

## 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 <sup>-1</sup> de sol)	ETBE	BE1-ETBE
			MTBE	BE1-MTBE
			TBA	BE1-TBA
GE1	Aquifère, Allemagne	- MTBE (29,3 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (0,4 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBF (0,7 mg.L <sup>-1</sup> ) - Benzène (0,3 mg.L <sup>-1</sup> )	ETBE	GE1-ETBE
			MTBE	GE1-MTBE
			TBA	GE1-TBA
FR3 *	Aquifère, France	- MTBE (113,5 mg.L <sup>-1</sup> ) - ETBE (4,2 mg.L <sup>-1</sup> ) - TAME (8,1 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (16,4 mg.L <sup>-1</sup> ) - TAA (1,7 mg.L <sup>-1</sup> )	ETBE	FR3-ETBE
			TBA	FR3-TBA
FR5	Aquifère, France	- MTBE (4,5 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (0,7 mg.L <sup>-1</sup> )	ETBE	FR5-ETBE
			MTBE	FR5-MTBE
			TBA	FR5-TBA
FR6 **	Aquifère, France	- ETBE (196 mg.L <sup>-1</sup> ) - MTBE (1,5 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (4,2 mg.L <sup>-1</sup> ) - BTEXs (37 mg.L <sup>-1</sup> )	MTBE	FR6-MTBE
			TBA	FR6-TBA
US2 **	Aquifère, USA	- MTBE (4,7 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (0,4 mg.L <sup>-1</sup> )	MTBE	US2-MTBE
			TBA	US2-TBA
US3 **	Aquifère, USA	- MTBE (19,3 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (0,6 mg.L <sup>-1</sup> )	MTBE	US3-MTBE
			TBA	US3-TBA
US6 *	Aquifère, USA	- MTBE (2,0 mg.L <sup>-1</sup> ) - TBA (0,6 mg.L <sup>-1</sup> )	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 :  $\text{MgSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.5 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ( $1.5 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{CaCl}_2$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.04 \text{ g.L}^{-1}$ ); solution d'oligo-éléments 1<sup>(1)</sup> ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ); solution d'oligo-éléments 2<sup>(2)</sup> ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ); solution de  $\text{FeSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$ <sup>(3)</sup> ( $1 \text{ mL.L}^{-1}$ ) + solution de vitamines<sup>(4)</sup> + solution de phosphate<sup>(5)</sup>

<sup>(1)</sup> La solution d'oligo-éléments 1 (stockée à 4°C) a la composition suivante :  $\text{CoCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{ZnSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{AlCl}_3$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.4 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{NiCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.25 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{H}_3\text{BO}_3$  ( $0.1 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{CuSO}_4$ , 5  $\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g.L}^{-1}$ ); eau déminéralisée (qsp 1 L)

<sup>(2)</sup> La solution d'oligo-éléments 2 (stockée à 4°C) a la composition suivante :  $\text{NaMoO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ );  $\text{NaWO}_4$ , 2  $\text{H}_2\text{O}$  ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ); eau déminéralisée (qsp 1 L)

<sup>(3)</sup> La solution de  $\text{FeSO}_4$ , 7  $\text{H}_2\text{O}$  (stockée à 4°C) est préparée à  $1 \text{ g.L}^{-1}$

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

Les solutions suivantes sont stérilisées par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ) et ajoutées avant utilisation du milieu :

solution de vitamines<sup>(4)</sup> (1 mL.L<sup>-1</sup>) ; solution de phosphate<sup>(5)</sup> (10 mL.L<sup>-1</sup>)

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

<sup>(5)</sup> La composition de la solution de phosphate (stockée à 4°C) est la suivante : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (140 g.L<sup>-1</sup>) ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (170 g.L<sup>-1</sup>) ; 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<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup>. Stérilisation à 120°C pendant 20 minutes.

c) Milieu riche Tryptic Soy Agar (TS1/10A): Milieu préparé à 3 g.L<sup>-1</sup> (TSB dilué au 1/10) additionné de 20 g.L<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>) 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  $\mu$ ) à t<sub>0</sub> 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<sup>-1</sup> pour l'ETBE et 100 mg.L<sup>-1</sup> 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, CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O) 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<sub>c</sub> H<sub>h</sub> Cl<sub>cl</sub> N<sub>n</sub> Na<sub>na</sub> O<sub>o</sub> P<sub>p</sub> S<sub>s</sub>, 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 <sup>-1</sup> )	Pe (°C)	D à 20°C	S dans l'eau à 20°C (g.L <sup>-1</sup> )	Demande théorique en oxygène ou D.Th.O (mg O <sub>2</sub> .mg <sup>-1</sup> composé)
ETBE	637-92-3	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O	102,18	72,8	0,74	12	2,65
MTBE	1634-04-4	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88,15	55,3	0,74	48	2,89
TBA	75-65-0	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74,12	82,8	0,79	∞	2,79
Benzène	71-43-2	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	78,11	80,1	0,88	1,80*	3,07
Toluène	108-88-3	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92,15	110,6	0,87	0,51	3,13
Ethylbenzène	100-41-4	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	136	0,87	0,15	3,24
<i>m</i> -xylène	108-38-3	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	139,1	0,86	0,15	3,16
<i>o</i> -xylène	95-47-6	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	144,4	0,88	0,17	3,16
<i>p</i> -xylène	106-42-3	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub>	106,16	138,4	0,86	0,19	3,16
Octane	111-65-9	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub>	114,23	125,6	0,7	0,4	3,5
Hexadécane	544-76-3	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	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 CO<sub>2</sub> 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<sub>660nm</sub>) 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 CO<sub>2</sub>**

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 CO<sub>2</sub> 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 CO<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup>) = [biomasse mesurée à l'issue des incubations (mg.L<sup>-1</sup>) - biomasse initiale introduite à l'ensemencement (mg.L<sup>-1</sup>)]

## **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<sup>-7</sup> sont ensuite étalées sur des boîtes de Petri (milieu TS au 1/10<sup>ème</sup>). 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<sup>ème</sup> 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<sup>-1</sup>). 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 mg.mL<sup>-1</sup>) : 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 ng.µL<sup>-1</sup>) : 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 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 ADN 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.

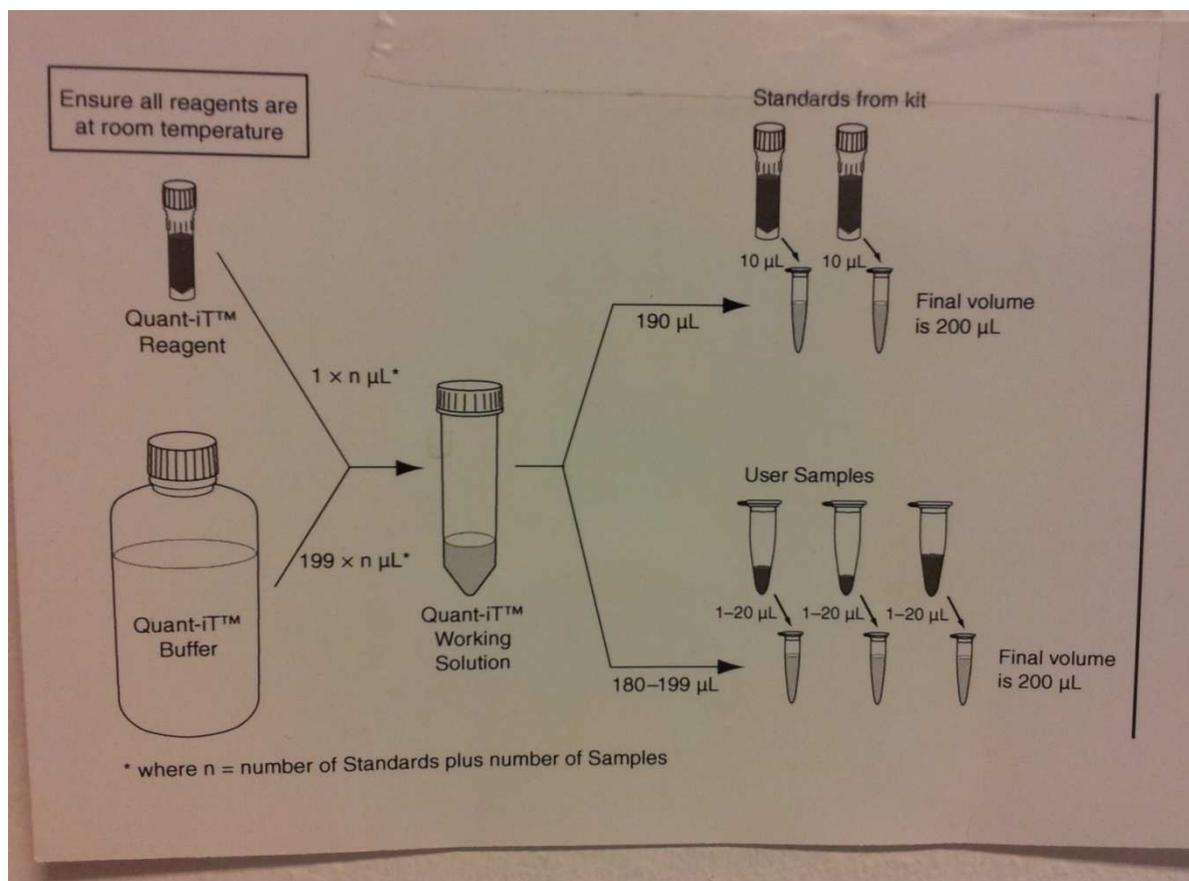


Figure 2.1. Mesure des concentrations en acides nucléiques par Qubit

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 : AGTACCGACGAAGCGGAGT 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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 <sup>1/10</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> 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<sup>®</sup> Total RNA Isolation Kit et RNA PowerSoil<sup>®</sup> 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<sup>-1</sup> + 2 µL de tampon + 11 µL d'H<sub>2</sub>O «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<sup>™</sup> Kit (Invitrogen) est utilisé selon les recommandations du fournisseur ([http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/cms\\_055740.pdf](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  $\mu$ M initial), 18  $\mu$ L de mélange réactionnel sont introduits dans chaque tube et 2  $\mu$ L d'échantillons purs ou dilués sont ajoutés de façon à avoir une concentration en ADN ou ARN inférieure à 20 ng.L<sup>-1</sup>.

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  $\mu$ L de produit PCR sont mélangés à 1  $\mu$ 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](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		T3 priming site	
201	CACACAGGAA ACAGCTATGA CCATGATTAC GCCAAGCTCA GAATTAACCC TCACTAAAGG	GTGTGTCCTT TGTCGATACT GGTACTAATG CGGTTCGAGT CTTAATTTGGG AGTGATTTC		
261	GACTAGTCCT GCAGGTTTAA ACGAATTCGC CCTT	GAGGGC GAATTCGCGG	<b>PCR Product</b>	TTCCCG CTTAGCGCC
311	CCGCTAAATT CAATTCGCC TATAGTGAGT CGTATTACAA TTCACTGGCC GTCGTTTTAC	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<sup>-1</sup>). 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<sup>-1</sup>. La température de l'injecteur, initialement de 110 °C, augmente de 10 °C.min<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup>, 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 CO<sub>2</sub>**

Le CO<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup>. 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 CO<sub>2</sub>. 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<sup>-1</sup>), 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 $\mu\text{m}$
Méthode colonne	1 <sup>er</sup> palier	
	Température initiale	35°C
	Température finale	114°C
	Pente	1,1°C.min <sup>-1</sup>
	2 <sup>ème</sup> palier	
	Température initiale	114°C
	Température finale	280°C
	Pente	1,7°C.min <sup>-1</sup>
Détecteur	Température	280°C
Injecteur (non programmé)	Température initiale	250°C
	Split	50 mL.min <sup>-1</sup>
Méthode d'injection	Volume	1 $\mu\text{L}$
	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 <sup>-1</sup>
Autres gaz	Make up (N <sub>2</sub> )	23 mL.min <sup>-1</sup>
	Air	290 mL.min <sup>-1</sup>
	Hydrogène	35 mL.min <sup>-1</sup>