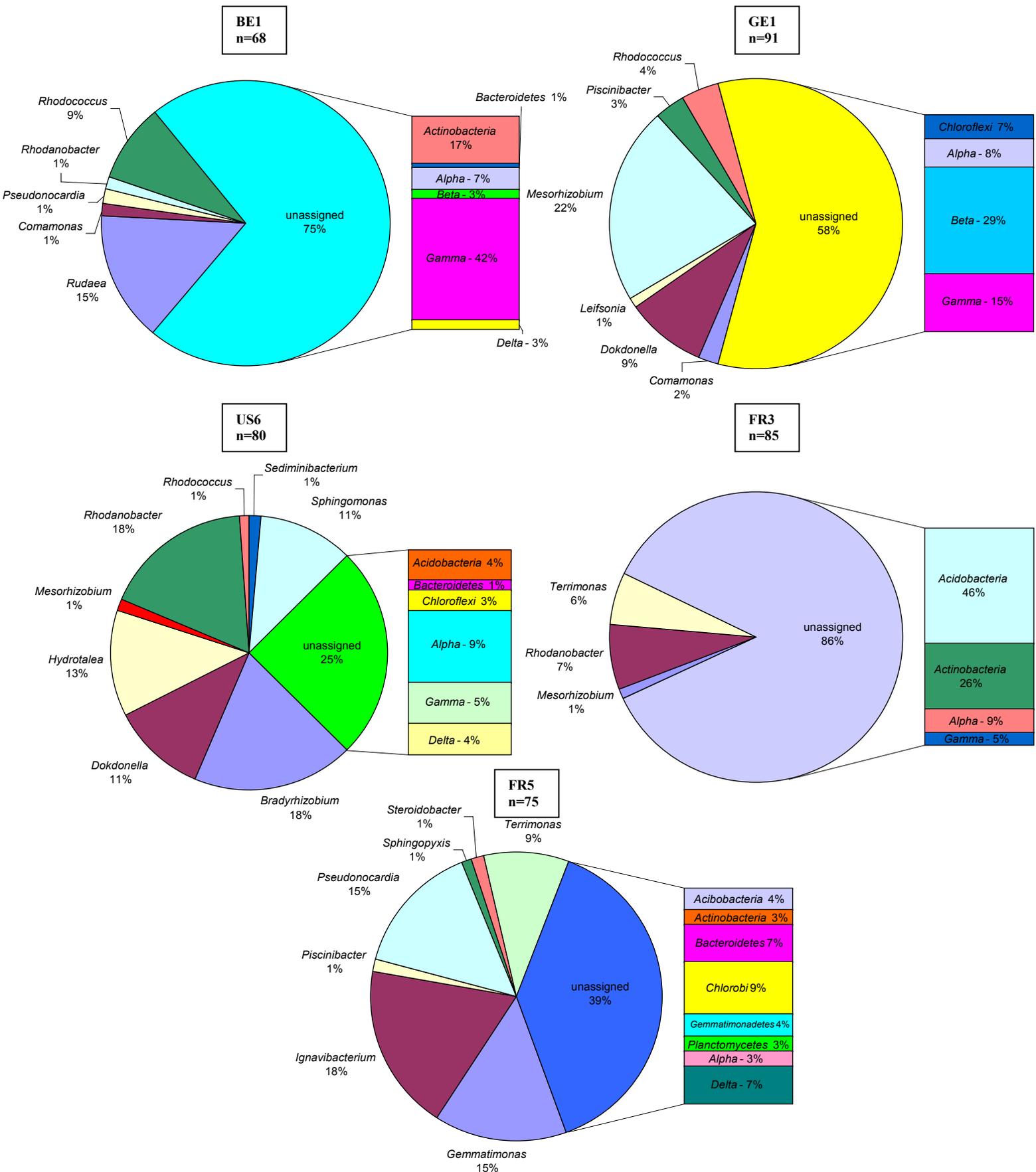


Figure 4.14. Répartitions des séquences gènes codant l'ARNr 16S pour chaque enrichissement

### 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 *Aquicola 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 O<sub>2</sub> de 8 % (v/v, en couple avec de l'hélium) et une concentration en CO<sub>2</sub> 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

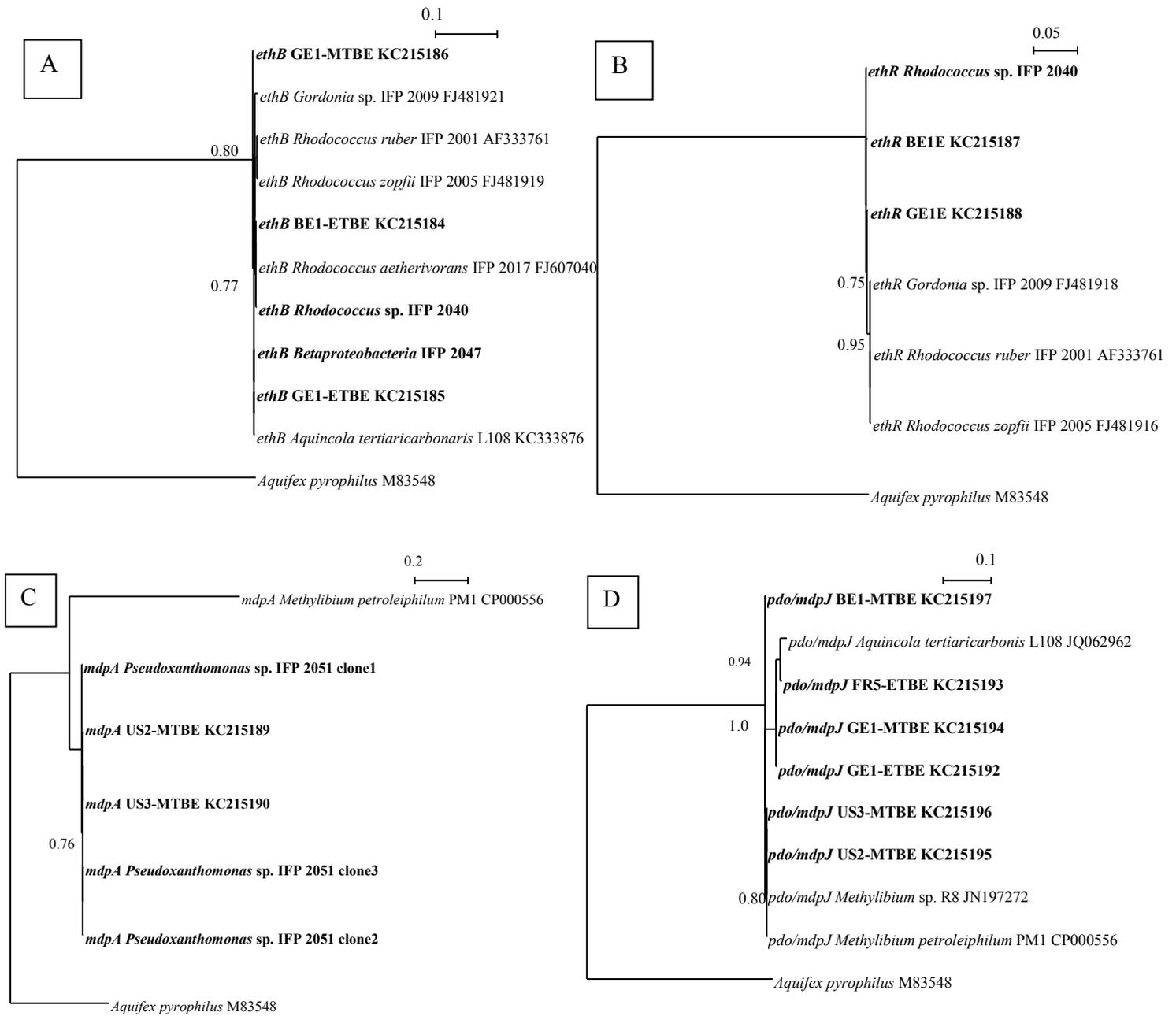


Figure 4.15. Arbres phylogénétiques obtenus pour les gènes de dégradation étudiés  
 A: Arbre du gène *ethB* ; B: Arbre du gène *ethR* ; C: arbre du gène *mdpA* ; D: Arbre du gène *pdo/mdpJ* .

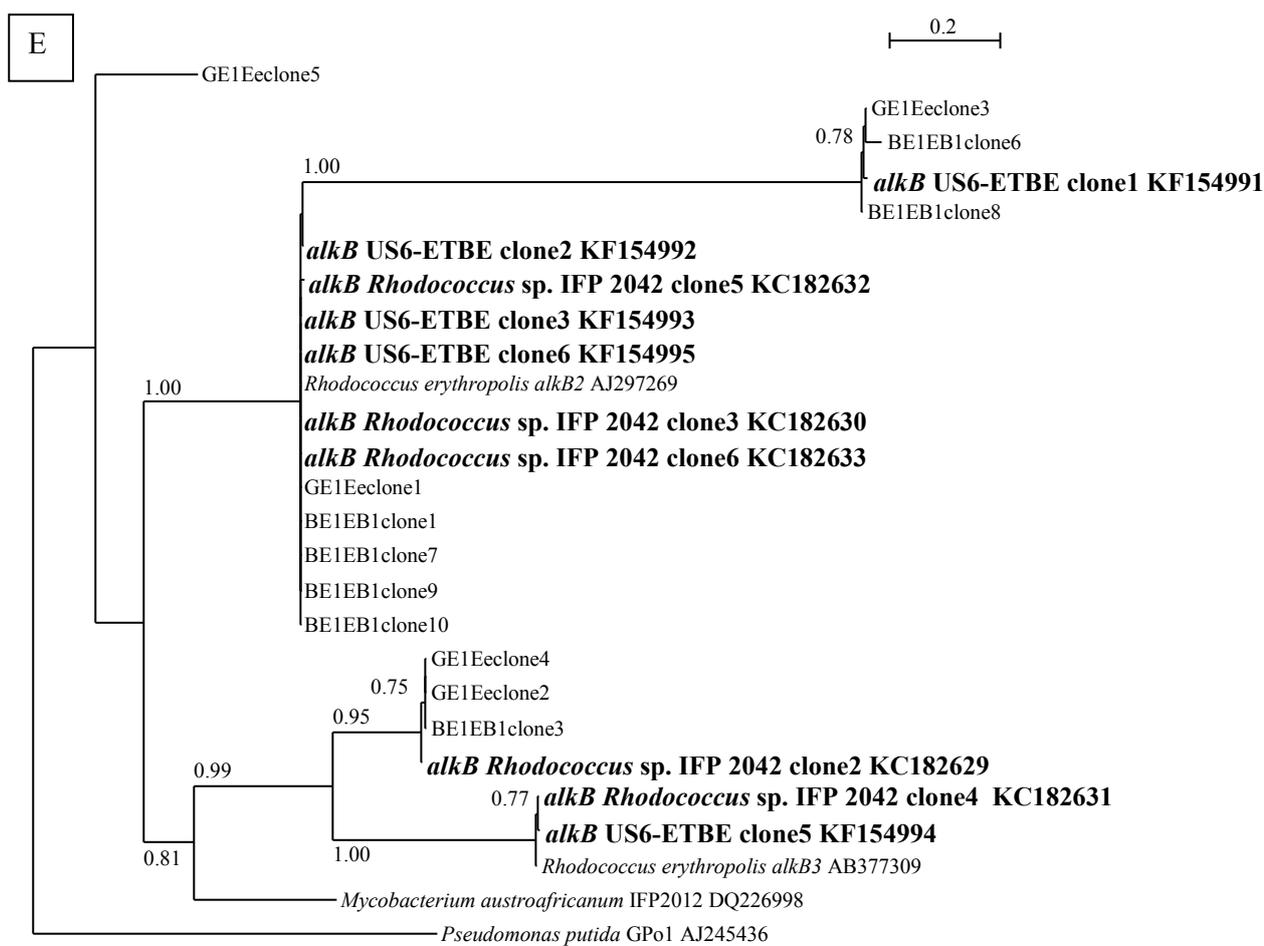


Figure 4.15 (suite). Arbres phylogénétiques obtenus pour les gènes de dégradation étudiés  
E: Arbre du gène *alkB*

#### 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).

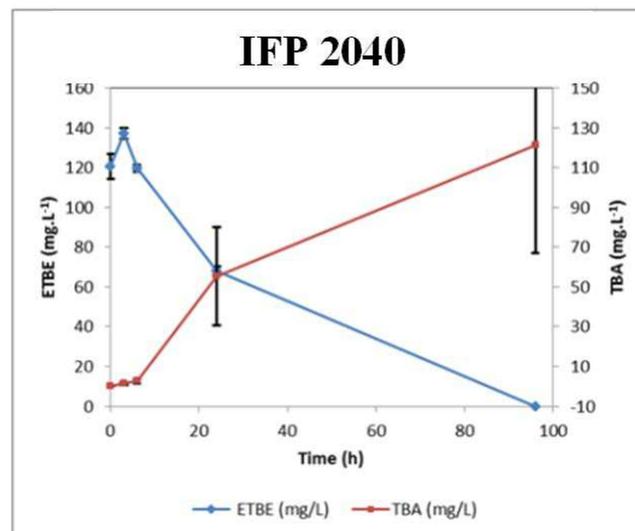


Figure 4.16. Courbe de dégradation de l'ETBE pour *Rhodococcus* sp. IFP 2040

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 <sub>600</sub>	ARN (ng.µL <sup>-1</sup> )	ADN (ng.µL <sup>-1</sup> )
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.

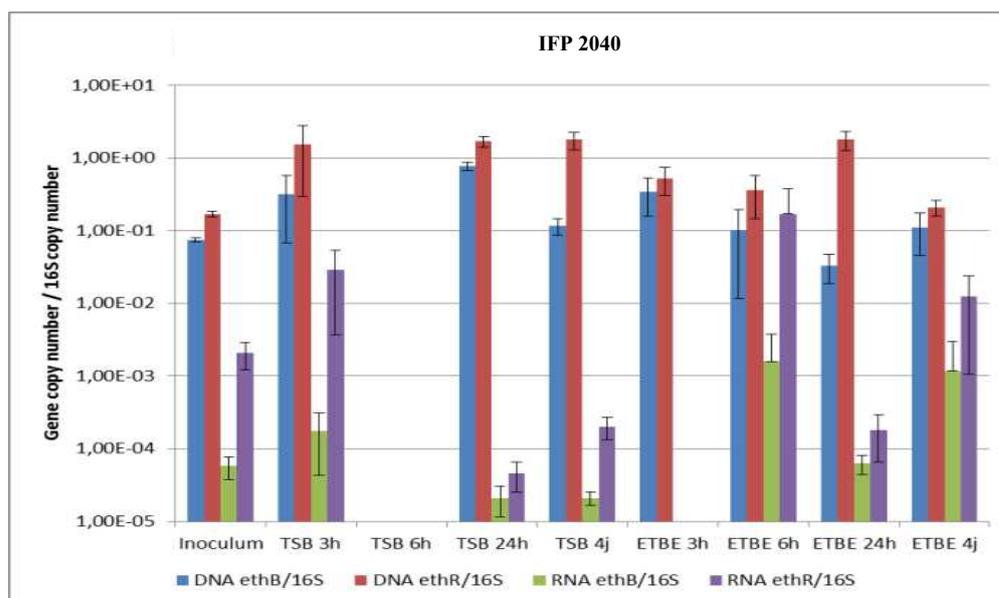


Figure 4.17. Expression des gènes *ethB* et *ethR* chez IFP 2040

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.

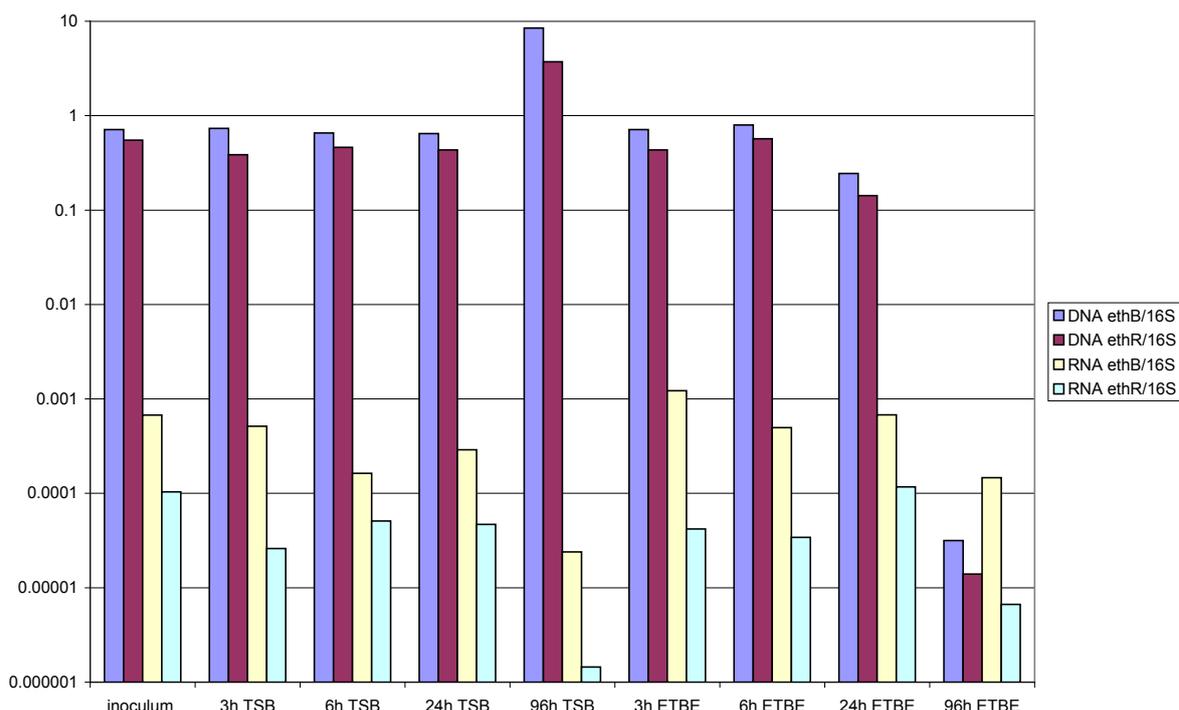


Figure 4.18. Expression des gènes *ethB* et *ethR* chez IFP 2040

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).

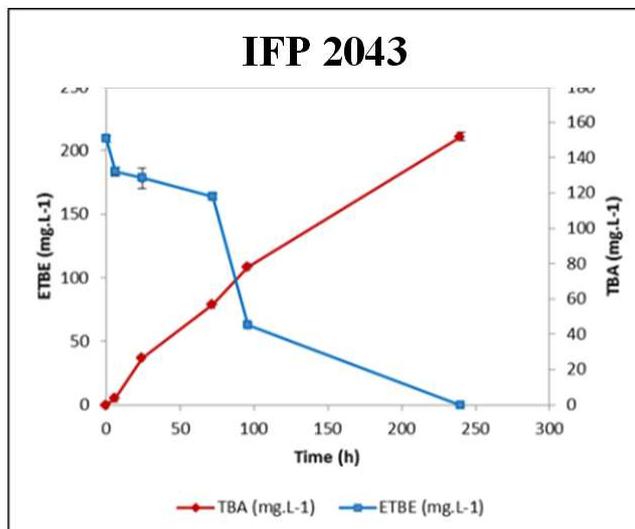


Figure 4.19. Courbe de dégradation de l'ETBE pour *Rhodococcus* sp. IFP 2043

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 <sub>600</sub>	ARN (ng.µL <sup>-1</sup> )	ADN (ng.µL <sup>-1</sup> )
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).

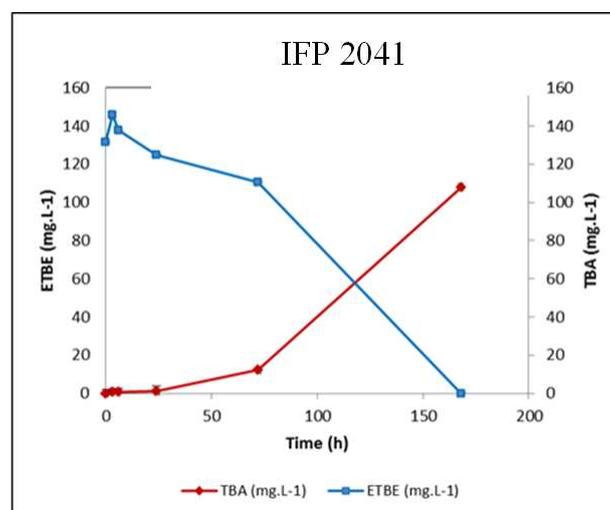


Figure 4.20. Courbe de dégradation de l'ETBE pour *Rhodococcus* sp. IFP 2041

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 <sub>600</sub>	ARN (ng.µL <sup>-1</sup> )	ADN (ng.µL <sup>-1</sup> )
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.

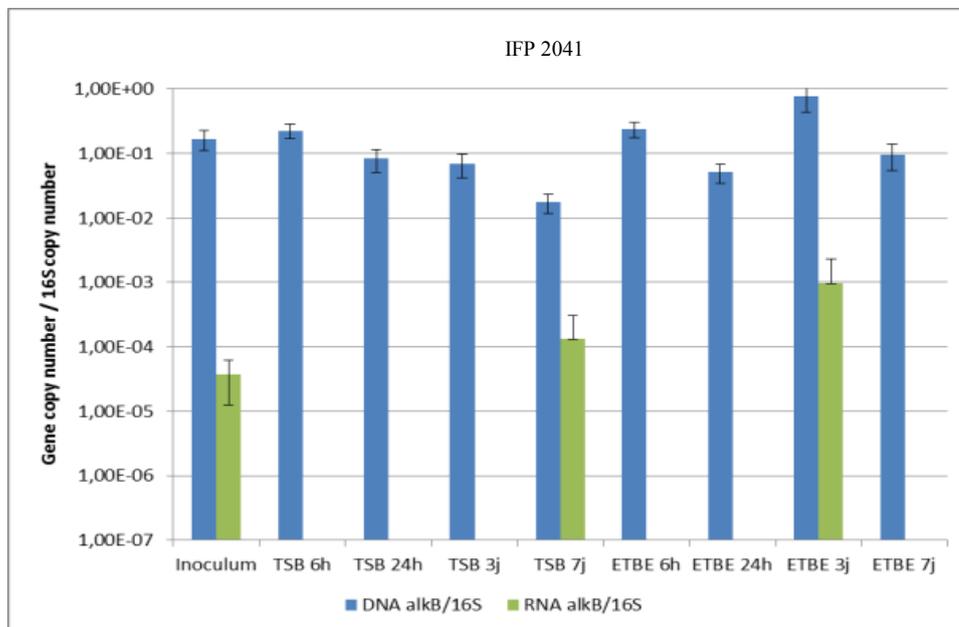


Figure 4.21. Expression du gène *alkB* chez IFP 2041

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).

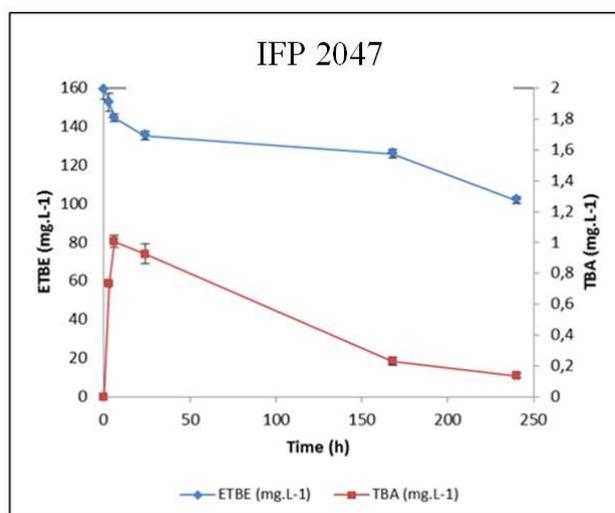


Figure 4.22. Courbe de dégradation de l'ETBE pour IFP 2047

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 <sub>600</sub>	ARN (ng.µL <sup>-1</sup> )	ADN (ng.µL <sup>-1</sup> )
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.

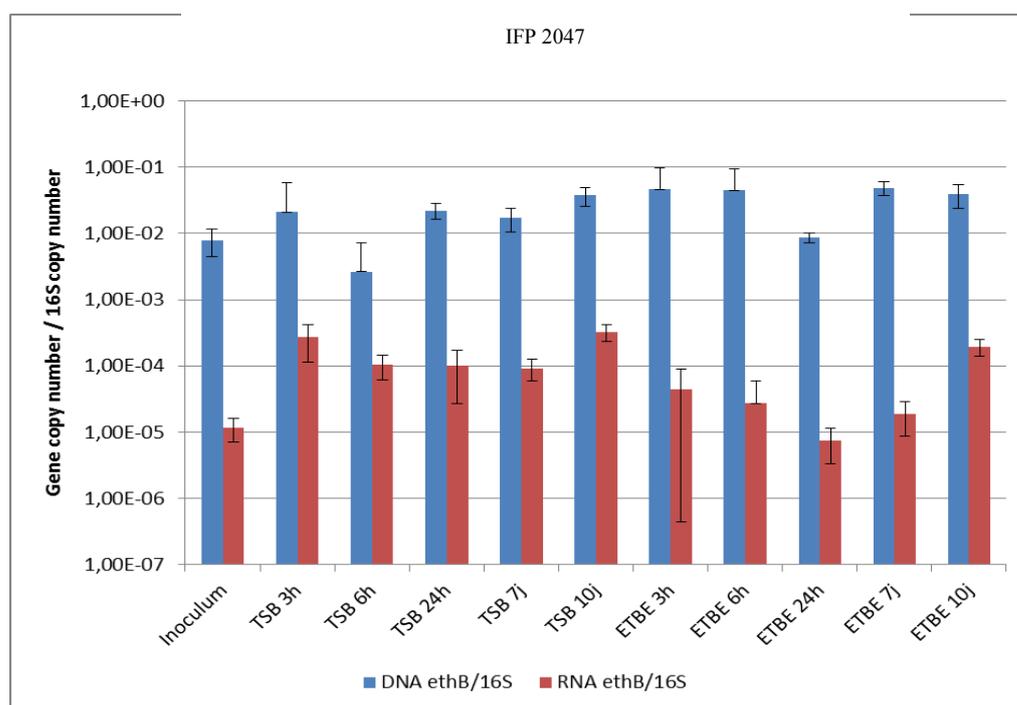


Figure 4.23. Expression du gène *ethB* chez IFP 2047

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.

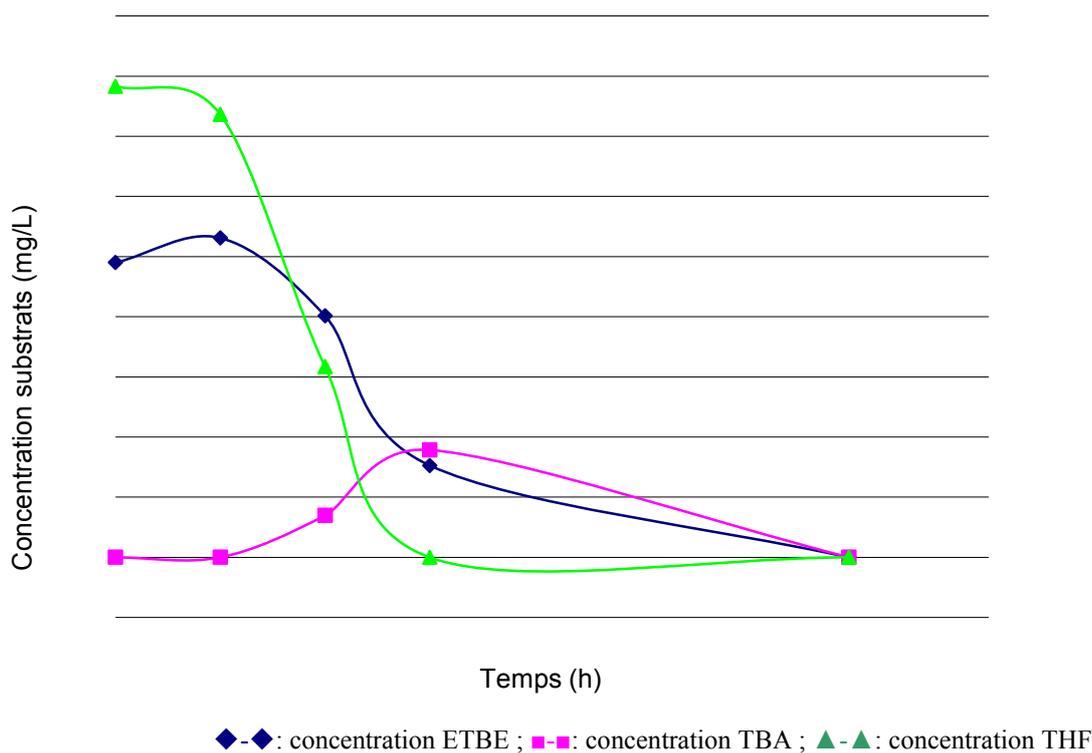


Figure 4.24. Courbe de dégradation de l'ETBE par *Pseudonocardia* sp. IFP 2050

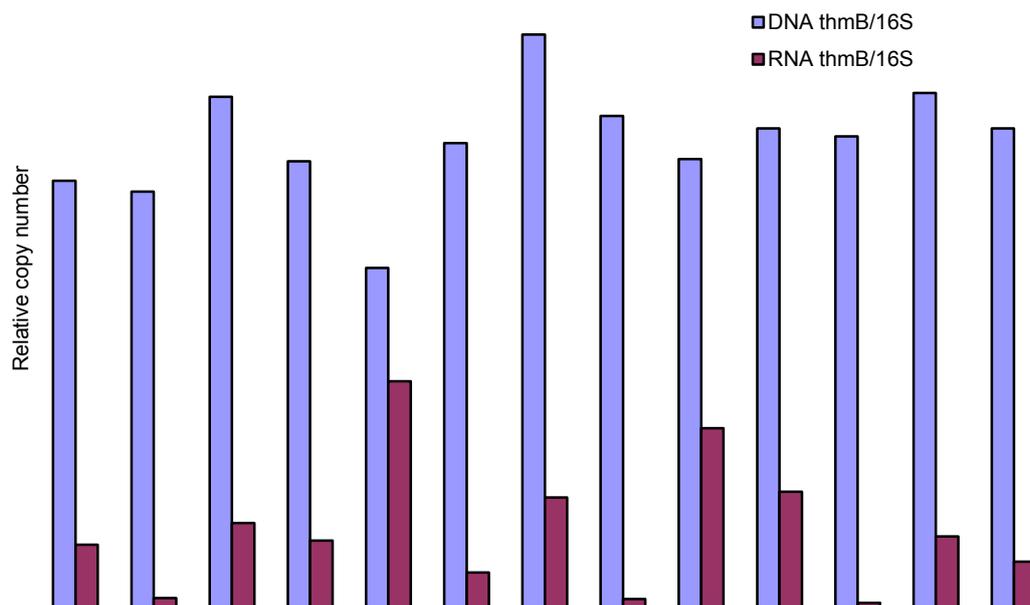


Figure 4.25. Expression du gène *thmB* chez IFP 2050

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.