

Composition des essences

I – 1 – 1. Les essences

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



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

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

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

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

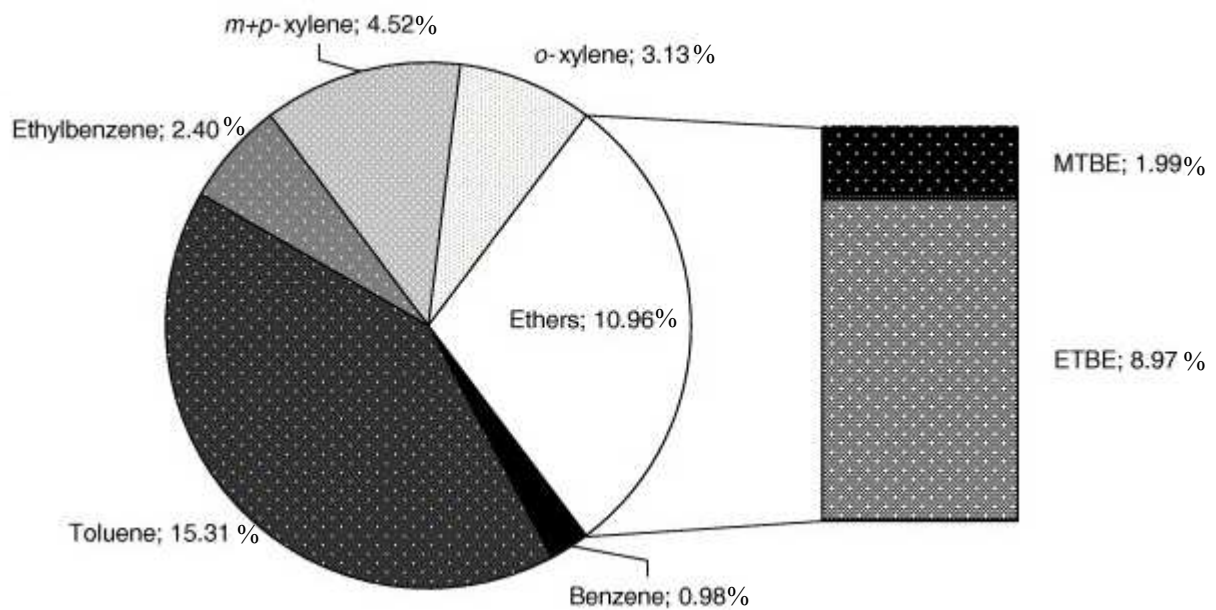


Figure 1.2. Composition d'une essence British Petroleum (BP) en Espagne en mai 2003 (Rosell et al., 2006)

I – 1 – 2. Additifs des essences

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

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

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

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

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

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

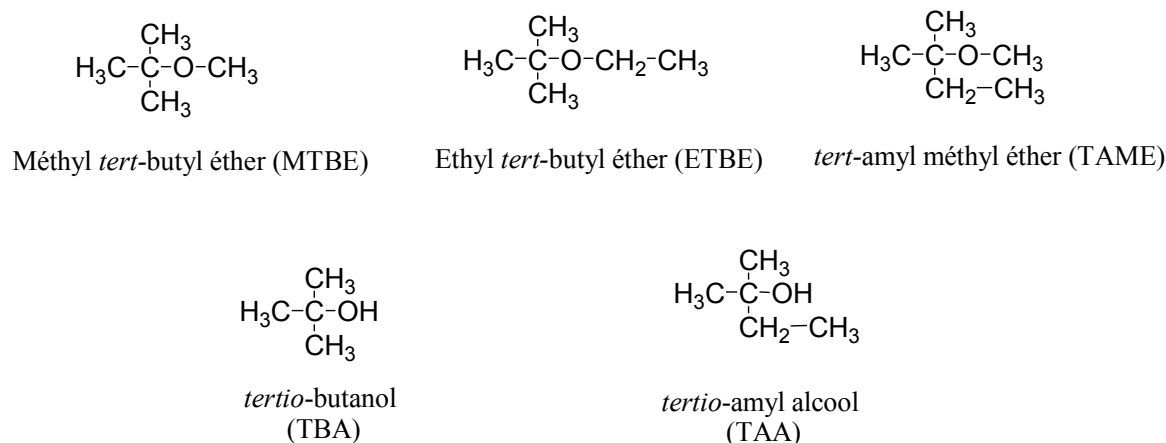


Figure 1.3. Structure des éthers-carburants et des alcools associés

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

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

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

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

* Après fonctionnement

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

I – 3. Pollution des aquifères et impact environnemental

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

I – 3 – 1. Les aquifères

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

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

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

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

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

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

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

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

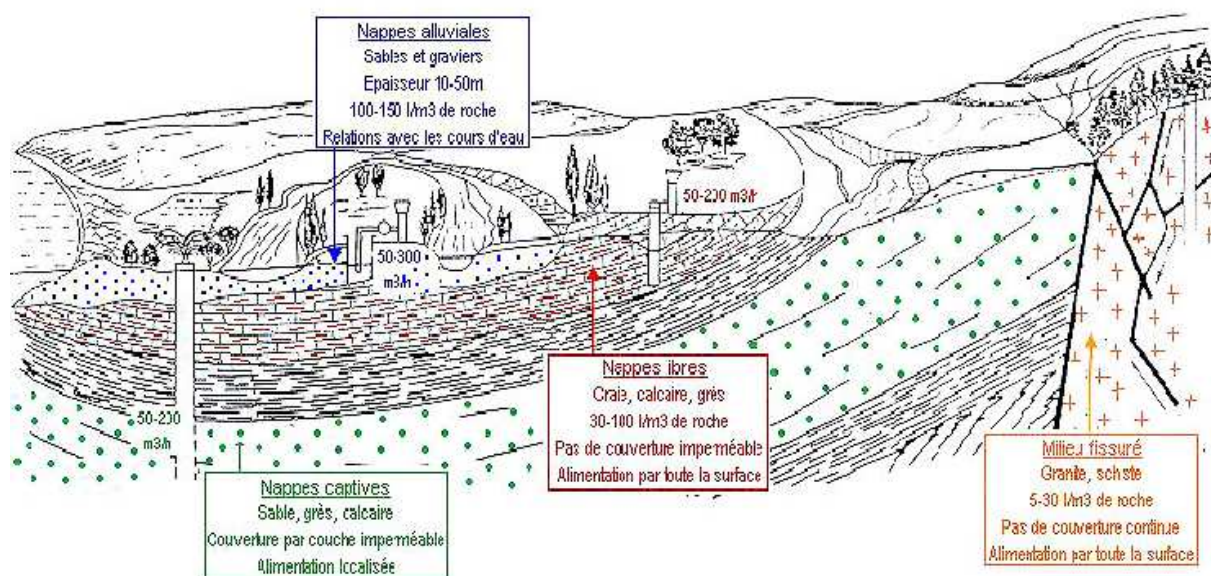


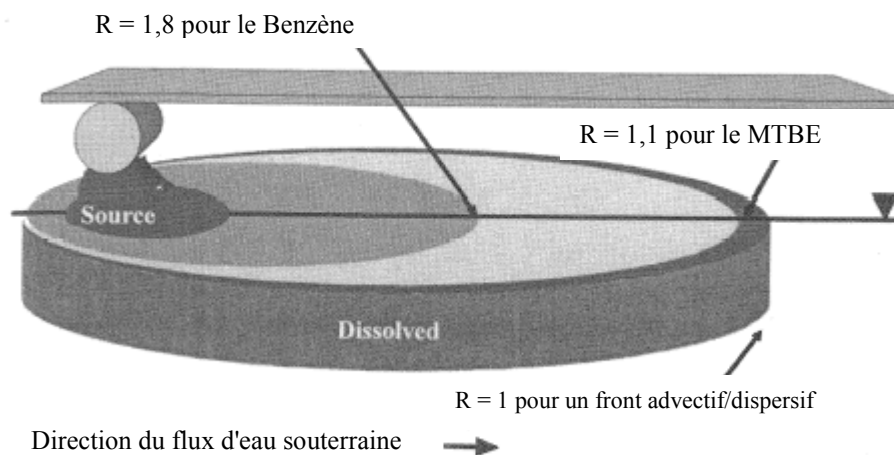
Figure 1.3. Les différents types d'aquifères (source: <http://www.brgm.fr/>)

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

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

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

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



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

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

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

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

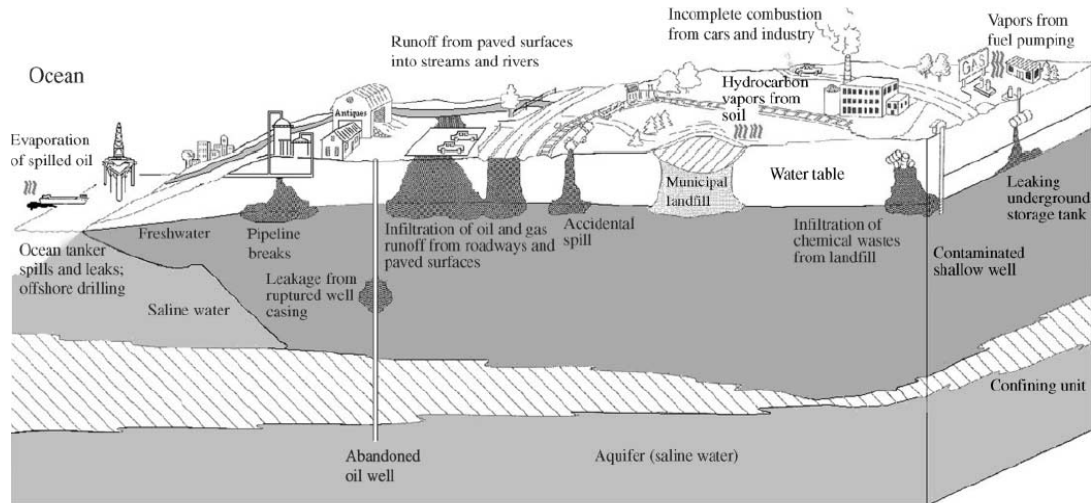


Figure 1.5. Modes de contamination des aquifères par les polluants de type hydrocarbures (Cozzarelli et Baehr, 2003)

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

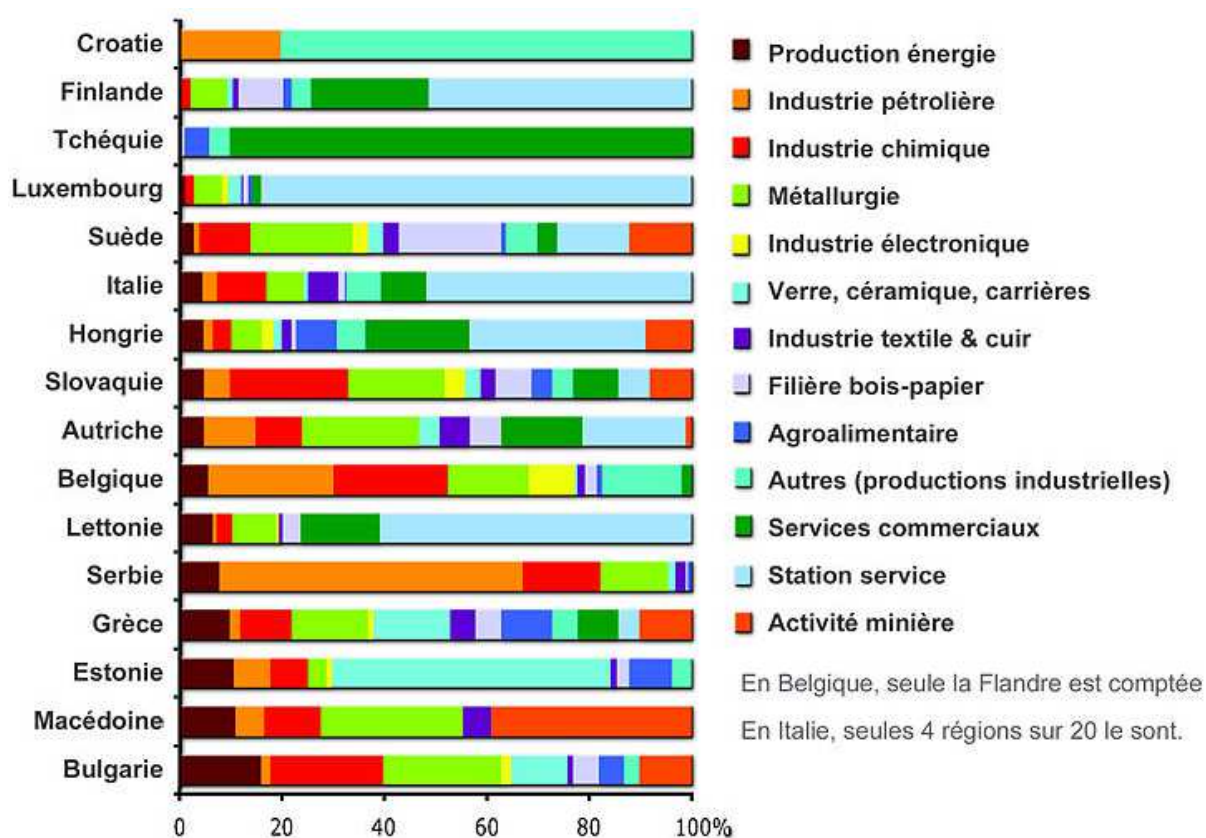


Figure 1.6. Source de pollution des sols dans 16 pays européens
<http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/soil-contamination-1>

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

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

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

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

I – 4 – 1. Diversité bactérienne des aquifères

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

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

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

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

a) Micro-organismes capables de croissance sur MTBE

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

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

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

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

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

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

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

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

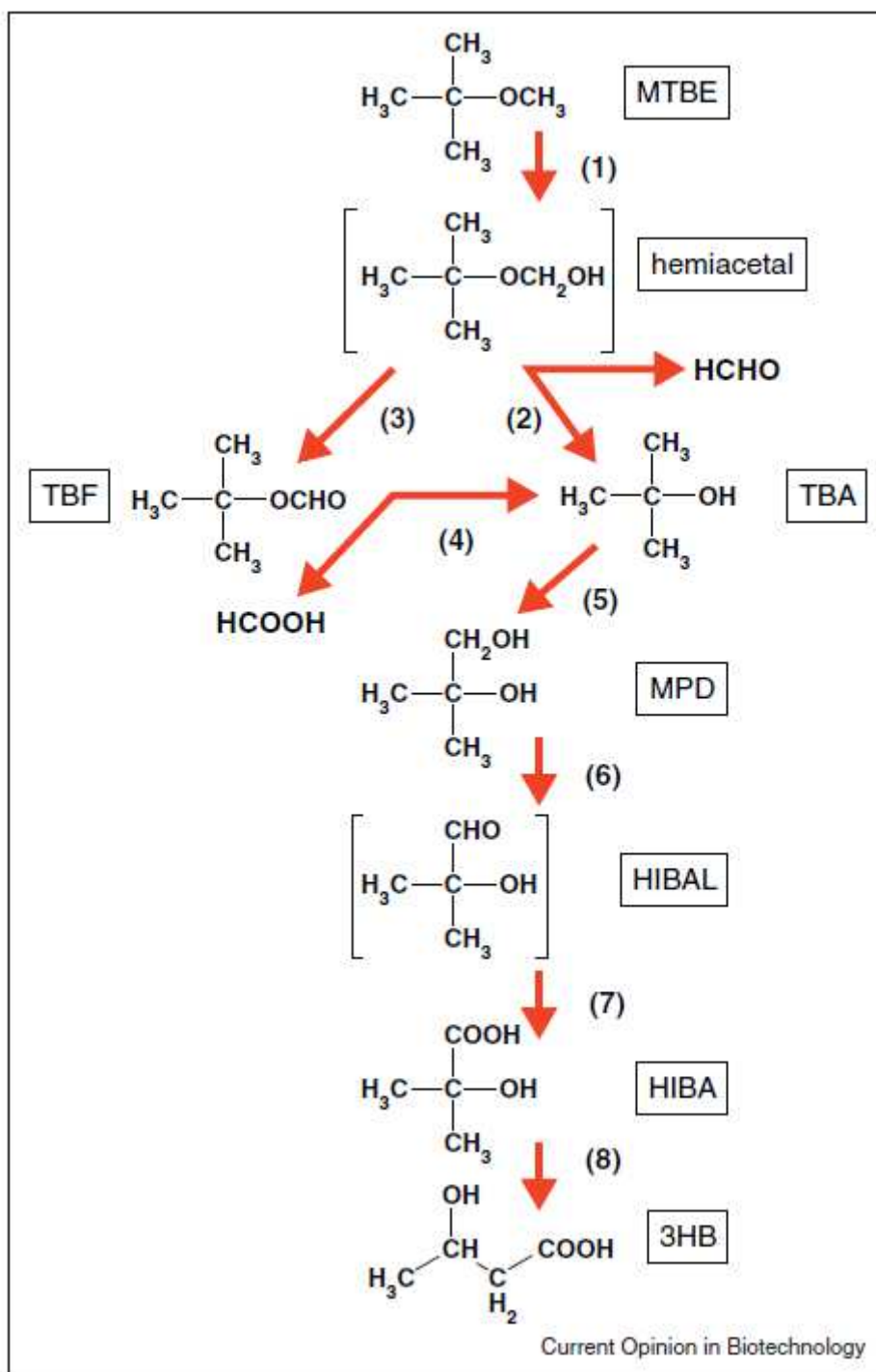


Figure 1.7. Voie de biodégradation aérobie du MTBE (Hyman, 2012)

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

b) Micro-organismes capables de croissance sur ETBE

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

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

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

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

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

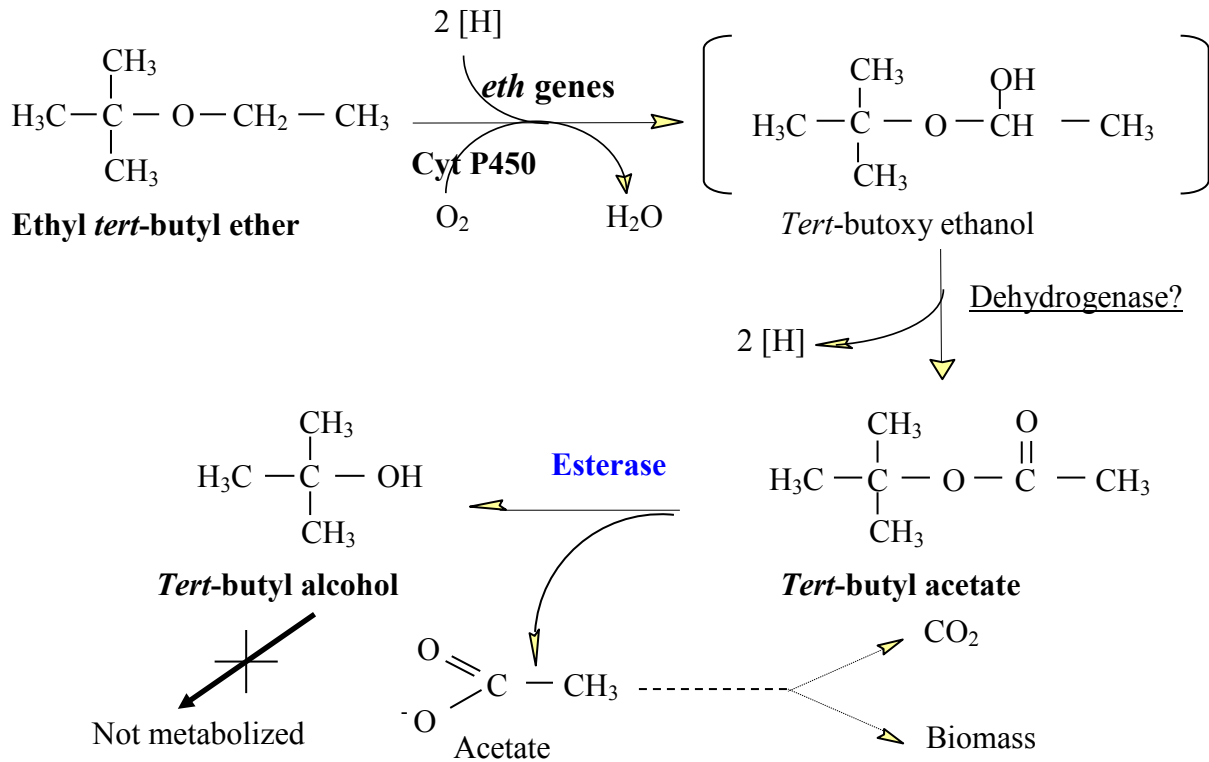


Figure 1.8. Voie de biodégradation de l'ETBE chez *R. ruber* IFP 2001 (Lopes Ferreira et al., 2006)

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

c) Biodégradation des éthers-carburants par cométabolisme

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

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

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

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

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

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

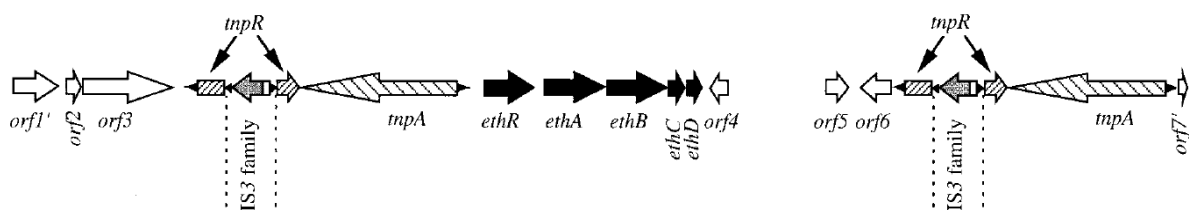


Figure 1.9. Structure de l'opéron *eth* chez *R.ruber* IFP 2001 (Chauvaux et al., 2001)
ethR (régulateur), *ethA* (ferredoxine réductase), *ethB* (cytochrome P450), *ethC* (ferredoxine), *ethD* (protéine de fonction inconnue mais indispensable à l'activité), *tnpA* (transposase), *tnpR* (résolvase)

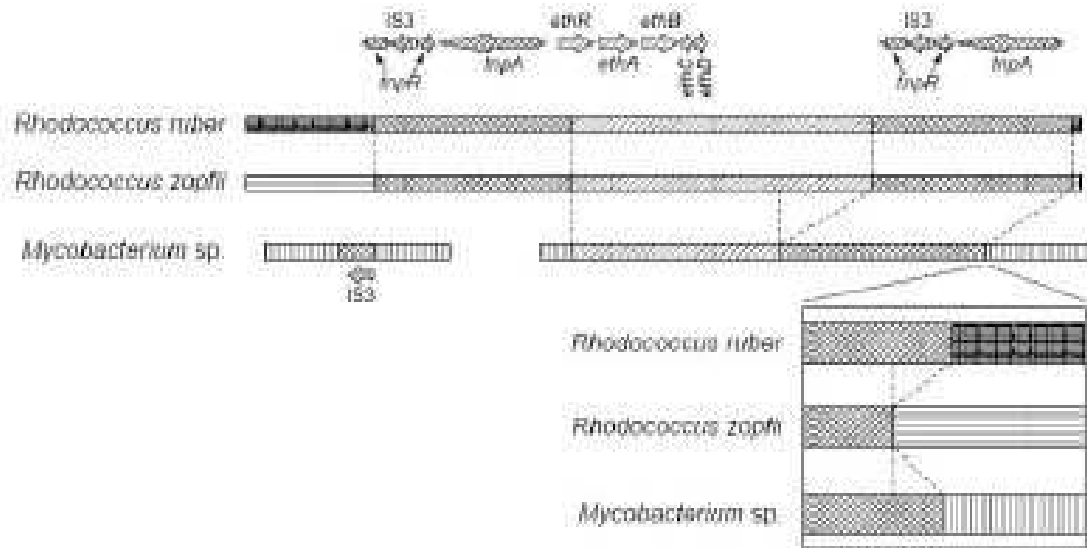


Figure 1.10. Comparaison de la structure des locus *eth* chez *R.ruber* IFP 2001, *R.zopfii* IFP 2005 et *Gordonia* sp. IFP 2009 (Béguin et al., 2003)

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

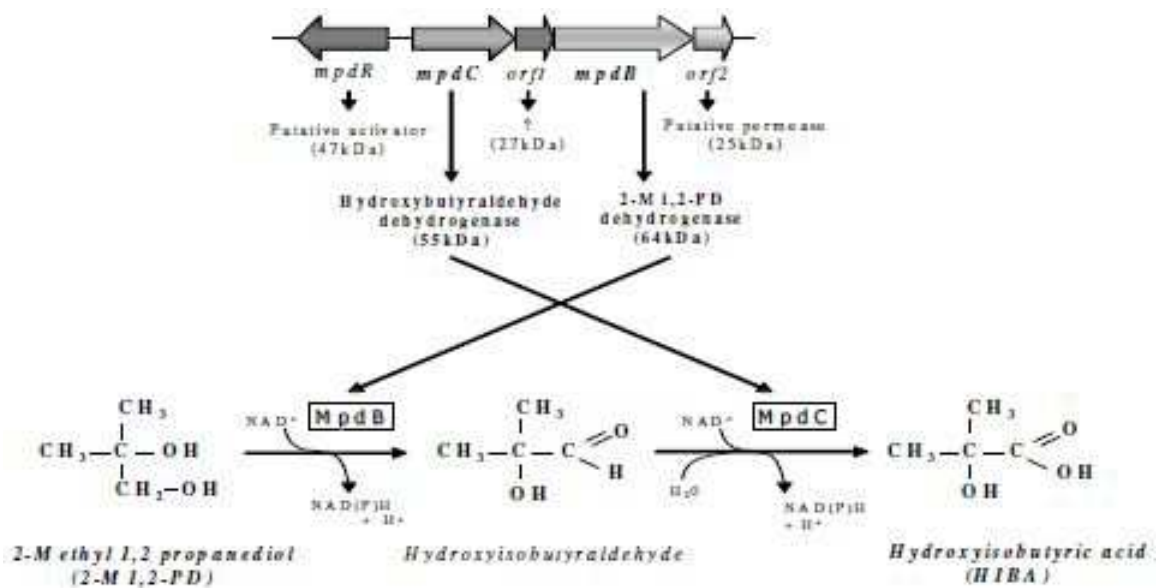


Figure 1.11. Organisation et rôle des gènes *mpd* dans le métabolisme du MTBE chez *M.austroafricanum* IFP 2012 (Lopes Ferreira et al., 2006)

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

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

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

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

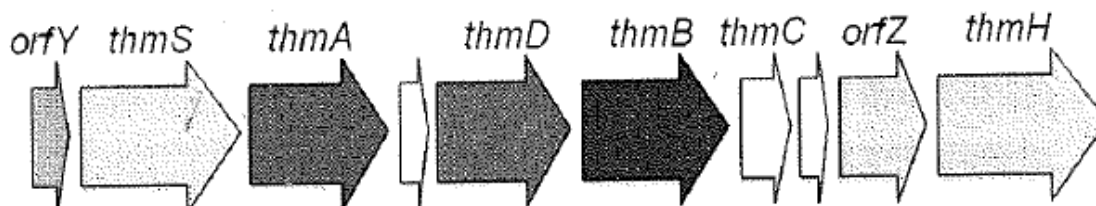


Figure 1.12. Organisation de l'opéron *thm* (Masuda et al., 2009)

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

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

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

I – 5 – 1. Isolement de bactéries et cultures

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

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

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

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

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

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

I – 5 – 3. Recherche des gènes fonctionnels

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

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

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

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

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

I – 5 – 4. Puces à ADN

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

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

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

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

I – 5 – 5. Approches métagénomiques

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

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

I – 5 – 6. Autres approches

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