



HAL
open science

Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone

Mohamed Soltani

► **To cite this version:**

Mohamed Soltani. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Autre. Chimie ParisTech, 2004. Français. NNT: . tel-00009276

HAL Id: tel-00009276

<https://pastel.hal.science/tel-00009276v1>

Submitted on 17 May 2005

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS 6

Spécialité

Chimie Analytique

Présentée par

Mr SOLTANI Mohamed

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS 6

Sujet de thèse:

Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone.

soutenue le 18 juin 2004

devant le jury composé de:

M. Jean-Claude BERTRAND

Rapporteur

M. Pierre DOUMENQ

Rapporteur

M. Jean GUEZENNEC

Examineur

M. Alain SALIOT

Examineur

M. Claude LARGEAU

Directeur de thèse

Avant Propos

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire de Chimie Bioorganique et Organique Physique (UMR 7573) de l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Paris. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Mr Claude Largeau pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'avoir accepté de diriger mon travail de recherche.

Au cours de ces années de thèse j'étais encadré par Monsieur Pierre Metzger, Ingénieur de recherche au CNRS. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus vive gratitude pour ses conseils scientifiques, sa disponibilité et pour l'amélioration de la rédaction de ce rapport.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur Alain Saliot, Monsieur le Professeur Jean-Claude Bertrand, Monsieur le Professeur Pierre Doumenq et Monsieur Jean Guezennec d'avoir accepté de juger ce travail.

J'exprime toute ma reconnaissance à toutes les personnes qui à un moment ou un autre, se sont intéressées à mes recherches. Parmi celles-ci je cite notamment tout le personnel du Laboratoire de Chimie Bioorganique et Organique Physique à l'ENSCP: Béatrice Allard, Odile Largeau, Yves Pouet, Joëlle Templier et Sylvie Derenne; du Laboratoire d'Océanographie de Marseille, particulièrement Monique Acquaviva qui m'a initié aux cultures des bactéries sur hydrocarbures.

Enfin, un grand merci à tous mes collègues du Laboratoire de Chimie Bioorganique et Organique physique à l'ENSCP pour l'ambiance sympathique qu'ils ont su créer tout au long de ces années de thèse.

à toute ma famille

à Anne-lise

à tous mes amis

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	11
----------------------------	----

CHAPITRE I

Rappels bibliographiques

I. POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT MARIN PAR LES HYDROCARBURES.....	14
<i>I.1. INTRODUCTION.....</i>	14
<i>I.2. FORMULES CHIMIQUES DES HYDROCARBURES DE DIFFERENTES SOURCES DANS LES ENVIRONNEMENTS MARINS.....</i>	16
I.2.1. Les composés pétroliers.....	17
<i>I.2.1.1. Les hydrocarbures saturés.....</i>	17
<i>I.2.1.2. Les hydrocarbures aromatiques.....</i>	18
<i>I.2.1.3. Les composés polaires.....</i>	18
<i>I.2.1.4. Les asphaltènes.....</i>	18
I.2.2. Les hydrocarbures biogènes.....	20
<i>I.2.2.1. Les hydrocarbures aliphatiques saturés.....</i>	20
<i>I.2.2.2. Les hydrocarbures aliphatiques insaturés.....</i>	21
<i>I.2.2.3. Les cycloalcanes et les cycloalcènes.....</i>	21
<i>I.2.2.4. Les hydrocarbures aromatiques.....</i>	21
<i>I.3. DEVENIR DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN.....</i>	22
I.3.1. Facteurs abiotiques dans l'élimination des hydrocarbures.....	22
<i>I.3.1.1. Evaporation.....</i>	23
<i>I.3.1.2. Solubilisation.....</i>	23
<i>I.3.1.3. Emulsification.....</i>	23
<i>I.3.1.4. Sédimentation.....</i>	23
<i>I.3.1.5. Photo-oxydation.....</i>	23
<i>I.3.1.6. Biodégradation.....</i>	23
I.3.2. Pénétration des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire.....	24
II. BIODEGRADATION AEROBIE DES HYDROCARBURES PAR LES MICROORGANISMES.....	25
<i>II.1. INTRODUCTION.....</i>	25

II.2. PROCESSUS D'OXYDATION DES HYDROCARBURES.....	26
II.2.1. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures aliphatiques.....	27
II.2.1.1. Dégradation des <i>n</i>-alcanes.....	27
II.2.1.1.1. L'oxydation monoterminale.....	27
II.2.1.1.2. Oxydation des <i>n</i> -alcanes par le système de dioxygénase.....	29
II.2.1.1.3. Oxydation des alcanes <i>via</i> alcènes.....	30
II.2.1.1.4. Oxydation subterminale.....	30
II.2.1.1.5. Oxydation diterminale.....	31
II.2.1.2. Biodégradation des alcanes ramifiés.....	32
II.2.1.3. Biodégradation des alcènes.....	36
II.2.2. Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques.....	37
II.2.3. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques.....	40
II.3. FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES AFFECTANT LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES.....	43
II.3.1. Composition chimique des hydrocarbures.....	43
II.3.2. Etat physique et concentration des hydrocarbures ou du pétrole.....	45
II.3.3. Influence de la température.....	46
II.3.4. Influence de l'oxygène.....	47
II.3.5. Influences des éléments nutritifs.....	48
II.3.6. Effet de la salinité et du pH.....	48
II.3.7. Effet de la pression.....	48
III. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES DANS LES GISEMENTS DE PETROLE ET VOIES ANAEROBIES.....	50
III.1. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES DANS LES PUITES DE PETROLE.....	50
III.1. VOIES DE DEGRADATION ANAEROBIE.....	52
IV. LES LIPIDES DES BACTERIES GRAM-NEGATIVES.....	55
IV.1. LES PHOSPHOLIPIDES.....	57
IV.2. LES LIPOPOLYSACCHARIDES.....	58
IV.3. INFLUENCE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION LIPIDIQUE DES BACTERIES GRAM-NEGATIVES.....	61
IV.3.1. Influence de la température sur la composition lipidique.....	61
IV.3.2. Influence de la salinité sur la composition lipidique.....	62
IV.3.3. Influence de la source de carbone sur la composition lipidique.....	63
V. BIOMARQUEURS.....	63
V.1. NOTION DE BIOMARQUEURS.....	63
V.2. BIOMARQUEURS BACTERIENS.....	65
V.2.1. Les acides gras.....	66

V.2.1.1. <i>Les acides gras saturés normaux</i>	67
V.2.1.2. <i>Les acides gras insaturés</i>	68
V.2.1.3. <i>Les acides gras ramifiés</i>	69
V.2.1.4. <i>Les acides gras cyclopropaniques</i>	70
V.2.2. Les hydroxy acides.....	71
V.2.3. Autres marqueurs bactériens.....	74
V.3. LES HYDROCARBURES	77

CHAPITRE II

Etude expérimentale

I. ORIGINE DES SOUCHES.....	80
II. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE.....	80
II.1. <i>COMPOSITION CHIMIQUE DES MILIEUX DE CULTURES</i>	80
II.2. <i>CONSEVATION DES SOUCHES</i>	81
II.3. <i>CULTURE SUR HYDROCARBURES</i>	81
III. SYNTHÈSE DES HYDROCARBURES.....	82
IV. EXTRACTION DES LIPIDES DES DIFFÉRENTES CULTURES.....	84
IV.1. <i>ISOLEMENT DES LIPIDES FACILEMENT EXTRACTIBLES</i>	85
IV.2. <i>EXTRACTION DES LIPIDES EN MILIEU BASIQUE</i>	85
IV.3. <i>EXTRACTION DES ACIDES LABILES EN MILIEU ACIDE</i>	86
V. <i>SYNTHÈSE DU DIAZOMETHANE</i>	86
VI. PRÉPARATION DES DÉRIVÉS DIMETHYL DISULFURES (DMDS).....	87
VII. DÉTERMINATION DE LA POSITION DU GROUPEMENT HYDROXYLE DES HYDROXYACIDES ET DES ALCOOLS: PRÉPARATION DES DÉRIVÉS TRIMETHYLSILYLES.....	88
VIII. FORMATION DES DÉRIVÉS N-ACYL-PYRROLIDIDES.....	88
IX. RÉDUCTION CATALYTIQUE DES ACIDES GRAS INSATURÉS.....	88
X. MÉTHODES UTILISÉES POUR L'ANALYSE DES LIPIDES.....	89
X.1. <i>CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE</i>	89
X.2. <i>CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLÉE À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE PAR IMPACT ÉLECTRONIQUE</i>	89

CHAPITRE III

Biodégradation de différentes familles d'hydrocarbures par *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*: influence sur la composition lipidique et voies métaboliques.

I. INTRODUCTION.....	92
II. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	93
III. HYDROCARBURES TESTES ET CULTURES.....	94
IV. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES LIPIDES ET RESULTATS QUANTITATIFS....	96
V. IDENTIFICATION ET DISTRIBUTION DES LIPIDES DE <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> CULTIVEE SUR ALCANES NORMAUX (C ₁₉ ET C ₂₁).....	99
V.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES EN SPECTROMETRIE DE MASSE.....	99
V.1.1. Esters méthyliques d'acides gras normaux saturés.....	99
V.1.2. Dérivés DMDS des esters méthyliques d'acides gras insaturés.....	103
V.1.3. Dérivés <i>N</i> -acyl pyrrolidides.....	105
V.1.4. Dérivés TMS des alcools gras saturés et insaturés.....	107
V.1.5. Dérivés TMS des esters méthyliques des β-hydroxy acides.....	111
V.1.6. β-Méthoxy acides.....	115
V.2. LIPIDES "NON LIES".....	117
V.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE.....	122
V.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE.....	127
VI. CULTURE DE <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SUR HYDROCARBURES RAMIFIES.....	130
VI.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES.....	130
VI.2. LIPIDES "NON LIES".....	132
VI.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE.....	140
VI.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE.....	144
VI.5. CONCLUSIONS PARTIELLES SUR L'INFLUENCE DES ALCANES LINEAIRES... 147	
VI.5.1. Influence de la parité des alcanes sur la composition lipidique.....	147
VI.5.2. Influence de la ramification des alcanes sur la composition lipidique.....	149
VI.5.3. Voies de dégradation des alcanes linéaires par <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	152
VII. CULTURE DE <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SUR ALCENE: <i>n</i> -NONADEC-1-ENE.....	158

VII.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES.....	158
VII.2. LIPIDES "NON LIES".....	160
VII.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE	164
VII.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE.....	164
VII.5. CONCLUSIONS PARTIELLES SUR LA DEGRADATION DU NONADEC-1-ENE....	169
VII.5.1. Influence sur la composition lipidique.....	169
VII.5.2. Voies métaboliques du <i>n</i> -nonadéc-1-ène.....	169
VIII. CULTURES DE <i>M. hydrocarbonoclasticus</i> SUR CYCLOHEXYL- ET PHENYL-ALCANES.....	172
VIII.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES.....	172
VIII.2. LIPIDES "NON LIES".....	177
VIII.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE.....	179
VIII.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE.....	181
VIII.5. CONCLUSION PARTIELLE SUR LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES CYCLIQUES PAR <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	188
VIII.5.1. Influence des cyclohexyl- et phényl-alcane sur la composition en acides gras de <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	188
VIII.5.2. Voies métaboliques des cyclohexyl- et phényl-alcane.....	190
IX. Les hydroxy acides indicateurs de l'activité bactérienne.....	180
X. CONCLUSION.....	196

CHAPITRE IV

Influence de la source de carbone sur la composition lipidique de bactéries Gram-négatives, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas oleovorans*. Distribution des β -hydroxy acides de la membrane extérieure

I. INTRODUCTION.....	199
II. PRESENTATION DES BACTERIES ETUDIEES.....	199
II.1. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE <i>Marinobacter aquaeolei</i>	199
II.2. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES D' <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	200

II.3. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE <i>Pseudomonas Oleovorans</i>	201
III. RESULTATS QUANTITATIFS	202
IV. IDENTIFICATION DES LIPIDES	205
V. DISTRIBUTION DES LIPIDES DE <i>M. AQUAEOLEI</i> EN FONCTION DE LA SOURCE DE CARBONE ET COMPARAISONS AVEC <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	209
V.1. RESULTATS	209
V.1.1. Cultures sur acétate d'ammonium	210
V.1.1.1. Lipides "non liés"	210
V.1.1.2. Lipides labiles en milieu basique	217
V.1.1.3. Lipides labiles en milieu acide	218
V.1.2. Cultures sur <i>n</i>-nonadécane	218
V.1.2.1. Lipides "non liés"	218
V.1.2.2. Lipides labiles en milieu basique	219
V.1.2.3. Lipides labiles en milieu acide	220
V.1.3. Culture sur <i>iso</i>-nonadécane	221
V.1.3.1. Lipides "non liés"	221
V.1.3.2. Lipides labiles en milieu basique	222
V.1.3.3. Lipides labiles en milieu acide	222
V.2. DISCUSSION	224
V.2.1. Influence de la nature de la source de carbone sur la composition lipidique	224
V.2.2. Variation de la composition en β-hydroxy acides	225
V.2.3. Métabolisme des hydrocarbures	225
VI. DISTRIBUTION DES LIPIDES D'<i>A. calcoaceticus</i> EN FONCTION DE LA SOURCE DE CARBONE ET COMPARAISON AVEC <i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	226
VI.1. RESULTATS	226
VI.1.1. Culture sur acétate	226
VI.1.1.1. Lipides "non liés"	226
VI.1.1.2. Lipides labiles en milieu basique	230
VI.1.1.3. Lipides labiles en milieu acide	230
VI.1.2. Culture sur <i>n</i>-nonadécane	231
VI.1.2.1. Lipides "non liés"	231
VI.1.2.2. Lipides labiles en milieu basique	231
VI.1.2.3. Lipides labiles en milieu acide	232
VI.1.3. Culture sur <i>iso</i>-nonadécane	232
VI.1.3.1. Lipides "non liés"	232

VI.1.3.2. <i>Lipides labiles en milieu basique</i>	233
VI.1.3.3. <i>Lipides labiles en milieu acide</i>	233
VI.2. DISCUSSION	233
VI.2.1. Influence de la nature de la source de carbone sur la composition lipidique.....	233
VI.2.2. Influence de la source de carbone sur la composition en alcools.....	234
VI.2.3. Variation de la composition en hydroxy acides.....	234
VI.2.4. Métabolisme des hydrocarbures.....	236
VII. INFLUENCE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LA COMPOSITION	
LIPIDIQUE DE <i>Pseudomonas oleovorans</i> 59.11T	236
VII.1. RESULTATS	236
VII.1.1. Culture sur acétate d'ammonium.....	237
VII.1.1.1. <i>Lipides "non liés"</i>	237
VII.1.1.2. <i>Lipides labiles en milieu basique</i>	237
VII.1.1.3. <i>Lipides labiles en milieu acide</i>	237
VII.1.2. Culture sur <i>n</i> -octane.....	243
VII.1.2.1. <i>Lipides "non liés"</i>	243
VII.1.2.2. <i>Lipides labiles en milieu basique</i>	243
VII.1.2.3. <i>Lipides labiles en milieu acide</i>	243
VII.1.3. Culture sur 2-méthylheptane.....	243
VII.1.3.1. <i>Lipides "non liés"</i>	244
VII.1.3.2. <i>Lipides labiles en milieu basique</i>	244
VII.1.3.3. <i>Lipides labiles en milieu acide</i>	245
VII.2. DISCUSSION	245
VII.2.1. Influence de la source de carbone sur la composition lipidique.....	245
VII.2.2. Variation de la composition en β -hydroxy acides.....	247
VII.2.3. Métabolisme des alcanes courts par <i>P. oleovorans</i>	248
VIII. CONCLUSION	249
CONCLUSION GENERALE	252
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	256
Annexes	
ANNEXE 1: SYNTHÈSE DES ALCANES RAMIFIÉS.....	279
ANNEXE 2: SPECTRES DE MASSE DES HYDROCARBURES SYNTHÉTISÉS.....	281

Introduction générale

INTRODUCTION GENERALE

L'exploitation humaine des gisements de pétrole n'a cessé d'augmenter depuis le début du siècle dernier. L'extraction, le transport et l'utilisation de cette source d'énergie entraînent des risques de pollution (accidentelle et chronique) pour l'environnement marin pouvant influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème.

L'élimination du pétrole de l'environnement marin nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs la biodégradation par les microorganismes et en particulier les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin. En conséquence, les mécanismes de dégradation des hydrocarbures pétroliers (alcanes linéaires, phénylalcane, cycloalcanes, hydrocarbures polycycliques et polyaromatiques) par les bactéries marines ainsi que les paramètres pouvant influencer la biodégradation ont été largement étudiés. Cependant, il apparaît que très peu d'études ont été entreprises sur les voies métaboliques d'oxydation d'hydrocarbures de structures différentes par une même bactérie. Si l'influence des hydrocarbures sur la composition en acides gras des bactéries a été bien étudiée, par contre celle sur la composition d'autres lipides, tels les β -hydroxy acides est encore assez mal connue.

Dans le but d'améliorer nos connaissances sur de tels composés, nous avons entrepris une étude complète de la composition lipidique de la bactérie marine *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* en fonction de la nature de l'hydrocarbure (*n*-alcanes, *iso*- et *antéiso*-alcanes, phényl- et cyclohexyl-alcanes, alcane ramifié en milieu de chaîne et 1-alcène) utilisé comme source unique de carbone et d'énergie. Dans le but d'avoir une meilleure connaissance des lipides des bactéries Gram-négatives et en particulier de la distribution des β -hydroxy acides de la membrane extérieure, la composition lipidique de trois autres espèces, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas oleovorans* a été également déterminée en fonction de la source de carbone.

Les principaux objectifs de ce travail de recherche étaient donc (i) l'analyse qualitative et quantitative détaillées de la composition lipidique de quatre bactéries en fonction de la source de carbone, (ii) la détermination des voies métaboliques mises en jeu au cours de la dégradation des hydrocarbures testés, (iii) mieux connaître la composition en β -hydroxy

acides des lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives et (iv) en définir les implications géochimiques éventuelles.

Ce document comporte quatre chapitres. Le premier chapitre présente un rappel des principales données bibliographiques concernant, d'une part, l'origine des hydrocarbures dans l'environnement et leurs voies métaboliques chez les bactéries, d'autre part, quelques éléments relatifs à la notion de biomarqueurs. L'ensemble du matériel et des méthodes utilisés pour la culture et l'étude de la composition lipidique des bactéries Gram-négatives est ensuite décrit dans le deuxième chapitre. Le troisième chapitre est consacré à l'étude de l'influence des hydrocarbures sur les lipides de la bactérie marine *M. hydrocarbonoclasticus* et les voies métaboliques de dégradation de ces composés. Dans le quatrième et dernier chapitre, nous exposons et discutons l'ensemble des résultats relatifs aux lipides de trois autres bactéries Gram-négatives, *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans* en fonction de la source de carbone et nous les comparons à ceux de *M. hydrocarbonoclasticus* afin de déterminer l'influence des hydrocarbures comportant des chaînes aliphatiques sur la distribution des β -hydroxy acides de la membrane extérieure des bactéries Gram-négatives.

Une conclusion générale et une bibliographie complètent cette rédaction. Enfin, deux annexes, la première décrit la procédure de synthèse des hydrocarbures ramifiés utilisés pour les cultures et la deuxième rassemble les spectres de masse de tous les hydrocarbures synthétisés.

CHAPITRE I

Rappels bibliographiques

I. POLLUTION DE L'ENVIRONNEMENT MARIN PAR LES HYDROCARBURES

1.1. INTRODUCTION

Le pétrole, première source d'énergie, a connu une progression ininterrompue de son extraction pendant plus d'un siècle. Suite au développement du transport et de l'industrie, la production mondiale n'a cessé d'augmenter pour atteindre 11 millions de tonnes par jour (11 Mt/j) en 2000 et on s'attend à une augmentation de la production de 1,9 % / an dans la décennie actuelle. Des estimations de la consommation mondiale de pétrole, suggèrent une augmentation de l'ordre de 44,7 millions de barils par jour (soit 6,4 Mt/j) entre 1999 et 2020. La consommation mondiale passera ainsi de 74,9 Mb/j (soit 10,7 Mt/j) en 1999 à 119,6 Mb/j (soit 17 Mt/j) en 2020. La croissance annuelle est donc estimée à 2,3 % / an, alors qu'elle n'était que de 1,6 % / an entre 1970 et 1999 (National Research Council-U.S., 2002).

Le pétrole est une source de pollution des environnements marins qui peut largement influencer les équilibres écologiques et par extension les activités économiques des régions sinistrées. "The National Research Council" a estimé dans la revue "Oil in the sea: inputs, fates and effects, 2002", la quantité de pétrole introduite annuellement dans les océans par les diverses voies à 1,3 millions de tonnes / an, sachant qu'une tonne de pétrole peut couvrir environ une surface de 12 kilomètres carrés. Les marées noires dues à des accidents pétroliers, ne représentent qu'une faible proportion du total des hydrocarbures déversés en mer chaque année, de façon plus insidieuse, invisible mais quotidienne.

Le tableau I.1, montre les catastrophes les plus importantes ainsi que les quantités de pétrole déversées et les zones affectées, depuis 1967 (premier échouage d'un pétrolier sur les côtes françaises) à nos jours. La plus grande catastrophe fut celle de la tête du puits sous marin d'Ixtoc one, dans le golfe du Mexique où 350 000 tonnes de pétrole brut se sont déversées dans l'océan entre juin 1979 et février 1980 (soit 3 Amoco Cadiz). D'autres sources viennent alourdir le bilan, citons l'exemple de la première guerre du Golfe, où la fin du conflit en 1991 a révélé la catastrophe des champs de puits de pétrole en flamme et le naufrage de pétroliers bombardés, déversant des quantités importantes de brut. Le bilan total a été estimé à 800 000 tonnes déversées, 40 millions de tonnes de sols saturés de pétrole et 700 km de côtes polluées.

Tableau I.1. Accidents pétroliers les plus importants de 1967 à 2002 (Kennish, 2001 modifié).

Année	Nom du pétrolier	Quantité de pétrole (tonne)	Zones affectées
1967	<i>Torrey Canyon</i>	117 000	France
1970	<i>Texaco Oklahoma</i>	31 500	U.S.
1976	<i>Urquiola</i>	100 000	Espagne
1977	<i>Grand Zenith</i>	32 000	Canada
1978	<i>Amoco Cadiz</i>	230 000	France
1979	<i>Ixtoc / Platform</i>	350 000	Golf du Mexique
1979	<i>Andros Patria</i>	60 000	Espagne
1979	<i>Betelgeuse</i>	35 000	Irlande
1979	<i>Gino</i>	42 000	France
1979	<i>Aviles</i>	25 000	Mer d'Arabie
1979	<i>Atlantic Express</i>	276 000	Tobago
1979	<i>Burmah Agate</i>	40 000	U.S.
1979	<i>Independenta</i>	94 600	Turkie
1980	<i>Irenes Serenade</i>	102 000	Grece
1980	<i>Juan A. Lavalleja</i>	40 000	Algérie
1983	<i>Castello deBelver</i>	255 500	Sud Afrique
1984	<i>Assimi</i>	51 400	Oman
1984	<i>Pericles GC</i>	46 600	Qatar
1985	<i>Neptunia</i>	60 000	Iran
1985	<i>Nova</i>	71 100	Iran
1989	<i>Exxon Valdez</i>	35 000	Alaska
1992	<i>Aegean Sea</i>	79 000	France / Espagne
1993	<i>Brear</i>	84 000	Norvège / Scotland
1999	<i>Erika</i>	28 000	France
2001	<i>Baltic Carrier</i>	30 000	Mer Baltique
2002	<i>Prestige</i>	77 000	France / Espagne

Les hydrocarbures pétroliers qui arrivent dans l'environnement marin peuvent avoir quatre origines majeures: les sources géochimiques, l'extraction de pétrole, le transport et la consommation. La part des sources géochimiques dues à des fuites naturelles qui apparaissent au fond des océans s'élève à 47 %. Les 53 % restant se répartissent ainsi: 38 % proviennent des rejets suite à la consommation (exemple: rejets d'industries basées à terre et des grandes agglomérations urbaines), 12 % sont dus au transport et 3 % à la production pétrolière offshore (Figure I.1).

Il faut enfin signaler qu'une quantité non négligeable d'hydrocarbures peut provenir de l'activité de nombreux microorganismes et des plantes (Albro, 1976; Bachofen, 1982; Saliot, 1981).

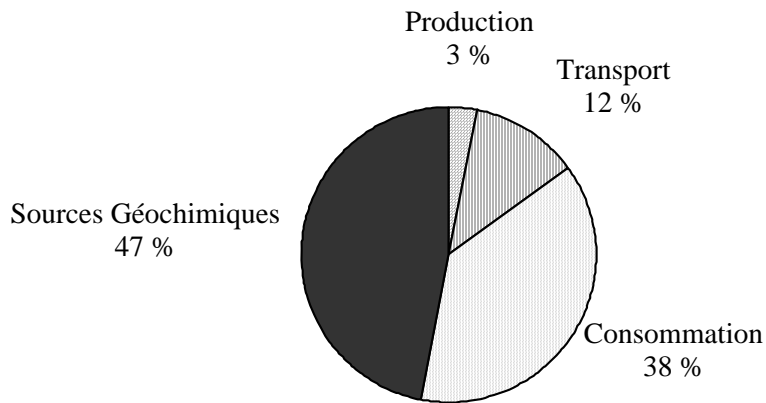


Figure I.1. Les différentes sources pétrolières responsables de la pollution de l'environnement marin (National Research Council, 2002).

Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées comme les marées noires: forte mortalité de la faune aquatique, bords de mer englués,... Il ne faut pas négliger les conséquences économiques de ces événements pour les riverains vivant de la pêche ou du tourisme ainsi que pour les collectivités territoriales et l'état. Mais les effets à court terme comme à très long terme sur les écosystèmes terrestres et aquatiques sont mal connus.

1.2. FORMULES CHIMIQUES DES HYDROCARBURES DE DIFFERENTES SOURCES DANS LES ENVIRONNEMENTS MARINS

Les hydrocarbures dans l'environnement marin peuvent avoir trois origines principales:

- Les rejets industriels et urbains, sources d'hydrocarbures pétroliers ou pyrolytiques.
- Les végétaux aquatiques (phytoplancton, macrophytes) et organismes hétérotrophiques (zooplancton, bacterioplancton).
- Les végétaux supérieurs terrestres *via* la matière organique détritique des sols, résultant du drainage des bassins versants.

Notons que la première origine est anthropique, alors que les deux dernières sont biogéniques, donc issues de la biosynthèse récente.

I.2.1. Les composés pétroliers

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés (Figure I.2.) dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique (Tissot et Welte, 1984). Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine: les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltènes (0 à 10 %).

Les produits pétroliers sont aussi introduits dans l'environnement marin sous forme de produits raffinés: carburants et huiles, leurs compositions dépendent de l'origine du pétrole et des opérations subies au cours du raffinage. On dénombre environ 230 composants pour l'essence et de l'ordre de 2000 pour un fuel lourd.

I.2.1.1. Les hydrocarbures saturés

Parmi lesquels, on distingue

* Les alcanes linéaires (*n*-alcanes, C_nH_{2n+2}), dont la longueur de chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier).

* Les alcanes ramifiés: les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemple: pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles des *n*-alcanes.

Par contre le pétrole brut d'origine fossile ne contient en général pas d'alcènes.

* Les cycloalcanes: renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut.

1.2.1.2. Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et polyaromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présents dans les pétroles bruts. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri-aromatiques (Neff, 1979). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier. Les composés alkylés sont, la plupart du temps, plus abondants que les molécules parentales dont ils dérivent. Certains cycles aromatiques peuvent être associés à des noyaux (cycle à 5 ou à 6 atomes de carbone) saturés (naphtéo-aromatiques).

1.2.1.3. Les composés polaires

Cette fraction correspond à des molécules hétérocycliques, telles que:

- des composés oxygénés: phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,...
- des composés soufrés: mercaptans, sulfures, disulfures,...
- des composés azotés: pyridines, quinoléines,...

Les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés.

1.2.1.4. Les asphaltènes

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hauts poids moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. La structure de ces composés est mal connue du fait, d'une part de leur composition chimique complexe (à base de cycles aromatiques condensés, de naphtéo-aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (O, N, S), d'autre part de méthodes analytiques difficilement utilisables.

Les métaux sont également présents mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés.

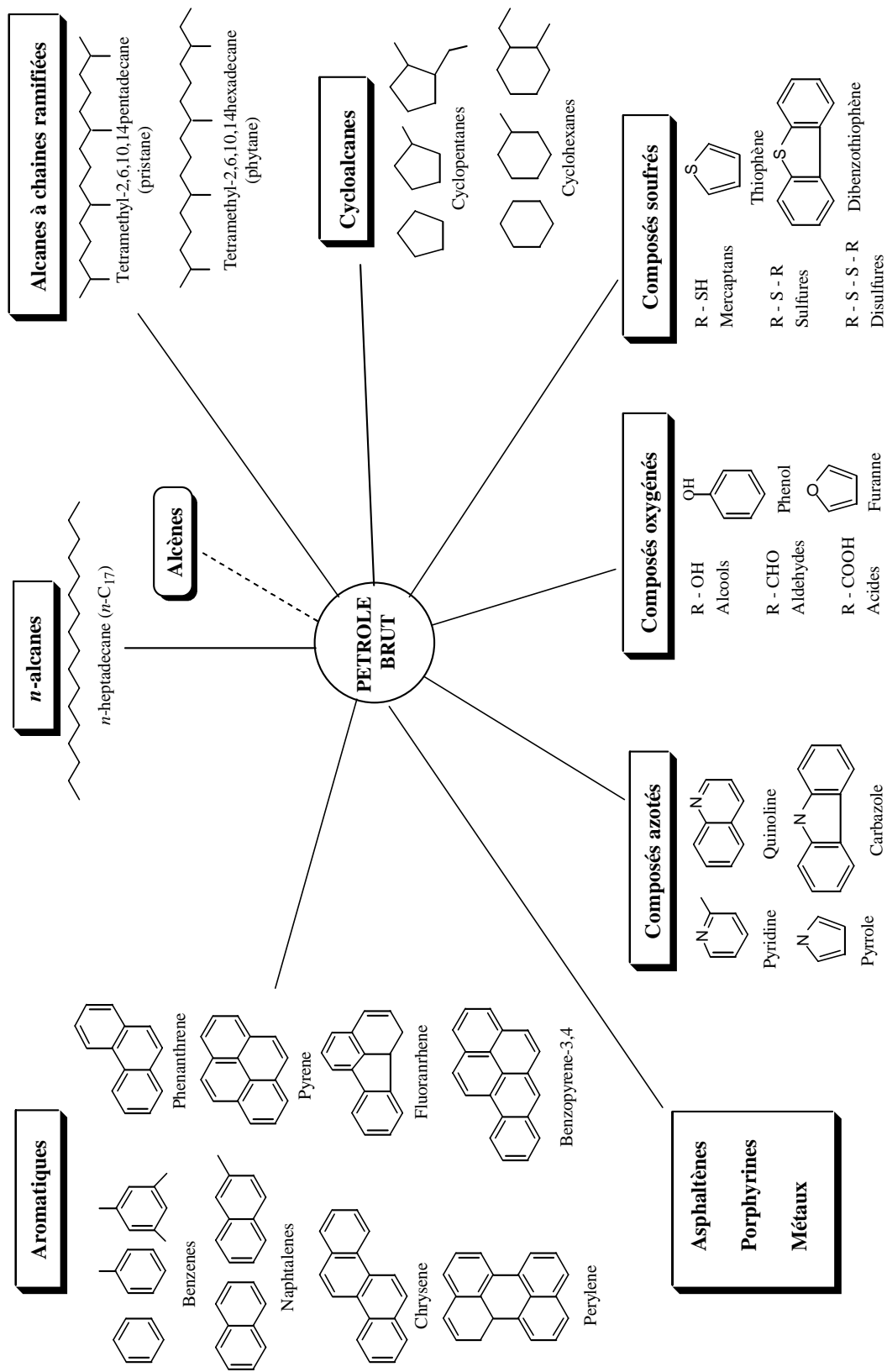


Figure I.2. Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut.

I.2.2. Les hydrocarbures biogènes

Les organismes vivants biosynthétisent des hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et polyaromatiques condensés. Le développement des techniques analytiques (chromatographiques et spectroscopiques) a démontré la complexité de ces composés présents en faibles quantités dans les colonnes d'eau et les sédiments. En effet, la biosynthèse et les mécanismes de transformations (dissolution, évaporation, photo-oxydation, adsorption-desorption sur des particules, transformations biologiques, ...) conduisent à un mélange de composés dont la spécificité dépend des organismes producteurs et des conditions physico-chimiques du milieu. Ainsi, la stabilité de ces composés a fait d'eux des marqueurs biologiques et géochimiques d'une très grande valeur.

Plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à la distribution et l'abondance des hydrocarbures dans les environnements marins, ce qui permet d'évaluer les niveaux de pollution, d'estimer une éventuelle augmentation en concentration suite aux phénomènes de transport et aux activités industrielles et de prédire les effets des hydrocarbures anthropogéniques sur les processus physiques, chimiques et biologiques (Saliot, 1981).

1.2.2.1. Les hydrocarbures aliphatiques saturés

*** Les alcanes linéaires (*n*-alcanes):**

Les *n*-alcanes sont des constituants prédominants dans la distribution des hydrocarbures dans l'environnement marin.

Les espèces phytoplanctoniques et les macro-algues synthétisent des *n*-alcanes dont les longueurs de chaînes varient respectivement de *n*-C₁₄ à *n*-C₃₂ et de *n*-C₂₀ à *n*-C₃₀ (Saliot, 1981), avec un maximum à *n*-C₁₅ ou *n*-C₁₇ (Blumer et al. 1971; Gelpi et al., 1970; Clark et Blumer, 1967; Youngblood et al., 1971). Une distribution des *n*-alcanes sans prédominance paire / impaire a été observée chez les bactéries (C₁₃ à C₃₁) et les plantes inférieures terrestres (C₁₅ à C₂₃) avec un maximum dans la zone de C₁₇ à C₂₀ pour les bactéries (Han and Calvin, 1969; Oro et al., 1967). Cependant, les plantes supérieures synthétisent des *n*-alcanes de haut poids moléculaire (C₂₃ à C₃₃) à prédominance impaire.

*** Les alcanes ramifiés:**

Les hydrocarbures isopréniques sont les plus fréquents dans l'environnement marin et ils présentent plusieurs origines (Saliot, 1981). Le pristane (2,6,10,14-

tetraméthylpentadécane) a été identifié en faible quantité chez les phytoplanctons, chez les macro-algues, les zooplanctons et pourrait être l'hydrocarbure majeur chez certaines bactéries anaérobies. Han et Clavin (1969), ont identifié le phytane (2,6,10,14-tetramethylhexadecane) en faibles concentrations chez des bactéries, qui a été aussi identifié chez des micro-algues (Volkman et al., 1980).

On trouve également d'autres composés comme le 7-méthylheptadécane et 8-méthylheptadécane, identifiés chez les micro-algues. Ces alcanes portant une ramification méthyle sont absents chez les autres organismes et en particulier les bactéries. Ces dernières sont caractérisées par des hydrocarbures à courtes chaînes, avec une prédominance marquée de composés à nombre impair d'atomes de carbone et surtout ramifiés en position *iso* et *antéiso* (Kolattukudy, 1976). D'autres sources peuvent être également à l'origine des hydrocarbures ramifiés notamment les plantes dont les *iso*-alcanes pourraient constituer dans certains cas plus de 50 % des hydrocarbures totaux (Eglinton et al., 1962; Saliot, 1981).

1.2.2.2. Les hydrocarbures aliphatiques insaturés

Les organismes marins synthétisent un grand nombre d'oléfines à chaînes droites, possédant jusqu'à six doubles liaisons, où prédominent les composés suivants (Saliot, 1981; Volkman et al., 1980, 1981):

- *n*-C_{17:1}, *n*-C_{18:1}, *n*-C_{19:1}, *n*-C_{21:5} et *n*-C_{21:6} chez les micro-algues.
- *n*-C_{17:1}, *n*-C_{19:5}, *n*-C_{21:5} et *n*-C_{21:6} chez les macro-algues.
- *n*-C_{21:6}, *n*-C_{14:1}, *n*-C_{19:1}, *n*-C_{22:1} et *n*-C_{30:1} chez le zooplancton.
- *n*-C_{17:1} et *n*-C_{17:2} chez les bactéries.

Des polyoléfines ramifiées telles que le squalène et les carotènes ont été également identifiés.

1.2.2.3. Les cycloalcanes et les cycloalcènes

Le plus simple hydrocarbure cyclique est un alkylcyclopropane identifié dans des algues marines (Youngblood et al., 1971) mais la plupart de ces composés sont des terpénoïdes comme les triterpénoïdes pentacycliques (Saliot, 1981).

1.2.2.4. Les hydrocarbures aromatiques

La biosynthèse directe de ces composés par des microorganismes ou des végétaux est un sujet controversé. En effet, à l'exception d'une faible contribution des algues, des bactéries et

des plantes, les hydrocarbures aromatiques sont généralement considérés comme produits de pyrolyse des activités humaines et des phénomènes naturels (incendies de forêts, éruptions volcaniques) (Bouchez et al., 1996; Saliot, 1981).

I.3. DEVENIR DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN

I.3.1. Facteurs abiotiques dans l'élimination des hydrocarbures

Du fait de la très faible solubilité des hydrocarbures dans l'eau et de leur densité qui est légèrement inférieure à l'unité, les hydrocarbures rejetés dans les océans s'étalent à la surface avant de subir une série de modifications suite à l'action de facteurs abiotiques et biologiques (Figure I.3). L'action simultanée de ces différents facteurs aboutira à l'élimination de cette pollution (Bertrand et Mille, 1989; U.S. Congress, Office of Technology Assesment, 1991). Les facteurs environnementaux sont:

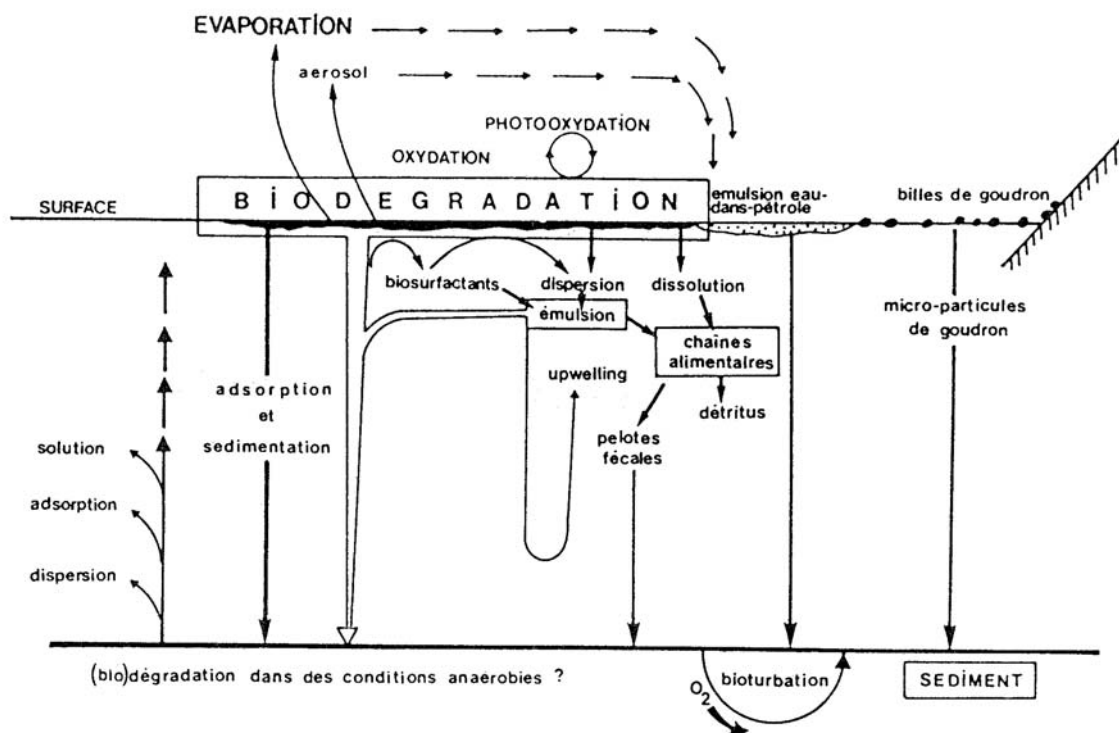


Figure I.3. Processus physico-chimiques et biologiques intervenant dans l'évolution d'une nappe de pétrole en milieu marin (Bertrand et Mille, 1989).

1.3.1.1. Evaporation

Ce phénomène touche les fractions de faible poids moléculaire et dépend des conditions atmosphériques (vent, vagues, température,...). Les hydrocarbures les plus légers, ayant de 4 à 12 atomes de carbone ($T_{eb} < 270\text{ °C}$), qui représentent généralement près de 50 % des hydrocarbures totaux d'un brut moyen, sont éliminés rapidement dès les premiers jours, pouvant conduire à une pollution de l'atmosphère.

1.3.1.2. Solubilisation

La solubilité des hydrocarbures dans l'eau de mer est très faible. Un hydrocarbure est d'autant plus soluble que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée. Il est important de noter que ces hydrocarbures solubles sont parmi les plus dangereux pour l'environnement, ils sont difficiles à éliminer et sont adsorbés par la faune et la flore.

1.3.1.3. Emulsification

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée "mousse Chocolat" et huile-dans-eau. Les émulsions eau-dans-huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages, alors que les émulsions huile-dans-eau facilitent l'élimination des hydrocarbures.

1.3.1.4. Sédimentation

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer.

La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradable par voie naturelle.

1.3.1.5. Photo-oxydation

La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures (Payne

et Phillips, 1985). L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés (Bertrand et Mille, 1989). Ainsi, la photo-oxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques. Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les *n*-alcanes (Rontani et Giusti, 1987).

La photo-oxydation conduit à la formation de composés solubles dans l'eau (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxydes) et certains travaux de recherche ont montré leur toxicité pour les communautés microbiennes (Payne and Phillips, 1985; Larson et al., 1979; Maki et al., 2001) alors que Rontani et al. (1987, 1992), ont montré l'existence d'interactions entre la photo-oxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkylbenzènes et de l'anthracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés.

1.3.1.6. Biodégradation

la biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries. L'importance de la biodégradation dans l'élimination du pétrole, les voies métaboliques d'oxydation des hydrocarbures par les bactéries et les paramètres qui peuvent influencer la biodégradation seront traités dans les paragraphes suivants.

1.3.2. Pénétration des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire

Les produits pétroliers rejetés dans l'environnement ont des répercussions sur les plantes, animaux et êtres humains. Les conséquences de la contamination dépendent des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. Certaines espèces éprouvent des changements de comportement à peine perceptibles ou des problèmes de santé à court terme. Certaines d'entre elles éprouvent des effets toxiques instantanés et aigus parfois mortels, tandis que chez d'autres espèces, les répercussions se manifestent lentement à long terme (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, communiqué de presse, 6 Janvier 2000). Face à ces polluants, les organismes susceptibles d'être contaminés doivent être considérés en fonction de leur capacité de réponse spécifique.

Les bactéries, nourriture de nombreuses espèces aquatiques, peuvent être des vecteurs de contamination par lesquels les hydrocarbures peuvent entrer dans la chaîne alimentaire (Bertrand et Mille, 1989 et articles cités).

Les connaissances les plus nombreuses portent sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dont la toxicité la plus souvent rapportée correspond à leur potentiel carcinogène.

II. BIODEGRADATION AEROBIE DES HYDROCARBURES PAR LES MICROORGANISMES

II.1. INTRODUCTION

La biodégradation est l'un des premiers mécanismes conduisant à l'élimination des hydrocarbures de l'environnement. La littérature concernant l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes indique que la croissance cellulaire dépend des processus de transport des hydrocarbures à la surface cellulaire et de passage à travers l'enveloppe cellulaire jusqu'au cytoplasme.

Trois modes de transport des hydrocarbures sont généralement considérés (Hommel, 1994; Goswani et Singh, 1991; Husain et al., 1997):

- 1- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures dissous dans la phase aqueuse par les facteurs de solubilisation extracellulaires.
- 2- L'interaction des cellules avec les hydrocarbures émulsifiés par les agents actifs de surface appelés biosurfactants.
- 3- Le contact direct des cellules avec les hydrocarbures.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes appelés hydrocarbonoclastes a été mise en évidence dès 1946 par ZoBell. Depuis cette date le nombre d'espèces bactériennes identifiées possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter. En se basant sur la fréquence d'isolement, les genres bactériens prédominants sont *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligènes*, *Vibro*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Corynebacteria*, et *Nocardia* (Leahy et Colwell, 1990; Floodgate, 1995). Ces organismes dégradant les hydrocarbures sont ubiquistes (Atlas, 1995 a, b; Olivera et al., 1997), ils ont

même été rencontrés dans les écosystèmes extrêmes comme les régions polaires (Whyte et al., 1995; Aislabie et al., 1998), les déserts (Al-Hadrami et al., 1995) ou les sources chaudes (Zarilla et Perry, 1984).

L'activité humaine, au travers des multiples sources de pollution et par la mondialisation des déplacements, favorise l'apparition de nouvelles souches aptes à la dégradation des hydrocarbures (Van der Meer et al., 1992). Ainsi, même si les conditions de température, aération, pH, toxicité ou nutriments sont défavorables, une dépollution intrinsèque reste possible avec une efficacité amoindrie (Leahy et Colwell, 1990; Delille et al., 1998).

La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de les dégrader (Klug et Markovetz, 1971; Blasig et al., 1984; Davies et Westlake, 1979; Fedorak et al, 1984; Meulenbergh et al., 1997; Yamada-Onodera et al., 2002).

Signalons enfin que certaines micro-algues sont capables d'attaquer les hydrocarbures, citons l'exemple de *Protatheca zopfii* qui dégrade 40 % du pétrole brut (Walker et al., 1975). Cependant parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats (Bertrand et Mille, 1989; MacNaughton et al., 1999).

Le rejet des produits pétroliers dans les milieux marins ou terrestres entraîne une prolifération des microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique et s'accroît après un apport d'hydrocarbures dans les sites dépourvus de contamination (Bartha et Atlas, 1977; Atlas, 1981; Floodgate, 1984).

II.2. PROCESSUS D'OXYDATION DES HYDROCARBURES

L'étude de l'oxydation des hydrocarbures se base sur l'analyse des milieux de culture des microorganismes dont la croissance dépend de la nature de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone ainsi que des capacités métaboliques des cellules. Les produits détectés peuvent directement provenir du substrat, mais leur accumulation ultérieure peut être due au fait qu'ils sont faiblement métabolisés ou non métabolisés. D'autre part, plusieurs produits d'oxydation peuvent être de nature transitoire et n'apparaissent jamais en quantités détectables. Les informations obtenues par l'analyse cellulaire et des milieux de cultures

permettent d'établir le processus métabolique de dégradation des hydrocarbures. La confirmation de ces mécanismes nécessite des vérifications enzymologiques. Quand la dégradation suit des chemins alternatifs, ceux-ci doivent être vérifiés par inhibition sélective de chacun d'entre eux.

II.2.1. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures aliphatiques

II.2.1.1. Dégradation des *n*-alcanes

Les *n*-alcanes à courtes chaînes, tel le *n*-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seulement quelques bactéries ont la capacité de croître sur les alcanes plus courts que le *n*-octane alors que les *n*-alcanes dont le nombre de carbone est supérieure à 9, sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables par une très grande variété de microorganismes (Ratledge, 1978). Plusieurs modes d'attaque des *n*-alcanes ont été décrits. Ils font intervenir l'oxygène moléculaire.

II.2.1.1.1. L'oxydation monoterminale

L'oxydation monoterminale est le principal processus utilisé par la plupart des bactéries, conduisant à la formation de l'alcool primaire puis de l'aldéhyde et de l'acide gras correspondant (Pirnack et al, 1974; Nieder et Shapiro, 1975; Grund et al, 1975). Les acides gras formés peuvent être oxydés par α , β ou ω -oxydation; les composés formés pourront par la suite être incorporés aux lipides cellulaires. Une élongation de la chaîne carbonée est alors possible. Les voies métaboliques d'oxydation monoterminale des *n*-alcanes sont indiquées sur la Figure I.4.

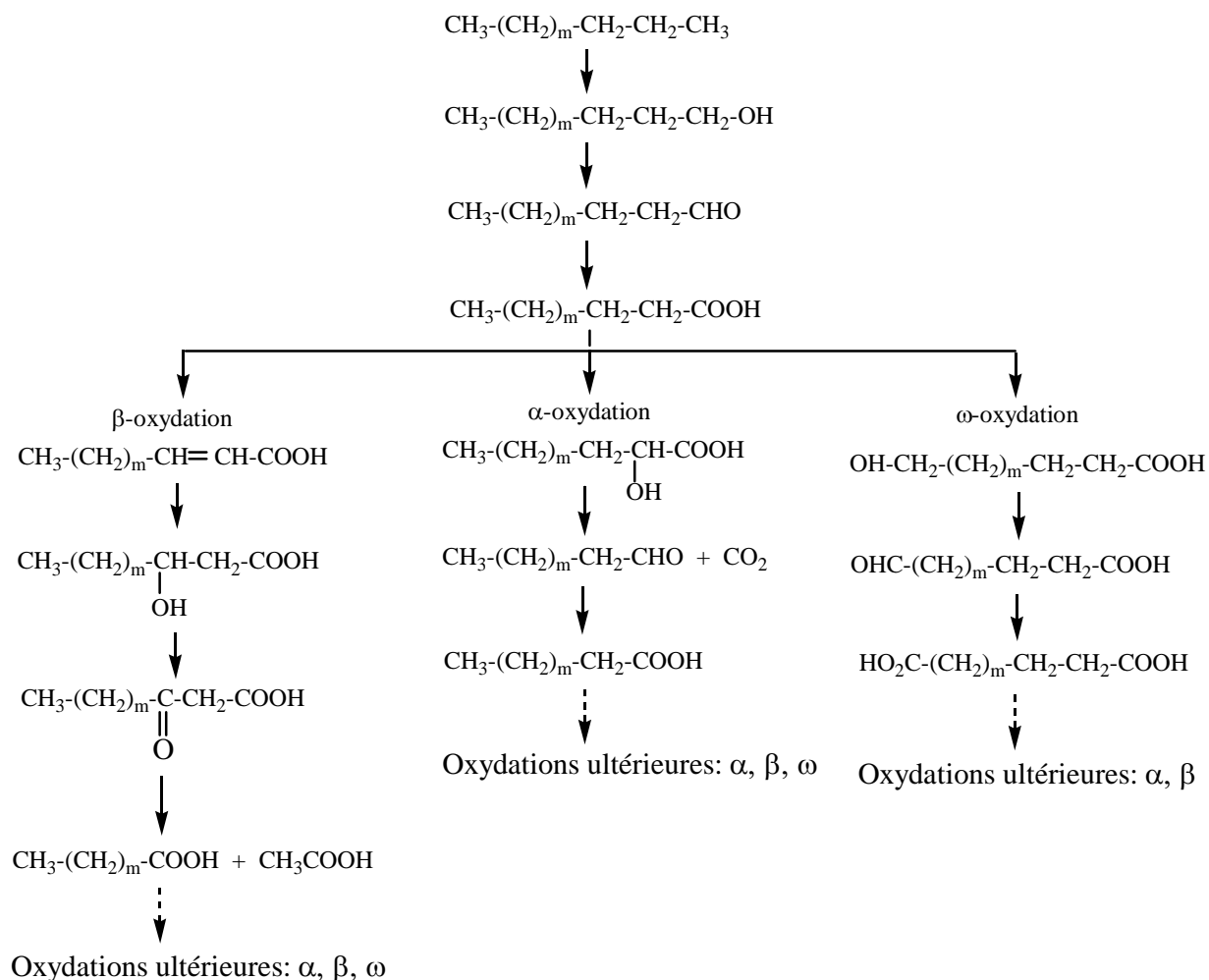


Figure I.4. Voie métabolique de l'oxydation monoterninale des *n*-alcanes.

Cette oxydation monoterninale pour donner l'alcool primaire est catalysée par un mécanisme complexe d'hydroxylase qui peut être relié à un système de transport d'électrons permettant l'incorporation de l'atome d'oxygène. Les deux meilleurs systèmes décrits sont: le Cytochrome P450 et le Rubredoxin.

* Cytochrome P450:

Ce système a été décrit en premier lieu chez les bactéries pour l'hydroxylation des *n*-alcanes par *Corynebacterium* sp (Cardini et Jurtshut, 1968, 1970) via l'incorporation d'oxygène atmosphérique (Figure I.5).

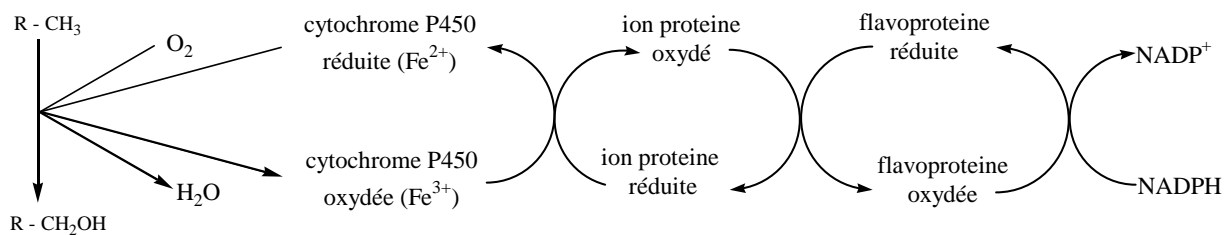


Figure I.5. Mécanisme de l'oxydation d'un *n*-alcane en alcool primaire par le système cytochrome P450 (Cardini et Jurtshuk, 1968, 1970).

* Système rubredoxin:

Ce système enzymatique a été initialement découvert chez *Pseudomonas oleovorans* (Figure I.6).

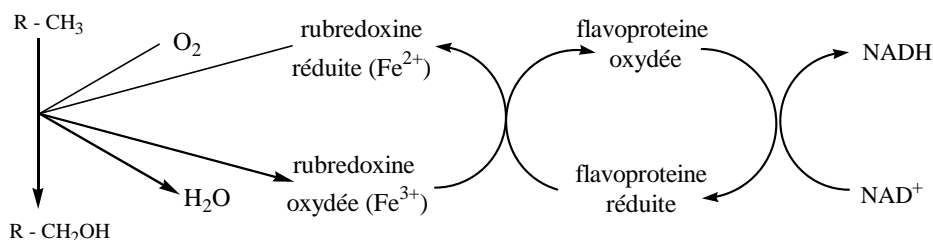
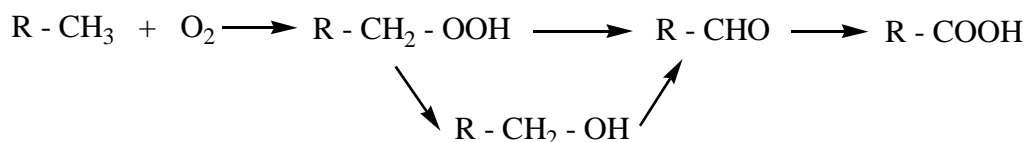


Figure I.6. Mécanisme de l'oxydation d'un *n*-alcane en alcool primaire par le système Rubredoxin (Cardini et Jurtshuk, 1968, 1970).

II.2.1.1.2. Oxydation des *n*-alcanes par le système de dioxygénase

Cette voie métabolique d'oxydation des *n*-alcanes a été proposée pour la première fois par Finnerty (1977, 1988) pour les bactéries du genre *Acinetobacter*. Les *n*-alcanes sont oxydés par une dioxygénase conduisant à la formation d'un *n*-alkyl-hydroperoxyde, qui sera à son tour oxydé en aldéhyde puis en acide. Chez d'autres souches, une étape supplémentaire dans la voie métabolique d'oxydation des *n*-alcanes a été démontrée: il s'agit de la formation d'un alcool à partir du *n*-alkyl-hydroperoxyde, qui est ensuite oxydé en aldéhyde (Finnerty, 1990 a, b). La figure suivante montre ces deux voies métaboliques:



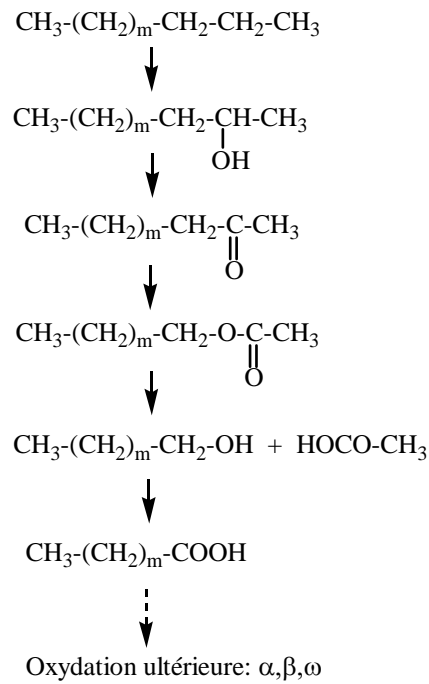


Figure I.8. voie métabolique de l'oxydation subterminale (Klug et Markovetz, 1971)

II.2.1.1.5. Oxydation diterminale

Après formation de l'acide gras, une deuxième oxydation peut se produire au niveau du groupement méthyl- ω pour donner un di-acide. La formation de 1- ω -alcane-diol et de dialdéhyde n'a pas été observée (Rehm et Reiff, 1981). L'oxydation subterminale de l'acide gras peut également se produire pour donner le (ω -1)-hydroxy acide de même longueur de chaîne que le *n*-alcane (Figure I.9).

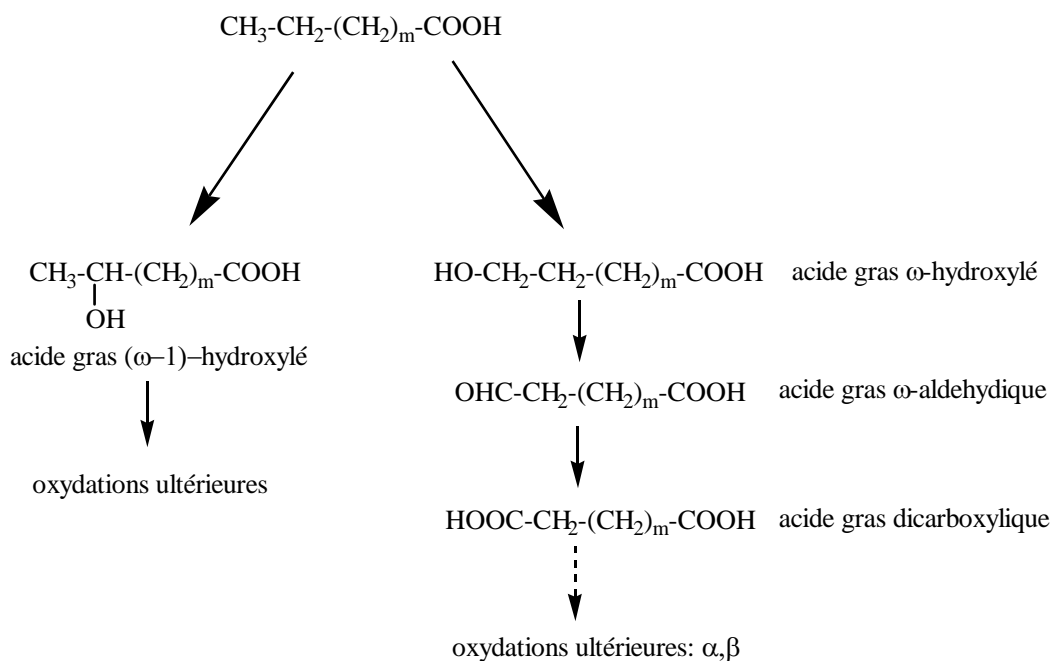


Figure I.9. Voie métabolique via l'oxydation terminale et subterminale des acides (d'après Bertrand et Mille, 1989; Ratledge, 1978).

II.2.1.2. Biodégradation des alcanes ramifiés

Les alcanes ramifiés sont généralement moins sensibles à la biodégradation, ce qui peut provoquer leur accumulation dans l'environnement. La présence d'un groupement méthyle en position β , va empêcher la β -oxydation, ce qui nécessite l'intervention d'un autre mécanisme comme l' α -oxydation ou une oxydation à l'autre extrémité. Chez certaines bactéries, la voie métabolique passe alors par la voie dite de "citronelleol"; c'est le cas de *Pseudomonas citronellolis* capable de dégrader le 2-octène, le 3,6-diméthyl-octane et le 2,6-diméthyl-décane (Figure I.10) (Fall et al., 1978), ainsi que chez plusieurs autres espèces *Pseudomonas* (Cantwell et al., 1978). L'augmentation du nombre de ramifications a pour effet de diminuer leur biodégradabilité (Davis, 1967; Foster, 1962; McKenna, 1972). Par contre une ramification en α n'empêche pas une β -oxydation (Rontani et Giusti, 1986; Schaeffer et al., 1979), c'est ce qui explique la biodégradation de composés polyramifiés de type isoprénique tel le pristane (2,6,10,14-tétraméthyl pentadécane) (McKenna et Kallio, 1971; Pirnik et al., 1974; Rontani et al., 1986; Ko et Lebealt, 1999; Alvarez, 2003).

L'oxydation des alcanes ramifiés commence généralement par le groupement méthyle terminal le plus éloigné de la ramification et l'acide gras formé est ensuite incorporé dans les lipides cellulaires. Par β -oxydation, la dégradation peut se poursuivre jusqu'à la ramification où une ω -oxydation sera alors nécessaire pour une minéralisation complète de l'alcane.

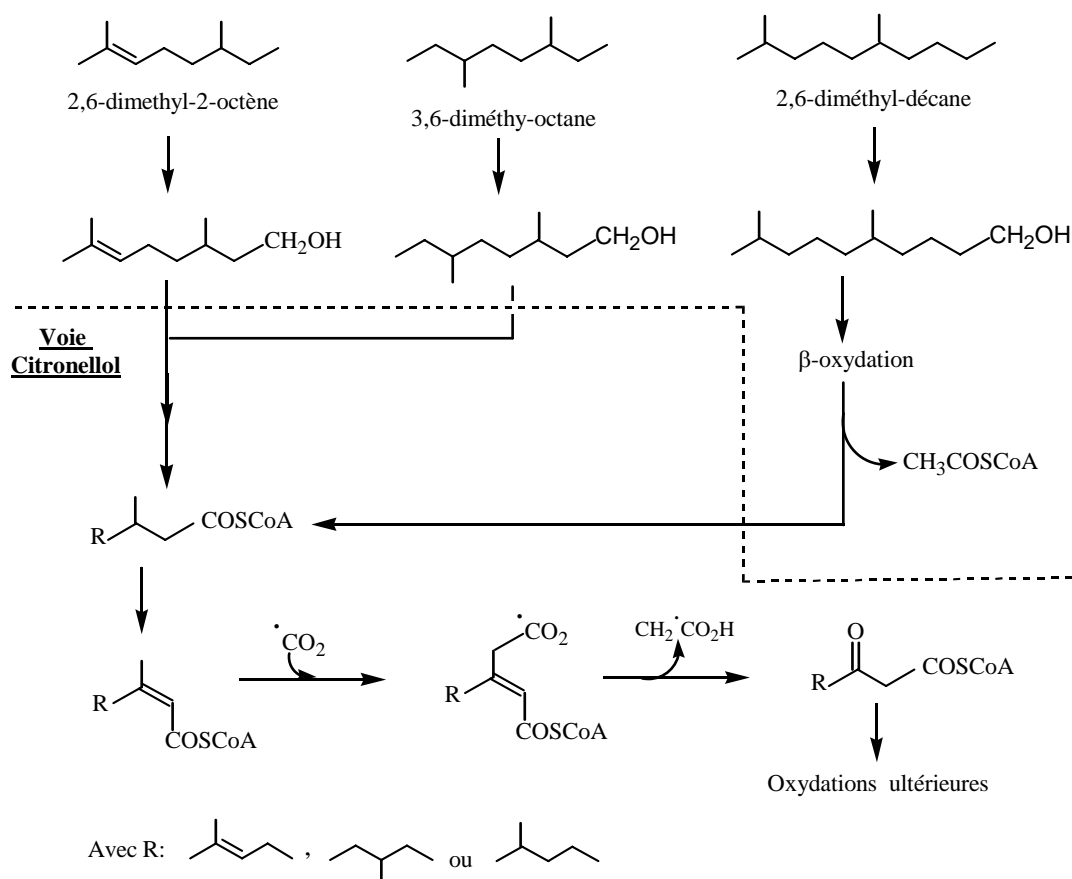


Figure I.10. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures ramifiés par *Pseudomonas citronellolis* suivant la voie "Citronellol"

Plusieurs travaux se sont intéressés aux mécanismes de dégradation du pristane puisque les hydrocarbures isoprénoïques sont des produits naturels ubiquistes et que le pristane est un composé relativement inerte et très utilisé comme marqueur biologique. Les mécanismes de dégradation du pristane souvent rencontrés chez les bactéries sont indiqués à la Figure I.11.

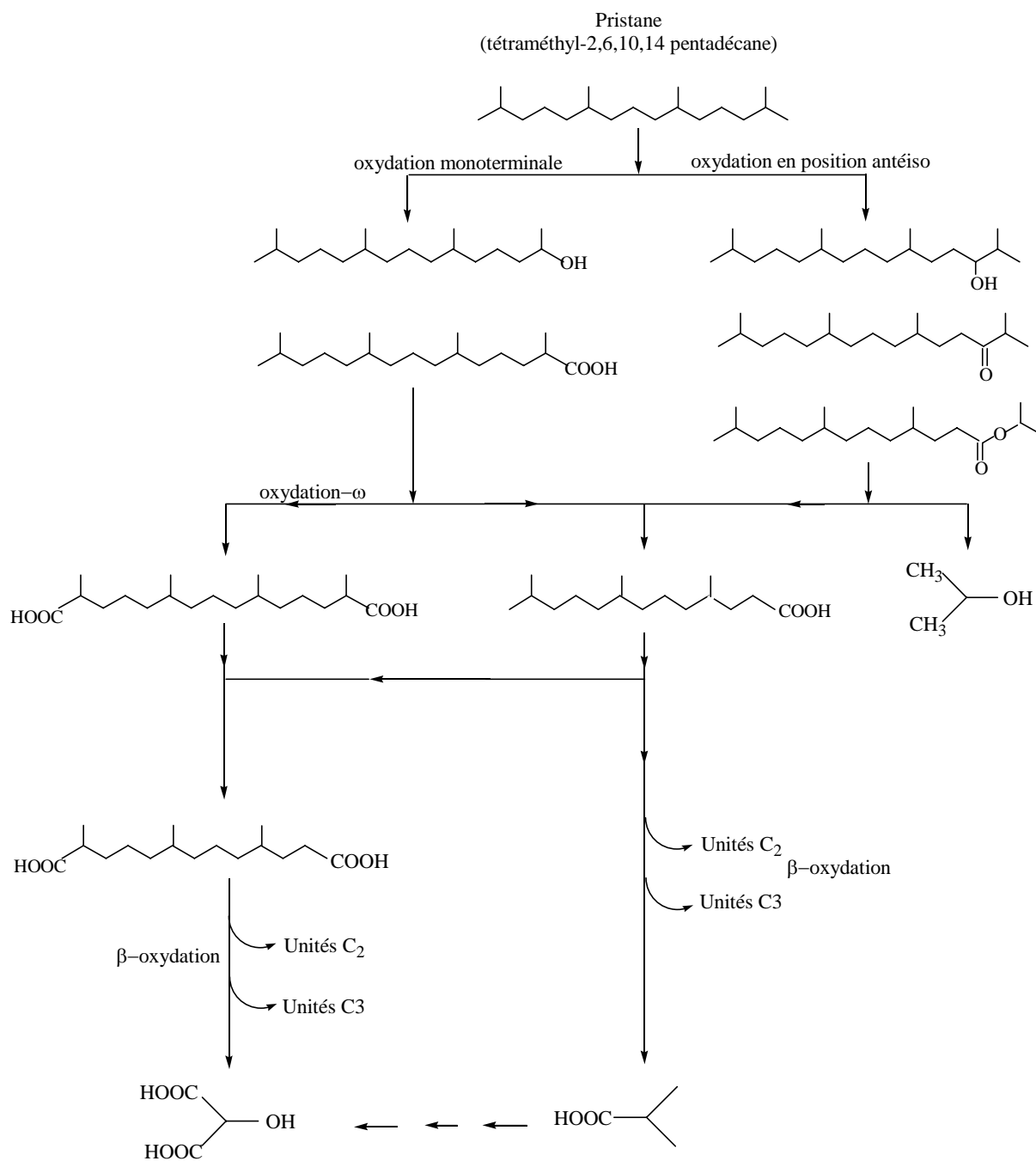


Figure I.11. Mécanisme de dégradation du pristane.

La présence de deux groupements méthyles chacun en position β des extrémités de la chaîne hydrocarbonée (ramification *antéiso*) bloque la dégradation des alcanes linéaires (Schaeffer et al., 1979).

Par ailleurs, Rontani et Giusti (1986) ont montré que l'oxydation directe en position 3 était possible: une population mixte de bactéries marines a en effet oxydé un composé α -disubstitué aux deux extrémités, le 2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane.

Berekaa et Steinbüchel (2000) ont isolé deux souches *Mycobacterium* : *Mycobacterium fortuitum* et *Mycobacterium ratisbonense*, capables d'utiliser l'alcane ramifié le squalane (2,6,10,15,19,23-hexaméthyltétracosane) et son hydrocarbure parent insaturé le squalène comme source unique de carbone. Une partie du mécanisme de dégradation de ce composé correspond à celle du pristane et une autre partie correspond à la voie de Citronellool (Figure I.12).

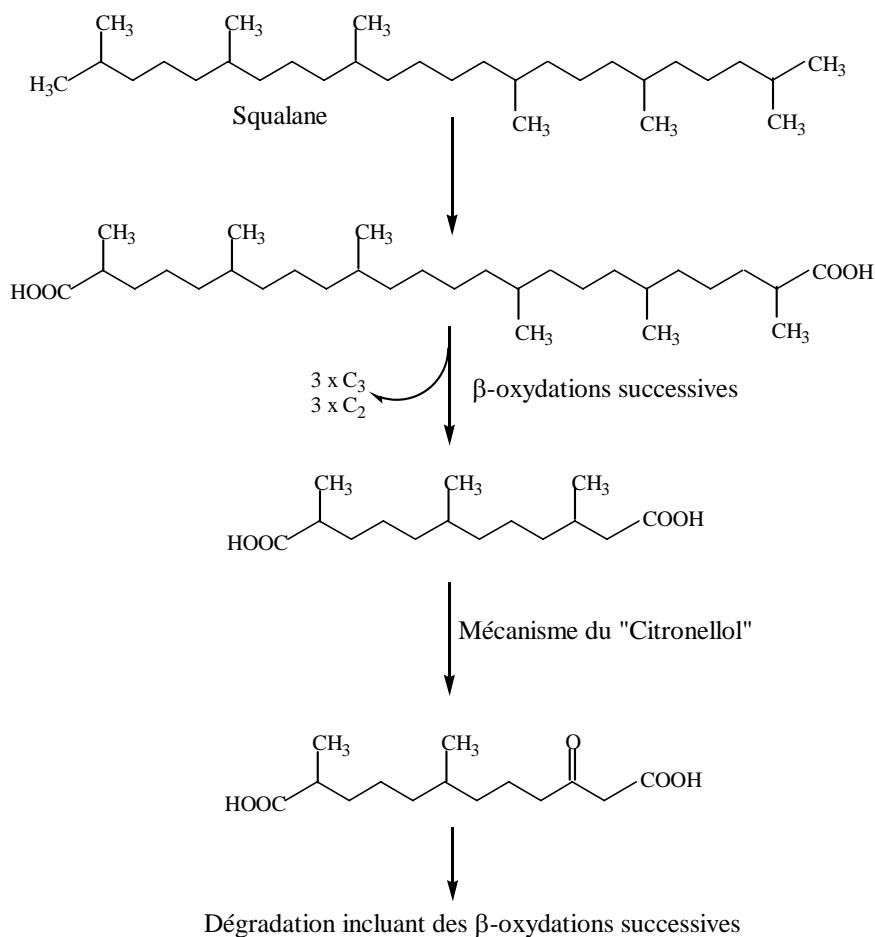


Figure I.12. Voie métabolique de la dégradation du squalane par *Mycobacterium fortuitum* et *ratisbonense* (Berekaa et Steinbüchel, 2000).

II.2.1.3. Biodégradation des alcènes

La voie métabolique la plus importante dans la dégradation des alcènes, correspond à l'oxydation du groupement méthyle terminal pour donner un alcool primaire ω -insaturé, qui à son tour sera oxydé en acide (Stewart et al., 1960). Une autre voie métabolique a été montrée par les études de Van der Linden (1963) et de Huybregtse et Van der Linden (1964) sur l'oxydations des alcènes, qui est la formation d'un époxyde, d'un diol-1,2, d'un α -hydroxy acide et enfin d'un acide saturé (l'aldéhyde qui est un métabolite intermédiaire n'a pas été détecté). Des études ultérieures ont confirmé ce deuxième mécanisme (Markovetz et al., 1967; Klug et Markovetz, 1967; Makula et Finnerty, 1968b; Schwartz et McCoy, 1973; Vaz et al., 1998; Small et Ensign, 1997). La Figure I.13, montre ces deux voies métaboliques dans le cas des alcènes terminaux.

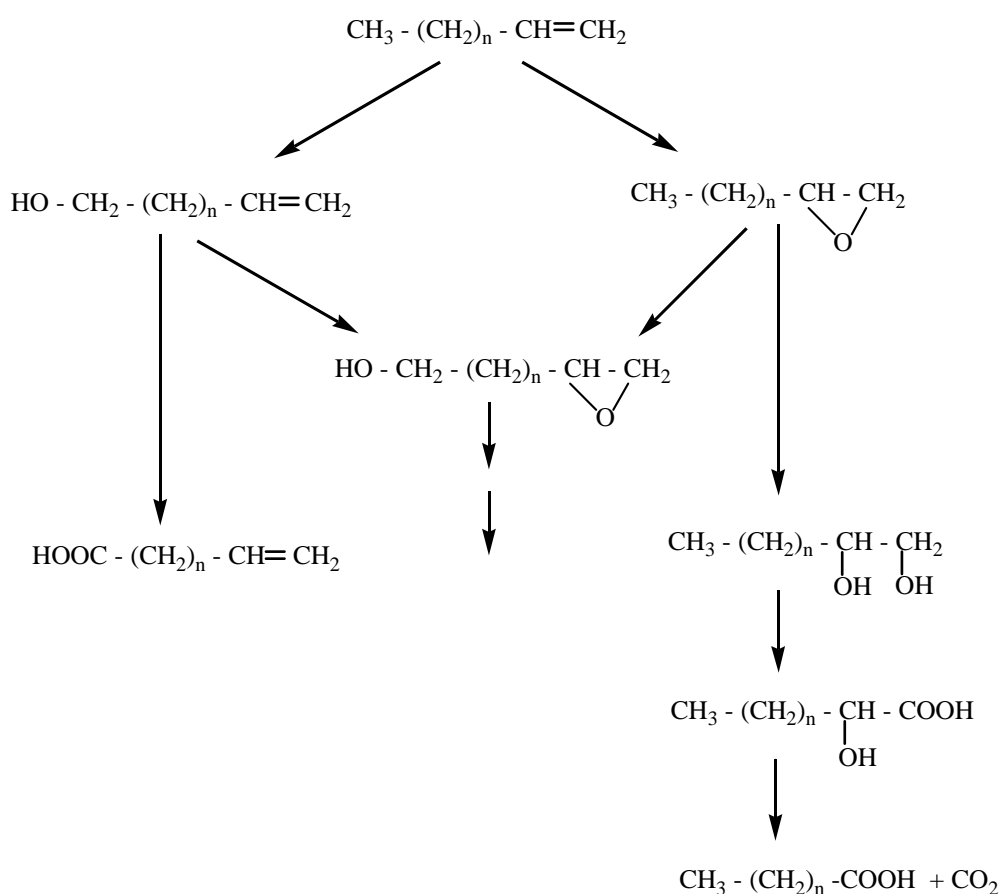


Figure I.13. Voies métaboliques de la dégradation des alcènes terminaux (d'après Ratledge, 1978).

II.2.2. Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques

Le pétrole brut est un mélange complexe contenant notamment des séries homologues de cyclanes alkylés tel que les *n*-alkyl-cyclohexanes et les *n*-alkyl-cyclopentanes (Williams et al, 1988; Kissin, 1990; Dong et al., 1993). De nombreux dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux, tels les stéranes et les triterpanes sont caractéristiques de l'origine du pétrole. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures d'un pétrole brut (Bertrand et Mille, 1989).

L'accumulation de ces composés dans l'environnement, montre leur caractère relativement réfractaire aux attaques microbiennes. Cependant, un grand nombre de microorganismes incluant les champignons, les algues et essentiellement les bactéries sont capables de les dégrader (Davis et Raymond, 1961; Beam et Perry, 1974a; Feinberg et al., 1980; Rontani et Bonin, 1992; Dutta et Harayama, 2001; Rios-Hernandez et al., 2003).

Les cycloalkanes non substitués peuvent être oxydés et transformés en lactones hydrolysables, conduisant ultérieurement à un diacide (Figure I.14) (Beam et Perry, 1974a; Trudgill, 1978).

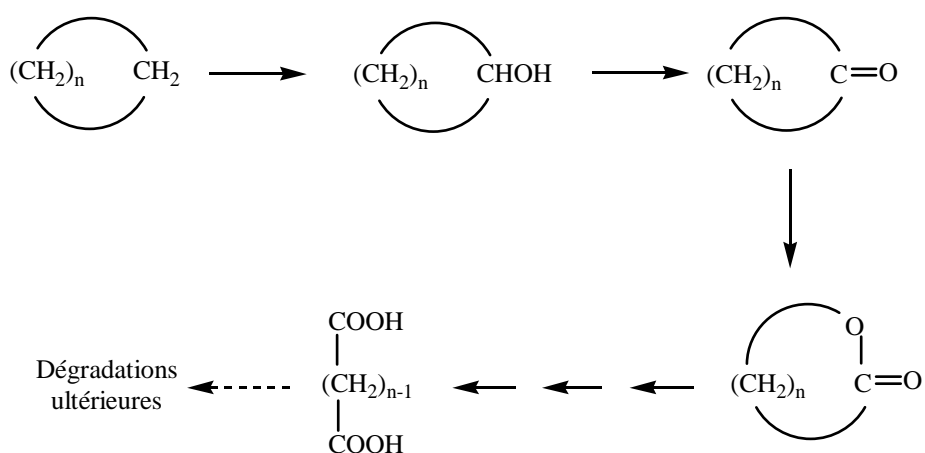


Figure I.14. Biodégradation des cycloalkanes non-substitués (Bertrand et Mille, 1989).

Les dérivés substitués des cycloalkanes sont plus facilement dégradés que les molécules parentales homologues. La dégradation des cyclohexanes *n*-alkyl substitués a été largement étudiée du fait de leur présence dans le pétrole brut et leur accumulation dans l'environnement.

Généralement, le groupement méthyle terminal de la chaîne *n*-alkyl de ces composés est initialement oxydé en acide carboxylique ; un processus de dégradation par β -oxydation conduit ensuite à l'acide cyclohexylcarboxylique ou à l'acide cyclohexyl-acétique suivant que le nombre d'atomes de la chaîne alkyle est impair ou pair (Dutta et Harayama, 2001; Rontani et Bonin, 1992; Trudgill, 1978; Feinberg et al., 1980). Ces derniers métabolites peuvent être dégradés par un mécanisme d'hydroxylation, aromatisation et une ouverture du cycle selon plusieurs mécanismes dépendant de la parité de la chaîne alkyle (Trudgill, 1978). Les voies métaboliques sont rapportées sur la Figure I.15.

Rontani et Bonin (1992) ont montré qu'en présence d'un mécanisme d' α -oxydation la production de l'acide cyclohexylcarboxylique est possible à partir d'un alkyl-cyclohexane à nombre pair d'atomes de carbone tel que le dodecylcyclohexane. L'acide cyclohexylcarboxylique formé est ensuite métabolisé par un mécanisme classique de β -oxydation (Guyer et Hegeman, 1969; Blakley et Papish, 1982; Rontani et Bonin, 1992), comme le montre la Figure I.16.

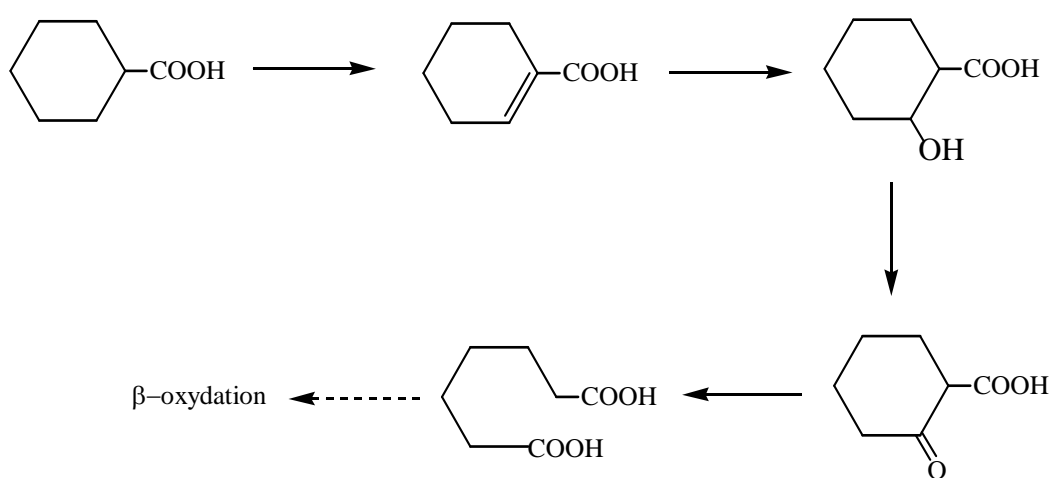


Figure I.16. Assimilation de l'acide cyclohexyl-carboxylique par *Alcaligenes* sp. PHY 12 suivant un mécanisme de β -oxydation (Rontani et Bonin, 1992).

Nous tenons à signaler que les phénomènes de co-oxydation sont très importants dans la dégradation totale de ce type de composés. En effet, certaines bactéries présentent une complémentarité enzymatique leur permettant la dégradation totale des cycloalcanes et des cyclanes substitués.

II.2.3. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques sont des polluants ubiquistes dans l'environnement. Plusieurs sortes d'hydrocarbures aromatiques et polycycliques aromatiques existent avec une grande variété de substituants alkyles en certaines positions, dépendant de leurs origines. En plus de leur présence dans le pétrole (10 à 30 % des hydrocarbures totaux), les hydrocarbures aromatiques sont produits en quantité importante par l'activité humaine, et notamment dans les processus de pyrolyse et de combustion mis en œuvre dans l'industrie, le transport et le chauffage. Ils sont détectés dans des échantillons d'air, d'eau et de sol, ainsi que dans les végétaux et les aliments. A part le cas particulier des aromatiques monocycliques, les pouvoirs mutagène et cancérogène apparaissent pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques à partir de quatre cycles et sont particulièrement marqués pour les hydrocarbures polycycliques aromatiques à cinq et six cycles (Bouchez et al., 1996).

Plusieurs travaux de recherche ont fait l'objet de la distribution des hydrocarbures polycycliques aromatiques dans l'environnement et leurs effets sur la santé humaine: plusieurs de ces composés ont été reconnus cancérigènes.

Les hydrocarbures de faible poids moléculaire sont très solubles dans l'eau et par conséquent très toxiques pour les microorganismes. Ils peuvent interagir avec la membrane cellulaire des microorganismes (Sikkema et al., 1992, 1994; de Smet et al., 1978; Uribe et al. 1985). Ces interactions conduisent à des changements structuraux et fonctionnels de la membrane, ce qui par conséquent, peut diminuer la croissance et l'activité cellulaire (Uribe et al., 1990; Sikkema et al., 1994) .

La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est très importante pour l'élimination de ces composés des systèmes aquatiques et terrestres. Les procaryotes et les eucaryotes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques dont la taille peut varier du benzène au benzo(a)-pyrène (Cerniglia, 1984). Les bactéries oxydent initialement les hydrocarbures aromatiques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration *cis* (Gibson et al., 1975). Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. L'oxydation des *cis*-dihydrodiols conduit à la formation de catéchols (Gibson et al., 1968). Généralement, l'oxydation se poursuit par une rupture *ortho* (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) ou *méta* (rupture d'une liaison entre un

carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) du cycle qui est assuré par une autre dioxygénase (Dagley, 1971), comme le montre la Figure I.17 correspondant à la dégradation du benzène.

Pour les dérivés méthylés du benzène tel que le toluène ou le xylène, l'oxydation dépend du microorganisme. L'attaque enzymatique initiale peut se faire au niveau du groupement méthyle pour donner l'acide benzoïque, ou sur le cycle aromatique pour former des méthyl-catéchols, ou sur les deux à la fois (Hopper, 1978; Cerniglia, 1984).

En ce qui concerne les alkyl-benzènes qui sont des produits caractéristiques du pétrole et dont la présence est utilisée comme indicateur de contamination pétrolière des sédiments et des organismes marins (Bouchez et al., 1996), plusieurs travaux de recherche se sont intéressés à l'étude de leur voies métaboliques de dégradation par les bactéries (Chablain et al., 2001; Wilkes et al., 2000; Budzinski et al., 1998; Amund et Higgins, 1985; Dutta et Harayama, 2001; Sariaslani et al., 1974). Généralement, il se produit une oxydation du groupement méthyle terminal qui donne l'acide phényl-alcanoïque correspondant, qui par une série de β -oxydations peut conduire à l'acide benzoïque ou à l'acide phényl-acétique en fonction du nombre d'atomes de la chaîne alkyle. La dégradation peut s'arrêter à ce stade ou se poursuivre au niveau du cycle aromatique. Dans certains cas la co-oxydation par des populations microbiennes mixtes peut jouer un rôle très important dans la dégradation complète de ces composés (Hopper, 1978). Par ailleurs, Rontani et al. (1987) ont montré que la photo-oxydation des alkylbenzènes permettait d'accélérer leur dégradation par les bactéries.

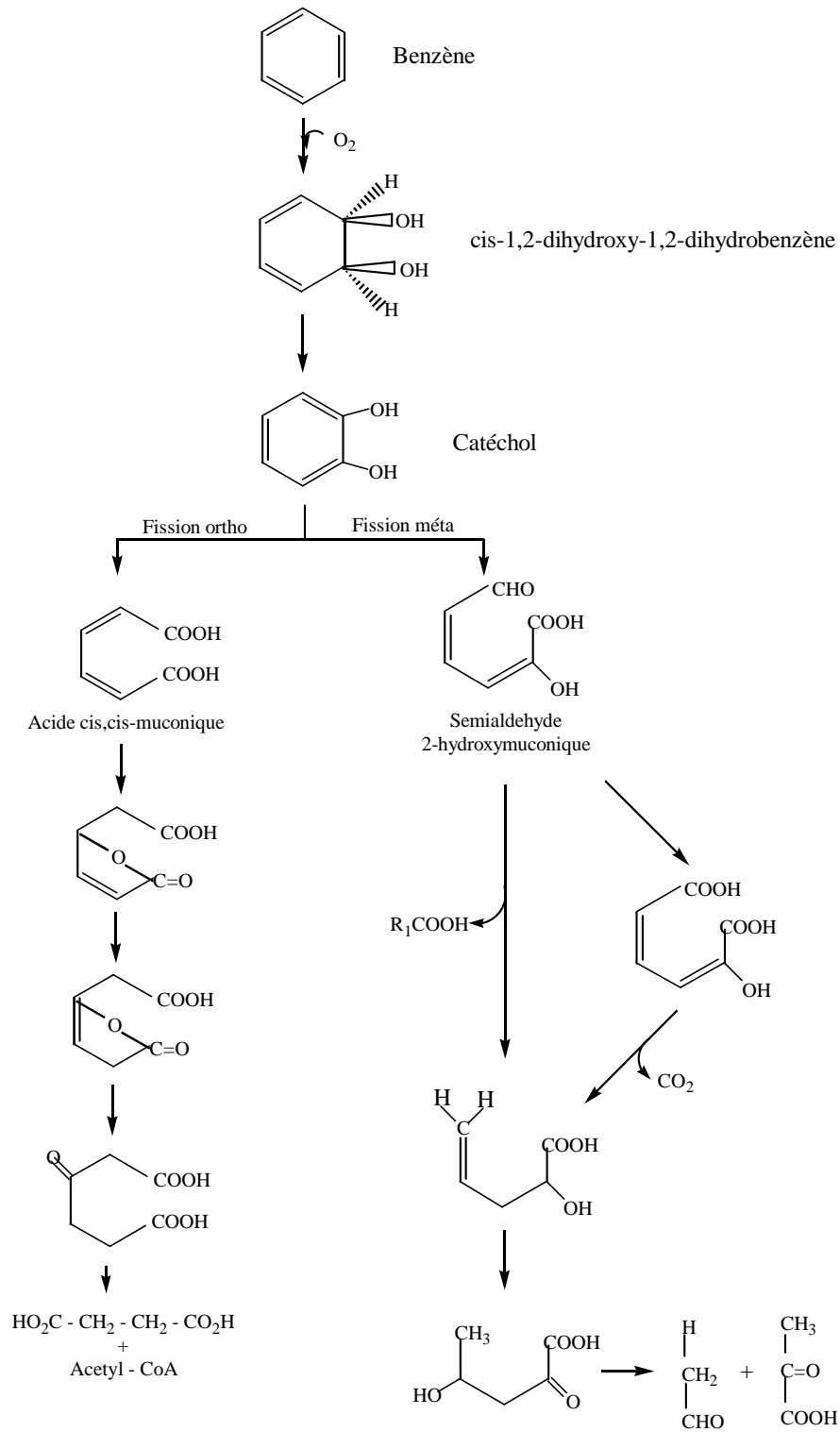


Figure I.17. Voies métaboliques de la dégradation du cycle aromatique: cas du benzène.

II.3. FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES AFFECTANT LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont: la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique (Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981).

II.3.1. Composition chimique des hydrocarbures

La spécificité des substrats à l'attaque microbienne a été largement étudiée. Atlas (1981) et Leahy et Colwell (1990), ont classé les composés du pétrole en quatre familles: les hydrocarbures saturés, les aromatiques, les asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxides, et amides). Ces composés diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible.

Les hydrocarbures saturés incluent les *n*-alcane, les alcanes ramifiés et les cycloalcanes (naphtènes). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants (10 à 40 % des hydrocarbures totaux dans le cas du pétrole léger et peuvent atteindre dans certains cas 60 %) et les plus rapidement dégradables: les *n*-alcane à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les microorganismes mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C₁₀-C₂₄) sont généralement les plus facilement dégradables. Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les *n*-alcane et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des microorganismes (Sikkema et al., 1994, 1995). Les expériences montrent de façon non équivoque que la biodégradation des cycloalcanes est très limitée (Atlas, 1981). La non accumulation des

hydrocarbures cycliques dans l'environnement, implique des phénomènes non conventionnels de dégradation tel que l'intervention des phénomènes de co-oxydations impliquant plusieurs souches microbiennes dont l'équipement enzymatique est complémentaire (Bertrand et al., 1983; Perry, 1979; Rontani et al., 1985; Leahy et Colwell, 1990).

Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Bertrand et Miller, 1989). Des études sur la transformation de ces hydrocarbures par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire (Sikkema et al., 1995). Les hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaires constituent généralement 2 à 20 % des hydrocarbures des pétroles légers et moins de 2 % des hydrocarbures des pétroles lourds (Congress of the United States, Office of Technology Assessment, 1991), tels que les alkyl-benzènes légers qui sont les plus toxiques à cause de leur solubilité dans l'eau, mais peuvent cependant être métabolisés par les microorganismes quand ils sont présents en faibles concentrations. La structure moléculaire de ces substrats détermine la vitesse de leur dégradation: un grand nombre de substituants méthyle empêche l'oxydation initiale (Cooney et Summers, 1976; Atlas et al., 1981). Les polyaromatiques sont moins toxiques pour les microorganismes, mais ils sont rarement métabolisés et quand ils le sont leur biodégradation est lente: c'est ce qui explique leur accumulation dans l'environnement. Ces hydrocarbures aromatiques lourds constituent 2 à 10 % des hydrocarbures des pétroles légers et plus de 35 % des hydrocarbures des pétroles lourds.

Les asphaltènes et les résines constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5 % du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25 % d'asphaltènes et 20 % de résines. Cette dernière classe de composés pétroliers n'est pas biodégradable ou très lentement dégradable

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition (Atlas, 1975); à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd.

Par exemple, un brut à très faible teneur en soufre et très riche en composés saturés (exemple: Louisiane du Sud) (Tableau I.2) sera facilement biodégradé, contrairement à un fuel de type "Bunker C", à très haute teneur en soufre et composés aromatiques. Nous signalons également que les *n*-alcane contenus dans un pétrole provenant du Vénézuéla sont moins bien dégradés que ceux présents dans un pétrole de type "Léger d'Arabie", par suite de la présence de produits à plus longue chaîne.

Tableau I.2. Proportions des différentes familles de composés dans divers bruts pétroliers (d'après Bertrand et Mille, 1989).

Bruts Pétroliers	Saturés	Aromatiques	Polaires (résines)	Asphaltènes
Louisiane du Sud	69	20	10.3	0.3
Koweït	44	28.3	23.2	4.5
Bunker C	21.1	34.2	30.3	14.4
Léger d'Arabie	48	35	9	7.5
Tunisien (Asthart)	48	32	12	8
Vénézulierien	46	21.6	19.3	9
Prudhoe Bay	55	25	10	10

Ratledge (1978), a rassemblé des règles qui ont une application générale à l'ensemble des micro-organismes:

- 1- Les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de micro-organismes, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement.
- 2- Les *n*-alcanes à chaînes courtes, tel que le *n*-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seules quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcanes plus courts que le *n*-octane. Quand la longueur de chaîne augmente au delà de C₉, le facteur de production augmente, mais la vitesse d'oxydation décroît.
- 3- Les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés.
- 4- Les composés ramifiés sont moins rapidement dégradés que les composés non substitués.

II.3.2. Etat physique et concentration des hydrocarbures ou du pétrole.

Les hydrocarbures tendent à se dissiper dans l'eau formant ainsi des marées noires. Sous l'action du vent et des vagues, le pétrole dans l'eau et l'eau dans le pétrole peuvent former des émulsions, ce qui augmente la surface du pétrole et par conséquent favorise l'attaque microbienne. Par contre les grandes masses ou les nappes de mousse pétrolière de viscosité très importante et qui ont un rapport surface/volume faible inhibent la croissance.

La formation d'émulsions par la production et la sécrétion de biosurfactants est un processus très important dans l'assimilation des hydrocarbures par les bactéries (Kaplan et al., 1987; Hommel, 1994; Goswani et Singh, 1991; Broderick et Cooney, 1982; Pines et Gutnick, 1986, Zhang et Miller, 1992).

La dispersion artificielle a été étudiée comme moyen d'augmentation de la surface de contact entre les hydrocarbures et les membranes cellulaires des microorganismes, cependant, les dispersants sont dans la plupart du temps toxiques et peuvent conduire à des dommages dans la faune et la flore, et ils peuvent aussi inhiber le processus microbien (Leahy et Colwell, 1990).

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses. Ratledge (1978) rapporte que les *n*-alcane de courtes chaînes ($< C_9$) sont très toxiques pour les microorganismes alors que ceux plus longs que le *n*-nonane, les alcènes $> C_{12}$, les alkyle-bromides $> C_{10}$, et les alcanols $> C_{14}$ ne sont toxiques pour aucun microorganisme. Broderick et Cooney (1982), ont montré que la dégradation des *n*-alcane longs ($\geq C_{12}$), pour lesquels les solubilités sont inférieures à 0,01 mg/l s'effectue à des vitesses qui dépassent les vitesses de dissolution des hydrocarbures et sont fonction de la surface des hydrocarbures disponibles pour l'émulsification et leur fixation par les cellules.

II.3.3. Influence de la température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (Atlas, 1981; Leahy et Colwell, 1990).

A basse température, la viscosité du pétrole augmente, la volatilisation des composés toxiques pour les microorganismes tels que les alcanes de faibles poids moléculaires est réduite et leur solubilité dans l'eau augmente par diminution de leur volatilisation, ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes (Atlas et Bartha, 1972; Atlas, 1975). Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de

l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (Walworth et al., 2001; Sandvik et al., 1986; Song et al., 1990). Si l'oxydation des hydrocarbures a été observée à des températures inférieures à 0 °C (Rike et al., 2003), ou élevées 70-80 °C (Annweiler et al, 2000), le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C (Bossard et Bartha, 1984). Au delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique. Röling et al. (2003) mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au delà de 80-90°C malgré l'isolement de bactéries thermophiles (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Thermodesulfobacterium*) et d'Archae hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100°C.

II.3.4. Influence de l'oxygène

L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable (Leahy et Colwell, 1990; Atlas, 1981; Bertrand et Mille, 1989). Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est inexistant, en effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des microorganismes hydrocarbonoclastes. Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole; Zobell (1969), a calculé que la quantité d'oxygène dissoute dans 320 m³ d'eau de mer est nécessaire pour l'oxydation de 1 l de pétrole brut.

Dans un site très pollué, on aboutira fréquemment à un ralentissement de la biodégradation par suite d'une carence en oxygène. Marin et al. (1996), en étudiant les facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux et des *n*-alcanes de 10 % après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation.

Les sédiments aquatiques, sont par contre généralement anoxiques, à l'exception de la fine couche superficielle (Leahy et Colwell, 1990). Bertrand et al.(1986), ont étudié dans des systèmes à flux continu, l'évolution des différents hydrocarbures en fonction de la

concentration en oxygène. Ils ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures a lieu essentiellement dans la partie superficielle des sédiments (0-1 cm), où la concentration en oxygène est de 8 ppm, alors qu'elle est plus faible en profondeur. Par contre aucune dégradation n'a été observée dans des conditions anaérobies (0,2-0,3 ppm), en dépit d'une activité sulfato-réductrice très élevée dans les sédiments.

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols (Hurst et al., 1996, El-Kadi, 2001) et les eaux souterraines (Boyd et al., 2001).

La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme de moindre importance.

II.3.5. Influences des éléments nutritifs

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements aquatiques, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (Leahy et Colwell, 1990). Le pétrole lui-même contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple: dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes (Bertrand et Mille, 1989). Les sources d'azote et de phosphore sont toujours faibles, surtout pendant les périodes de forte activité des organismes photosynthétiques.

L'azote et le phosphore sont aussi des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols (Walworth et al., 2001, 2003; Mohn et Stewart, 2000).

II.3.6. Effet de la salinité et du pH

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5 % et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3% et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes (Bertrand et Mille, 1989). Quand la concentration en chlorure de sodium dépasse 1 M, l'élimination du pétrole brut diminue rapidement. Pour ce type de substrat, les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (Al Mallah, 1988; Tagger et al., 1976; Bertrand et

al., 1990). Bertrand et al. (1993) ont étudié l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, ils ont trouvé que la biodégradation est maximale pour une concentration de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci. Ward et Brock (1978) ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4‰, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

L'effet de la concentration en NaCl sur la biodégradation dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone (Bertrand et al., 1993); Fernandez et al. (1996) ont montré que la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bactérie marine halotolérante dégrade l'eicosane, avec un taux de biodégradation de 90% pour des concentrations en chlorure de sodium comprises entre 0,2 et 2,5 M.

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (Leahy et Colwell, 1990). Dibble et Bartha (1979) et Hambrick et al. (1980) ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

Quel qu'il soit, le pH des milieux marins n'atteint jamais des valeurs suffisamment extrêmes pour inhiber la biodégradation.

II.3.7. Effet de la pression

La pression n'est considérée comme une variable dans la biodégradation des hydrocarbures que dans les profondeurs des océans (Leahy et Colwell, 1990; Bertrand et Mille, 1989; Atlas, 1981). En effet, le pétrole qui n'est pas dégradé dans les eaux de surface va progressivement s'enfoncer, en subissant une lente transformation, et ce sont les molécules difficilement dégradables qui atteindront le fond des océans. La profondeur moyenne de ceux-ci est de 3800 m (ce qui correspond à une pression de 380 bars) et la température est inférieure à 5 °C (Bertrand et Mille, 1989). Schwarz et al. (1974, 1975) ont étudié la croissance et l'utilisation des hydrocarbures par les bactéries isolées de sédiments marins

profonds, en fonction de la pression. Ils ont trouvé que la vitesse d'utilisation des hydrocarbures est fortement diminuée à hautes pressions. Sous une pression de 1 bar (pression atmosphérique), ces bactéries dégradent 94 % de l'hexadécane en 8 semaines alors qu'il leur faut 40 semaines pour arriver au même résultat à 500 bars. Il apparaît donc, que les hydrocarbures qui parviennent aux grandes profondeurs océaniques sont très lentement dégradés par les microorganismes et par conséquent peuvent persister pendant de longues périodes.

III. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES DANS LES gisements DE PETROLE et voies anaerobies

III.1. BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES DANS LES PUIITS DE PETROLE

La biodégradation du pétrole conduit à une diminution du pourcentage des hydrocarbures facilement biodégradables (*n*-alcanes, alcanes monocycliques, phénylalcane) et par conséquent une augmentation de sa densité, de sa teneur en soufre, de son acidité et sa viscosité (Connan, 1984; Lal et Khanna, 1996). Ces changements ont des conséquences économiques négatives sur la production du pétrole et les opérations de son raffinage.

L'activité microbiologique dans les puits de pétrole peut être le résultat des activités humaines par introduction de microorganismes et de produits chimiques (nutriments, accepteurs d'électrons) lors de l'exploitation des gisements. Ces derniers peuvent stimuler la croissance microbienne et donc induire des modifications dans la composition du pétrole.

La biodégradation aérobie des hydrocarbures dans les gisements de pétrole a été largement étudiée (Evans et al., 1971; Hunt, 1979; Winters et Williams, 1969). Cependant, il a été montré que l'apport en oxygène dans ces gisements est insuffisant pour assurer l'activité microbiologique aérobie (Horstad et al., 1990, 1992), il a donc été suggéré que la biodégradation anaérobie est le processus prépondérant dans la dégradation des hydrocarbures dans les roches réservoirs de pétrole (Röling et al., 2003; Zengler et al., 1999; Wilkes et al., 2001; Widdel et Rabus, 2001). En effet, les premières bactéries isolées des eaux provenant des champs de pétrole par Bastin (1926) étaient anaérobies et Connan et ses collaborateurs (Bernard et Connan, 1992; Magot et Connan, 1993; Connan et al., 1996) ont montré la présence de différents organismes anaérobies dans les gisements de pétrole. Ils ont avancé l'hypothèse que ces organismes sont majoritairement responsables de la dégradation des

hydrocarbures en profondeurs. La détection de métabolites spécifiques, produits uniquement par voies métaboliques anaérobies a confirmé cette hypothèse (Röling et al., 2003).

Dans les réservoirs, 80 % du volume est occupé par le pétrole alors que les 20 % restants (sous forme de pores) le sont par de l'eau de salinité variable constituant le milieu de croissance des organismes. Les réservoirs de pétrole sont aussi caractérisés par des températures élevées puisque la température augmente de 2 à 3° par 100 mètres de profondeur. Généralement, une biodégradation significative se produit à des températures inférieures à 80 °C (Connan, 1984) correspondant à une profondeur maximale de l'ordre de 4 km, mais cela ne signifie pas que tous les réservoirs à basse température contiennent du pétrole biodégradé (Wilhelms et al., 2001). Au de là d'une température de 80-90 °C, on assiste à une inhibition de la biodégradation (Connan, 1984; Bernard et Connan, 1992; Röling et al., 2003).

Les organismes majeurs responsables de la dégradation des hydrocarbures dans les réservoirs de pétrole sont les bactéries et les archaea et la connaissance du degré de dégradation du pétrole est très importante avant toute exploitation (Larter et al., 2003). Cette dégradation se passe à une vitesse très faible de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} kg d'hydrocarbures/kg de pétrole/an; ce qui nécessite des millions d'années pour perturber la composition du pétrole dans les roches réservoirs (Larter et al., 2003). Par exemple: 15 millions d'années sont approximativement nécessaires pour éliminer les *n*-alcane d'un pétrole lourd et 5 millions d'années pour un pétrole léger. La vitesse de biodégradation est limitée par la diffusion des *n*-alcane vers la surface de contact entre l'eau et le pétrole et la disponibilité d'éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore.

Les conditions physico-chimiques dans les réservoirs de pétrole telles que le pH, la salinité, la pression, les conditions redox et la température, représentent des obstacles dans l'isolement et l'étude des microorganismes présents. La reproduction des conditions *in situ* permet généralement d'isoler des organismes représentatifs (Yanagibayashi et al., 1999). La plupart des informations obtenues ont été recueillies à partir d'échantillons de pétrole provenant des réservoirs: des bactéries thermophiles (*Thermotoga*, *Thermoanaerobacter*, *Thermodesulfobacterium*) et des archaea hyperthermophiles (*Thermococcus*, *Archeaoglobus*) ont été isolées d'échantillons de pétrole provenant d'un gisement à 1670 mètres de profondeur (Grassia et al., 1996), ces microorganismes peuvent se développer dans des conditions comparables à celles *in situ* (74-171 mM NaCl, 65-70 °C et une pression comprise entre 50 et 150 bars).

III.1. VOIES DE DEGRADATION ANAEROBIE

De nombreux microorganismes ont développé des capacités métaboliques leur permettant d'utiliser les hydrocarbures comme donneurs d'électrons et comme sources de carbone pour la synthèse cellulaire.

La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle, alors que l'utilisation de ces composés dans des conditions anoxiques (sédiments profonds et réservoirs de pétrole) n'a été étudiée que durant la dernière décennie. En effet, il a été largement admis que pour les bactéries dégradant les hydrocarbures en aérobiose, la présence d'oxygène moléculaire est indispensable pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures (Britton, 1984; Gibson et Subramanian, 1984). Cette activation se traduit par l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyles dans la molécule apolaire. L'absence de l'oxygène moléculaire dans les environnements anoxiques nécessite un nouveau mode d'activation biochimique pour convertir les hydrocarbures apolaires en des composés comportant des groupements fonctionnels: la présence de groupements fonctionnels (hydroxyle, carbonyle ou carboxyle) dans les composés organiques est indispensable pour toute réaction d'oxydation ultérieure (Spormann et Widdel, 2000; Widdel et Rabus, 2001).

Différentes souches de bactéries anaérobies capables de dégrader les hydrocarbures ont été isolées de sites contaminés. Ces bactéries utilisent le nitrate, le fer (III) ou le sulfate comme accepteurs d'électrons (Figure I.18). Un mécanisme de dégradation par méthanogénèse peut avoir lieu dans des environnements où l'oxygène, le nitrate, le fer (III) et le sulfate sont totalement absents (Zengler et al., 1999).

Le tableau I.3, montre des exemples de bactéries anaérobies dégradant les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques classées en fonction de l'accepteur d'électrons.

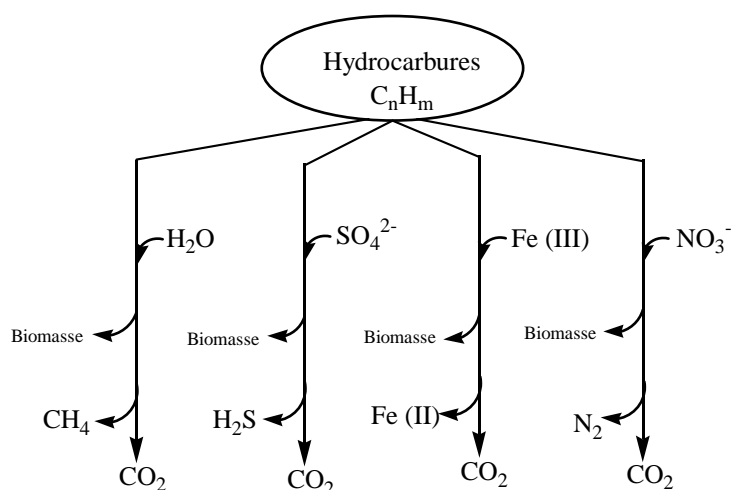


Figure I.18. Les différentes voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures en fonction de l'accepteur d'électrons.

Tableau I.3. Exemples de bactéries anaérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques.

Espèce ou souche bactérienne	<i>HYDROCARBURES METABOLISES</i>	Références
Bactéries dénitrifiantes		
<i>Thauera aromatica</i> T1	Toluène	Evans et al. (1991)
<i>Azoarcus toluolyticus</i> Td15	Toluène, <i>m</i> -xylène	Fries et al. (1994)
<i>Azoarcus</i> sp. souche EB1	Ethylbenzène	Ball et al. (1996)
Souche HxN1	Alcanes (C ₆ -C ₈)	Ehrenreich et al. (2000)
Souche HdN1	Alcanes (C ₁₄ -C ₂₀)	Ehrenreich et al. (2000)
Bactéries réduisant le fer		
<i>Geobacter metallireducens</i> GS15	Toluène	Loveley et Lonergan (1990)
Bactéries réduisant le sulfate		
<i>Desulfobacula toluolica</i>	Toluène	Rabus et al. (1993)
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	Toluène	Harms et al. (1999)
Souche AK-01	Alcanes (C ₁₃ -C ₁₈)	So and Young (1999)

La dégradation des hydrocarbures aromatiques et en particulier le toluène a été la plus étudiée du fait qu'elle assure une croissance rapide des bactéries. Des études récentes, ont montré que l'étape initiale dans la dégradation des *n*-alcanes, du toluène, des xylènes et de l'éthylbenzène par les bactéries dénitrifiantes se traduit par l'introduction d'une molécule de fumarate pour former un substituant succinate (Heider et al., 1999; Spormann et Widdel, 2000; Widdel et Rabus, 2001), comme le montre la Figure I.19.

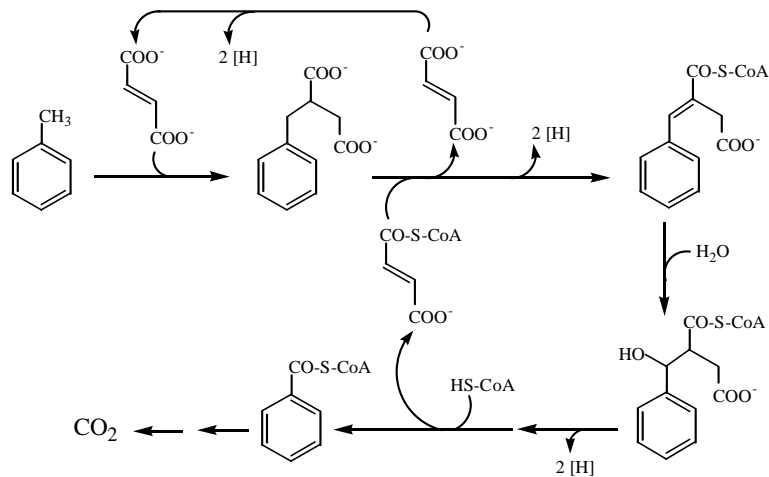


Figure I.19. Métabolisme de dégradation du toluène par les bactéries dénitrifiantes.

La dégradation du propylbenzène par les bactéries dénitrifiantes s'effectue par hydroxylation pour donner le 1-phenyl-1-propanol et ensuite la propiophénone (Figure I.20; Rabus et Widdel, 1995).

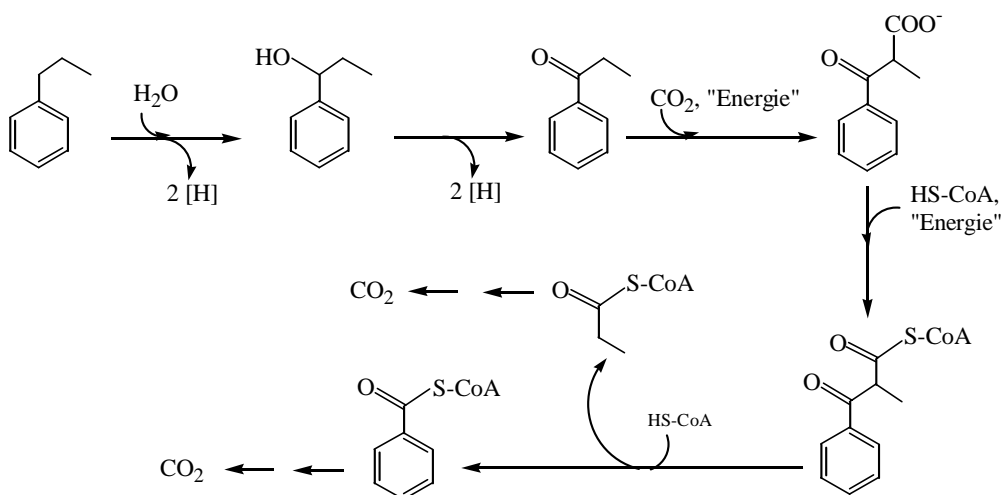


Figure I.20. Métabolisme de dégradation du propylbenzène par les bactéries dénitrifiantes.

La dégradation anaérobie du toluène et des alkylbenzènes tel que le *m*-xylène ou l'éthylbenzène a été également étudiée pour différents accepteurs d'électrons. L'activation des hydrocarbures saturés s'effectue par l'addition d'un composé carboné plutôt que par désaturation ou hydratation. Enfin, il faut noter que la dégradation des hydrocarbures en anaérobiose compte encore des domaines mal connus.

IV. LES LIPIDES DES BACTERIES GRAM-NEGATIVES

Un très grand nombre de bactéries hydrocarbonoclastes sont des bactéries Gram-négatives (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*), et incluent les bactéries étudiées dans nos travaux. Il est donc important de faire le point sur la composition de leurs lipides. Ceux-ci sont essentiellement localisés dans l'enveloppe cellulaire constituée essentiellement de trois couches: la membrane cytoplasmique, la couche peptidoglycane et la membrane extérieure:

- la membrane cytoplasmique: contient des phospholipides et des protéines en quantités quasiment égales et joue un rôle dans le transport des éléments nutritifs, dans la phosphorylation oxydative et dans la synthèse des phospholipides, du peptidoglycane et des lipopolysaccharides.
- la couche peptidoglycane: est constituée de chaînes linéaires contenant alternativement la N-acétyl-glucosamine et l'acide N-acétylmurannique. Dans les bactéries Gram-négatives, une monocouche de peptidoglycane entoure la membrane cytoplasmique et sa rigidité permet à la cellule de supporter la pression osmotique du cytoplasme qui est de l'ordre de 3,5 bars.
- la membrane extérieure: elle a la même épaisseur que la membrane cytoplasmique, qui est de l'ordre de 7,5 nm. Elle contient 9 à 12 % des protéines cellulaires, alors que les phospholipides et les lipopolysaccharides sont les constituants majeurs. Cette membrane est reliée à la couche peptidoglycane par des liaisons covalentes *via* des lipoprotéines.

Il existe une nette différence de composition entre les parois cellulaires des bactéries Gram-négatives et celles des bactéries Gram-positives (Figures I.21 et I.22). La paroi cellulaire des bactéries Gram-positives est essentiellement constituée par un peptidoglycane, auquel est attachée une fraction lipidique généralement peu importante, et il n'y a pas de membrane externe. En plus du peptidoglycane, on distingue les acides téichoïques qui sont

des polymères de glycérol ou de ribitol joints par des groupes phosphates. Ils sont chargés négativement et jouent un rôle dans la fixation des ions Mg^{++} .

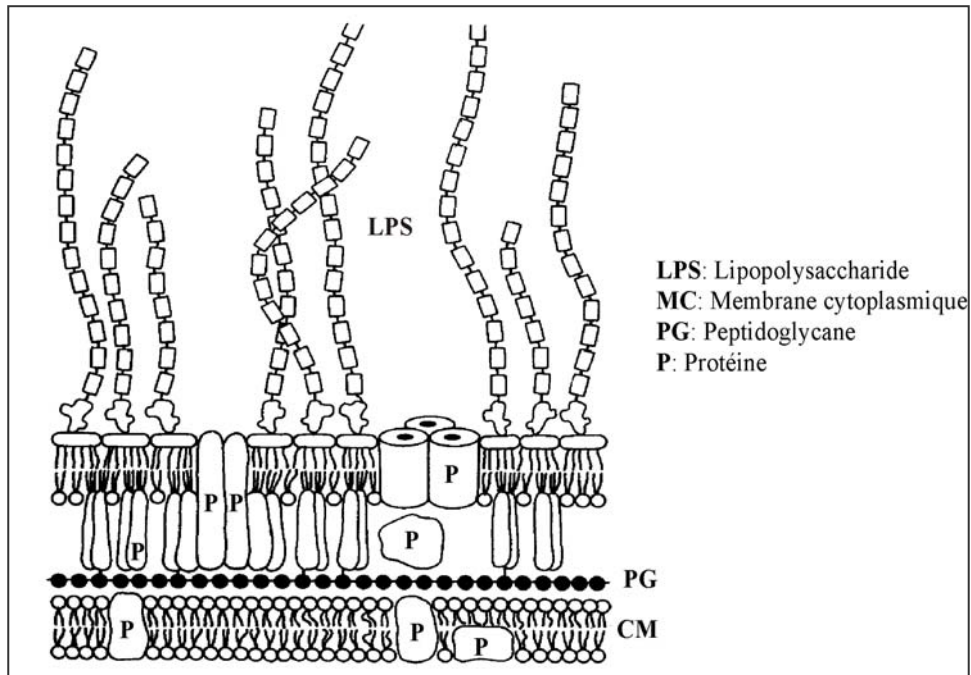


Figure I.21. Structure de la paroi cellulaire des bactéries Gram-négatives (d'après Lugtenberg et Van Alphen, 1983).

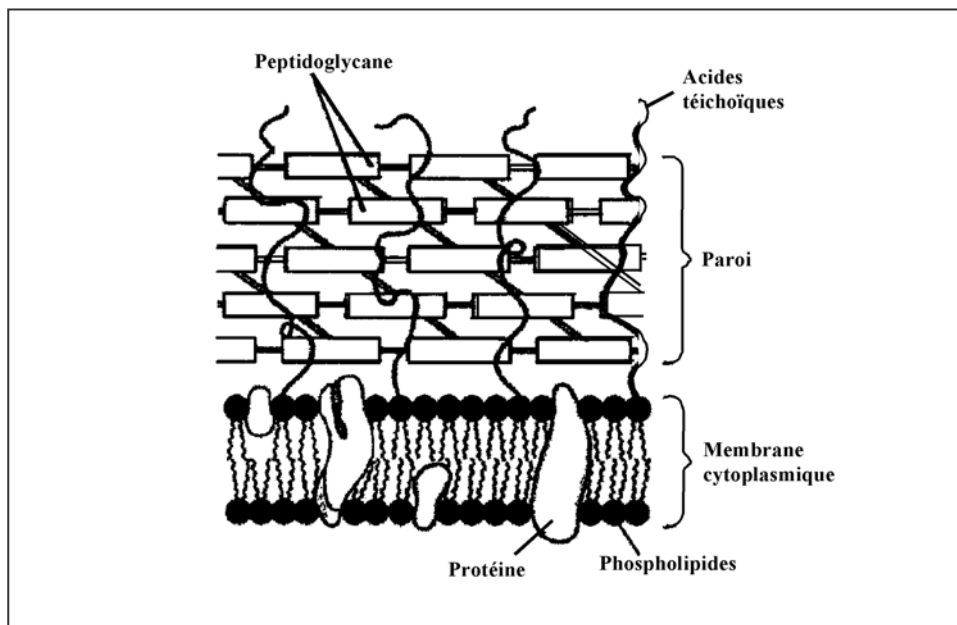


Figure I.22. Structure de la paroi cellulaire chez les bactéries Gram-positives.

IV.1. LES PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides membranaires constituent entre 3 et 9 % du poids sec des bactéries Gram-négatives (Raetz 1978). Généralement, la phosphatidylethanolamine est le constituant majeur des phospholipides dans différentes bactéries Gram-négatives (exemple : *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, ...), d'autres composés tel que le phosphatidylglycérol et le diphosphatidylglycérol (ou cardiolipine) ont été identifiés en quantités importantes (structures indiquées dans la Figure I.23) (Lugtenberg et Van Alphen, 1983; Raetz, 1978; Albelo et Domenech, 1997); ces derniers sont des composés dérivés du 1,2-diacyl-sn-glycerol-3-phosphate (Figure I.23) (d'après Kates, 1986).

Ces phospholipides peuvent se trouver dans des proportions différentes dans les deux membranes cellulaires (den Kamp, 1979). La phosphatidylethanolamine peut constituer jusqu'à 90 % des phospholipides de la membrane extérieure, alors que les deux autres se trouvent en quantités importantes dans la membrane cytoplasmique (Lugtenberg, 1976, 1981; Lugtenberg et Van Alphen, 1983). Les compositions en acides gras des phosphatidylethanolamine, phosphatidylglycérol et cardiolipine sont relativement similaires (Raetz, 1978). Elles sont constituées essentiellement d'acides gras saturés et insaturés ainsi que de leur dérivés cyclopropanes. Dans le cas d'*Escherichia coli*, la membrane extérieure est plus riche en acides gras insaturés alors que la membrane cytoplasmique est enrichie en acides gras insaturés et cyclopropaniques (Lugtenberg et Peters, 1976).

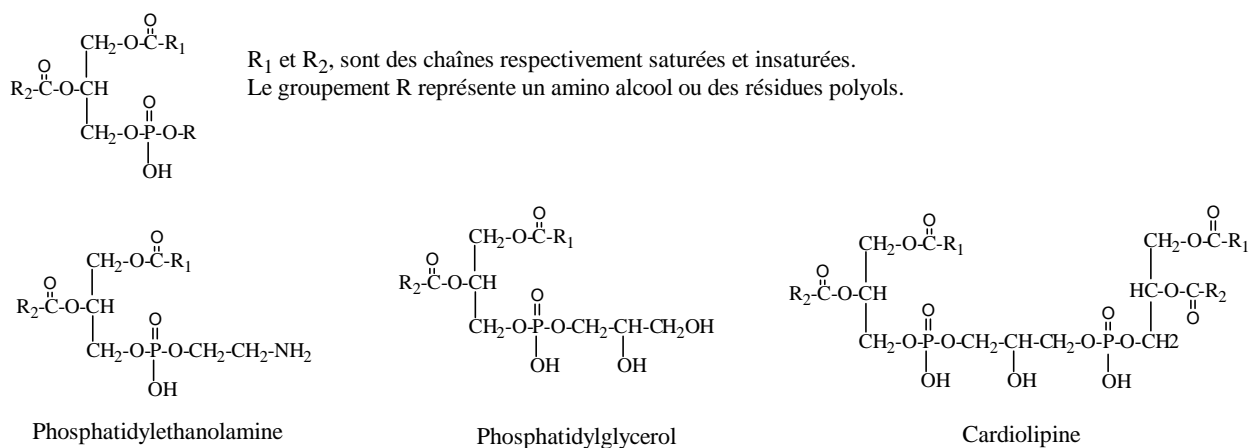


Figure I.23. Structure des phospholipides membranaires les plus importants de *E. coli* (d'après Raetz, 1978).

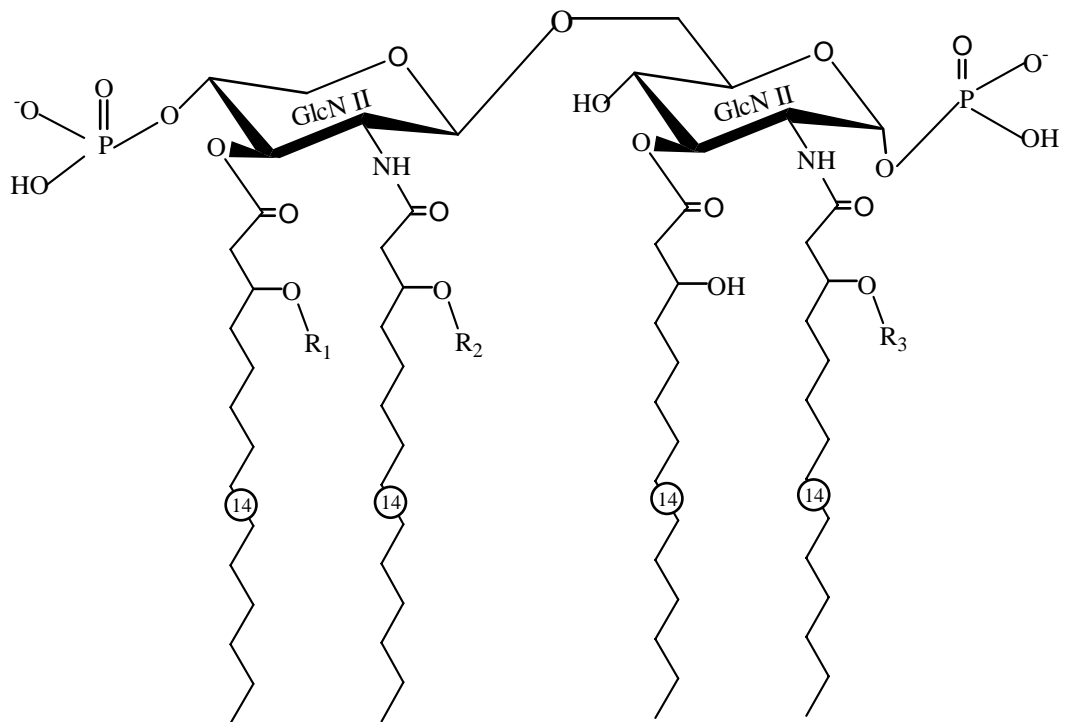
IV.2. LES LIPOPOLYSACCHARIDES

A partir des bactéries Gram-négatives, il est possible d'isoler des substances complexes douées de propriétés toxiques et antigéniques renfermant une partie polysaccharidique et une partie lipidique, ainsi que quelques acides aminés. Ces substances sont appelées lipopolysaccharides parce que, à la différence des glycolipides, elles sont solubles dans l'eau (en donnant d'ailleurs des solutions opalescentes) et insolubles dans les solvants organiques usuels (Asselineau, 1962). La Figure I.24 montre la structure chimique d'un lipopolysaccharide présent chez trois entérobactéries: *Salmonella minnesota*, *Escherichia coli* et *Proteus mirabilis* (Seydel et al., 1984).

Les lipopolysaccharides peuvent atteindre des poids moléculaires très élevés: environ 1 million pour le lipopolysaccharide isolé de *Brucella melitensis*, et 10 millions pour celui de *Serratia marcescens* ou *Shigella dysenteria*.

Le lipopolysaccharide qui est caractéristique des bactéries Gram-négatives, est une molécule amphipatique contenant une partie hydrophobe appelée lipide A libérée par une hydrolyse partielle et une partie hydrophile constituée d'une chaîne de sucres généralement ramifiée. Les sucres fréquemment rencontrés dans les lipopolysaccharides sont: les heptoses (par exemple, D-glycero-D-mannoheptose chez *Chromobacterium violaceum*), des 3,6-didésoxy-sucres (abéquose, colitose, tyvelose, paratose), ou des sucres aminés (par exemple, N-acétyl D-fucosamine chez *C. violaceum*).

Pour une même espèce de bactérie la composition en acides gras est sensiblement différente de celle des phospholipides. Les lipopolysaccharides sont particulièrement riches en acides hydroxycarboxyliques (Bryn and Rietschel, 1978; Seydel et al., 1984; Wilkinson, 1988; Thérissod et al., 2001, 2002; Hussein et al., 2001, Kussak et Weintraub, 2002; Ogawa et al., 2003; Hashimoto et al., 2003) reliés par des liaisons esters ou amides au lipopolysaccharide (Tableau I.4.).



Lipide A	R₁	R₂	R₃
<i>Salmonella. minnesota</i>	14:0	12:0	16:0
	2-OH-14:0		
<i>Escherichia coli</i>	14:0	12:0	H
<i>Proteus mirabilis</i> (37 °C)	14:0	14:0	H, 16:0
<i>Proteus mirabilis</i> (12 °C)	14:0	16:1 ω 7	H, 16:0

Figure I.24. Structure des lipides A lipopolysaccharidiques de quelques entérobactéries (d'après Seydel et al., 1984).

Tableau I.4. Composition en acides gras du lipide A selon le type de liaison aux chaînes polysaccharidiques pour différentes bactéries Gram-négatives.

Lipides	Type de liaison au polysaccharide		Références
	Ester	Amide	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12:0, 3-OH-14:0	3-OH-14:0	Süsskind et al., 1998
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	16:0, <i>i</i> -17:0, 18:0, 20:0 27-OH-28:0	3-OH-12:0, 3-OH- <i>i</i> -13:0 3-OH-20:0, 3-OH- <i>i</i> -21:0 3-OH-22:0, 3-OH-21:1	Choma, 1999
<i>Escherichia coli</i>	14:0, 3-OH-14:0	12:0, 3-OH-14:0	Seydel et al., 1984 Wollenweber et al., 1984
<i>Salmonella minnesota</i>	14:0, 2-OH-14:0 3-OH-14:0	12:0, 16:0, 3-OH-14:0	Seydel et al., 1984 Jiang et al., 2002
<i>Erwinia carotovora</i>	12:0, 3-OH-14:0	12:0, 3-OH-14:0	Fukuoka et al., 2001
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	12:0, 16:1, 16:0, 18:1 3-OH-12:0	14 :0, 3-OH-14:0	Goossens et al., 1989
<i>Shigella flexneri</i>	14:0, 3-OH-14:0	12:0, 3-OH-14:0	Kussak et Weintraub, 2002.
<i>Helicobacter mustelae</i>	14:0, 3-OH-14:0	14:0, 3-OH-14:0	Thérisord et al., 2001
<i>Helicobacter pylori</i>	12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 3-OH-16:0	3-OH-18:0	Moran et al., 1997; Suda et al., 1997
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	16:0, 3-OH-14:0	3-OH-14:0	Thérisod et al., 2002
<i>Yersinia pestis</i>	12:0, 3-OH-14:0	16:1, 3-OH-14:0	
<i>Yersinia ruckeri</i>	12:0, 3-OH-14:0	12:0, 3-OH-14:0	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12:0, 3-OH-14:0	3-OH-14:0	
<i>Xantomonas hortorum</i> pv. <i>vitians</i>	10:0, 3-OH-10:0 3-OH-12:0	3-OH-12:0	Molinaro et al., 1999
<i>Bacteroides fragilis</i>	Non déterminé	<i>i</i> -15:0, 3-OH-15:0, 3-OH-16:0, 3-OH- <i>i</i> -17:0, 3-OH-17:0	Wollenwober et al., 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-OH-10:0	12:0, 2-OH-12:0, 3-OH-12:0	Wollenwober et al., 1984 Drewry et al., 1973
<i>Neisseria meningitidis</i>	3-OH-12:0	12:0, 3-OH-14:0	Kulshin et al., 1992 Lyngby et al., 2002

Nomenclature: Le nombre avant les deux points indique le nombre de carbones de la chaîne linéaire de l'acide gras et celui après les deux points, le nombre d'insaturations. La désignation OH, indique la présence d'un groupement hydroxyle sur la chaîne hydrocarbonée et dont la position est indiquée par le chiffre juste avant. "*i*" et "*a*" indiquent respectivement *iso* et *antéiso*.

IV. 3. INFLUENCE DES PARAMETRES ENVIRONNEMENTAUX SUR LA COMPOSITION LIPIDIQUE DES BACTERIES GRAM-NEGATIVES

Pour les bactéries Gram-négatives, les lipides sont les constituants membranaires qui jouent un rôle très important dans la structure et le fonctionnement de la membrane cellulaire. Des changements dans les paramètres de l'environnement (température, salinité, pH, pression osmotique, source de carbone, solvants organiques...) sont accompagnés par des modifications dans la composition lipidique. Ainsi, plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude de la composition lipidique et en particulier les acides gras membranaires dans le but de comprendre le mode de protection des bactéries suite à des modifications dans la composition du milieu extérieur (Intriago et Floodgate, 1991; Pinkart et White, 1997; Ramos et al., 2001; Nichols et al., 2000; Krasikova et al., 1995; Petterson et Baath, 2003; Rabus et al., 2002; Hazel et Williams, 1990; Brown et al., 2000) et ils ont mentionné que les acides gras phospholipidiques sont les plus touchés lors des modifications membranaires suite aux adaptations aux nouvelles conditions de culture.

IV.3.1. Influence de la température sur la composition lipidique

La température de croissance affecte énormément la composition lipidique de la membrane, ces changements étant nécessaires pour maintenir une fluidité membranaire optimale et constante. Des travaux ont montré que les variations de la température s'accompagnent d'une altération de la composition en acides gras lipidiques: des basses températures entraînent une augmentation en acides gras insaturés (Rabus et al., 2002; Flahaut et al., 2000; Mejia et al., 1999; Carty et al., 1999; Krasikova et al., 1995; Monteolivia-Sanchez et al., 1988; Russell, 1984), une augmentation des acides gras de faibles poids moléculaires et une activité métabolique réduite (Rabus et al., 2002). Carty et al., (1999) ont constaté l'apparition de l'acide palmitoléique 16:1 dans le lipide A d'*Escherichia coli* cultivée à 12 °C alors qu'à 30 °C, celui-ci est constitué uniquement d'acides gras saturés. Pour des valeurs croissantes de la température, Dubois-Brissonet et al. (2000) et Nichols et al. (2000) ont trouvé que les cellules favorisent la synthèse des acides gras saturés au détriment des acides gras insaturés. Dubois-Brissonet et al. (2000), ont constaté aussi une augmentation de l'abondance de l'acide gras de courte chaîne 12:0 (acide laurique) chez la bactérie marine *Pseudomonas aeruginosa* quand la température diminue.

La température agit directement sur la fluidité membranaire, la flexibilité des protéines et la conformation des acides nucléiques (Ramos et al., 2001). Suite à des chocs thermiques, les bactéries réagissent en modifiant leurs compositions lipidiques membranaires dans le but d'assurer leur intégrité cellulaire en ayant une fluidité optimale. Mejia et al. (1999) mesurant la fluidité d'*Escherichia coli* pour des températures croissantes, ont trouvé que la fluidité décroît avec la température et ils ont attribué ces résultats aux changements dans la composition lipidique. En effet, la fluidité membranaire dépend directement de la proportion en acides gras insaturés dans la cellule.

Les changements dans la composition en acides gras conditionnent l'homéoviscosité de la membrane et permettent ainsi de maintenir sa stabilité et d'avoir une fluidité optimale (Russell et Fukunaga, 1990; Ramos et al., 2001).

IV.3.2. Influence de la salinité sur la composition lipidique

Il existe des environnements où la salinité varie selon les saisons et les activités humaines. Les bactéries capables de croître dans de telles conditions possèdent des mécanismes physiologiques pouvant les protéger de ces fluctuations. On distingue les bactéries halotolérantes pouvant tolérer de hautes concentrations de sel (jusqu'à la saturation; 5,2 M), mais qui ne sont pas nécessaires à leur développement et les bactéries halophiles dont la croissance est absente pour des concentrations en NaCl inférieures à 0,5 M.

Les bactéries halotolérantes et halophiles possèdent des mécanismes de protection contre les fortes salinités et ce sont ces mécanismes qui déterminent leur abondance et leur distribution par rapport aux autres microorganismes. Il a été suggéré que les modifications dans la composition lipidique membranaire induites par une variation de la concentration en NaCl sont très importantes dans le contrôle de la perméabilité ionique (Komarata et Kates, 1975; Ohno et al., 1979; Monteolivia-Sanchez et al., 1988; Russell et Kogut, 1985) et la régulation de la pression osmotique à l'intérieur de la cellule (Russell, 1989). Une augmentation de la salinité s'accompagne d'une élévation de la proportion des phospholipides anioniques: chez les bactéries Gram-négatives le changement majeur correspond à une augmentation de la quantité du phosphatidylglycérol par rapport à celle de la phosphatidylethanolamine (Russell, 1989; Sutton et al., 1991). Dans certains cas, le ralentissement de la croissance à cause des fortes salinités peut provoquer à son tour une augmentation de la proportion du phosphatidylglycérol (Hardwood et Russell, 1984). En effet,

une molécule de diphosphatidylglycérol est convertie en deux molécules de phosphatidylglycérol suite à une faible croissance.

La composition en acides gras subit des modifications importantes suite à un changement de la salinité du milieu de culture. Des travaux ont montré une augmentation de la quantité des acides gras comportant un cyclopropane et une diminution des acides gras monoinsaturés suite à l'augmentation de la salinité du milieu (Valderrama et al., 1998; Monteolivia-Sanchez et al., 1988; Monteolivia-Sanchez et Ramos-Cormenzana, 1986; McGarrity et Armstrong, 1975). Ce résultat fait suite à l'activation d'une enzyme, la cyclopropane synthétase. Ce changement est sans effet sur la fluidité membranaire du fait que ces deux types de composés ont des propriétés thermiques similaires. Chez certaines espèces bactériennes, le changement majeur dans la composition en acides gras concerne l'augmentation de la proportion des acides gras insaturés et cyclopropaniques et donc une augmentation de la fluidité, puisque pour une même température, ces composés sont plus fluides que leurs dérivés saturés (Russell, 1989).

Chez les bactéries Gram-positives, les fortes salinités conduisent à une augmentation des lipides anioniques (phosphoglycolipides et glycolipides), généralement avec une augmentation du phosphatidylglycerol et/ou du diphosphatidylglycérol (Russell, 1989). En ce qui concerne la composition en acides gras, on assiste à une augmentation des acides gras ramifiés dans le cas des bactéries halotolérantes et une diminution dans le cas des halophiles (Russell, 1989; Chihib et al., 2003; Miller, 1985).

IV.3.3. Influence de la source de carbone sur la composition lipidique

L'influence de la source de carbone et en particulier les hydrocarbures sur la composition lipidique des bactéries Gram-négatives sera discutée dans les chapitres suivants.

V. BIOMARQUEURS

V.1. NOTION DE BIOMARQUEURS

Dans l'écosystème marin, la plus grande partie de la matière organique est d'origine photosynthétique autochtone (phytoplancton et macrophytes) ou allochtone (issue des végétaux supérieurs, et apportée par les courants fluviaux et par l'action du vent; Durand, 1980). Par conséquent, les sédiments marins contiennent un mélange complexe de matière

organique d'origine autochtone et allochtone (seule la matière organique réfractaire à la dégradation pouvant atteindre les sédiments où elle sera éventuellement préservée, en général moins de 1 % en poids) dont l'évolution diffère selon les conditions environnementales et les types des matières organiques sédimentées. Les principaux producteurs de la matière organique dans le milieu marin sont les organismes microscopiques unicellulaires phytoplanctoniques (Tissot et Welte, 1978). La productivité est d'autant plus importante que les conditions favorables à la vie marine sont présentes: ensoleillement, eaux claires, température et apport de nutriments (azote et phosphate). Les bactéries qui sont présentes en grandes quantités dans tous les environnements (notamment dans les zones d'accumulation), jouent aussi un rôle important quant à la production de la matière organique sédimentaire. Toutefois malgré leur abondance, Hartgers et al. (1994) ont montré que la contribution de ces microorganismes à la production de la matière organique sédimentaire reste faible.

Les biomarqueurs permettent de reconnaître au sein d'un mélange complexe de matière organique, des "*empreintes moléculaires*" capables de traduire un signal géochimique spécifique d'une origine ou d'un processus d'évolution physique, chimique ou biologique. La notion de biomarqueur est liée à la découverte de molécules fossiles dans les sédiments et les pétroles, dont la caractérisation des structures moléculaires a permis de préciser non seulement l'origine biologique de la matière organique étudiée, mais aussi d'apporter des informations sur les conditions de dépôt, d'enfouissement (diagenèse), et sur les transformations dues à l'élévation de la température, au cours de la catagenèse (Peters et Moldowan, 1993).

Cette notion de biomarqueurs s'applique à des composés organiques ou à des familles de composés organiques, souvent à l'état de traces dont la spécificité, la distribution, la stabilité, ou l'inertie métabolique autorisent leur suivi, et leur identification, lors de leur évolution au sein de l'écosystème.

Le choix des biomarqueurs dépend de plusieurs facteurs:

- degrés de spécificité de marqueurs individuels,
- abondance relative,
- facilité d'analyse précise dans un mélange complexe (minimum d'interférence avec les composés co-extraits).

Bon nombre de travaux sur les marqueurs bactériens sont les fruits des recherches entreprises par les géochimistes du sédiment: Volkman et al. (1980), ont comparé la

distribution des acides gras d'un sédiment (sable de diamètre moyen 140 μm), de cultures de diatomées (*Melosira*, *Biddulphia*, *Nitzschia*, et *Navicula* principalement), des bactéries de sédiment cultivées sur le sédiment lui même (essentiellement des bactéries aérobies, hétérotrophes (Perry et al., 1979) et des populations alguaires dominées par *Chlamydomonas* sp, cultivées par inoculation de sédiment, ce qui leur a permis de proposer quelques structures témoins de l'activité microbiologique. Tronczynski et al.(1985), ont étudié quelques critères d'estimation de l'activité bactérienne par l'analyse de certains acides gras saturés, monoinsaturés et ramifiés présents dans les sédiments.

Plusieurs études consacrées à la composition de la matière organique dans différents sédiments marins (Haddad et Martens, 1987; Mark et al., 1995; Wakeham et Canuel, 1990; Zegouagh et al., 1996, 1998; van Dongen et al., 2000; Camacho-Ibar et al., 2003), ont montré que la principale source de la matière organique correspond à un mélange d'algues marines, de plantes vasculaires et de bactéries. Il faut préciser que l'importance de la contribution relative à chacune de ces sources dépend aussi des paramètres environnementaux.

V.2. BIOMARQUEURS BACTERIENS

Les organismes vivants sont constitués des mêmes classes principales de composés chimiques: les lipides, les protéines et les hydrates de carbone (sucres simples et leurs polymères de formules brutes $\text{C}_n(\text{H}_2\text{O})_n$). Cependant, certaines variations sont observées dans leurs compositions chimiques qui autorisent leur différenciation. Les lipides possèdent des origines très diverses (phytoplanctonique, zooplanctonique, bactériennes, archaenne ou terrigène) et sont subdivisés en plusieurs classes définies par des fonctions chimiques (alcanes, alcènes, aldéhydes, cétones, alcools, esters, éthers), ainsi que par la nature de leur squelette carboné (linéaire, terpénique, (poly)cyclique, aromatique, ...etc.). Ces lipides correspondent souvent aux constituants cellulaires majoritaires et peuvent représenter jusqu'à 20 % du poids sec des micro-organismes. Il assurent au sein de la cellule quatre fonctions principales:

- (i) ils contribuent à la structure des membranes cellulaires;
- (ii) ils représentent des réserves énergétiques intracellulaires;
- (iii) ce sont des formes de transport des métabolites énergétiques;
- (iv) ils jouent un rôle de protection à la surface des parois bactériennes et de l'exosquelette de nombreux organismes vivants.

Ainsi en raison de leurs spécificités structurales, les lipides ont pu être utilisés comme biomarqueurs (Saliot et al., 1988). Par conséquent leur caractérisation peut fournir des informations géochimiques importantes et certains travaux ont permis de préciser la validité du concept de biomarqueurs.

L'abondance lipidique est surtout importante dans la partie supérieure des sédiments et des colonnes d'eau et diminue progressivement avec la profondeur (Gillan et Sandstrom, 1985; Meyers et Eadie, 1993; Camacho-Ibar et al., 2003). Gillan et Sandstrom (1985) ont trouvé une abondance lipidique de 6 % du carbone organique total, pour les sédiments à 3-4 cm de profondeur, alors qu'elle ne représente que 1 % dans le cas d'échantillons profonds.

Il faut noter aussi que le nombre de nouveaux marqueurs spécifiques pourrait augmenter par la mise en évidence de nouvelles souches et de nouveaux écosystèmes particuliers tels que les sources hydrothermales profondes.

V.2.1. Les acides gras

Les acides gras sont les constituants prédominants dans tous les lipides d'organismes marins, y compris dans les bactéries où leur abondance est comprise entre 2 et 8 % de la biomasse sèche. Ces acides gras existent à l'état libre ou le plus souvent engagés dans des liaisons esters et amides aux structures polysaccharidiques membranaires. Certains de ces composés sont caractéristiques d'un type de microorganismes et parfois même d'un sous-groupe de chacun des règnes animal et végétal, on parle alors de marqueurs taxonomiques (Visot et Marty, 1993). Les acides gras les plus communément identifiés sont les acides monocarboxyliques à chaînes linéaires ramifiés ou non, à nombre pair ou impair d'atomes de carbone, saturés ou insaturés. Des acides gras cyclopropaniques et hydroxylés ont été également identifiés. Les géochimistes ont largement utilisé la nature et la distribution de ces acides pour caractériser l'origine et l'état de dégradation de la matière organique au sein des colonnes d'eau et dans les sédiments.

Les acides gras constituent d'excellents biomarqueurs pour différentes raisons: (1) une grande diversité de ces acides parmi les micro-organismes, (2) un turn-over relativement rapide, faisant de ces molécules des indicateurs de biomasse viable, (3) l'accès à des informations relatives aux modes de biosynthèse, (4) une relative facilité d'analyse considérant les progrès en chimie analytique (Guezennec, 1995).

Les principaux acides gras d'origine marine considérés comme biomarqueurs ainsi que les messages taxonomiques qui leurs sont associés sont rassemblés dans le tableau I.5.

V.2.1.1. Les acides gras saturés normaux

En ce qui concerne les acides gras saturés, ils sont présents dans tous les extraits lors de l'identification des lipides présents dans les sédiments. Les acides à longues chaînes ($>C_{20}$) avec prédominance pair représentent la contribution des végétaux supérieurs (Eglinton et al., 1968; Matsumoto et al., 1981; Meyers, 1997). Pourtant, des travaux ont montré que ces composés peuvent être synthétisés par les micro-algues (Volkman et al., 1980, 1989; Nichols et al., 1986; Dunstan et al., 1992) et les bactéries (Volkman et al., 1988b). Parmi les acides à chaînes plus courtes ($< C_{20}$), l'acide palmitique $n-C_{16:0}$ est l'acide gras majoritaire (Barouxis et al., 1988; Bigot et al., 1989; Sun et Wakeham, 1994; Wakeham, 1999; Zegouagh et al., 1996; Camacho-Ibar et al., 2003), mais il ne fournit pas d'informations précises sur l'origine de la matière organique. En effet, il a été identifié comme acide gras majoritaire chez des bactéries marines, des cyanobactéries, des algues et des végétaux supérieurs (Parker et al., 1967; Volkman et al., 1980, 1988a; Parrish, 1988; Shaw et Johns, 1986; Scribe et al., 1991; Meyers et Eadie, 1993). Le rapport des acides gras $< C_{20}$ par rapport à ceux $>C_{20}$ a été utilisé pour estimer la contribution autochtone et terrestre (Kawamura et Ishiwatari, 1984).

L'abondance des acides gras pairs de longueur de chaîne moyenne, dont le nombre d'atome de carbone est de 12 à 20, est considérée comme indicateur de la contribution des micro-algues autochtones (Taylor et al., 1984; Venkatesan, 1988; Grimalt et Albaigés, 1990; Sun et Wakaham, 1994; Johns et al., 1994), tandis que la présence d'acides gras normaux saturés de longueur de chaîne supérieure à C_{20} avec prédominance pair est considérée comme indicateur de la contribution terrigène (Saliot et al., 1980, 1991; Shaw et Johns, 1986; Venkatesan et al., 1987; Grimalt et Albaigés, 1990). Il est admis que ces acides longs dérivent des plantes supérieures et ils représentent généralement un maximum en C_{24} , C_{26} , C_{28} ou C_{30} (Venkatesan et al., 1987; Haddad et al., 1992). Le rapport $C_{16:0}/C_{26:0}$ est utilisé pour indiquer la contribution autochtone par rapport à la contribution allochtone dans les sédiments marins récents (Venkatesan et al., 1987; Venkatesan, 1988; Ogura et al., 1990).

Les acides gras normaux à nombre impair d'atomes de carbone ($n-C_{15}$, $n-C_{17}$ et $n-C_{19}$) sont considérés comme biomarqueurs bactériens (Saliot, 1994, Mendoza et al., 1987a). Tronczynski et al. (1985), ont montré que les acides gras impairs sont 5 à 10 fois plus importants dans les bactéries que dans les diatomées.

V.2.1.2. Les acides gras insaturés

Les acides gras insaturés sont omniprésents dans la plupart des organismes et sont les plus abondants dans les sédiments marins. Les polyinsaturés sont très abondants dans le phytoplancton et le zooplancton, tels les C_{20:5} et C_{22:6} (Morris and Culkin, 1976 ; Volkman et al., 1989, 1998), alors qu'ils sont généralement absents chez les bactéries. En ce qui concerne les activités microbiologiques, certains acides gras monoinsaturés s'avèrent caractéristiques. La position de la double liaison permet souvent de remonter à l'origine de l'organisme source : dans le cas des acides gras *n*-C_{18:1}, la position ω7 (l'acide vaccénique) est favorisée dans les cultures bactériennes par rapport à la position ω9 (acide oléique) qui est caractéristique des phytoplanctons (diatomées). L'acide vaccénique a été retrouvé comme acide gras prédominant dans plusieurs espèces (Williams et al., 1977; Cranwell, 1978; Perry et al., 1979; Gillan et Sandstrom, 1985), mais il reste principalement abondant chez les bactéries, raison pour laquelle ce composé est généralement considéré comme marqueur typiquement bactérien. Le rapport *n*-C_{18:1ω7}/*n*-C_{18:1ω9} est de 25 dans le cas des bactéries alors qu'il est de 1 pour les diatomées et de 0,2 pour les algues vertes, ce qui permet de proposer la concentration de *n*-C_{18:1ω7} comme critère de l'activité bactérienne sous réserve d'une évaluation de la contribution planctonique (Tronczynski et al., 1985). En effet, les microalgues peuvent aussi contribuer à l'acide vaccénique sédimentaire, mais il est alors accompagné de grande quantité d'acides gras polyinsaturés (Guezennec et Fiala-Medioni, 1996). Une étude récente sur la composition lipidique de la bactérie *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, a montré une prédominance de l'acide oléique par rapport à l'acide vaccénique (le rapport *n*-C_{18:1ω9}/*n*-C_{18:1ω7} est de 8), ce qui montre que ces marqueurs doivent être utilisés avec prudence (Lattuari et al., 2002). Certaines bactéries telles que les sulfato-réductrices peuvent être des sources significatives d'acide palmitoléique *n*-C_{16:1ω7} (Volkman et al., 1980, 1998) cependant, ce composé est considéré comme caractéristique des diatomées (Mc Caffrey et al., 1989). Les acides gras insaturés ω5 sont présents dans plusieurs bactéries telles *Desulforomonas acetoxidans*, *Desulfobacter AcBa*, *Desulfobulbus* sp., *Flavobacter flexilis*, et la plupart des souches de *Methylomonas* et *Methylococcus* (Guezennec et Fiala-Medioni, 1996). Les acides *n*-C_{16:1ω10} (Sire et al., 1988), *n*-C_{15:1ω6} et *n*-C_{17:1ω8} (Perry et al., 1979) sont aussi considérés comme biomarqueurs bactériens.

Un raffinement dans le critère de l'activité bactérienne peut être obtenu en déterminant l'isomérisation de la double liaison, sachant que les acides gras monoinsaturés de configuration

trans n'existent en général pas chez les bactéries, à l'exception du C_{16:1ω13} (Tronczynski et al., 1985).

On signale que les acides gras insaturés sont largement distribués chez les bactéries Gram-négatives et représentent des composés minoritaires chez la plupart des bactéries Gram-positives.

Certains géochimistes utilisent le rapport $\Sigma C_{16} / \Sigma C_{18}$ (Σ = somme des acides gras saturés et insaturés) pour déterminer l'origine de la matière organique. En effet, de grandes valeurs de ce rapport sont caractéristiques des diatomées (Saliot et al., 1991).

V.2.1.3. Les acides gras ramifiés

Les acides gras ramifiés à nombre impair d'atomes de carbone sont, d'une manière générale, plus abondants chez les bactéries que chez les diatomées et les algues vertes (de l'ordre de 5 à 10 fois plus) (Tronczynski et al., 1985). Les acides gras ramifiés en position *iso* et *anteiso* de C₁₃ à C₁₇ saturés ou non sont utilisés comme marqueurs des bactéries Gram-positives et des bactéries anaérobies Gram-négatives telles que les sulfato-réductrices (exemple : *Desulfovibrio* spp.) (les bactéries Gram-négatives aérobies, sont essentiellement riches en acides gras monoinsaturés) (Boon et al., 1977b; Tronczynski et al., 1985; Perry et al., 1979; Volkman et al., 1980, 1998; Saliot et al., 1991; Guezennec et Fiala-Medioni, 1996; Harvey et Macko, 1997; Zelles, 1997). Ils peuvent dans certains cas représenter de 40 à 70 % des acides gras totaux (Gillan et al., 1983) alors qu'ils n'existent qu'en très faibles quantités chez les autres groupes d'organismes marins tels que les espèces phytoplanctoniques et ne sont pas inclus dans les métabolismes des animaux et végétaux supérieurs. Ainsi, pour la bactérie Gram-positif *Micrococcus agilis*, le pourcentage d'acides gras *iso* et *anteiso* C_{15:0} correspond à 73 % des acides gras totaux ; et dans le cas de *Micrococcus haliobius*, les acides gras *iso* et *antéiso* de C_{14:0} à C_{17:0} représentent pratiquement la totalité des acides gras, l'acide gras C_{17:0} représente à lui seul 45 % des acides gras totaux (O'Leahy et Wilkinson, 1988). Les acides gras ramifiés autres que *iso* et *anteiso*, tels les acides ramifiés en position 10, sont largement observés chez les bactéries Gram-positives et seulement chez quelques bactéries Gram-négatives (Zelles, 1997).

Certains acides gras ramifiés saturés ou non, sont des marqueurs à caractère hautement spécifique ne concernant qu'un nombre limité de microorganismes. Parmi ceux-là, on peut

citer les bactéries sulfato-réductrices (*i*-C_{17:1ω7c}, 10-MeC_{16:0}) et les bactéries thio-oxydantes (10,11-diMeC_{18:1ω6}) (Guezennec et Fiala-Medioni, 1996; Parkes et al., 1993; Taylor et Parkes, 1983).

Ces composés sont donc considérés comme de très bons marqueurs de l'activité bactérienne en raison de leurs spécificités.

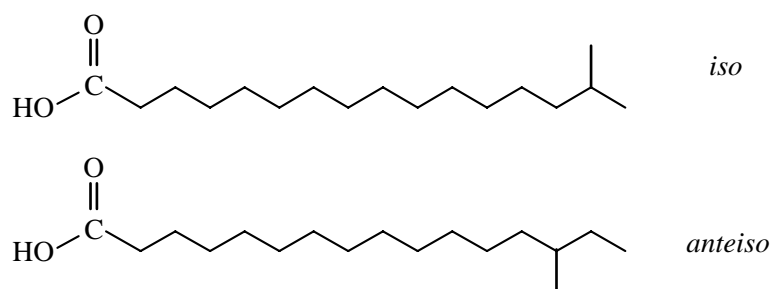


Figure I.25. Exemple d'acides gras *iso* et *anteiso* à 17 atomes de carbone.

V.2.1.4. Les acides gras cyclopropaniques

Les acides gras cyclopropaniques sont caractéristiques des bactéries aérobies et anaérobies (Guckert et al., 1985; Wilkinson, 1988; Fang et Barcelona, 1998; Pancost et al., 2001) bien qu'ils aient été également identifiés chez quelques algues marines (Meyers et Holz, 1966), chez des champignons et des plantes terrestres (Zelles, 1999). Aussi ces composés ont été considérés comme marqueurs bactériens. Perry et al. (1979) ont identifié les acides gras saturés cyclopropaniques C_{17∇9,10} et C_{19∇11,12} dans les sédiments marins, ce dernier étant considéré comme biomarqueur typiquement bactérien.

Les acides gras cyclopropaniques sont présents chez la plupart des bactéries Gram-négatives (Xu et al., 2000; Zelles, 1997; Wilkinson, 1988). A titre d'exemple, deux acides gras cyclopropaniques ont été identifiés chez la bactérie *Escherichia coli*, l'acide *cis*-9,10-méthylènehexadécanoïque et l'acide *cis*-11,12-méthylèneoctadécanoïque (Figure I.26). Ces acides gras cyclopropaniques sont accumulés à partir du précurseur monoénoïque lors du passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire de croissance (Wilkinson, 1988). Dans le cas des bactéries *Desulfobacter* sp., isolées des sédiments marins, l'acide gras cyclopropanique C₁₇ peut constituer jusqu'à 30 % des acides gras totaux et il a été considéré

comme caractéristique de ce genre bactérien (Dowling et al., 1986). Zelles (1997) a étudié la composition en acides gras phospholipidiques et lipopolysaccharidiques de différents organismes (10 bactéries Gram-négatives, 9 bactéries Gram-positives, 10 champignons et 11 plantes) et il a trouvé que les acides gras cyclopropaniques existent essentiellement chez les bactéries Gram-négatives ce qui lui a permis de considérer ces composés comme marqueurs spécifiques des bactéries Gram-négatives. Il faut aussi considérer les facteurs environnementaux pouvant influencer la teneur en acides gras cyclopropaniques. En effet, de faibles valeurs de pH et de tension en oxygène, des fortes concentrations de NaCl, d'autres sels ou de sucrose, sont des facteurs encourageant la cyclopropanation des acides gras monoénoïques (Wilkinson, 1988; Lundquist et al., 1999).

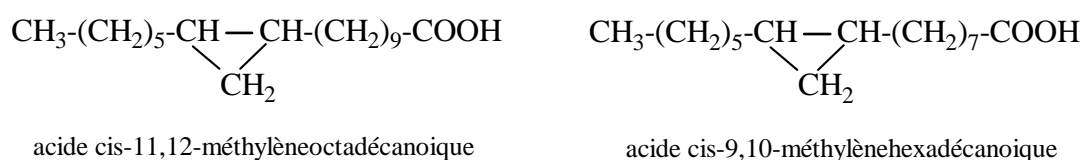


Figure I.26. Structure de deux acides gras cyclopropaniques rencontrés chez la bactérie Gram-négative *E. coli*.

V.2.2. Les hydroxy acides

Un grand nombre d'hydroxy acides (α , β , ω , et $(\omega-1)$) ont été identifiés dans les sédiments (Boon et al., 1977a; Eglinton et al., 1968; Cranwell, 1981a; Kawamura et Ishiwatari, 1982; Volkman et al., 1980; Wakeham, 1999), mais ce n'est que durant les dernières années que les géochimistes organiciens ont accordé beaucoup d'attention à la distribution et l'abondance de ces composés dans les bactéries et dans les sédiments. Ces composés peuvent être séparés en plusieurs catégories suivant le nombre et la position des groupements hydroxyles. Les β - et les α -hydroxy acides aliphatiques ont été identifiés dans un grand nombre de micro-organismes (bactéries, levures, champignons, prokaryotes photosynthétiques; Ratledge et Wilkinson, 1988) et sont généralement des produits intermédiaires de la β - et de l' α -oxydation des acides gras mono-carboxyliques; la β -oxydation est plus courante que l' α -oxydation, bien que cette dernière soit rencontrée chez les animaux, les plantes et les bactéries (Volkman et al., 1998).

Quelques travaux exhaustifs sur la distribution et l'abondance des hydroxy acides ont été réalisés sur différentes bactéries marines et il a été montré que les β -hydroxy acides de C_{10} à C_{20} avec un maximum à C_{12} , C_{14} ou C_{16} sont caractéristiques des distributions lipidiques membranaires des bactéries Gram-négatives (Wollenweber, et al., 1984; Goossens et al., 1986, 1989a; Klock et al., 1988; Skerratt et al., 1992; Lattuati et al., 2002; Wakeham et al., 2003), bactéries les plus abondantes dans les milieux marins (Giovannoni et Rappe, 2000). Ces hydroxy acides sont à chaînes normales, à nombre pair d'atomes de carbone et sont engagés dans les lipopolysaccharides des parois internes des bactéries Gram-négatives, où ils sont liés aux groupes amides et hydroxydes de la D-glucosamine disaccharide par respectivement l'intermédiaire de liaisons esters et amides (Figure I.24) et ils peuvent suivant l'espèce atteindre 70 % des acides gras totaux. Cependant, certaines bactéries synthétisent des β -hydroxyacides à nombre impair d'atomes de carbone *iso* et *anteiso* (voir Tableau I.5). Des α -hydroxy acides ont été également identifiés chez des bactéries Gram-négatives; ainsi pour *Serratia marcescens*, le pourcentage du β -hydroxy acide $C_{14:0}$ est de 61 %, et celui de l' α -hydroxy acide $C_{14:0}$ est de 10 %. Chez la bactérie *Pseudomonas paucimobilis* l'unique acide gras présent dans les lipopolysaccharides est l' α -hydroxy acide $C_{14:0}$ (Wilkinson, 1988). La détermination des β - et α -hydroxy acides dans les sols, les sédiments et l'eau permet d'avoir des informations sur les communautés microbiennes présentes (Keinänen et al., 2003).

La présence des β -hydroxy acides à chaînes courtes dans les sédiments (de C_{10} à C_{16} avec un maximum à C_{12} ou C_{14}) est attribuée aux bactéries alors que les β -hydroxy acides et les α -hydroxy acides à longues chaînes sont assimilés à des produits d'oxydation microbiennes et/ou chimiques des acides gras (Gillan et al., 1981; Mendoza et al., 1987b; Fukushima et al., 1992a,b). Cranwell (1981a) a étudié la stéréochimie des hydroxy acides sédimentaires et il a montré que les β -hydroxy acides non liés de C_{14} à C_{18} sont des produits de la biodégradation des acides gras ayant la configuration S pour le carbone portant l'hydroxyle alors que les β -hydroxy acides liés constitutifs des membranes, présentent une configuration R pour le carbone portant l'hydroxyle. Goossens et al. (1986), après avoir comparé la distribution des β -hydroxy acides dans différentes bactéries et trois sédiments, ont proposé les β -hydroxy acides engagés dans les liaisons amides dans les lipopolysaccharides (donc extractibles en milieu acide), comme marqueurs exclusifs des bactéries Gram-négatives et les ont considérés comme biomarqueurs de la présence bactérienne (Goossens et al., 1986, 1989a, b; Lattuati et al., 2002; Wakeham, 1999, 2003).

Les bactéries contribuent également avec des quantités significatives de β -hydroxy acides ramifiés *iso* et *antéiso* de C₁₂ à C₁₈ aux sédiments (Volkman et al., 1998). Mais ces composés sont également produits par des cyanobactéries et en faible quantité par des micro-algues (Matsumoto and Nagashima, 1984). Les α -hydroxy acides saturés de C₁₆ à C₂₈ avec un maximum à 16:0 et 24:0 retrouvés dans les sédiments marins (Volkman et al., 1980) ont été attribués à une herbe marine (*Zostera mulleri*) présentant une distribution en hydroxy acides similaire à celle des sédiments. D'autres études sur la composition en acides gras de différentes herbes marines ont montré des distributions en α -hydroxy acides de même longueur de chaîne que *Zostera mulleri* (Gillan et al. 1984; Nichols et Johns, 1985; de Leeuw et al., 1995). Les α -hydroxy acides de C₁₆ à C₂₆ (C₁₆ prédominant), et les β -hydroxy acides de C₈ à C₂₀, normaux à nombre pair d'atome de carbone sont présents chez des micro-algues (*Rhodophycées* et *Chlorophycées*) (Matsumoto et Nagashima, 1984; Matsumoto et al., 1984). Une revue de Volkman et al. (1998), a montré la présence des α - et β -hydroxy acides de C₂₆ à C₃₀ (non liés et extractibles en milieu basique) dans différentes micro-algues.

Les ω - et (ω -1)-hydroxy acides peuvent être obtenus par l'oxydation terminale des acides gras (Heinz et al., 1969; Miura et Fulco, 1975) par les microorganismes, qui dépendent de la spécificité de l'hydroxylation de ces derniers. Les ω -hydroxy acides sont donc des métabolites intermédiaires dans l'oxydation des acides mono-carboxyliques en acides dicarboxyliques. C'est le type de liaison aux structures macromoléculaires de la cellule qui permet la différenciation entre les hydroxy acides provenant de l'oxydation et de synthèse.

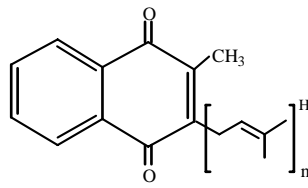
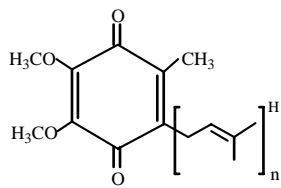
La cutine et la subérine des plantes supérieures peuvent contribuer aux α -, β - et surtout aux ω -hydroxy acides sédimentaires de C₁₆ à C₂₂, ainsi qu'aux polyhydroxy acides (di- et tri-) C₁₆ et C₁₈ (Cardoso et Eglinton, 1983). En effet les ω -hydroxy acides qui sont des constituants majeurs de la cutine et de la subérine sont généralement dominés par 16:0, 18:0, 18:1 ω 9 et 18:2 ω 6,9 (Huang et al., 1996). Les ω -hydroxy acides à longues chaînes des C₁₆ à C₂₈ ont été identifiés chez les herbes marines (Nichols et al., 1982; Nichols et Johns, 1985; Huang et al., 1996) et sont également retrouvés dans les sédiments (Shaw et Johns, 1986). Une étude récente de Allard et Templier (2001) a montré l'existence d' ω -hydroxy acides normaux longs, saturés et mono-insaturés à nombre pair d'atomes de carbone, de C₂₈ à C₃₆ (maximum à C₃₂) chez des micro-algues.

Les (ω -1)-hydroxy acides de C₁₄ à C₃₀ ont été identifiés dans plusieurs sédiments (Mendoza et al., 1987b; Goossens et al., 1989b; Shaw et Johns, 1985, 1986; Fukushima et al., 1992a, b; Wakeham, 1999) mais la détermination des organismes sources n'est pas évidente.

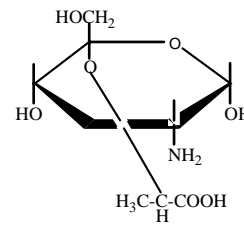
Boon et al. (1977b) et Kawamura et al. (1987) ont suggéré que ces composés sont produits par des microorganismes aérobies. Cependant, Wakeham (1999) a identifié des (ω -1)-hydroxy acides de C₁₄ à C₃₀ avec prédominance paire (maximum à C₂₄, C₂₆ et C₂₈) dans des sédiments anaérobies et il les a attribué à des sources allochtones (plantes supérieures). Certaines bactéries méthanotrophes contiennent en plus des α - et β -hydroxy acides de C₁₀ à C₁₈ à prédominance paire, des (ω -1)-hydroxy acides normaux longs, à nombre pair d'atomes de carbone (C₂₆, C₂₈ et C₃₀) (Nichols et al., 1985; Urakami et Komagata, 1987; Skerratt et al., 1992), ce résultat a permis l'identification d'une éventuelle contribution des bactéries aux (ω -1)-hydroxy acides sédimentaires. Fukushima et al. (1992a), ont identifié ces mêmes composés dans des sédiments lacustres, mais ils les ont attribué aux plantes supérieures. Huang et al. (1996), ont attribué les (ω -1)-hydroxy acides C₂₈ et C₃₀ à des organismes aquatiques photosynthétiques en raison de l'absence de β -hydroxy acides, généralement plus abondants que les (ω -1)-hydroxy acides chez les bactéries méthanotrophes. Le (ω -1)-hydroxy acide C₂₆ a été aussi retrouvé chez deux cyanobactéries, *Anabaena cylindrica* et *Aphanizomenon flos-aquae* (Volkman et al., 1998).

V.2.3. Autres marqueurs bactériens

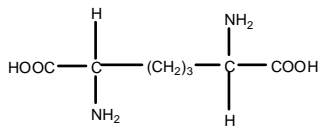
Les acides gras liés aux phospholipides et aux lipopolysaccharides, ne sont pas les seuls constituants bactériens utilisables en chimiotaxonomie. Il en existe d'autres, certes moins utilisés, mais pour certains d'une grande spécificité. Parmi ces composés, on peut citer les quinones (benzoquinones et naphthoquinones), les carbohydrates, les acides aminés (orthinine, D-alanine et acide glutamique), l'acide muramique, l'acide diaminopimélique et les hopanes (Guezennec, 1995). Les structures de ces composés sont représentées sur la Figure I.26.



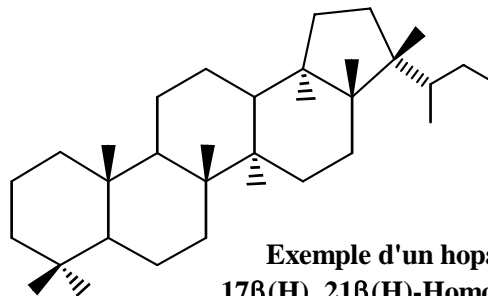
Quinones



Acide muramique



Acide diaminopimélique



**Exemple d'un hopane:
17β(H), 21β(H)-Homohopane
C₃₁H₅₁**

Figure I.26. Formules chimiques d'autres marqueurs bactériens.

Tableau I.5. : Principaux acides gras et messages taxonomiques associés.

Acides gras	Messages taxonomiques
<p>Acides normaux saturés</p> <ul style="list-style-type: none"> - Acides à longues chaînes (> C₂₀) avec prédominance pair. - Acides à nombre pair d'atomes de carbone de C₁₂ à C₂₀. - Acides à nombre impair d'atomes de carbone: C₁₅, C₁₇ et C₁₉. 	<ul style="list-style-type: none"> - Végétaux supérieurs - Micro-algues - Bactéries
<p>Acides normaux saturés</p> <ul style="list-style-type: none"> - Polyinsaturés - C_{18:1ω7}, C_{16:1ω10}, C_{17:1ω8} et C_{15:1ω6} - C_{16:1ω7} et C_{18:1ω9} 	<ul style="list-style-type: none"> - Phytoplancton et zooplancton - Bactéries Gram-négatives - Phytoplancton
<p>Acides ramifiés</p> <ul style="list-style-type: none"> - Acides iso et antéiso, saturés et insaturés à nombre impair d'atomes de carbone - <i>i</i>-C_{17:1ω7} et 10-Me-C_{16:0} - 10,11-diMe-C_{18:1ω6} 	<ul style="list-style-type: none"> - Bactéries Gram-positives et anaérobies Gram-négatives - Bactéries sulfato-réductrices - Bactéries thio-oxydantes
<p>Acides cyclopronaniques</p> <ul style="list-style-type: none"> - C_{17∇9,11} et C_{19∇11,12} 	<ul style="list-style-type: none"> - Bactéries Gram-négatives
<p>Hydroxy acides</p> <ul style="list-style-type: none"> - β-hydroxyacides de <i>n</i>-C₁₀ à <i>n</i>-C₂₀ avec un maximum à C₁₂, C₁₄ ou C₁₆ - β-hydroxyacides <i>iso</i> et <i>antéiso</i> de C₁₂ à C₁₈ - α-hydroxyacides de C₁₆ à C₂₈ avec un maximum à C₁₆ et C₂₄ - α-hydroxyacides de C₁₆ à C₂₆ avec un C₁₆ prédominant et les β-hydroxyacides de C₈ à C₂₀, normaux à nombre pair d'atome de carbone - α-, β- et ω-hydroxyacides de C₁₆ à C₂₂ et les polyhydroxyacides C₁₆ et C₁₈ - ω-hydroxyacides de C₁₆ à C₂₈ 	<ul style="list-style-type: none"> - Bactéries Gram-négatives - Bactéries - Herbes marines - Mico-algues - Plantes supérieures - Herbes marines

Nomenclature: la nomenclature simplifiée se traduit par une première valeur indiquant le nombre de carbones constituant l'acide, suivie du nombre de doubles liaisons et la position de ces doubles liaisons. Celle-ci est spécifiée à partir du carbone terminal (ω). Les préfixes "i" et "a" se rapportent à la ramification *iso* et *anteiso*, et l'isomérisie de configuration par "c" (*cis*) et "t" (*trans*). La présence de groupements "méthyle", "hydroxy" ou "méthoxy" est notifiée par l'abréviations "Me", "OH" et "MeO", respectivement; précédée par la position de ce groupement à partir du carbone carboxylique. Exemple: 10MeC_{18:1ω7c} indique un acide gras linéaire à 18 atomes de carbone monoinsaturé possédant: une double liaison sur le septième carbone à compter du carbone terminal, cette double liaison possédant une configuration *cis*, et une ramification méthyle en position 10 à partir du groupement méthyle terminal.

V.3. LES HYDROCARBURES

Les hydrocarbures, composés ubiquistes dans le milieu naturel, représentent une faible proportion de la matière organique sédimentaire récente. Cependant ces composés facilement analysables et stables représentent des biomarqueurs très utilisés pour élucider les sources de la matière organique (Wakeham, 1990; Zegouagh, 1998).

De nombreux travaux ont porté sur la caractérisation des hydrocarbures isolés des sédiments de surface provenant de divers environnements marins, les composés identifiés correspondent à un mélange complexe d'hydrocarbures normaux saturés et insaturés, ramifiés saturés (alcane *iso* et *anteiso*, isoprénoïdes) et polycycliques saturés et insaturés.

Les principaux hydrocarbures d'origine marine, ainsi que les messages taxonomiques qui leur sont associés sont rassemblés dans le tableau I.6.

Tableau I.6. Principaux hydrocarbures marins et les messages taxonomiques associés.

Hydrocarbures	Message taxonomique	Références
<i>n</i>-alcane:		
- à nombre impair d'atomes de C de <i>n</i> -C ₂₃ à <i>n</i> -C ₃₃ avec un maximum à <i>n</i> -C ₂₇ , <i>n</i> -C ₂₉ ou <i>n</i> -C ₃₁ .	Plantes supérieures	(1)(2)(3)
- de C ₁₃ à C ₁₉ à nombre impair d'atomes de C: <i>n</i> -C ₁₅ , <i>n</i> -C ₁₇ et <i>n</i> -C ₂₁ .	Phytoplancton	(4)(5)(6)(7)(8)
- de <i>n</i> -C ₁₃ à <i>n</i> -C ₃₁ avec une prédominance des composés à nombre pair d'atomes de C: <i>n</i> -C ₁₆ , <i>n</i> -C ₁₈ et <i>n</i> -C ₂₀ .	Bactéries (<i>Rodospirillum rubrum</i> , <i>Clostridium acidurici</i>)	(9)(10)(8)
Alcane ramifiés:		
- Iso/antéiso à nombre impair d'atomes de C: C ₁₅ et C ₁₇ .	Bactéries	(11)
Alcane isopréniques:		
- Pristane (C ₁₉), phytane (C ₂₀), squalane (C ₃₀)	Phytoplancton, zooplancton, bactéries et archaea	(12)(4)(13) (14)(15)(10) (16)(17)
- Alcane isopréniques fortement ramifiés C ₂₀ , C ₂₅ et C ₃₀ .	Diatomées	(11)
<i>n</i>-alcène:		
<i>n</i> -C _{17:1} et <i>n</i> -C _{17:2}	Bactéries (<i>Vibrio marinus</i>)	(9)(10)
Alcène ramifiés:		
<i>Iso/antéiso</i>	Bactéries	(18)
Alcène isoprénique:		
Squalène	Bactéries (<i>Rodospirillum rubrum</i> , <i>Clostridium acidurici</i>) et archaea	(10)(17)
- Alcène isopréniques fortement ramifiés C ₂₀ , C ₂₅ C ₃₀ et C ₃₅ .	Diatomées	(11)

(1) Eglinton et al., 1962; (2) Kolattukudy et al., 1976; (3) Simoneit, 1986; (4) Blumer et al., 1971; (5) Douglas, 1981; (6) Payne et al., 1985; (7) Clark et Blumer, 1967; (8) Saliot, 1981; (9) Oro et al., 1967; (10) Han et Calvin, 1969; (11) Nichols et al., 1988; (12) Blumer et al., 1964; (13) Volkman et al., 1980; (14) Lee et al., 1970; (15) Volkman et al., 1992; (16) Goossens et al., 1984; (17) Langworthy, 1985; (18) Albro et Dittmer, 1971.

CHAPITRE II

Etude expérimentale

I. ORIGINE DES SOUCHES

La bactérie *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (souche sp 17) utilisée dans la présente étude a été fournie par le Laboratoire d'Océanographie de Marseille. Les trois autres bactéries, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas oléovorans* ont été procurées par l'institut Pasteur de Paris. Elles sont enregistrées respectivement sous le numéro 106100T, 66.33 et 59.11T.

II. MILIEUX ET CONDITIONS DE CULTURE

II.1. COMPOSITION CHIMIQUE DES MILIEUX DE CULTURES

1) Trois des quatre bactéries étudiées (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacter aquaeolei* et *Acinetobacter calcoaceticus*) sont cultivées dans des milieux préparés avec l'eau de mer synthétique, dont la composition en g.l⁻¹ est la suivante:

- Tris (Hydroxyméthyl-aminométhane.....	2
- NaCl.....	23
- KCl.....	0,75
- NH ₄ Cl.....	1
- MgSO ₄ .7H ₂ O.....	6,16
- MgCl ₂ .6H ₂ O.....	5,08
- CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1,98

Le pH est ensuite ajusté à une valeur de 7,5 à 7,8 avec une solution concentrée d'HCl (10 M). Dans le cas où le pH descend à une valeur inférieure, il faut éviter d'utiliser une solution basique pour ne pas modifier la salinité; on utilise alors le Tris pour le faire remonter.

2) Dans le cas de *Pseudomonas oleovorans* on a utilisé un autre milieu de culture dont la composition est la suivante (Schwartz, 1973):

(NH ₄) ₂ HPO ₄	10,0 g
K ₂ HPO ₄	5,0 g
Na ₂ SO ₄	1,0 ml
CaCl ₂ (50 g/l).....	1,0 ml
Sels :.....	10,0 ml <u>solution I</u>
Micro-éléments :.....	1,0 ml <u>solution II</u>
Eau distillée.....	1 litre

Le pH est ajusté à une valeur de 7,5 à 7,8 par une solution d'HCl 10 M.

La composition en g.l⁻¹ des solutions I et II est la suivante:

Solution I

MgSO ₄ .7H ₂ O.....	40,0 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	2,0 g
MnSO ₄ .7H ₂ O.....	1,6 g
NaCl.....	2,0 g
Eau distillée.....	1 litre

Solution II

H ₃ BO ₃	0,50 g
CuSO ₄ .5H ₂ O.....	0,04 g
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O.....	0,20 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	8,00 g
CuCl ₂ .6H ₂ O.....	0,20 g
Eau distillée.....	1 litre

Les hydrocarbures (1 g/l), sont additionnés aux milieux de culture avant stérilisation à 120 °C pendant 20 minutes. Dans le cas des trois premières bactéries, 2 ml d'une solution de sulfate de fer (FeSO₄.7H₂O, 1 g.l⁻¹) et 4 ml d'une solution de phosphate de dipotassium (K₂HPO₄, 18,6 g.l⁻¹), stérilisés séparément (120 °C pendant 20 minutes), sont ajoutés dans le milieu de culture avant utilisation.

II.2. CONSERVATION DES SOUCHES

Les souches sont conservées à 4 °C sur milieu riche solide, constitué d'eau de mer synthétique contenant 5 g.l⁻¹ de bactopectone (bioMérieux), 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure (bioMérieux) et 20 g.l⁻¹ d'agar-agar (bioMérieux). Le repiquage est effectué tous les mois.

II.3. CULTURE SUR HYDROCARBURES

Pour réaliser les cultures sur hydrocarbures, on commence par effectuer deux précultures successives. La première est réalisée avec un substrat soluble comme source de carbone, l'acétate d'ammonium (concentration: 4 g.l⁻¹), à partir de colonies conservées sur gélose nutritive âgées de 24 heures. En début de phase stationnaire de croissance, cette préculture sert d'inoculum pour la seconde: elle est rajoutée à raison de 5 % en volume à un

milieu contenant l'hydrocarbure. Ces deux précultures sont effectuées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant 120 ml de milieu de culture, avec agitation magnétique à une température de 25 °C ($\pm 2^\circ$).

Les précultures sur hydrocarbures servent, lorsqu'elles entrent en phase stationnaire de croissance, d'inocula pour les expériences elles-mêmes: elles sont ajoutées, à raison de 5 % en volume, à des erlenmeyers de 3 l contenant 750 ml de milieu et 1g/l d'hydrocarbure.

Toutes les cultures sont réalisées avec agitation magnétique (400 tpm) à une température de 25 °C ($\pm 2^\circ$). La croissance a été suivie par mesure de la densité optique à 450 nm avec un spectrophotomètre UV (Varian DMS 90). Les cultures sont arrêtées en fin de phase exponentielle de croissance et les biomasses sont recueillies par centrifugation à 10000 tpm à 4 °C pendant 15 min. Les culots sont lavés avec 30 ml d'eau de mer synthétique puis lyophilisés.

III. Synthèse des hydrocarbures

Certains des hydrocarbures utilisés comme source de carbone dans les cultures des différentes souches bactériennes sont disponibles dans le commerce alors que d'autres ont dû être synthétisés. Les hydrocarbures utilisés, leur pureté et leur origine sont exposés dans le tableau II.1.

Tableau II.1. Liste des hydrocarbures utilisés comme source de carbone.

Hydrocarbure	Origine	Pureté
<i>n</i> -nonadécane	Fluka	$\geq 99\%$
<i>n</i> -nonadec-1-ène	Fluka	$\geq 99\%$
Héneicosane	Lancaster	99 %
Phényldodécane	Aldrich	96 %
Phényltridécane	Aldrich	99 %
Propylbenzène	Aldrich	98 %
Ethylbenzène	Aldrich	99 %
2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane	Aldrich	98 %
Pristane	Sigma	98 %
<i>ai</i> -nonadécane	} Synthétisés suivant la réaction de Wittig.	98 %
<i>i</i> -icosane		97 %
<i>ai</i> -icosane		99 %
10-méthylnonadécane	} Obtenus par hydrogénation catalytique de leur homologues insaturés.	97 %
<i>i</i> -nonadécane		96 %
Cyclohexyldodécane		99 %
Cyclohexyltridécane		99 %

Dans le cas de la synthèse du 10-Me-C₁₉ la procédure est la suivante (Jones and Gilman, 1951; Newman, 1960):

Dans un ballon rodé, on introduit successivement 11,22 g (31,5 mmoles) de bromure de méthyltriphénylphosphonium et 50 ml de THF anhydre. Après solubilisation à température ambiante, on rajoute sans agitation 60 ml d'une solution de *n*-butyl lithium dans le THF anhydre (1,5 M dans l'hexane; 32,4 mmol) et le mélange réactionnel est agité pendant 48 heures à 67 °C. Ensuite, 3 g de nonadécan-10-one (10,5 mmoles) en solution dans 10 ml de THF anhydre sont additionnés et le mélange est mis à reflux pendant 72 heures. Après refroidissement, le mélange réactionnel est centrifugé et le surnageant est dilué dans 200 ml de diéthyl éther et lavé à l'eau (2 × 200 ml). La phase organique est ensuite séchée au sulfate de sodium, filtrée sur coton et concentrée sous pression réduite. L'oléfine produite lors de la réaction (10-méthylène-nonadécane) est séparée par chromatographie du produit brut sur colonne d'alumine (60 g, activité II) et éluée avec 660 ml d'heptane. Le 10-méthyl-nonadécane est obtenu par hydrogénation du 10-méthylène-nonadécane en solution dans 15 ml d'heptane, en présence de Rhodium sur charbon à 5 % comme catalyseur, à 70 °C, sous une pression de 20 bars d'hydrogène et pendant 24 heures. Le catalyseur est ensuite séparé par centrifugation et le 10-méthylnonadécane est purifié par élution sur colonne d'alumine (60 g, activité II) avec 660 ml d'heptane. L'heptane est évaporé sous pression réduite puis au dessiccateur pour éliminer les traces restantes.

Les alcanes *antéiso* C₁₉ et C₂₀ sont obtenus respectivement par la réaction de l'éthylidène triphénylphosphorane obtenu par réaction du bromure d'éthyltriphénylphosphonium et du *n*-butyl lithium, avec respectivement l'heptadécan-2-one (Fluka, pureté ≥ 99 %) et l'octadécan-2-one (Fluka, pureté ≥ 99 %), suivie d'une réduction catalytique des oléfines. L'*iso* C₂₀ est issu de la réaction de l'octadécan-2-one avec le méthylidène triphénylphosphane (obtenu par réaction du bromure de méthyltriphénylphosphonium avec le *n*-butyl lithium), suivie d'une réduction de l'oléfine.

Par ailleurs, l'*iso* nonadécane est préparé par hydrogénation catalytique du *cis*-2-méthyl-octadec-7-ene (Lancaster, pureté ≥ 98 %) en solution dans 15 ml d'heptane, en présence de Rhodium sur charbon à 5 % comme catalyseur, à 60 °C, sous une pression de 20 bars d'hydrogène et pendant 24 heures. De même, le cyclohexyltridécane et le cyclohexyldodécane sont obtenus à partir de la réduction catalytique des phénylalcane correspondants. Les structures des hydrocarbures synthétisés ont été vérifiées par CG/SM (spectres de masse en annexe 1 et 2) et leurs degrés de puretés ont été déterminés par CG.

IV. EXTRACTION DES LIPIDES DES DIFFERENTES CULTURES

Le protocole général d'extraction des différentes catégories de lipides des bactéries Gram-négatives étudiées au cours de ce travail est rapporté sur la Figure II.1.

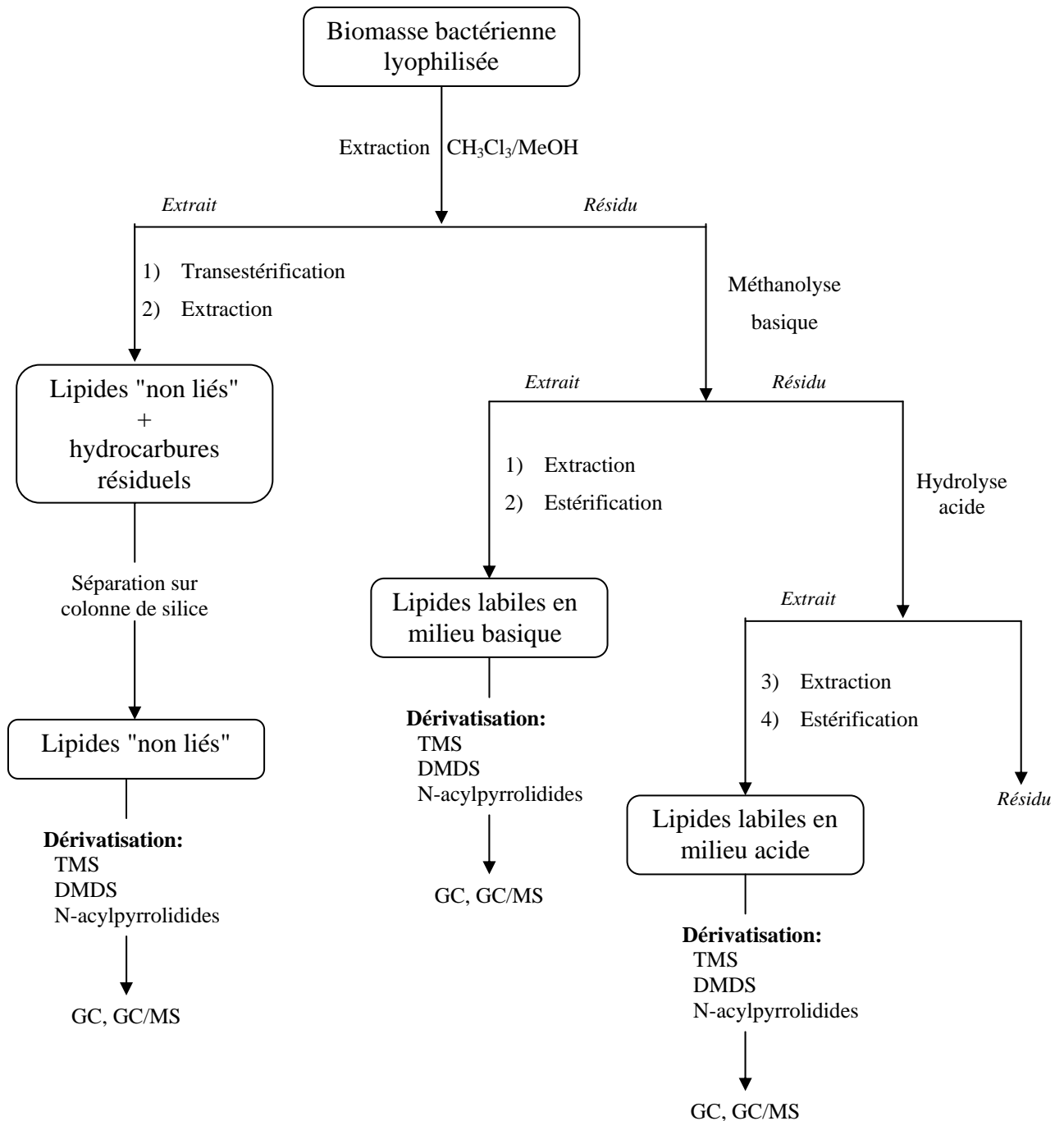


Figure II.1. Protocole général d'extraction des différents groupes de lipides des bactéries Gram-négatives.

IV.1. ISOLEMENT DES LIPIDES FACILEMENT EXTRACTIBLES

Les biomasses bactériennes lyophilisées (de 0,5 à 1,5 g), préalablement broyées sous forme de poudre fine sont extraites par 100 ml d'un mélange chloroforme/méthanol (80/20, v/v). Après agitation pendant 24 heures, le mélange est filtré au moyen de filtres de porosité 0,5 µm, type FH (millipore), et la solution obtenue est concentrée à sec au rotavapor.

Les acides gras présents sous forme d'esters dans les extraits lipidiques sont dérivés en esters méthyliques par transestérification en milieu basique dans le méthanol (Orgambide et al., 1993). L'extrait, dissous dans 70 ml de méthanol 0,1 M en KOH, est agité pendant 2 heures à 0°C. La réaction est arrêtée par addition de 120 ml d'une solution aqueuse de HCl à 5%.

Les lipides sont extraits du milieu réactionnel (par aliquote de 50 ml) par 150 ml d'éther, 50 ml d'heptane. La phase organique est lavée à l'eau jusqu'à pH neutre.

La phase organique est récupérée dans un erlenmeyer, et séchée par addition de 50 g de sulfate de sodium. Après filtration et évaporation du solvant, le produit est repris dans un volume connu d'heptane (de l'ordre de 5 à 10 ml).

Les hydrocarbures utilisés comme source de carbone pour les cultures bactériennes et qui ont été co-extraits avec les lipides "non liés", sont éliminés par chromatographie sur colonne de silice (12 g de gel de silice, 70 - 230 meshes, Merck). L'extrait brut déposé en tête de colonne en solution dans l'heptane est fractionné en deux fractions. Les hydrocarbures sont élués avec 60 ml d'heptane et les lipides bactériens sont ensuite récupérés avec 60 ml d'un mélange diéthyl éther/méthanol (4/1, v/v). Cette dernière fraction est concentrée sous pression réduite et la solution obtenue est prête pour l'analyse en chromatographie en phase gazeuse et en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

IV.2. EXTRACTION DES LIPIDES EN MILIEU BASIQUE

Au résidu bactérien récupéré après la première extraction, on fait subir une méthanolyse en milieu basique par addition de 20 ml de méthanol/KOH (1M). Le mélange est mis à reflux pendant deux heures.

La partie insoluble est filtrée et rincée avec 20 ml de méthanol. Au filtrat on ajoute 120 ml d'HCl à 10 % et 120 ml d'eau. Les lipides libérés par attaque basique et incluant les esters méthyliques d'acides gras sont ensuite extraits en suivant le même protocole que celui utilisé pour les lipides existant sous forme libre.

Pour être sûr que la méthylation soit totale, une réaction d'estérification supplémentaire a été effectuée avec le diazométhane en solution dans l'éther (2 ml), il s'agit d'une réaction instantanée qui permet d'estérifier les acides gras libres présents dans le mélange.

Le solvant et l'excès de diazométhane sont évaporés, et les lipides labiles en milieu basique sont repris dans un volume connu d'heptane (3 à 5 ml).

IV.3. EXTRACTION DES ACIDES LABILES EN MILIEU ACIDE

Au résidu récupéré après l'extraction des lipides labiles en milieu basique, on ajoute 12 ml d'une solution aqueuse d' HCl 4 M; le mélange est mis à reflux à 110°C pendant 6 heures. Après refroidissement, le mélange est filtré par des filtres de porosité 0,5 µm type FH et le résidu est rincé avec 20 ml d'eau et ensuite avec 20 ml de méthanol.

Les lipides libérés par attaque acide sont extraits du filtrat en suivant le même protocole que celui décrit pour les lipides existant sous forme libre. Une fois le solvant évaporé, les acides gras sont estérifiés par le diazométhane en solution dans l'éther. Après évaporation de l'éther et du diazométhane en excès, l'extrait est reconstitué dans quelques dizaines de microlitres d'heptane. Les composés lipidiques seront ensuite identifiés par CG et CG/SM/IE.

V. Synthèse du diazométhane

Le diazométhane a été préparé en solution étherée par l'action d'une base sur un nitrosamide, en présence d'alcool (Williams, 1993). Dans notre cas, la base utilisée est l'hydroxyde de potassium, le nitrosamide choisi est le *N*-méthyl-*N*-nitroso-*p*-toluène sulfonamide (diazaldTM) et l'alcool étant l'éthanol. La synthèse du diazométhane s'effectue selon le schéma présenté sur la Figure II.2.

A 1,25 g de KOH dissous dans 2 ml d'eau distillée et 2,5 ml d'éthanol à 95 %. On rajoute goutte à goutte une solution de diazald 1,25 g dans le diéthyléther (30 ml).

Le diazométhane formé et l'éther sont condensés au niveau du compartiment "B", maintenu à une température de l'ordre de -20 °C grâce à un mélange de glace et de chlorure de sodium.

Le diazométhane est potentiellement explosif, il faut éviter en particulier les verreries rodées et la forte lumière. Les solutions de diazométhane dans le diéthyléther sont stables

pour des courtes durées à condition qu'elles soient stockées à l'obscurité et à basse température.

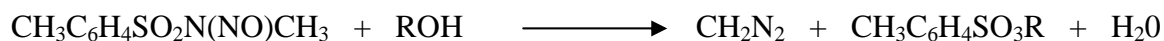
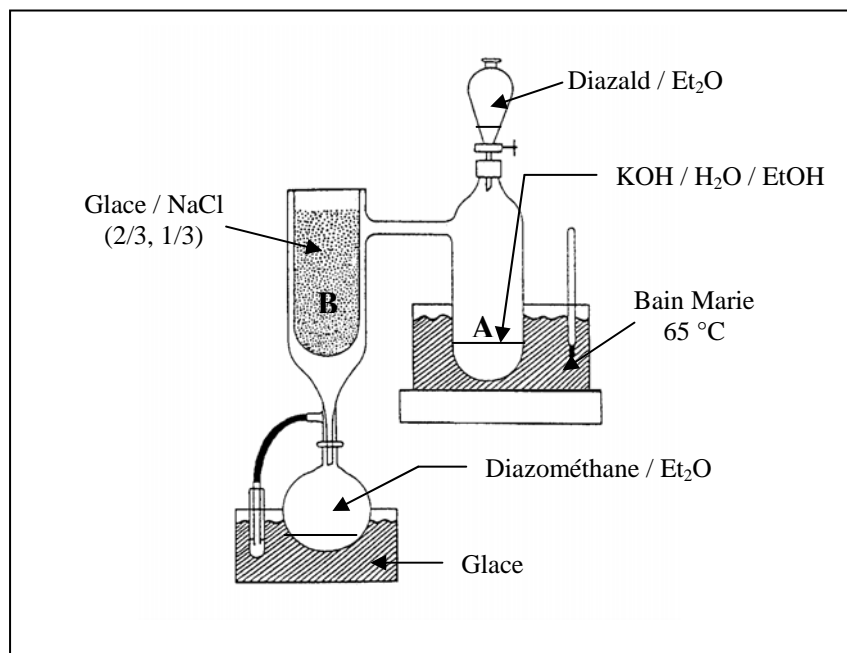


Figure II.2. Préparation du diazométhane à partir du *N*-méthyl-*N*-nitroso-*p*-toluène sulfonamide.

VI. PREPARATION DES DERIVES DIMETHYL DISULFURES (DMDS)

A une partie de l'extrait lipidique (2mg) préalablement évaporée à sec, dissoute dans 100 µl d'heptane sont ajoutés 100 µl de DMDS et 1,2 mg d'iode en solution dans 20 µl de diéthyléther (60 mg dans 1 ml de diéthyléther) (Scribe et al., 1990). La solution ainsi obtenue est chauffée à 50°C en tube de Pyrex hermétiquement clos par un bouchon en Téflon, pendant 48 heures, ce qui nous permet d'obtenir des rendements quantitatifs. Il est déconseillé d'effectuer la réaction à des températures supérieures pour diminuer le temps de réaction, afin d'éviter la formation de composés secondaires gênant l'analyse par CG/SM. Ensuite l'excès d'iode est réduit par addition de 200 µl d'une solution aqueuse de thiosulfate de sodium (5 %

en poids), le mélange réactionnel est extrait deux fois par 200 µl d'heptane. Les phases organiques récupérées sont rassemblées, concentrées sous un courant d'azote et immédiatement analysées par CG/SM/IE.

VII. DETERMINATION DE LA POSITION DU GROUPEMENT HYDROXYLE DES HYDROXYACIDES ET DES ALCOOLS: PREPARATION DES DERIVES TRIMETHYLSILYLES

A une partie de l'extrait lipidique (1 à 5 mg) préalablement évaporée à sec, on rajoute successivement 100 µl de pyridine anhydre, 20 µl d'hexamethyldisilazane et 10 µl de triméthylchlorosilane. La solution ainsi obtenue est agitée au vortex pendant une minute à température ambiante, centrifugée et la phase liquide est récupérée et concentrée sous un courant d'azote. Le produit est prêt pour l'analyse par CG/MS/IE.

VIII. FORMATION DES DERIVES N-ACYL-PYRROLIDIDES

A une partie de l'extrait lipidique dont on a éliminé le solvant, on rajoute: 900 µl de pyrrolidine et 100 µl d'acide acétique (Ayanoglu et al, 1982). Le mélange est chauffé à 100 °C pendant une heure dans un tube hermétiquement clos. Les dérivés N-acyl-pyrrolidides sont extraits à l'éther (20 ml), en milieu acide (20 ml d'HCl à 10 %). La phase éther est ensuite lavée jusqu'à pH neutre puis séchée au sulfate de sodium. Après filtration sur coton, l'éther est ensuite éliminé à l'évaporateur rotatif et le résidu dissous dans l'heptane pour être analysé par CG et CG/SM/IE.

IX. REDUCTION CATALYTIQUE DES ACIDES GRAS INSATURES

Une partie de l'extrait lipidique (2 mg) dissoute dans l'éthanol est réduite sous un bullage d'hydrogène en présence de Paladium sur charbon à 5 % utilisé comme catalyseur. La réaction est effectuée à température ambiante pendant 2 heures avec agitation. Le catalyseur est ensuite éliminé par centrifugation. Les produits réactionnels présents dans le surnageant sont concentrés à l'évaporateur rotatif avant analyse par CG et CG/MS/IE.

Cette réaction ne touche pas les doubles liaisons carbone-oxygène.

X. Méthodes utilisées pour l'analyse des lipides

X.1. CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE

Le chromatographe en phase gazeuse utilisé est un appareil Hewlet-Packard HP 6890, série II. Les conditions analytiques sont les suivantes:

* Caractéristiques et dimensions de la colonne:

- colonne capillaire en silice fondue (JW Scientific DB-5MS)
- longueur: 30 m.
- diamètre intérieur: 0.25 mm.
- épaisseur du film: 0.5 μm .
- composition: la phase est peu polaire (95 % polydiméthylsiloxane, 5 % phénylsiloxane: 95 % apolaire/5 % polaire).
- stabilité du polymère: 300 °C.
- Gaz vecteur: Hélium à une pression de 1 bar.

* Type et température de l'injecteur: injecteur split/splitless utilisé en mode splitless avec un débit de fuite réglé à 50 ml/min et la température à 280 °C.

* type et température du détecteur: détecteur à ionisation de flamme (FID) chauffé à 300 °C.

Les chromatogrammes ont été réalisés en programmation linéaire de température, de 100 à 300 °C avec un gradient de 4 °C par minute.

X.2. CHROMATOGRAPHIE GAZEUSE COUPLEE A LA SPECTROMETRIE DE MASSE PAR IMPACT ELECTRONIQUE

Dans cette étude nous avons utilisé un chromatographe 6890 N d'Agilent Technologies couplé à un spectromètre de masse 5973N à analyseur quadripolaire. La colonne et les conditions chromatographiques sont identiques à celles utilisées en chromatographie gazeuse.

Les différents paramètres de réglage du spectromètre de masse sont les suivantes :

- Température de la source d'ionisation: 220 °C
- Température de la canne de transfert : 250 °C
- Température du filtre quadripolaire : 100 °C
- Gamme de masse balayée : $m/z = 35-600$
- Potentiel d'ionisation : 70 eV

CHAPITRE III

Biodégradation de différentes familles d'hydrocarbures par *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*: influence sur la composition lipidique et voies métaboliques.

Effects of hydrocarbon structure on FA and β -hydroxy acid composition in the hydrocarbon-degrading bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*

**Mohamed Soltani, Pierre Metzger and Claude Largeau
Lipids 39, 491-505 (2004).**

I. INTRODUCTION

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'effet de la nature des hydrocarbures, apportés dans le milieu de culture comme seule source de carbone, sur la composition lipidique d'une bactérie marine dégradant activement ces composés. Le travail a été réalisé sur *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* cultivée sur onze hydrocarbures différents pouvant être classés en quatre principaux types:

- composés linéaires non ramifiés, saturés, n -C₁₉ et n -C₂₁; les résultats de travaux récents sur n -C₂₀ seront également rappelés;
- composés linéaires ramifiés, saturés, de type *iso* et *antéiso* C₁₉ et C₂₀, et un composé ramifié en milieu de chaîne: 10-Me-C₁₉;
- composés comportant une partie cyclique: phényl-alcanes portant une chaîne normale C₁₂ et C₁₃ et cyclohexyl-alcane portant une chaîne normale C₁₃;
- enfin un composé insaturé n -C_{19:1}, à double liaison terminale.

Six hydrocarbures également testés n'ont pas pu assurer la croissance de *M. hydrocarbonoclasticus*. Il s'agit du cyclohexyldodécane, de l'heptaméthyl-2,2,4,4,6,8,8-nonane, du pristane, du squalane, de l'ethyl-benzene et du propyl-benzene. Les raisons possibles de l'inaptitude de la bactérie à métaboliser ces composés seront discutées ultérieurement.

Cette étude a pour but d'identifier les composés lipidiques de cette souche bactérienne ainsi cultivée et de mettre en évidence leurs degrés de variabilité en fonction de la source de carbone.

Ce chapitre propose tout d'abord une présentation de la bactérie étudiée. L'ensemble des données qualitatives et quantitatives recueillies sur les composés lipidiques extraits de la biomasse de *M. hydrocarbonoclasticus* sont ensuite exposées et discutées. Enfin, une analyse comparative des principaux lipides identifiés, en fonction de la source de carbone utilisée pour les cultures sera présentée dans la dernière partie de ce chapitre.

II. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE *M. HYDROCARBONOCLASTICUS*

Une étude entreprise le long des côtes méditerranéennes françaises pour suivre la dégradation des hydrocarbures par les populations de bactéries, a conduit à l'isolement d'une nouvelle espèce dégradant le pétrole, à partir d'un échantillon de sédiment collecté dans un site pollué (Golfe de Fos à 50 km au nord de Marseille) (Al-Mallah et al., 1990).

Il s'agit d'une bactérie en forme de bâtonnet, Gram-négative, anaérobie facultative et qui semble ubiquiste en milieu marin, appelée à l'origine *Alteromonas* sp. 17. Elle est capable de dégrader une grande variété d'hydrocarbures liquides et solides (elle peut être cultivée sur un milieu contenant comme source unique de carbone, d'une part de l'acétate d'ammonium et d'autre part des hydrocarbures: alcanes normaux compris entre C₁₀ et C₃₀), et de produire une grande quantité de bioémulsifiants non dialysables.

Des études microbiologiques menées par Gauthier et al. (1992) ont permis d'établir la position taxonomique exacte de cette bactérie marine et de démontrer son appartenance à un genre nouveau. Le nom *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a été adopté en référence à son origine marine et son potentiel de dégradation des hydrocarbures.

La croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* peut avoir lieu en anaérobiose, en présence de KNO₃ comme accepteur terminal d'électrons, et avec le citrate, l'acétate ou le succinate (sel de sodium) comme seule source de carbone et d'énergie. Par contre la croissance ne peut avoir lieu en anaérobiose en présence de glucose avec ou sans nitrate.

Par ailleurs, cette bactérie peut utiliser par exemple les composés suivants: acétate, butyrate, fumarate, glycine, lysine, L-méthionine, comme seule source de carbone et d'énergie. Elle est aussi capable d'utiliser le DL-hydroxybutyrate, mais n'accumule pas le polymère correspondant comme produit de réserve, comme le font la plupart des bactéries Gram-négatives.

Cette bactérie a une activité hydrocarbonoclastique très marquée. En effet, elle est capable d'utiliser le tétradécane, l'hexadécane, l'icosane, l'heneicosane comme seule source de carbone et d'énergie.

M. hydrocarbonoclasticus est capable de croître à une température comprise entre 10 et 45 °C avec un optimum de croissance à 32 °C, et peut tolérer une variation de pH de 6,1 à 9,5 avec un optimum de 7 à 7,5 (Gauthier et al., 1992; Linares et al., 1996).

Cette bactérie présente une halotolérance extrême, et elle est aussi halophile faible. En effet, elle est capable de croître dans un milieu dont la concentration en NaCl est comprise entre 0,08 et 3,5 M, l'optimum de croissance est observé pour une concentration de 0,6 M, qui est proche de celle existante en Méditerranée (Linares et al., 1996). La cellule de *M. hydrocarbonoclasticus* a une exigence pour les ions Na⁺ : aucune croissance n'est observée en milieu synthétique sans addition de Na⁺. L'absence de ce dernier ne peut être palliée par l'addition de LiCl ou KCl, mais l'ajout de NaNO₃ conduit à une croissance immédiate des souches. En effet, les ions Na⁺ interviennent dans la conservation du volume cytoplasmique.

Les travaux de Linares et al. (1996), ont montré que la croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* sur l'acétate d'ammonium ou l'icosane est affectée par la salinité: on observe une augmentation linéaire du temps de génération et une augmentation de la période de latence quand la concentration en NaCl augmente (> 0,6 M), bien qu'il n'y ait aucun changement significatif de la biomasse finale sur toute la gamme de salinité. Une augmentation de la salinité de 0,2 à 2,5 M n'a aucun effet significatif sur sa capacité à biodégrader l'icosane.

La recherche bibliographique permet de constater un intérêt croissant pour *M. hydrocarbonoclasticus*. Par ailleurs, le genre *Marinobacter* s'accroît, et d'autres espèces manifestant une activité dégradative vis à vis des hydrocarbures ont été récemment découvertes. Il s'agit notamment de *M. aquaeolei* (Huu et al., 1999), que nous traiterons dans le chapitre suivant, *M. lipolyticus* (Martin et al., 2003) ou encore *M. squalenivorans* (Rontani et al., 2003) qui, comme nom l'indique, dégrade activement le squalène.

III. HYDROCARBURES TESTES ET CULTURES

Dans le Tableau III.1 sont rapportés l'origine des hydrocarbures testés, leurs degrés de pureté ainsi que l'identification en GC/SM des autres composés présents dans ces échantillons. Aucune purification des composés commerciaux n'a été effectuée. Quand à ceux synthétisés, une purification sur colonne de silice du produit réactionnel issu de la dernière étape de synthèse a été réalisée.

Tableau III.1. Données relatives aux hydrocarbures fournis aux cultures de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Hydrocarbures	Origine	Etat physique à T _{ambiante}	Croissance bactérienne	% Pureté ^a	Autres identifiés
<i>n</i> -C ₁₉	C	Solide	+	≥ 99	aucun
<i>n</i> -C ₂₁	C	Solide	+	> 99	aucun
<i>i</i> -C ₁₉	S	Liquide	+	96	<i>i</i> -C ₁₈
<i>i</i> -C ₂₀	S	Liquide	+	97	aucun
<i>ai</i> -C ₁₉	S	Liquide	+	98	<i>n</i> -C ₁₇ , <i>i</i> -C ₁₈ , <i>ai</i> -C ₁₈ et <i>n</i> -C ₁₈
<i>ai</i> -C ₂₀	S	Liquide	+	99	<i>i</i> -C ₁₉
10-Me-C ₁₉	S	Liquide	+	97	10-méthylène-C ₁₉ , 10-Me-C _{19:1}
Phenyl-C ₁₂	C	Liquide	+	96	1-phenyl-1-nonène, phenyldécane, phenylundécane, phenyltridécane et phenyldodécane.
Phenyl-C ₁₃	C	Liquide	+	99	aucun
Cyclohexyl-C ₁₃	S	Liquide	+	> 99	aucun
<i>n</i> -C _{19:1}	C	Liquide	+	≥ 99	<i>n</i> -C _{19:1ω2}
Pristane	C	Liquide	-	98	nd
Squalane	C	Liquide	-	99	nd
Heptaméthylnonane	C	Liquide	-	98	nd
Cyclohexyl-C ₁₂	S	Liquide	-	99	nd
Phenyl-C ₂	C	Liquide	-	99	nd
Phenyl-C ₃	C	Liquide	-	98	nd

C: commercial.

S: synthèse.

^a: indiqué par le vendeur ou déterminée par GC.

^b: selon analyse en CG/SM.

nd: non déterminé

Dans un premier temps, *M. hydrocarbonoclasticus* a été cultivée sur un milieu contenant de l'acétate d'ammonium comme seule source de carbone. La souche a été ensuite transférée une première fois dans un milieu contenant l'hydrocarbure à étudier. Lorsque cette culture atteignait la phase stationnaire de croissance, un inoculum était prélevé et transféré dans un milieu de culture contenant le même hydrocarbure. La souche était alors cultivée jusqu'à ce que la phase stationnaire soit de nouveau atteinte, et la biomasse récupérée par ultracentrifugation et étudiée.

IV. PROTOCOLE D'EXTRACTION DES LIPIDES et resultats quantitatifs

En général l'analyse des lipides de bactéries, comprend une extraction avec un solvant organique, généralement suivie d'une saponification pour obtenir les lipides sous forme libre et estérifiée. Ensuite, les différentes classes de composés sont séparées selon leur polarité par chromatographie sur couche mince ou sur colonne puis les produits sont analysés par chromatographie en phase gazeuse et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Cependant, il est bien connu que de nombreuses bactéries, incluant les bactéries Gram-négatives, contiennent des lipides qui ne sont libérés que par méthanolyse basique, tel que les acides gras engagés dans les liaisons esters dans les matrices macromoléculaires de la membrane bactérienne. Les acides gras et les β -hydroxyacides engagés dans les liaisons amides, présents dans les lipopolysaccharides (LPS), nécessitent quant à eux une hydrolyse en milieu acide (Goossens et al., 1986, 1989a; Mendoza et al., 1987a; Orgambide et al., 1993; Lattuari et al., 2002; Wakeham, 2003). Un maximum d'informations est obtenu par une séquence d'extraction et d'hydrolyses, qui permet de distinguer entre les lipides facilement extractibles (existant sous forme "libre"), les lipides labiles en milieu basique (engagés dans des liaisons esters) et les lipides labiles en milieu acide (incluant les lipides engagés dans des liaisons amides).

Des protocoles similaires à ceux appliqués aux bactéries, ont été utilisés pour l'étude de la matière organique présente dans les sédiments, afin d'établir son état de dégradation et son origine (Cranwell, 1981b; Zegouagh et al., 1996, 1998; Goossens et al., 1989b; Fukushima et al., 1992a, b; Wakeham et al., 1999).

Nous avons appliqué dans ce travail une procédure analytique qui nous permet de distinguer trois fractions lipidiques: les lipides facilement extractibles (non liés), les lipides dégagés par traitement basique de la biomasse bactérienne déjà extraite aux solvants (liés par des liaisons esters), et ceux libérés par traitement acide du résidu bactérien (liés par des liaisons amides). La Figure II.1 illustre le protocole général d'extraction des différents types de lipides de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les résultats quantitatifs concernant les trois fractions lipidiques de *M. hydrocarbonoclasticus* en fonction de la source de carbone sont rassemblés dans le Tableau III.2. Les résultats obtenus par Lattuati et al. (2002) correspondant aux cultures de la même souche bactérienne sur acétate d'ammonium et sur icosane ($n\text{-C}_{20}$) y figurent également pour comparaison. Le pourcentage des lipides totaux obtenus par extraction de la biomasse bactérienne de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur hydrocarbures varie de 7,3 % (culture sur $i\text{-C}_{20}$) à 17,1 % (culture sur $n\text{-nonadec-1-ène}$) du poids sec de la biomasse. Ces valeurs sont supérieures à celle obtenue avec la culture sur milieu contenant l'acétate d'ammonium comme source unique de carbone et d'énergie (5,2 % de la biomasse sèche; Lattuati et al., 2002). De telles variations ont été observées chez d'autres bactéries hydrocarbonoclastiques, montrant une augmentation de leur pourcentage lipidique lors de la croissance sur hydrocarbures, comparé aux cultures sur substrats solubles (Makula et Finnerty, 1968a; Goutx et al., 1990; Doumenq et al., 1999). Ces variations dans le contenu lipidique total peuvent être attribuées aux différences dans l'état physiologique des bactéries au moment où les cultures sont arrêtées, et/ou à l'état liquide ou solide des hydrocarbures à la température de la culture, ce qui peut influencer leur assimilation par les bactéries.

Chacun des différents traitements fournit une quantité substantielle de lipides. Les lipides "non liés" constituent la fraction lipidique la plus importante, variant entre 68,6 % (culture sur $n\text{-C}_{19}$) et 84,5 % (culture sur $n\text{-C}_{19:1}$) des lipides totaux, alors que les lipides engagés dans des liaisons esters représentent toujours la deuxième fraction lipidique la plus importante avec des valeurs comprises entre environ 10 % et 24 % des lipides totaux. Les lipides obtenus par traitement acide, correspondent à la fraction la moins abondante avec environ 3 à 10 % des lipides totaux (moins de 1 % de la biomasse sèche).

Dans cette étude, les hydrocarbures utilisés pour réaliser les différentes cultures présentent des structures variées, cependant leur nombre d'atomes de carbone couvre une gamme restreinte (de 18 à 21 atomes de carbone), ce qui nous oblige à considérer les résultats sur l'influence de la longueur de la chaîne alkyle sur la composition lipidique avec beaucoup de précaution. Une étude détaillée de l'influence de la longueur de la chaîne alkyl des n -alcanes sur la composition en acides gras des lipides "non liés" d'une autre souche de *M. hydrocarbonoclasticus* (617) a par ailleurs été effectuée par Doumenq et al. (2001).

Tableau III.2. Abondance des différentes fractions lipidiques de *M. hydrocarbonoclasticus* en fonction de la source de carbone.

Source de carbone	<i>Pourcentage par rapport à la biomasse sèche</i>				<i>Pourcentage par rapport aux lipides totaux</i>		
	Lipides totaux	"Non liés" [#]	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide	"Non liés"	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide
Acétate d'ammonium*	5,2	3,5	1,1	0,6	67,3	21,2	11,5
<i>n</i> -C ₁₉	12,7	8,7	3,1	0,9	68,6	24,1	7,3
<i>n</i> -C ₂₀ *	7,8	5,6	1,5	0,7	75,7	20,3	9,5
<i>n</i> -C ₂₁	11,9	9,7	1,8	0,4	81,2	15,4	3,4
<i>i</i> -C ₁₉	12,3	10,2	1,6	0,5	83,2	12,7	4,1
<i>i</i> -C ₂₀	7,3	5,5	1,1	0,7	75,3	15,1	9,6
<i>ai</i> -C ₁₉	11,0	9,2	1,1	0,7	83,6	10,0	6,4
<i>a-i</i> C ₂₀	10,3	8,0	1,6	0,7	77,7	15,5	6,8
10-Me-C ₁₉	10,2	7,9	1,5	0,8	77,4	14,7	7,8
<i>n</i> -nonadec-1-ene	17,1	14,4	1,9	0,8	84,5	10,8	4,7
Cyclohexyltridecane	8,7	6,1	1,7	0,9	70,0	19,8	10,2
Phenylododecane	8,1	5,9	1,6	0,6	73,7	19,4	6,8
Phenyltridecane	8,8	6,3	1,8	0,7	71,9	20,4	7,7

*: d'après Lattuati et al. (2002).

#: après élimination de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone.

Les fractions correspondantes aux lipides "libres" sont dans un premier temps soumises à une méthanolyse basique afin d'obtenir les esters méthyliques par transestérification. Quand aux fractions contenant les lipides labiles en milieu acide elles ont subi un traitement par le diazométhane pour former les esters méthyliques correspondants. Afin de déterminer la position des groupes hydroxyles dans les alcools gras et les hydroxy acides, chacune des trois fractions lipidiques a subi une triméthylsilylation. La position des doubles liaisons carbone-carbone dans les composés insaturés a été déterminée sur les dérivés diméthyl-disulfures. Enfin, l'existence et la position d'une ramification sur les chaînes alkyles des acides gras ont été établies à partir des dérivés *N*-acyl pyrrolidides obtenus par réaction de la pyrrolidine sur les esters méthyliques.

L'identification des composés lipidiques de chaque fraction obtenue à partir des cultures sur chaque hydrocarbure, a été réalisée en CG/SM par analyse des spectres de masse des dérivés décrits ci-dessus, et par comparaison avec les spectres de masse des composés standards lorsque ceux-ci étaient disponibles. Des coinjections en CG avec des standards ont été également effectuées.

V. identification et distribution des lipides de *M. HYDROCARBONOCLASTICUS* Cultivée sur alcanes normaux (C₁₉ et C₂₁)

V.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES EN SPECTROMETRIE DE MASSE

Les lipides extraits des biomasses bactériennes de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur *n*-C₁₉ et *n*-C₂₁ contiennent des acides gras saturés et monoinsaturés, des β-hydroxy acides et des alcools gras saturés et monoinsaturés. Les spectres de masse de quelques uns des produits les plus importants extraits des cultures ainsi que leurs interprétations sont présentés ci-après.

V.1.1. Esters méthyliques d'acides gras normaux saturés

La Figure III.1 montre le spectre de masse de l'acide gras saturé *n*-C_{17:0}, l'ion le plus abondant est *m/z* 74 obtenu par un mécanisme de réarrangement de type Mc Lafferty: il s'agit d'un transfert d'hydrogène (transfert γ-H) suivi d'une rupture de la liaison carbone α - carbone β par rapport au carbonyle, comme le montre la Figure III.2 (Murphy, 1993).

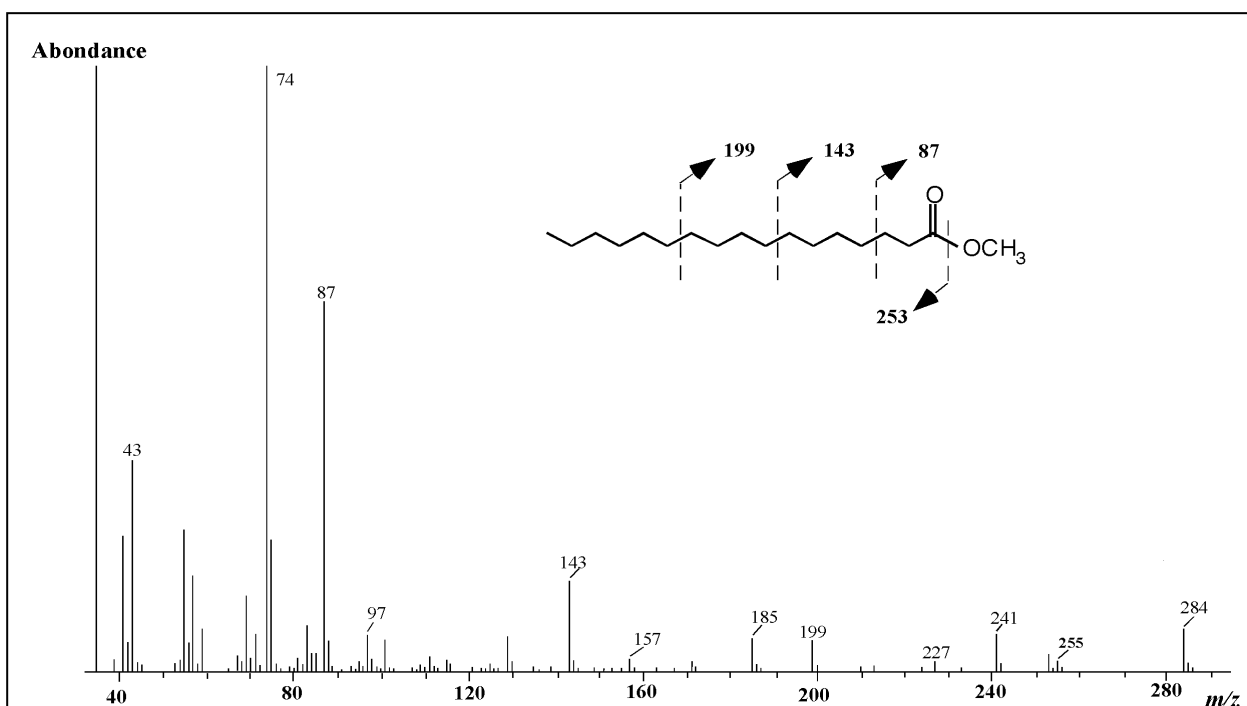


Figure III.1. Spectre de masse par impact électronique de l'ester méthylique de l'acide gras n - $C_{17:0}$.

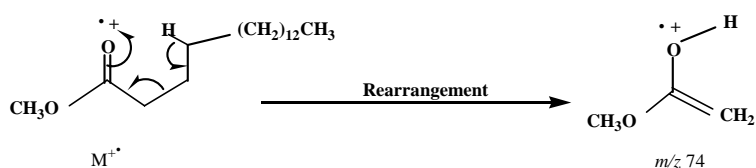


Figure III.2. Mécanisme de formation de l'ion fragment m/z 74.

Les autres ions les plus abondants du spectre sont m/z 87, m/z 143 et m/z 199, qui se forment par des mécanismes de réarrangement, comme le montre la Figure III.3. (Murphy, 1993) en ce qui concerne l'ion m/z 87.

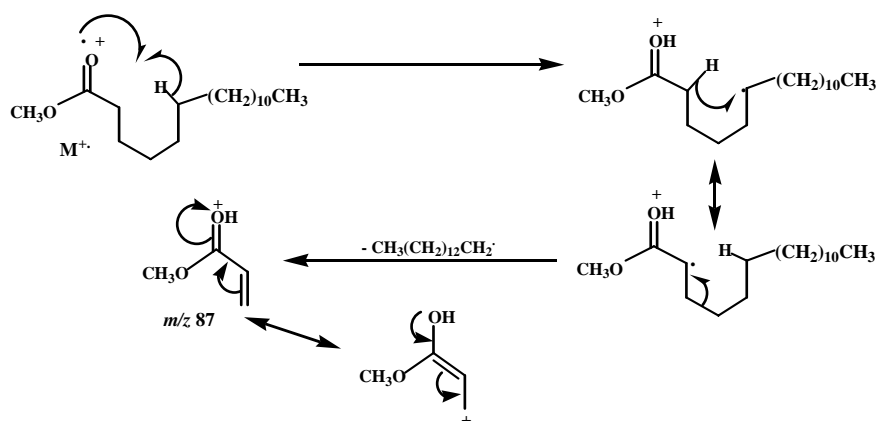


Figure III.3. Mécanisme de fragmentation conduisant à la formation de l'ion fragment m/z 87.

Deux ions carbométhoxylés sont aussi observés, m/z 255 et m/z 241 correspondant à la perte de 29 et 43 u.m.a. à partir de l'ion moléculaire. M-29 et M-43. Ils ne correspondent pas à la perte d'un groupement radicalaire éthyle ou propyle de la chaîne hydrocarbonée, mais à un mécanisme de réarrangement complexe (Murphy, 1993)(Figure III.4).

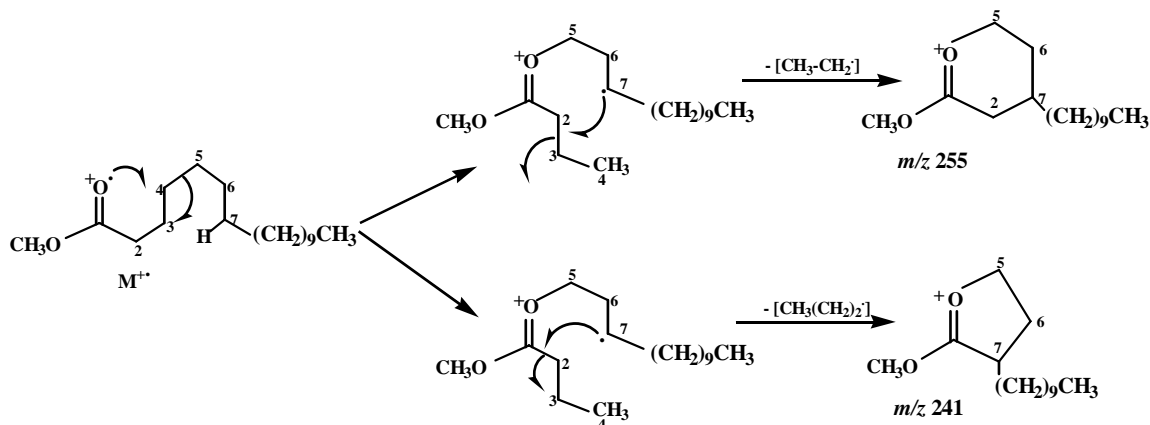


Figure III.4. Mécanismes de fragmentation conduisant à la formation des ions m/z 255 (M-29) et m/z 241 (M-43).

Un autre ion de faible abondance, mais qui est toujours présent dans le spectre de masse des esters méthyliques d'acides gras normaux, est l'ion M-31 représenté par m/z 253 pour l'acide $n\text{-C}_{17:0}$. La formation de cet ion peut être expliquée par deux mécanismes de réarrangement (Murphy, 1993) (Figure III.5).

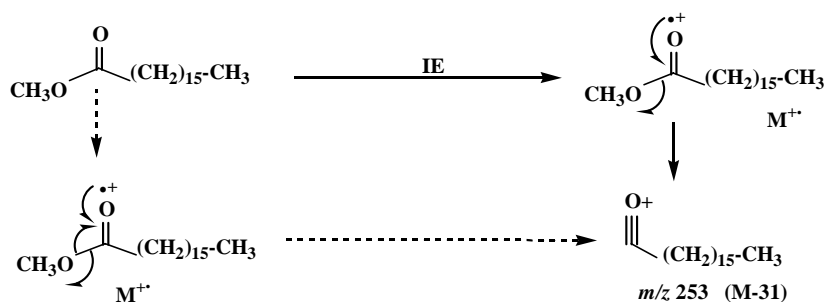


Figure III.5. Mécanisme de fragmentation conduisant à la formation de l'ion m/z 253 (M-31).

La spectrométrie de masse est incapable de différencier entre les acides gras normaux et leurs homologues ramifiés du côté du méthyle terminal (exemple: *iso* et *anteiso*).

Cependant, elle nous permet de distinguer les acides gras ramifiés en position α dont le réarrangement Mc Lafferty conduit à la formation de l'ion 88 à la place du 74 (Figure III.6) et du 101 à la place du 87 (Figure III.7).

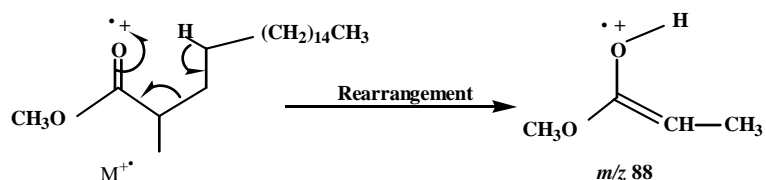


Figure III.6. Mécanisme de formation de l'ion m/z 88 à partir de l'acide 2-méthylnonadécanoïque (méthyl ester).

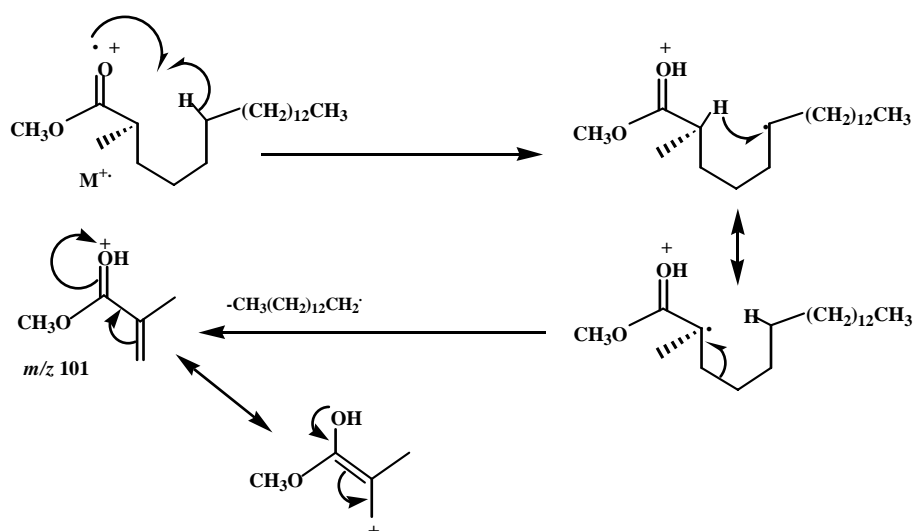


Figure III.7. Mécanisme de formation de l'ion m/z 101 à partir de l'acide 2-méthylnonadécanoïque (méthyl ester).

La Figure III.8 montre le spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide gras 2Me-C₁₉.

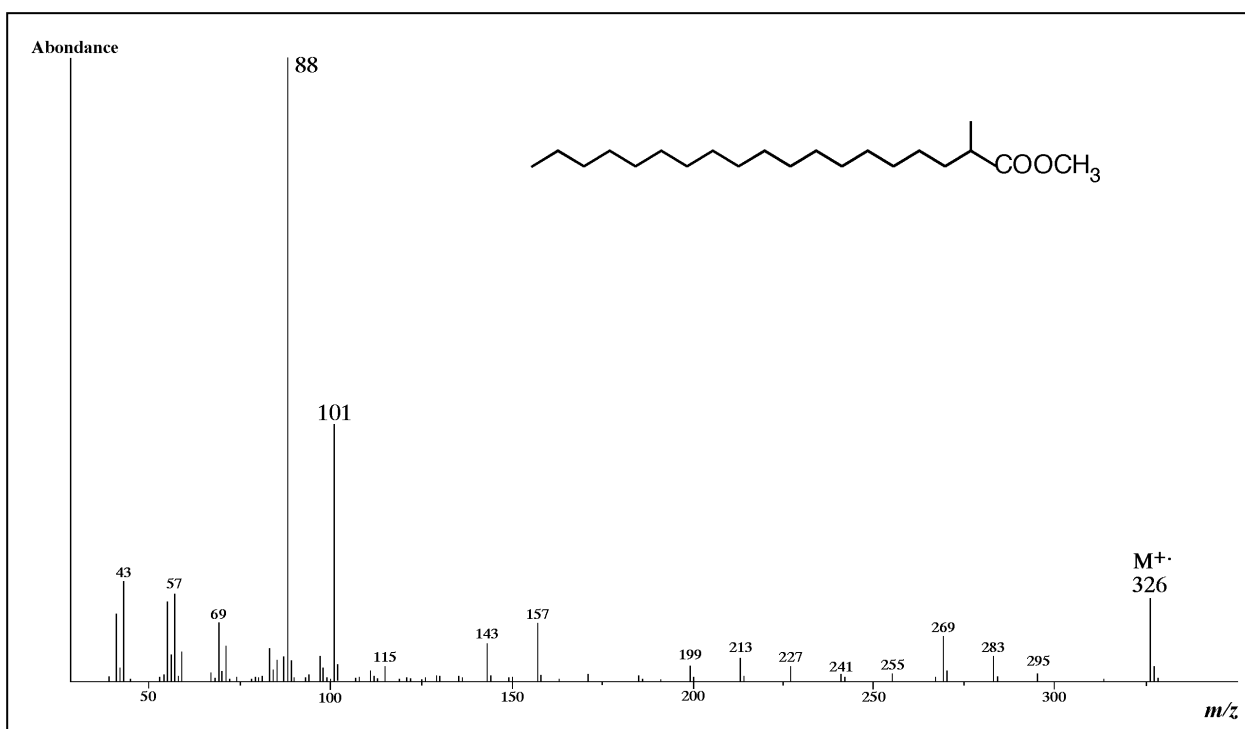


Figure III.8. Spectre de masse de l'ester méthylique de l'acide 2Me-C_{19:0}.

V.1.2. Dérivés DMDS des esters méthyliques d'acides gras insaturés

La spectrométrie de masse par impact électronique ne permet pas de préciser la position de la double liaison des acides gras insaturés, du fait qu'ils ne donnent aucune fragmentation privilégiée des liaisons vinyliques. Par conséquent, nous avons procédé à la localisation de la position de la double liaison par formation des dérivés diméthyles disulfures selon le protocole décrit par Scribe et al. (1990). Ainsi, l'acide insaturé *n*-C_{17:1} prédominant dans les cultures sur *n*-C₁₉ et *n*-C₂₁ correspond aux isomères *n*-C_{17:1ω10}, *n*-C_{17:1ω9} et *n*-C_{17:1ω8} pour la culture sur *n*-C₁₉, et aux isomères *n*-C_{17:1ω9} et *n*-C_{17:1ω8} pour la culture sur *n*-C₂₁. Les Figures III.9 et III.10 illustrent respectivement le spectre de masse et le schéma réactionnel de formation et de fragmentation du dérivé DMDS de l'ester méthylique de l'acide gras *n*-C_{17:1ω8}. Ce dernier met en évidence quatre ions facilement identifiables, M⁺ correspondant à *m/z* 376, et trois autres ions fragments à *m/z* 217, *m/z* 185 et *m/z* 159.

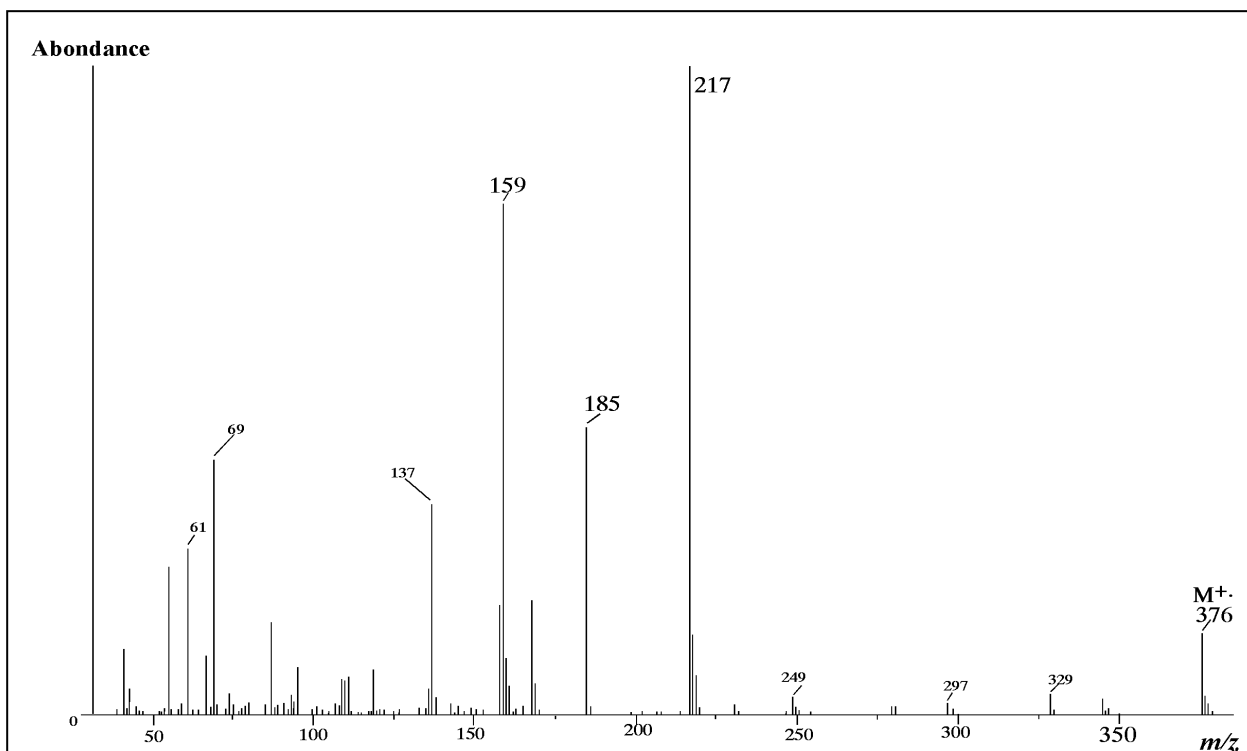


Figure III.9. Spectre de masse par impact électronique du dérivé DMDS de l'ester méthylique de l'acide $n\text{-C}_{17:1\omega 8}$.

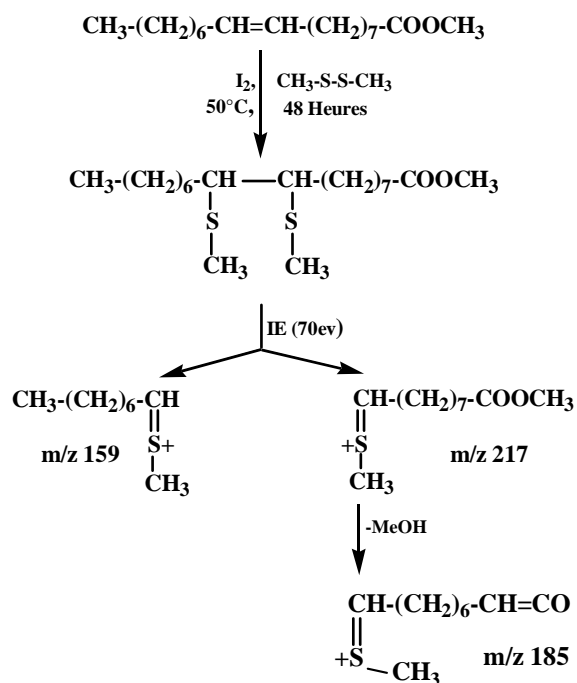


Figure III.10. Schéma réactionnel de formation et de fragmentation du dérivé DMDS de l'ester méthylique de l'acide $n\text{-C}_{17:1\omega 8}$.

L'analyse de ces dérivés DMDS par CG/SM présente un intérêt majeur par rapport à l'analyse des dérivés pyrrolidides en ce qui concerne l'identification structurale des acides gras monoinsaturés. En effet, l'interprétation des fragmentations est facilitée et les rapports signal/bruit des fragments déterminants sont excellents.

V.1.3. Dérivés *N*-acyl pyrrolidides

La position des groupes méthyles sur les chaînes alkyles d'acides gras saturés ramifiés a été déterminée grâce aux dérivés *N*-acylpyrrolidides obtenus par l'action de la pyrrolidine sur les esters méthyliques. Ces *N*-acylpyrrolidides sont caractérisés en spectrométrie de masse par une série régulière d'ions, correspondants aux ruptures simples au niveau de chaque atome de carbone. Quand un ion se trouve en faible intensité dans cette série, une ramification au niveau de cet atome de carbone est suggérée (Anderson, 1978 ; Ayanoglu et al., 1982).

Les Figures III.11, III.12, III.13 et III.14 représentent respectivement les spectres de masse des dérivés *N*-acylpyrrolidides des acides C₁₇ normal, *iso*, *antéiso* et ramifié en position 10.

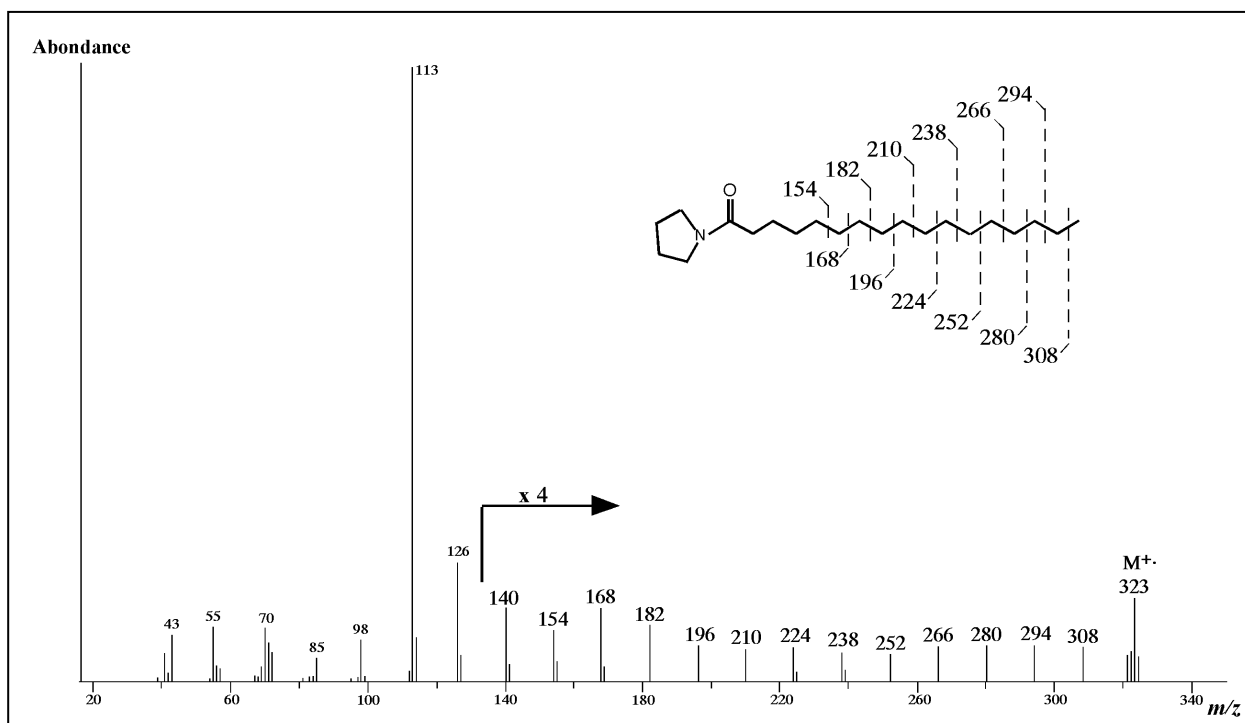


Figure III.11. Spectre de masse du dérivé *N*-acylpyrrolidide de l'acide *n*-C_{17:0}.

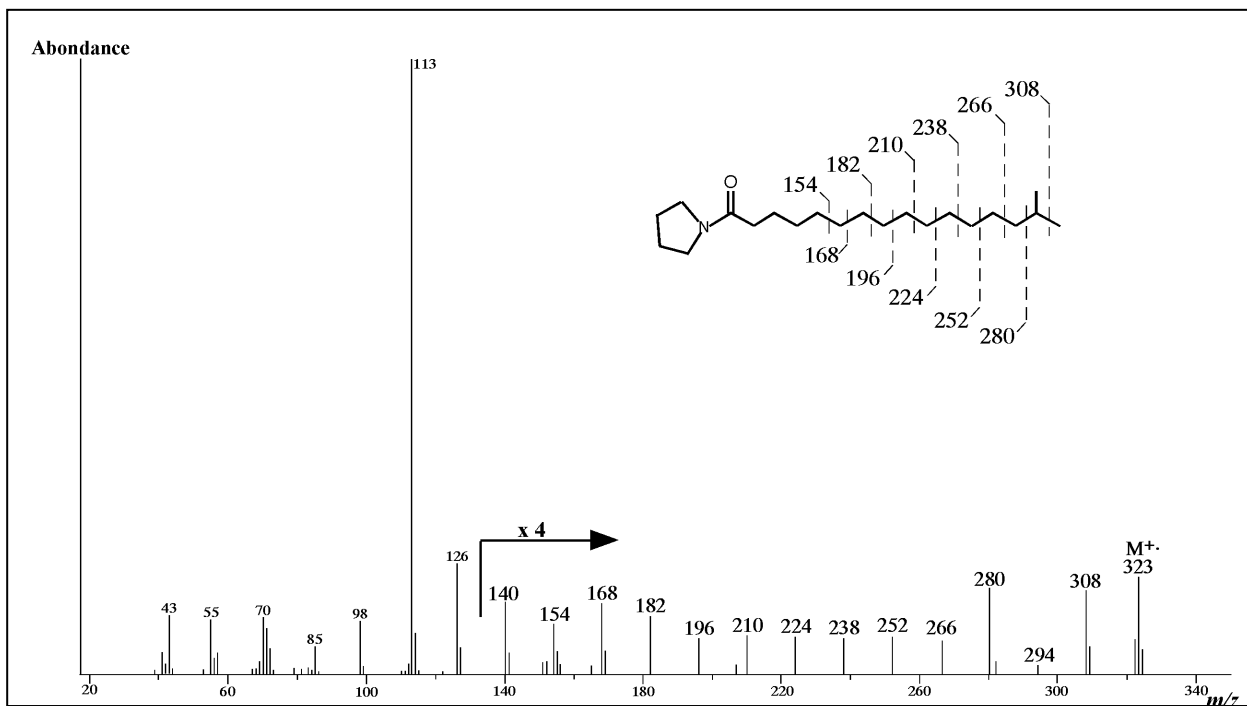


Figure III.12. Spectre de masse du dérivé *N*-acylpyrrolidide de l'acide *i*-C_{17:0}.

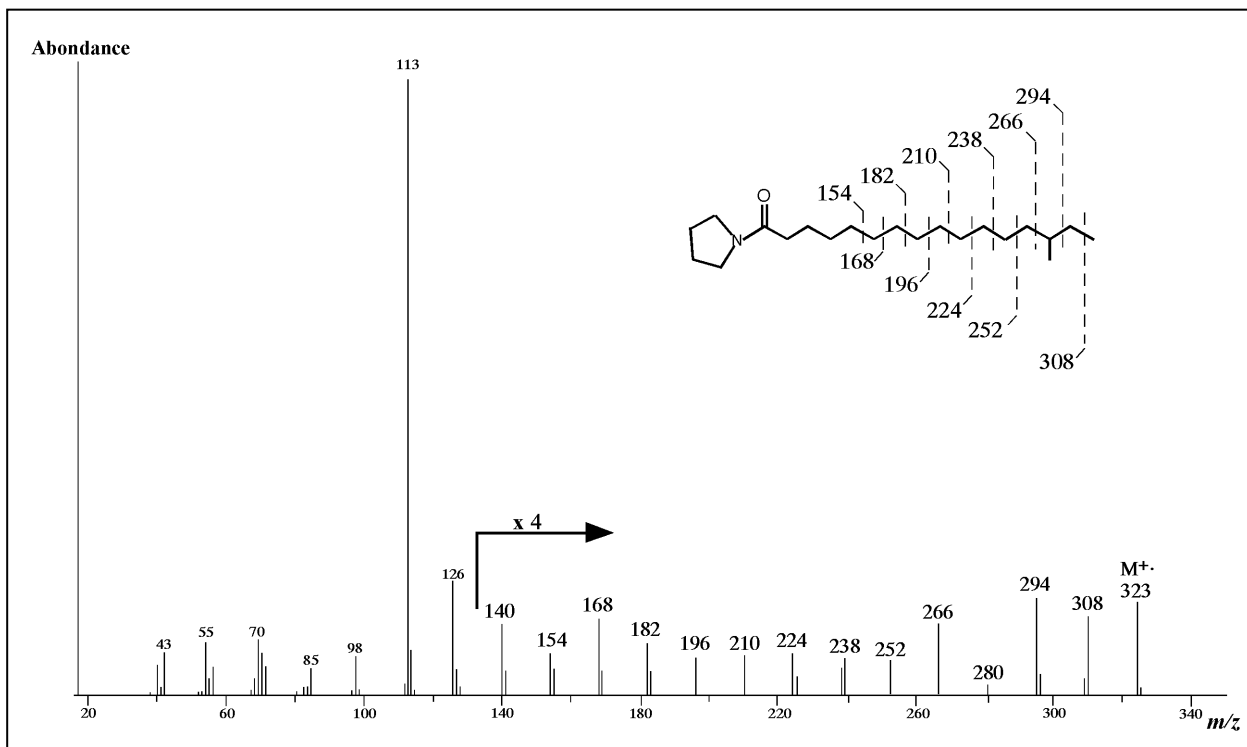


Figure III.13. Spectre de masse du dérivé *N*-acylpyrrolidide de l'acide *ai*-C_{17:0}.

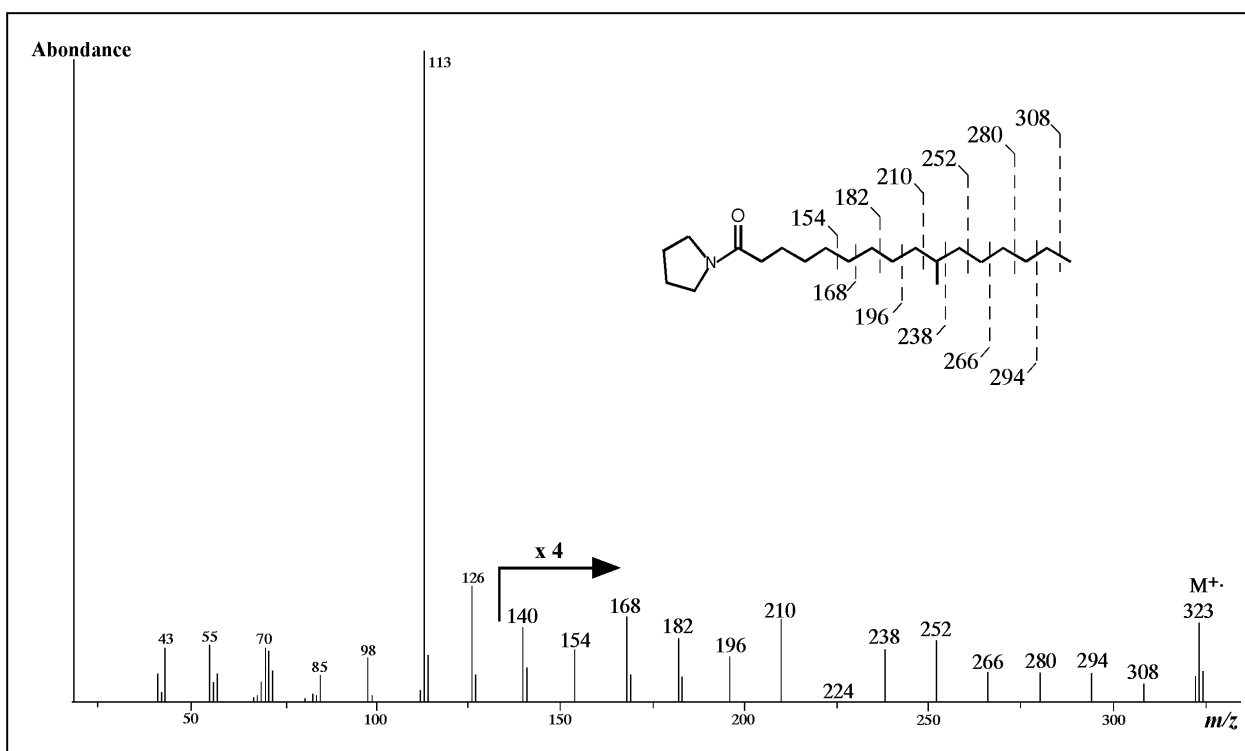


Figure III.14. Spectre de masse du dérivé *N*-acyl pyrrolidide de l'acide 10-Me-C_{15:0}.

V.1.4. Dérivés TMSides alcools gras saturés et insaturés

Les alcools primaires saturés ont été caractérisés grâce aux spectres de masse par impact électronique de leurs dérivés triméthylsilylés (TMSi) caractérisés par deux pics très intenses à m/z 75 [$(CH_3)_2Si=^+OH$] et $M-15$ ($M-CH_3$). Deux autres pics caractéristiques m/z 73 et m/z 103 correspondent respectivement aux ions [$(CH_3)_3Si^+$] et [$CH_2=O^+-Si(CH_3)_3$] (Figure III.15)

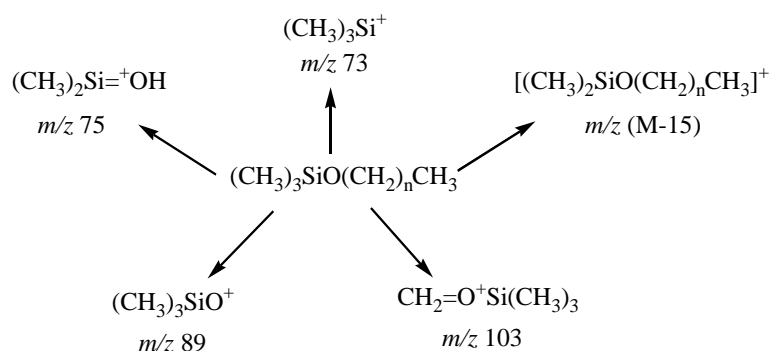


Figure III.15. Principaux fragments du spectre de masse des dérivés TMSi des alcools primaires normaux.

La Figure III.16 montre le spectre de masse du dérivé triméthylsilylé de l'alcool primaire saturé à 19 atomes de carbone présent dans les lipides "non liés" de la culture sur *n*-C₁₉. L'ion moléculaire est détecté en très faible abondance à *m/z* 356 alors que les pics très intenses à *m/z* 341 (M-CH₃) et *m/z* 75 permettent d'identifier ce composé.

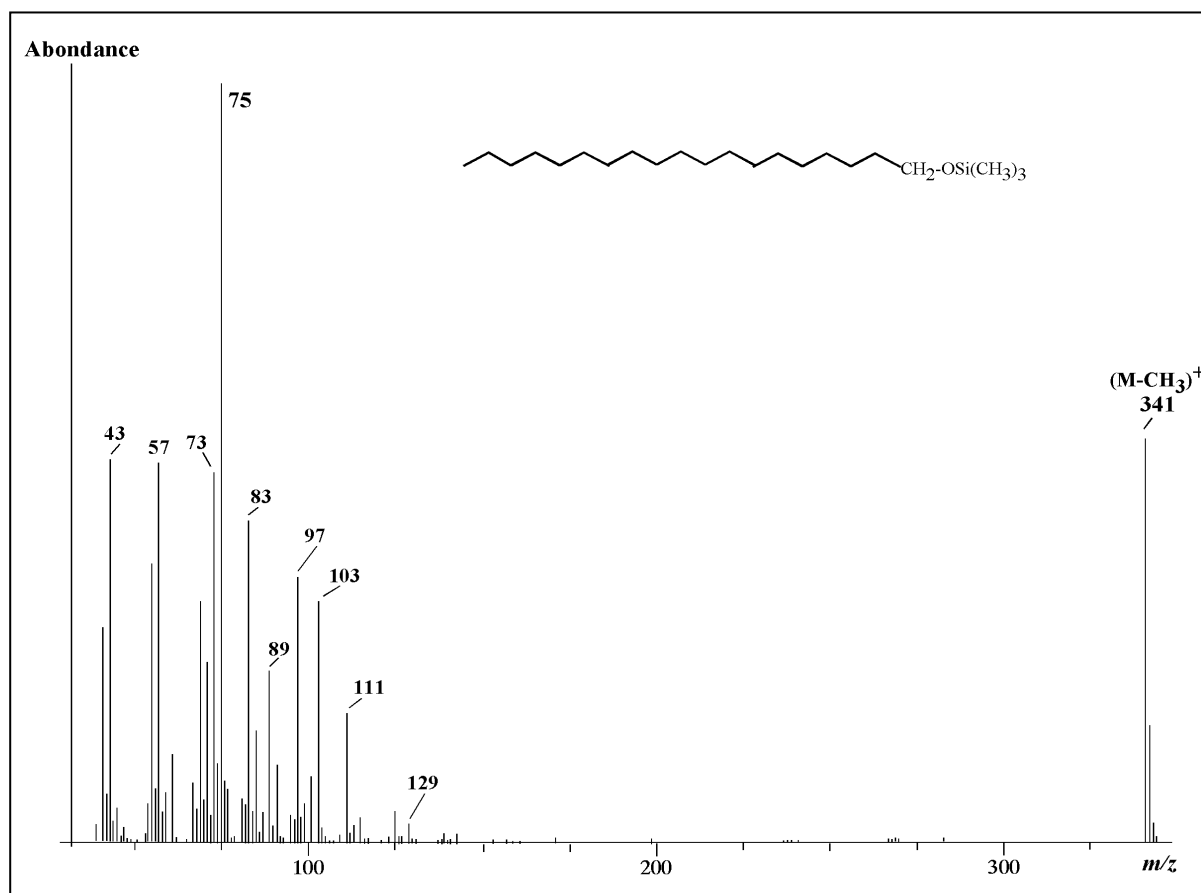


Figure III.16. Spectre de masse par impact électronique du dérivé TMSi de l'alcool *n*-19:0, 1-OH.

Les spectres de masse des dérivés TMS des alcools insaturés sont caractérisés par un pic intense à *m/z* 75 comme pour les alcools saturés et d'un pic de faible intensité à *m/z* M-15 correspondant à la perte d'un groupement méthyle de l'ion moléculaire. La détermination de la position de l'insaturation de ces alcools est possible par formation des dérivés diméthyl-disulfures. La Figure III.17 montre le spectre de masse de l'alcool insaturé à 21 atomes de carbone détecté dans les lipides "non liés" de la culture sur *n*-C₂₁. La réaction de formation et de fragmentation du dérivé DMDS de cet alcool triméthylsilylé ainsi que le spectre de masse correspondant sont présentés respectivement sur les Figures III.18 et III.19.

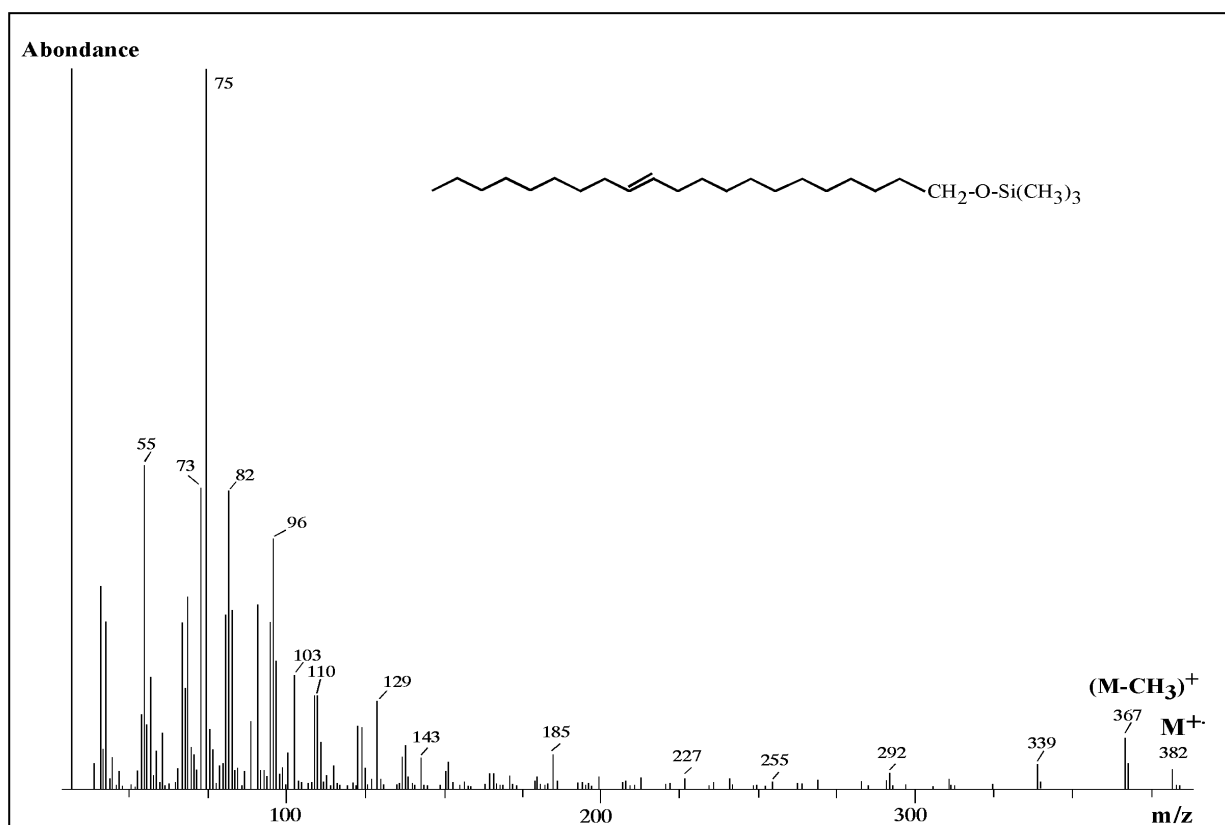


Figure III.17. Spectre de masse du dérivé TMSi de l'alcool insaturé *n*-21:1, 1-OH.

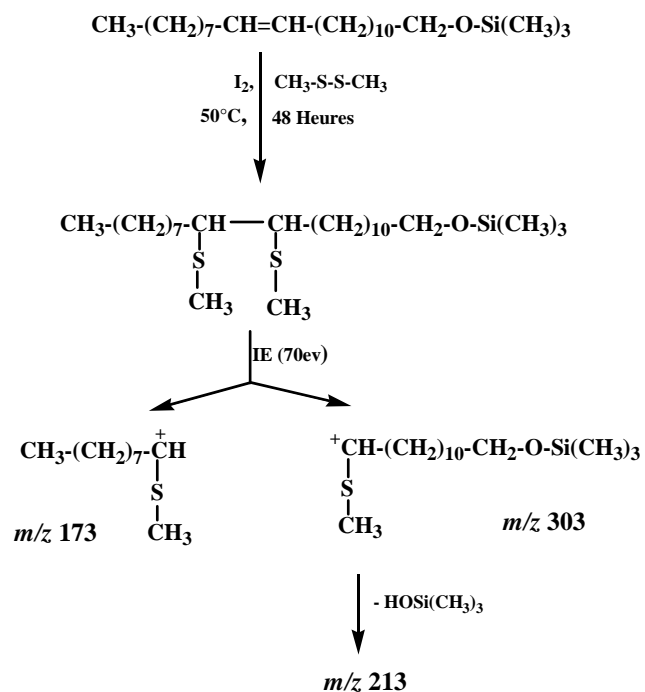


Figure III.18. Formation et fragmentation du dérivé diméthyl disulfure du dérivé TMSi de l'alcool *n*-21:1 ω 9, 1-OH.

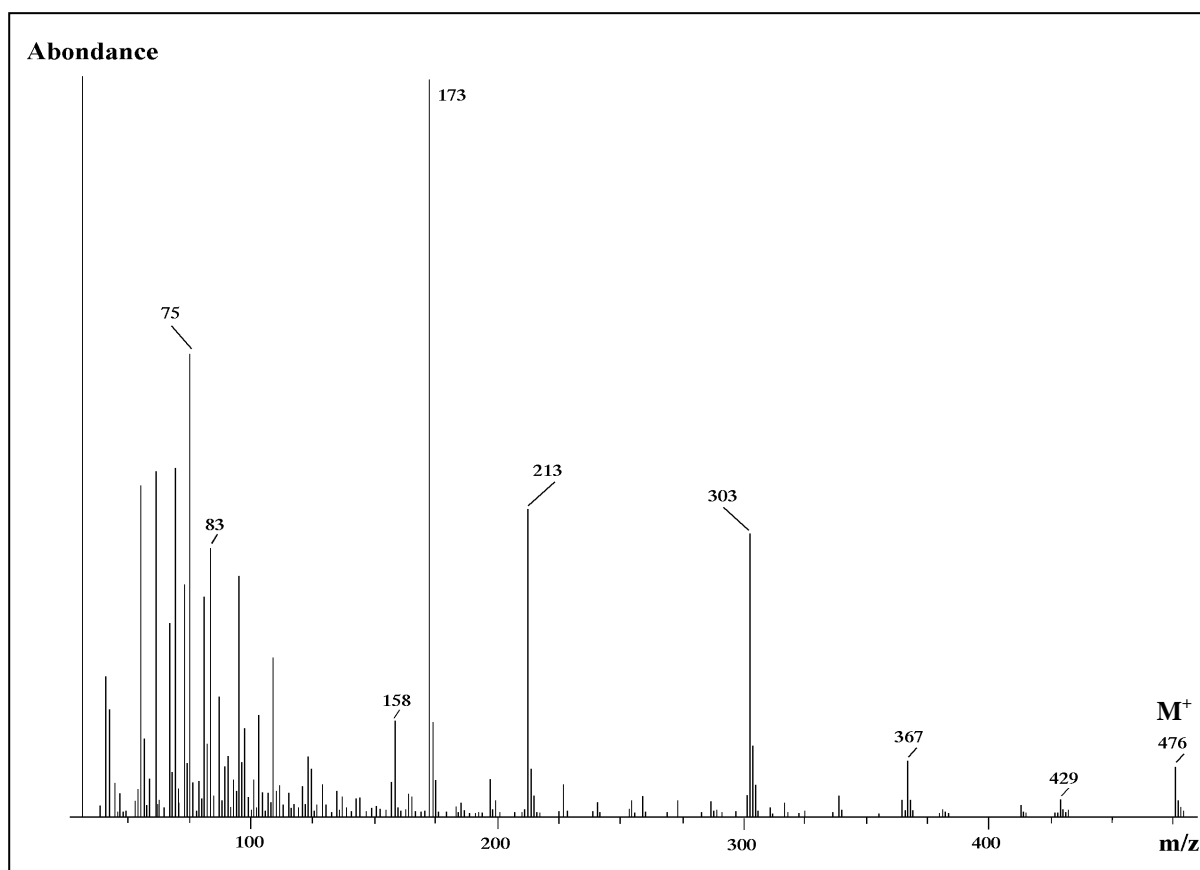


Figure III.19. Spectre de masse du dérivé TMSi/DMDS de l'alcool insaturé *n*-21:1 ω 9, 1-OH.

Les spectres de masse par impact électronique des dérivés TMSi des alcools secondaires sont caractérisés par un pic à m/z 117 [$\text{CH}_3\text{CHO}^+-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$], qui est le pic le plus abondant. Trois autres ions abondants et faciles à distinguer sont présents à m/z 73 [$(\text{CH}_3)_3\text{Si}^+$], m/z 75 [$(\text{CH}_3)_2\text{Si}^+\text{OH}$] et l'ion fragment à m/z (M-15) (Alugupalli et Larsson, 1992). Le spectre de masse du dérivé TMSi de l'alcool secondaire, *n*-19:0, 2-OH, détecté dans les lipides "non liés" de la culture sur *n*-C₁₉, est illustré à la Figure III.20.

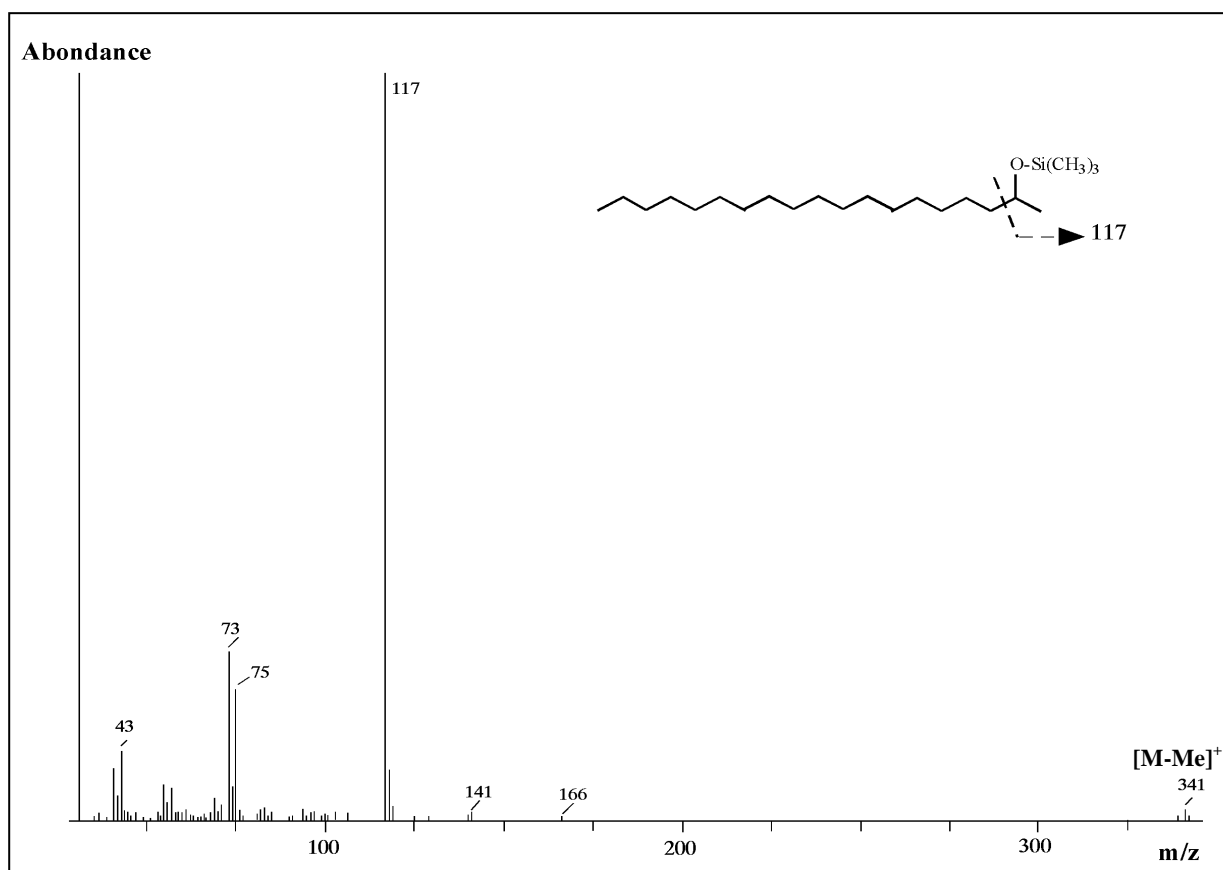


Figure III.20. Spectre de masse du dérivé TMSi de l'alcool secondaire n -19:0, 2-OH.

V.I.5. Dérivés TMS des esters méthyliques des β -hydroxy acides

Les spectres de masse des β -hydroxy acides non dérivatisés présentent un ion caractéristique à m/z 103, obtenu selon un mécanisme de réarrangement. Les Figures III.21 et III.22 montrent respectivement le mécanisme de formation de l'ion 103 et le spectre de masse de l'ester méthylique du n - β -hydroxy acide $C_{19:0}$.

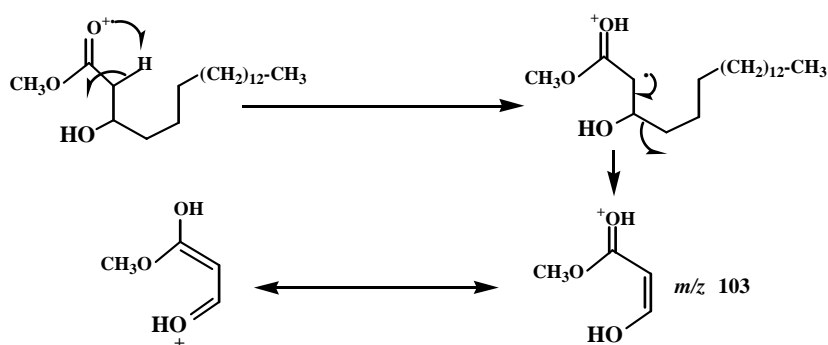


Figure III.21. Mécanisme de réarrangement conduisant à la formation de l'ion m/z 103.

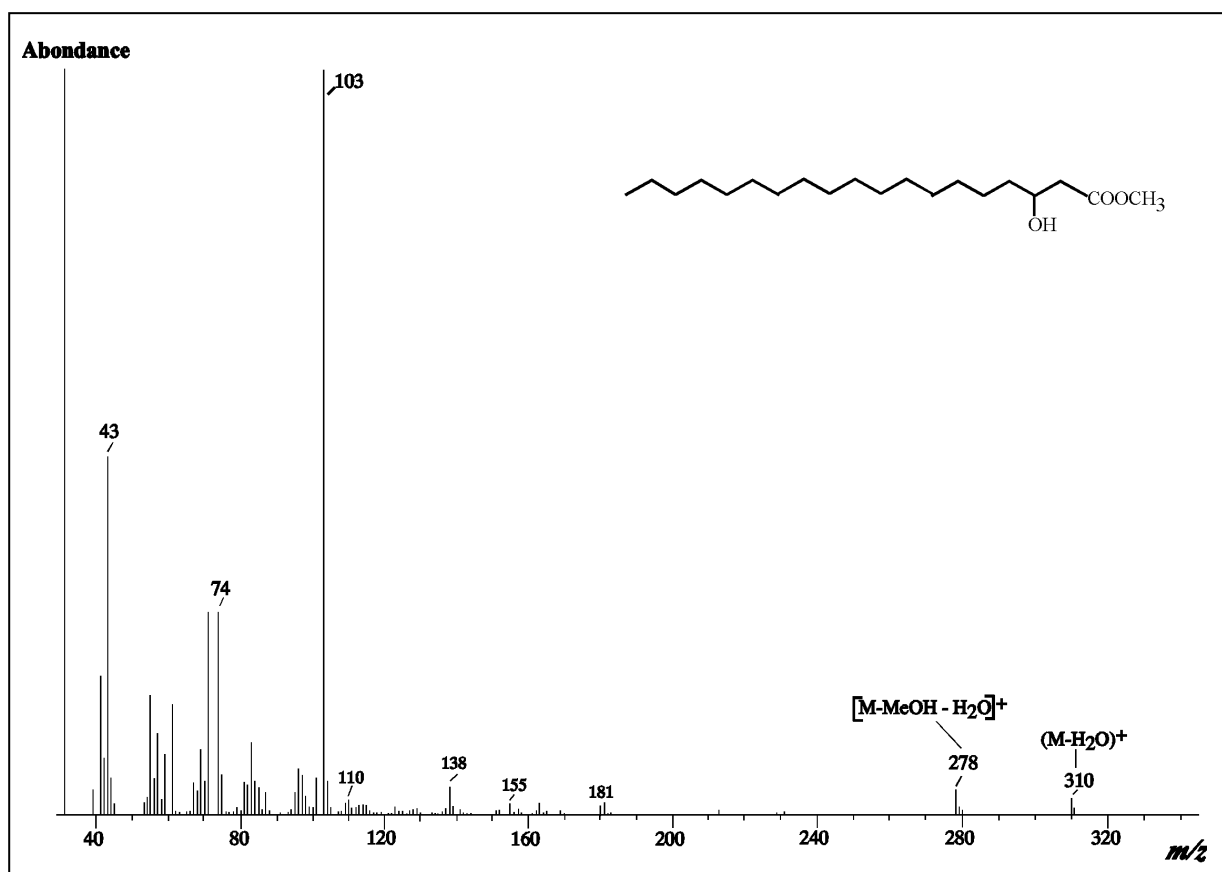


Figure III.22. Spectre de masse (IE) du β -hydroxy acide à 19 atomes de carbone.

Mais l'ion m/z 103 n'étant pas spécifique des β -hydroxy acides, nous avons donc utilisé la triméthylsilylation qui permet la détermination exacte de la position du groupement hydroxyle sur la chaîne hydrocarbonée (Figure III.23). Le spectre de masse du β -hydroxy acide C_{19:0} triméthylsilylé (Figure III.24) présente deux pics intenses à m/z 175 et 385 (M-CH₃)⁺. Les deux ions fragments à m/z 175 et 327 sont obtenus par ruptures simples (Figure III.24).

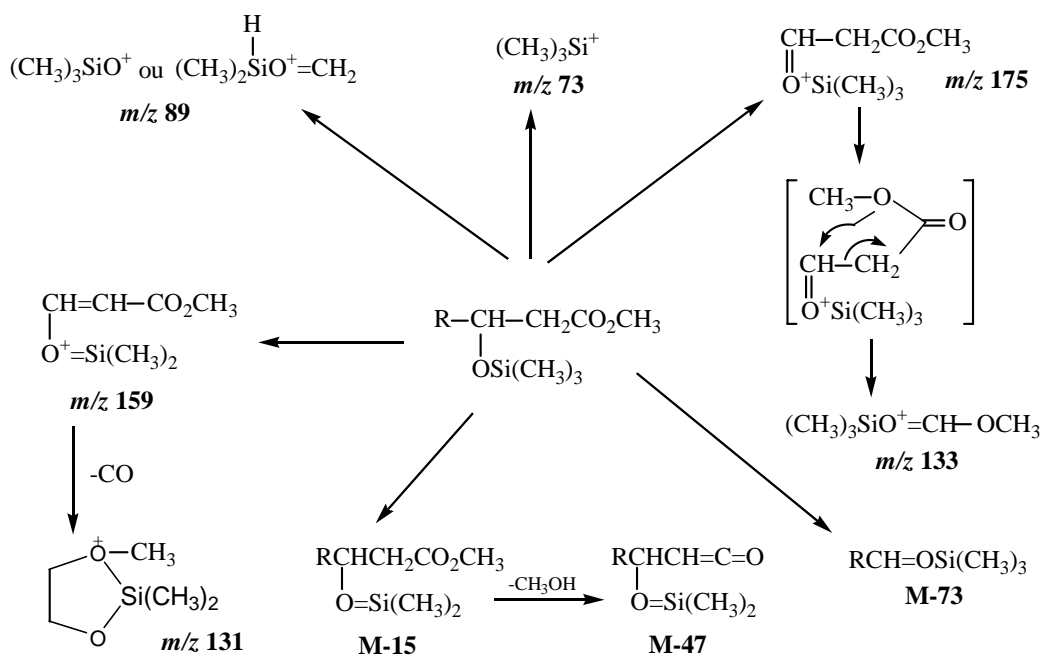


Figure III.23. Principaux ions fragments du spectre de masse des β -hydroxy méthyl ester triméthylsilylés (Eglinton et Hunneman, 1968).

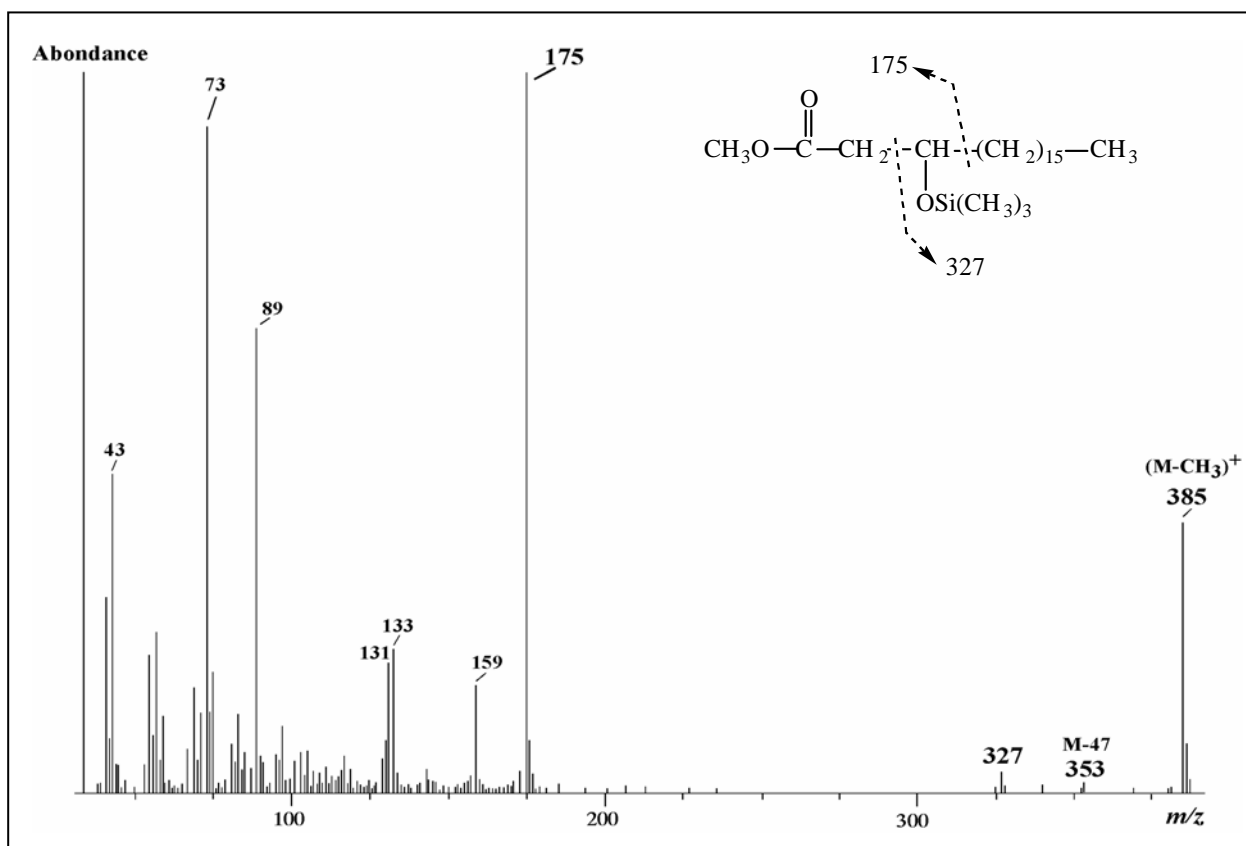


Figure III.24. Spectre de masse du dérivé triméthylsilylé du n - β -hydroxy méthyl ester $C_{19:0}$.

La position de l'insaturation des β -hydroxy acides insaturés peut être déterminée par dérivatisation DMDS de cette fraction triméthylsilylée ou non. Les Figures III.25 et III.26 montrent respectivement le spectres de masse du dérivé DMDS de l'ester méthylique du β -hydroxy acide n -13:1 ω 8 avec et sans triméthylsilylation.

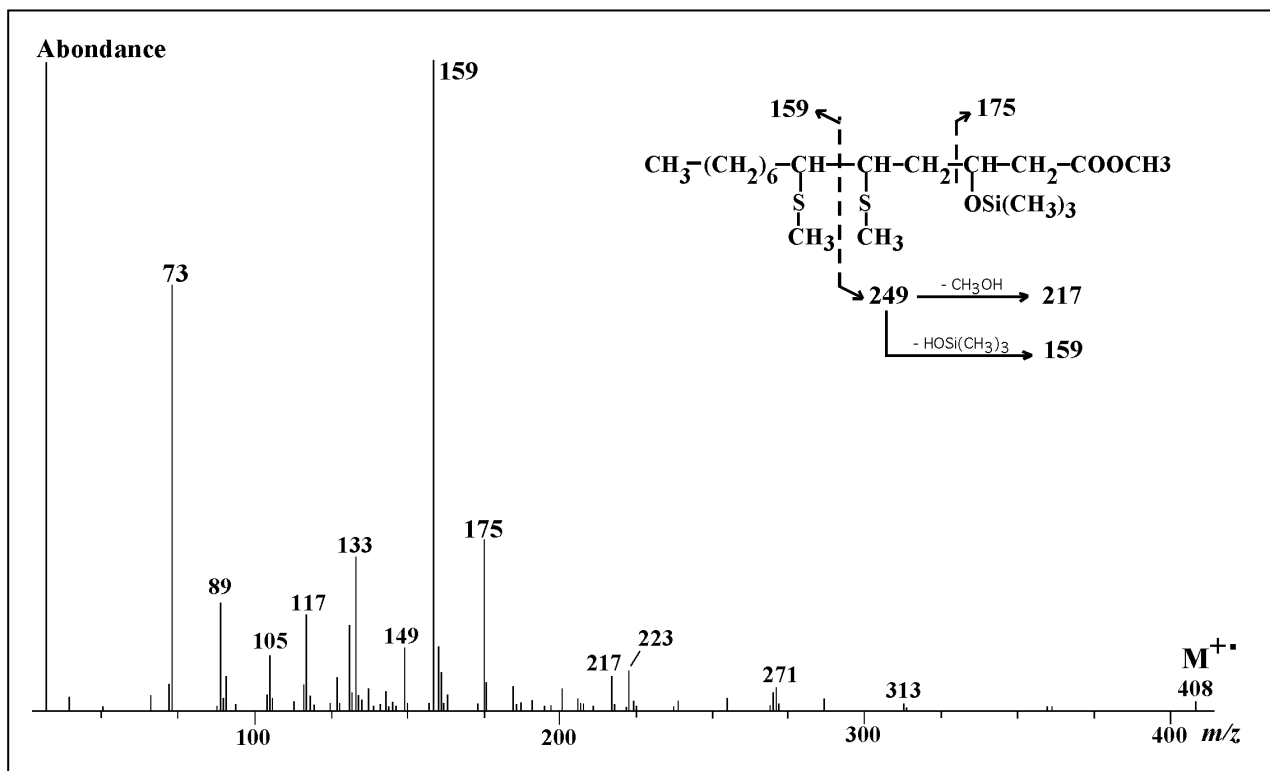


Figure III.25. Spectre de masse du dérivé DMDS de l'ester méthylique du β -hydroxy acide n -13:1 ω 8 après triméthylsilylation

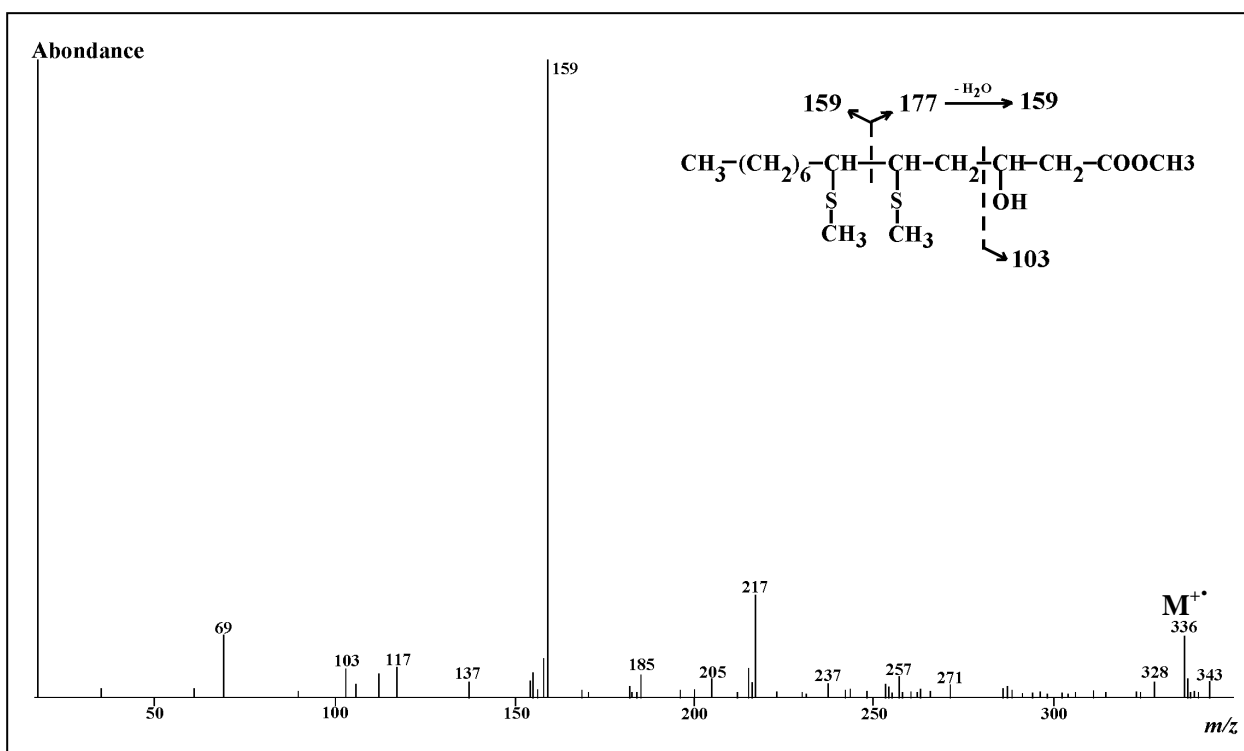


Figure III.26. Spectre de masse du dérivé DMDS de l'ester méthylique du β -hydroxy acide 13:1 ω 8.

V.1.6. β -Méthoxy acides

Certaines fractions lipidiques, notamment celles obtenues par hydrolyse acide de la biomasse bactérienne contiennent également en faible quantité des β -méthoxy acides qui sont vraisemblablement des artéfacts comme nous le verrons. La structure chimique, ainsi que le spectre de masse du β -méthoxy acide n -C_{12:0} qui est le composé le plus abondant de cette série sont présentés à la Figure III.27. Le spectre de masse montre les ions: $[M-CH_3]^+$ m/z 229, $[M-CH_2CO_2CH_3]^+$ m/z 171, $[M-(CH_3 + CH_2-CO_2-CH_3 + H^+)]$ m/z 155. Les ions caractéristiques sont observés à m/z 75 et à m/z 117, ils correspondent aux pics de base et sont formés comme la montre la Figure III.28.

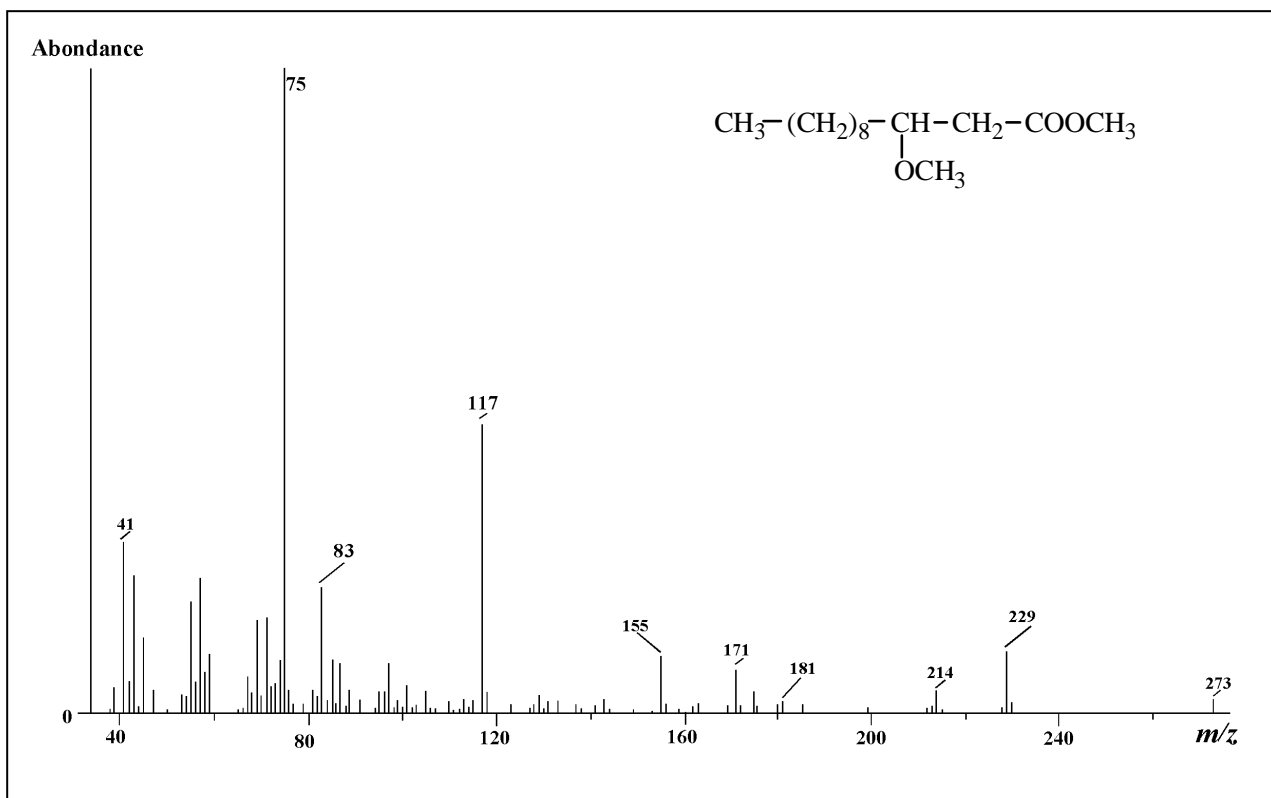


Figure III.27. Spectre de masse du β -méthoxy méthyl ester $\text{C}_{12:0}$.

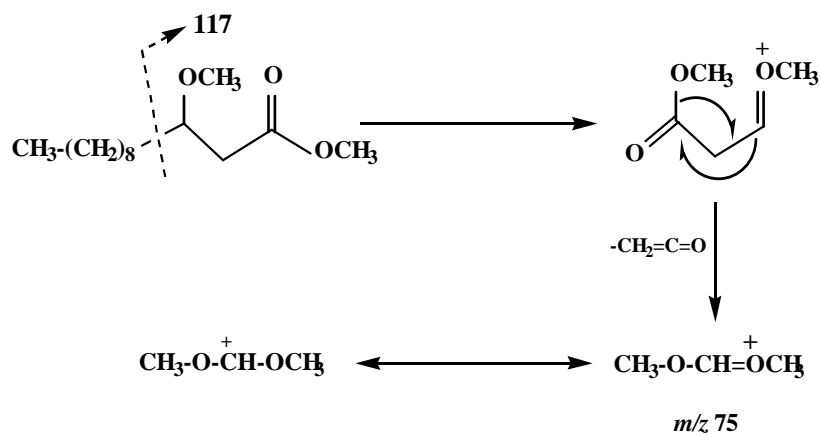


Figure III.28. Mécanisme de fragmentation du n - β -methoxy méthyl ester $\text{C}_{12:0}$ conduisant aux ions fragments m/z 75 et m/z 117.

V.2. LIPIDES "NON LIÉS"

Les lipides "non liés" des cultures sur $n\text{-C}_{19}$ et $n\text{-C}_{21}$ sont dominés par les acides gras normaux à nombre impair d'atomes de carbone de C_{13} à C_{21} (Tableaux III.3 et III.4). Ces acides gras normaux saturés et insaturés représentent, respectivement, 40,8 et 46,3 % des lipides "non liés" dans le cas de la culture sur $n\text{-C}_{19}$, et, 36,0 et 53,7 % pour la culture sur $n\text{-C}_{21}$. Les principaux acides gras saturés identifiés sont (en abondance relative) les acides $n\text{-C}_{17:0}$ (25,8 % dans le cas de la culture sur $n\text{-C}_{19}$ et 19,6 % sur $n\text{-C}_{21}$), $n\text{-C}_{15:0}$ (7,2 et 8,2 % correspondant respectivement, aux cultures sur $n\text{-C}_{19}$ et $n\text{-C}_{21}$) et l'acide palmitique (3,4 et 5,6 % correspondant respectivement aux cultures sur $n\text{-C}_{19}$ et $n\text{-C}_{21}$) (Tableau III.3). D'autres acides gras normaux tels que $n\text{-C}_{19:0}$, $n\text{-C}_{18:0}$, et $n\text{-C}_{13:0}$ ont été également identifiés, mais en faibles quantités. Nous observons également une faible quantité d'acides gras ramifiés, exclusivement saturés *iso* à 16, 17, 18 et 19 atomes de carbone (5 % pour la culture sur $n\text{-C}_{19}$ et 0,7 % pour la culture sur $n\text{-C}_{21}$). En outre, les acides gras saturés portant un groupement méthyle en position 10 sont absents dans ces deux cultures alors que la production de ce type de composés a été constatée en quantité notable (0,5 à 6 %) lors de la croissance d'une souche de *M. hydrocarbonoclasticus* également sur $n\text{-alcanes}$ (Doumenq et al., 2001).

Les acides $n\text{-C}_{17:1}$ ($\omega 8$, $\omega 9$ et $\omega 10$) sont les acides gras insaturés prédominants (plus de 55 % des acides gras insaturés de la fraction "non liée") dans les deux cultures (Tableau III.3). D'autres acides gras monoinsaturés à nombre impair d'atomes de carbone ont été également identifiés, mais en faibles quantités (plusieurs isomères de $n\text{-C}_{19:1}$ et $n\text{-C}_{15:1}$ dans les deux cultures, et $n\text{-C}_{21:1\omega 9}$ uniquement dans la culture sur $n\text{-C}_{21}$). En ce qui concerne les acides gras insaturés à nombre pair d'atomes de carbone, les acides $n\text{-C}_{16:1}$ et $n\text{-C}_{18:1}$ avec prédominance des isomères $\omega 9$ ont été également identifiés.

Les lipides "non liés" de ces deux cultures sont donc caractérisés par une forte abondance des acides gras normaux à 17 atomes de carbone ($n\text{-C}_{17:0}$ et $n\text{-C}_{17:1}$) (Tableaux III.3 et III.4). Ces résultats se distinguent des résultats obtenus avec la même bactérie cultivée sur $n\text{-C}_{20}$, pour laquelle l'acide $n\text{-C}_{17:0}$ était un composé minoritaire dans les lipides "non liés" et ses analogues insaturés absents (Lattuari et al., 2002). En effet, la culture de *M. hydrocarbonoclasticus* sur $n\text{-C}_{20}$ est caractérisée par une forte dominance des acides gras normaux à 16 et 18 atomes de carbone ($n\text{-C}_{16:0}$, $n\text{-C}_{16:1}$ et $n\text{-C}_{18:1\omega 9}$) alors qu'ils ne

représentent que des composés minoritaires avec les *n*-alcanes C₁₉ et C₂₁. Une étude récente sur l'influence de la parité des *n*-alcanes sur la composition en acides gras "non liés" d'une autre souche de *M. hydrocarbonoclasticus* (617) a conduit à des résultats similaires (Doumenq et al., 2001). Ces résultats concordent aussi avec les travaux antérieurs sur la dégradation des *n*-alcanes par des bactéries aérobies (*Mycobacterium vaccae*, *Candida lipolytica*, *Micrococcus cerificans*, *Acinetobacter sp*, *Cunninghamella echunilata*) pour lesquelles les cultures sur *n*-alcanes à nombre pair d'atomes de carbone conduisent essentiellement à des acides gras à nombre pair d'atomes de carbone et inversement (Dunlap et Perry, 1967; Makula et Finnerty, 1968a; Hug et Fiechter, 1973; King et Perry, 1975; Rehm et Reif, 1981).

Les alcools primaires saturés et insaturés constituent la deuxième classe lipidique avec 6 % des lipides "non liés" de la bactérie cultivée sur *n*-C₁₉ et 7,4 % pour la culture sur *n*-C₂₁ (Tableau III.4). Cette classe est caractérisée par la prédominance des alcools dont les nombres d'atomes de carbone sont semblables à ceux des alcanes utilisés (> 75 %). Ces alcools représentant la première étape de l'oxydation des *n*-alcanes par les bactéries n'ont pas été observés par Doumenq et al.(2001) lors de la culture de *M. hydrocarbonoclasticus* sur ce type de composés. Ceci pourrait s'expliquer dans leurs cas par un état de dégradation plus avancé des hydrocarbures fournis à la bactérie. Une quantité non négligeable d'alcool secondaire (0,6 % des lipides non liés) provenant de l'oxydation subterminale a été mise en évidence dans le cas de la culture sur *n*-C₁₉, alors que seulement quelques traces de son alcool secondaire homologue ont été détectées dans les lipides "non liés" de la culture sur *n*-C₂₁. Des alcools primaires normaux de C₁₅ à C₁₈, ont été également identifiés en quantités appréciables (2,1 %) dans le cas de la culture sur *n*-C₁₉ alors que l'alcool *n*-16:0, 1-OH est à l'état de traces dans les lipides "non liés" de la culture sur *n*-C₂₁. Ces résultats corroborent ceux de la culture sur *n*-C₂₀ (Lattuati et al., 2002) où les alcools primaires saturé *n*-C_{20:0} et monoinsaturé *n*-C_{20:1} ont été identifiés comme pratiquement les seuls alcools (Tableau III.3).

Deux β -hydroxy acides à 17 et 19 atomes de carbone ont été détectés en faibles quantités dans les lipides "non liés" des cultures sur *n*-C₁₉ et *n*-C₂₁ (Tableaux III.3). Ces deux β -hydroxy acides (*n*-17:0 et *n*-19:0) représentent respectivement 0,3 et 0,6 % des lipides libres dans le cas de la culture sur *n*-C₁₉ alors qu'ils ne sont détectés qu'à l'état de traces dans la culture sur *n*-C₂₁. La présence de ces β -hydroxy acides met en évidence un mécanisme de β -

oxydation des acides gras dans les voies métaboliques de dégradation des *n*-alcanes (Klug et Markovetz, 1971; Rehm et Reiff, 1981; Bertrand et Mille, 1989). Ces résultats concordent avec ceux de la culture sur *n*-C₂₀ (Lattuati et al., 2002) où des β -hydroxy acides homologues à nombre pair d'atomes de carbone saturés et insaturés (16, 18 et 20) ont été identifiés. Par contre, les travaux de Doumenq et al.(2001) sur la dégradation des *n*-alcanes par une autre souche de *M. hydrocarbonoclasticus* n'ont pas révélé la présence de β -hydroxy acides intermédiaires dans la β -oxydation de ces hydrocarbures. Dans cette étude seul le β -hydroxy acide *n*-12:0 a été rapporté, il pourrait provenir, comme nous le verrons plus loin d'une hydrolyse des lipopolysaccharides de la bactérie.

La Figure III.29 représente le courant ionique total en spectrométrie de masse des lipides "non liés" de la culture sur *n*-C₁₉.

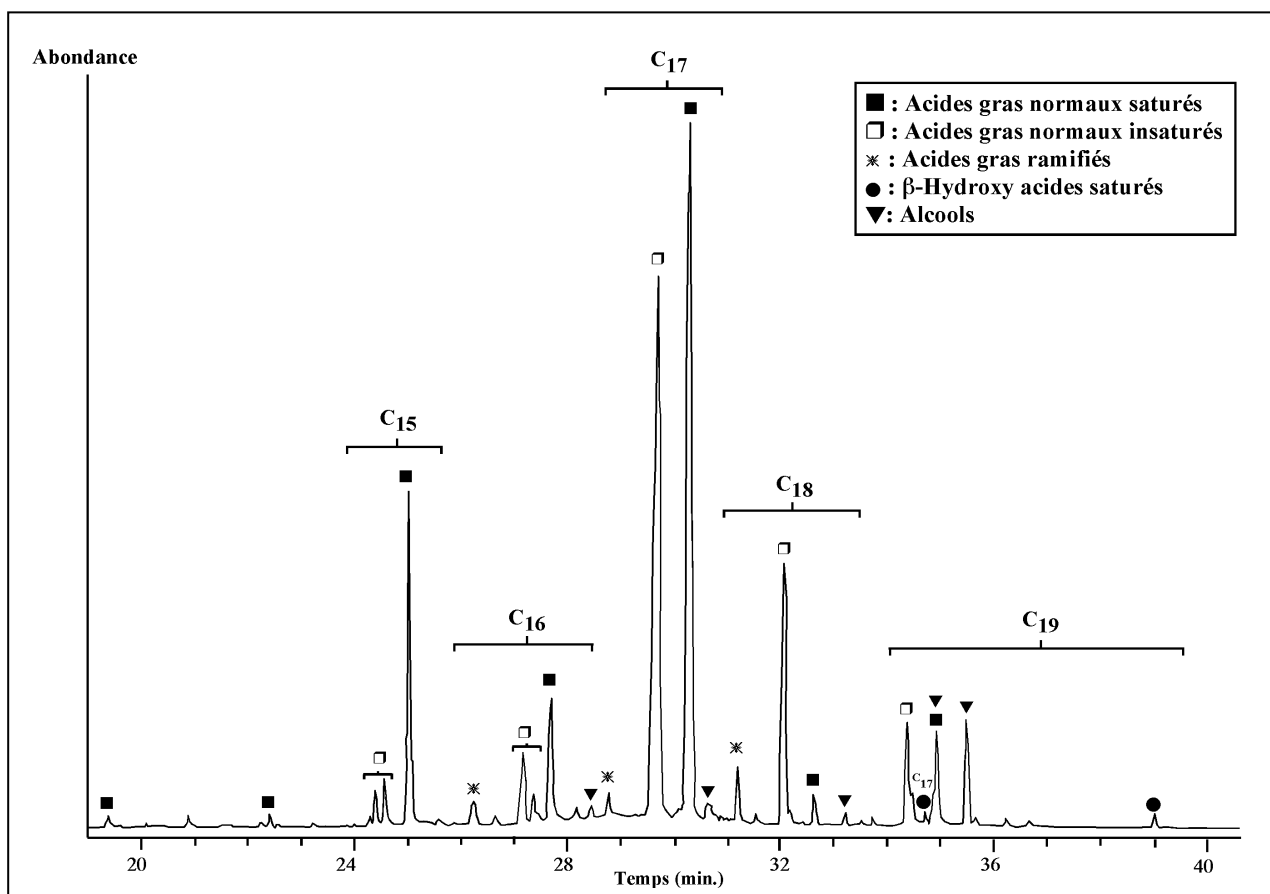


Figure III.29. Courant ionique total des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur *n*-C₁₉ après une triméthylsilylation.

Tableau III.3. Composition des lipides "non liés"* de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes normaux.

Lipides	Acétate	<i>n</i>-C₁₉	<i>n</i>-C₂₀	<i>n</i>-C₂₁
<i>Acides gras saturés</i>				
<i>n</i> -13:0	-	0,3	-	0,6
<i>n</i> -14:0	3,0	0,1	1,2	0,4
<i>n</i> -15:0	tr	7,2	0,3	8,2
<i>n</i> -16:0	22,4	3,4	25,3	5,6
<i>i</i> -16:0	-	0,4	-	0,2
<i>n</i> -17:0	tr	25,8	0,4	19,6
<i>i</i> -17:0	-	1,5	-	0,2
<i>n</i> -18:0	4,3	1,5	1,5	1,0
<i>i</i> -18:0	-	1,7	-	0,3
<i>n</i> -19:0	-	2,5	-	0,6
<i>i</i> -19:0	-	1,4	-	-
<i>Acides gras insaturés</i>				
<i>n</i> -14:1 ω9	-	-	0,5	-
<i>n</i> -15:1 ω9	-	1,3	-	2,0
<i>n</i> -15:1 ω8	-	0,7	-	-
<i>n</i> -15:1 ω6	-	0,1	-	0,7
<i>n</i> -16:1 ω9	10,6	1,1	16,2	2,5
<i>n</i> -16:1 ω7	7,3	1,0	8,9	0,9
<i>n</i> -16:1 ω5	0,5	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω10	-	9,6	-	-
<i>n</i> -17:1 ω9	-	tr	-	16,5
<i>n</i> -17:1 ω8	-	19,3	-	13,6
<i>n</i> -18:1 ω9	44,3	5,2	26,6	9,9
<i>n</i> -18:1 ω7	5,5	5,1	-	-
<i>n</i> -18:1 ω5	0,6	-	tr	-
<i>n</i> -19:1 ω12	-	-	-	3,8
<i>n</i> -19:1 ω10	-	2,7	-	-
<i>n</i> -19:1 ω9	-	-	-	0,9
<i>n</i> -19:1 ω8	-	0,2	-	0,5
<i>n</i> -20:1 ω9	-	-	4,2	-
<i>n</i> -21:1 ω9	0,6	-	-	2,4
<i>n</i> -22:1 ω9	0,6	-	-	-
<i>β</i>-hydroxy acides				
<i>n</i> -12:0, OH	tr	-	0,2	-
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	0,1	-
<i>n</i> -16:0, OH	-	-	0,2	-
<i>n</i> -16:1 ω9, OH	-	-	0,1	-
<i>n</i> -17:0, OH	-	0,3	-	tr
<i>n</i> -18:0, OH	-	-	0,4	-
<i>n</i> -18:1 ω9, OH	-	-	0,3	-
<i>n</i> -19:0, OH	-	0,6	-	tr
<i>n</i> -20:0, OH	-	-	0,6	-
<i>n</i> -20:1 ω9, OH	-	-	0,3	-

Lipides	Acétate	<i>n</i>-C₁₉	<i>n</i>-C₂₀	<i>n</i>-C₂₁
Alcools				
<i>n</i> -15:0, 1-OH	-	0,1	-	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	tr	0,6	tr	tr
<i>n</i> -17:0, 1-OH	-	0,9	-	-
<i>n</i> -18:0, 1-OH	-	0,5	-	-
<i>n</i> -19:0, 1-OH	-	3,8	-	-
<i>n</i> -19:1, 1-OH	-	0,1	-	-
<i>n</i> -19:0, 2-OH	-	0,6	-	-
<i>n</i> -20 :0, 1-OH	-	-	1,3	-
<i>n</i> -20:1 ω9, 1-OH	-	-	10,3	-
<i>n</i> -21:0, 1-OH	-	-	-	tr
<i>n</i> -21:1 ω9, 1-OH	-	-	-	7,4
<i>n</i> -21:0, 1-OH	-	-	-	tr

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentant entre 0,2 % et 2,1 % des lipides totaux.

Tableau III.4. Composition globale des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes normaux.

<i>Source de carbone</i>	Acétate d'ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>n</i> -C ₂₀	<i>n</i> -C ₂₁
<i>Classes de composés</i>				
<i>n</i> -alcan-1-ols	tr	6.0	11.6	7.4
<i>n</i> -alcan-2-ols	-	0.6	-	tr
Σ Alcools	tr	6.6	11.6	7.4
<i>n</i> -acides saturés	29,7	40.8	28.7	36.0
<i>n</i> -acides insaturés	70,0	46.3	56.4	53.7
acides ramifiés saturés	-	5.0	-	0.7
Σ acides	99,7	92.1	85.1	90.4
Σ β-hydroxy acids	tr	0.9	2.2	tr
Σ composés pairs	99,1	20.6	98.2	20.8
Σ composés impairs	0,6	79.0	0.7	77.0
Σ composés normaux	99,7	94.6	98.9	97.1
Σ composés ramifiés	-	5.0	-	0.7
Σ AG saturés	29,7	45.8	28.7	36.7
Σ AG insaturés	70,0	46.3	56.4	53.7
Σ AG <i>n</i> -C ₁₆	40,8	5.5	50.4	9.0
Σ AG <i>n</i> -C ₁₇	tr	54.7	0.4	49.7
Σ AG <i>n</i> -C ₁₈	54,7	11.8	28.1	10.9

AG: acides gras

V.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE

Les fractions lipidiques obtenues par traitement basique des biomasses bactériennes déjà extraites aux solvants contiennent les mêmes classes lipidiques que les fractions "non liés" mais dans des proportions différentes (Tableau III.6). La Figure III.30 montre le courant ionique total des lipides labiles en milieu basique extraits de la culture sur *n*-C₁₉.

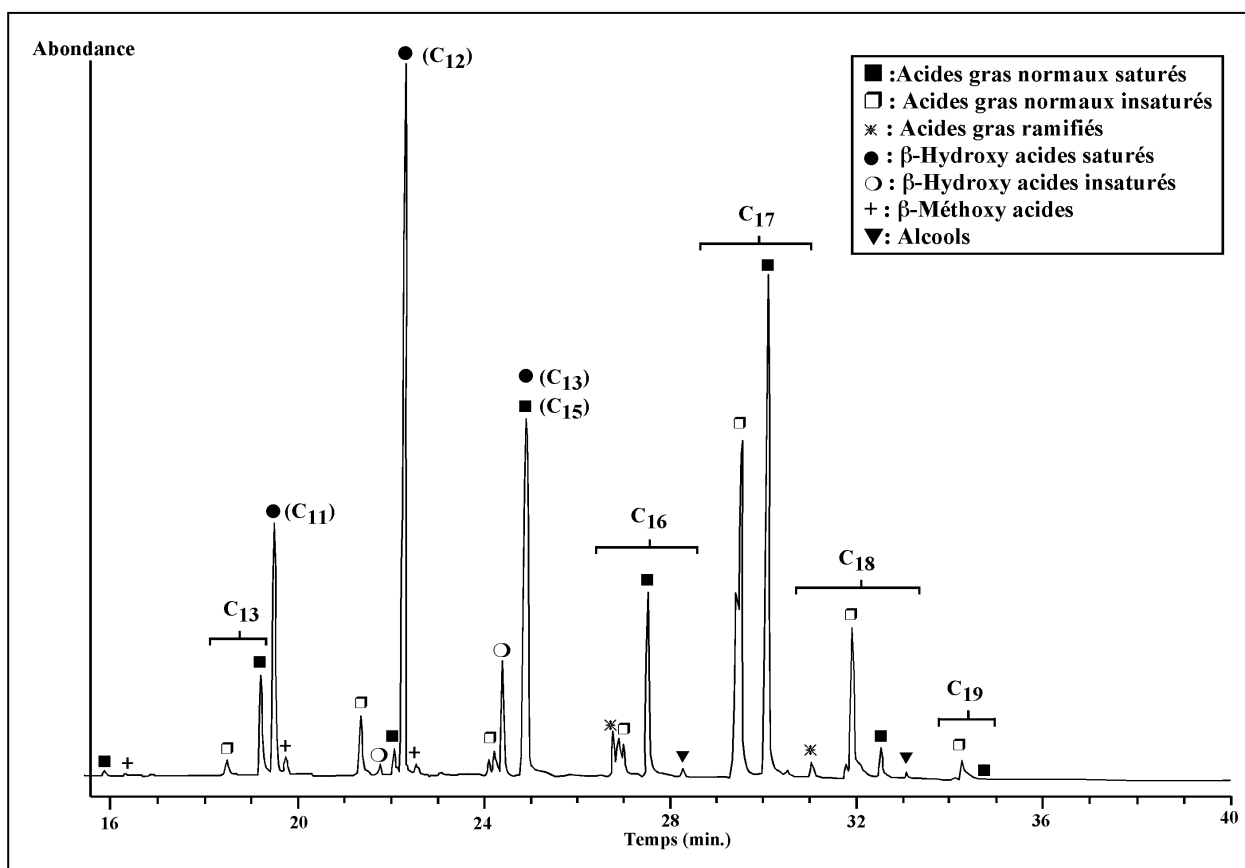


Figure III.30. Courant ionique total des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur *n*-C₁₉.

Les acides gras constituent 31,7 % des lipides labiles en milieu basique de la culture sur *n*-C₂₁ contre plus du double (approximativement 72 %) dans les cultures sur *n*-C₁₉ et *n*-C₂₀ (Tableau III.6). Les acides gras normaux saturés et insaturés se trouvent dans des proportions presque égales dans les cultures sur les deux *n*-alcanes impairs alors que les saturés sont prédominants dans la culture sur *n*-C₂₀. Ces acides gras sont caractérisés par une forte prédominance de composés normaux à nombre impair d'atomes de carbone dans le cas de la

culture sur n -C₁₉ (Tableau III.5) (plus de 50 % de la fraction et 70 % des acides gras) alors qu'on assiste à une distribution presque équivalente en acides gras pairs et impairs dans la culture sur n -C₂₁. Par comparaison, dans le cas de la culture sur n -C₂₀, l'acide n -C_{15:0}, à l'état de traces, est le seul acide gras à nombre impair (Tableau III.5) d'atomes de carbone. De faibles quantités d'acides gras *iso* C_{16:0} et C_{18:0} (respectivement 1,2 et 0,6 %) ont été identifiés uniquement dans la culture sur n -C₁₉ alors que les acides gras ramifiés sont complètement absents dans les cultures sur n -C₂₁ et n -C₂₀. Contrairement à la culture sur n -C₂₀ où les acides gras à courtes chaînes à 10 et 12 atomes de carbone constituent respectivement 17,6 et 37,8 % des lipides labiles en milieu basique, ils ne constituent que des composés minoritaires (< 3 %) dans les deux cultures sur n -alcane impairs (Tableau III.5).

Les β -hydroxy acides sont en quantités importantes dans cette fraction lipidique (Tableau III.5), ils présentent une distribution différente de celle observée pour les lipides "non liés" (Tableaux III.3 et III.5). Ils sont caractérisés par une forte dominance du β -hydroxy acide n -C_{12:0} (60,2 %, 99,3 % et 85 % des β -hydroxy acides totaux de cette fraction isolée des cultures sur n -C₁₉, n -C₂₀ et n -C₂₁) et par une faible contribution de n - β -hydroxy acides 11:0, 13:0 et 13:1 ω 8 dans les cultures sur n -C₁₉ et n -C₂₁ (Tableau III.5).

Cette fraction lipidique contient également une série de β -méthoxy acides saturés de même distribution que les β -hydroxy acides. La Figure III.31 montre la distribution de ces deux familles de composés dans les lipides liés par liaisons esters de la culture sur n -C₁₉.

Bien que certains auteurs considèrent les β -méthoxy acides comme étant des métabolites bactériens réels, tels ceux identifiés chez *Helicobacter pylori* (Inamoto et al., 1993), nombreux sont ceux à penser qu'ils ne sont que des artefacts. Ils seraient produits à partir des β -acyloxy acides présents dans les lipopolysaccharides au cours de la méthanolyse basique (Mendoza et al., 1987b; Lattuati et al., 2002). Les distributions similaires des β -méthoxy acides et des β -hydroxy acides établies respectivement à partir des ions chromatogrammes m/z 117 et 175 (Figure III.31), suggèrent que les β -méthoxy acides sont bien, dans notre cas, des produits artefactuels.

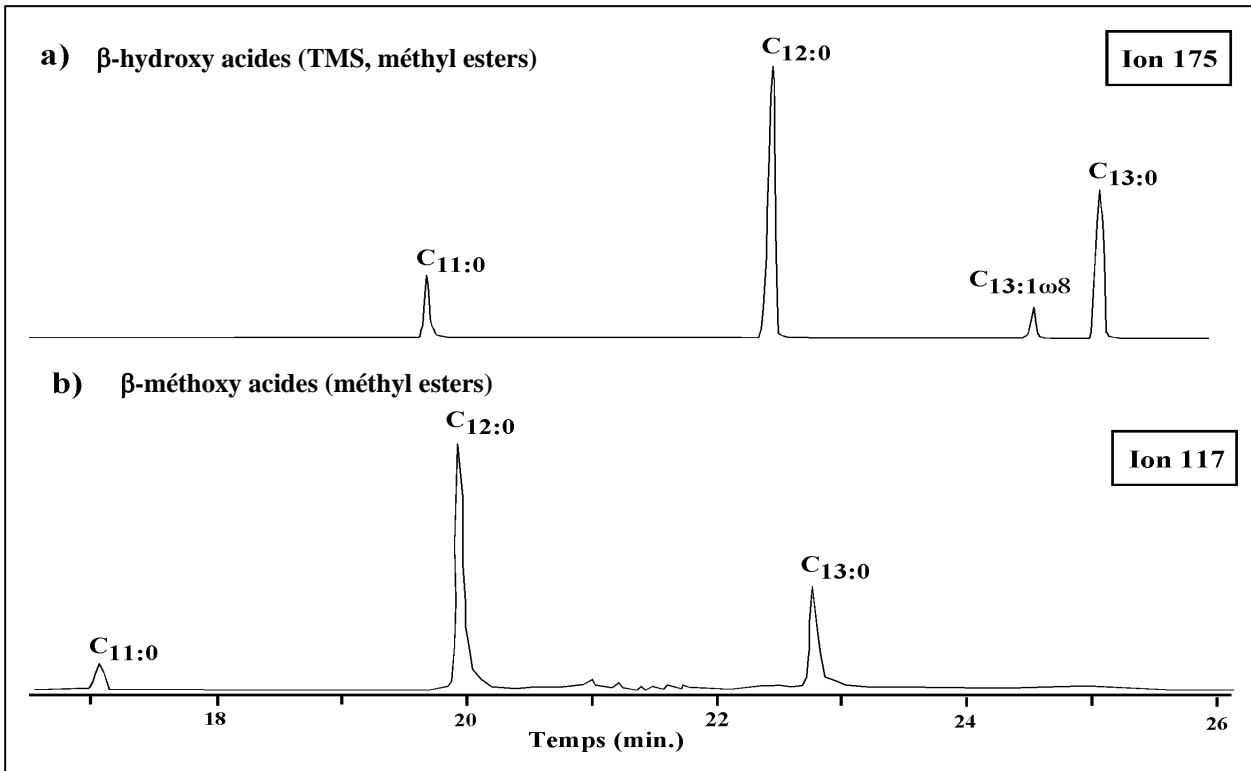


Figure III.31. *a*) Distribution des β -hydroxy acides (TMSi, méthyl esters) et *b*) des β -méthoxy acides dans les lipides liés par liaisons esters de la culture sur n -C₁₉.

Deux alcools primaires n -C_{16:0} et n -C_{18:0} ont été également identifiés en faibles quantités (0,6 %) dans les lipides labiles en milieu basique des cultures sur n -C₁₉ et n -C₂₁ alors qu'il étaient absents dans le cas de la culture sur n -C₂₀. Ces alcools ne peuvent pas provenir d'une extraction incomplète des lipides non liés, sinon on aurait du obtenir également dans cette fraction les alcools primaires provenant de l'oxydation des alcanes.

Tableau III.5. Composition des lipides labiles en milieu basique* de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes normaux.

Lipides	Acétate	<i>n</i>-C₁₉	<i>n</i>-C₂₀	<i>n</i>-C₂₁
<i>Acides gras saturés</i>				
<i>n</i> -10:0	3,5	-	17,6	-
<i>n</i> -11:0	-	1,0	-	-
<i>n</i> -12:0	20,3	1,7	37,8	1,8
<i>n</i> -13:0	-	1,9	-	3,0
<i>n</i> -14:0	1,8	0,1	1,2	0,3
<i>n</i> -15:0	0,1	5,8	tr	-
<i>n</i> -16:0	7,2	5,6	2,5	6,3
<i>i</i> -16:0	-	1,2	-	-
<i>n</i> -17:0	tr	15,4	-	5,1
<i>n</i> -18:0	1,4	1,9	-	1,2
<i>i</i> -18:0	-	0,6	-	-
<i>n</i> -19:0	-	1,6	-	-
<i>n</i> -20:0	0,1	-	-	-
<i>Acides gras insaturés</i>				
<i>n</i> -12:1 ω7	0,6	-	-	-
<i>n</i> -13:1 ω8	-	0,9	-	0,8
<i>n</i> -14:1 ω9	13,5	1,7	9,3	3,5
<i>n</i> -14:1 ω7	0,4	-	-	-
<i>n</i> -14:1 ω5	0,6	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω9	-	0,4	-	tr
<i>n</i> -15:1 ω8	-	2,1	-	tr
<i>n</i> -15:1 ω6	-	2,1	-	tr
<i>n</i> -16:1 ω9	2,3	0,7	1,2	0,9
<i>n</i> -16:1 ω7	2,1	0,3	0,5	0,1
<i>n</i> -16:1 ω5	0,2	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω10	-	6,2	-	-
<i>n</i> -17:1 ω9	-	-	-	3,4
<i>n</i> -17:1 ω8	-	10,0	-	2,9
<i>n</i> -18:1 ω9	11,6	5,9	0,9	2,4
<i>n</i> -18:1 ω7	1,4	-	0,3	-
<i>n</i> -18:1 ω5	0,1	-	tr	-
<i>n</i> -19:1 ω10	-	5,6	-	-
<i>n</i> -20:1 ω9	0,1	-	-	-
<i>β-hydroxy acids</i> #				
<i>n</i> -10:0, OH	0,2	-	0,2	-
<i>n</i> -11:0, OH	-	3,7	-	6,7
<i>n</i> -12:0, OH	31,5	16,0	27,9	47,6
<i>n</i> -13:0, OH	-	6,3	-	11,7
<i>n</i> -13:1ω8, OH	-	0,5	-	-
<i>n</i> -14:0, OH	0,1	-	tr	-
<i>n</i> -17:0, OH	-	0,1	-	-
<i>Alcools</i>				
<i>n</i> -16:0, 1-OH	-	0,3	-	0,6
<i>n</i> -18:0, 1-OH	-	0,3	-	tr

Les abondances relatives des β -méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement à celles des β -hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, à partir desquels ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 0,1 % et 1,6 % des lipides totaux.

Tableau III.6. Composition globale des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes normaux.

<i>Classes de composés</i>	<i>Source de carbone</i> Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>n</i> -C ₂₀	<i>n</i> -C ₂₁
Σ alcools	-	0,6	-	0,6
<i>n</i> -acides saturés	34,5	35,0	59,1	17,7
<i>n</i> -acides insaturés	32,9	35,9	12,2	14,0
acides ramifiés saturés	-	1,8	-	-
Σ acides	67,4	72,7	71,3	31,7
<i>n</i> - β -hydroxy acides	31,8	26,6	28,3	66,0
Σ β -hydroxy acides	31,8	26,6	28,3	66,0
β -hydroxy 12:0*	99,0	60,2	99,3	72,1
Σ composés normaux	99,2	98,1	99,6	98,3
Σ composés ramifiés	-	1,8	-	-
Σ composés pairs	99,1	36,3	99,6	64,7
Σ composés impairs	0,1	63,6	tr	33,6
Σ AG <i>n</i> -C ₁₆	11,8	6,6	4,2	7,3
Σ AG <i>n</i> -C ₁₇	tr	31,6	-	11,4
Σ AG <i>n</i> -C ₁₈	14,5	7,8	1,2	3,6

AG: acides gras.

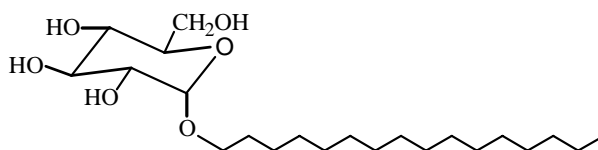
*: % par rapport aux β -hydroxy acides totaux de la présente fraction.

V.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE

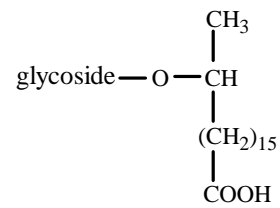
L'analyse par CG/SM des lipides labiles en milieu acide obtenus par hydrolyse acide des résidus bactériens indique la présence prédominante de β -hydroxy acides. Ces derniers constituent 64,3 % de cette fraction dans le cas de la culture sur n -C₁₉, 84,8 % pour le n -C₂₁ et 98,3 % pour le n -C₂₀. Ils présentent une forte prédominance du β -hydroxy acide n -12:0 (entre 60,3 et 99,3 % des β -hydroxy acides) (Tableaux III.7 et III.8). Des quantités importantes de β -hydroxy acides n -13:0 et, dans une moindre mesure de n -11:0 sont aussi présentes uniquement dans les cultures sur n -C₁₉ et n -C₂₁ ce qui peut être expliqué par l'intégration dans les lipopolysaccharides d'hydroxy acides provenant de la dégradation des hydrocarbures.

Les acides gras représentent 27,5 %, 1,0 % et 11,5 % des lipides labiles en milieu acide des cultures sur n -C₁₉, n -C₂₀ et n -C₂₁, respectivement (Tableau III.8). Contrairement aux deux fractions précédentes, les acides gras sont essentiellement normaux saturés à nombre pair d'atomes de carbone (C₁₆ et C₁₈) avec prédominance des composés saturés dans les cultures sur n -C₁₉ et n -C₂₀ (Tableau III.7). Selon les travaux de Wilkinson (1988), ces acides ne proviennent pas des LPS, mais plus probablement de lipoprotéines qui comportent des parties acyles sans substituant hydroxyle, liées par liaisons amides.

Des alcools normaux, essentiellement à nombre pair d'atomes de carbone ont été identifiés dans cette fraction pour les cultures sur n -C₁₉ et n -C₂₁. Ils représentent respectivement 7,1 et 1,7 % des lipides de cette fraction (Tableau III.8). La présence d'alcools dans les lipides libérés par hydrolyse acide est très surprenante. Elle a été cependant notée lors de l'hydrolyse acide de sédiments lacustres préalablement extraits et saponifiés (Goossens et al., 1989b). La seule liaison imaginable, qui par hydrolyse en milieu acide pourrait conduire à la formations d'alcools est de type glycosides- O -alkyle, une liaison acétal qui pourrait exister dans des biosurfactants produits par la bactérie. Si aucun biosurfactant naturel comportant un groupement n -alkyle de type:



n'a été identifié à ce jour, d'autres surfactants de type glycosidiques mettant en jeu des acétals du type:



ont été identifiés chez des *Pseudomonas* (Lang, 2002; Holmberg, 2001).

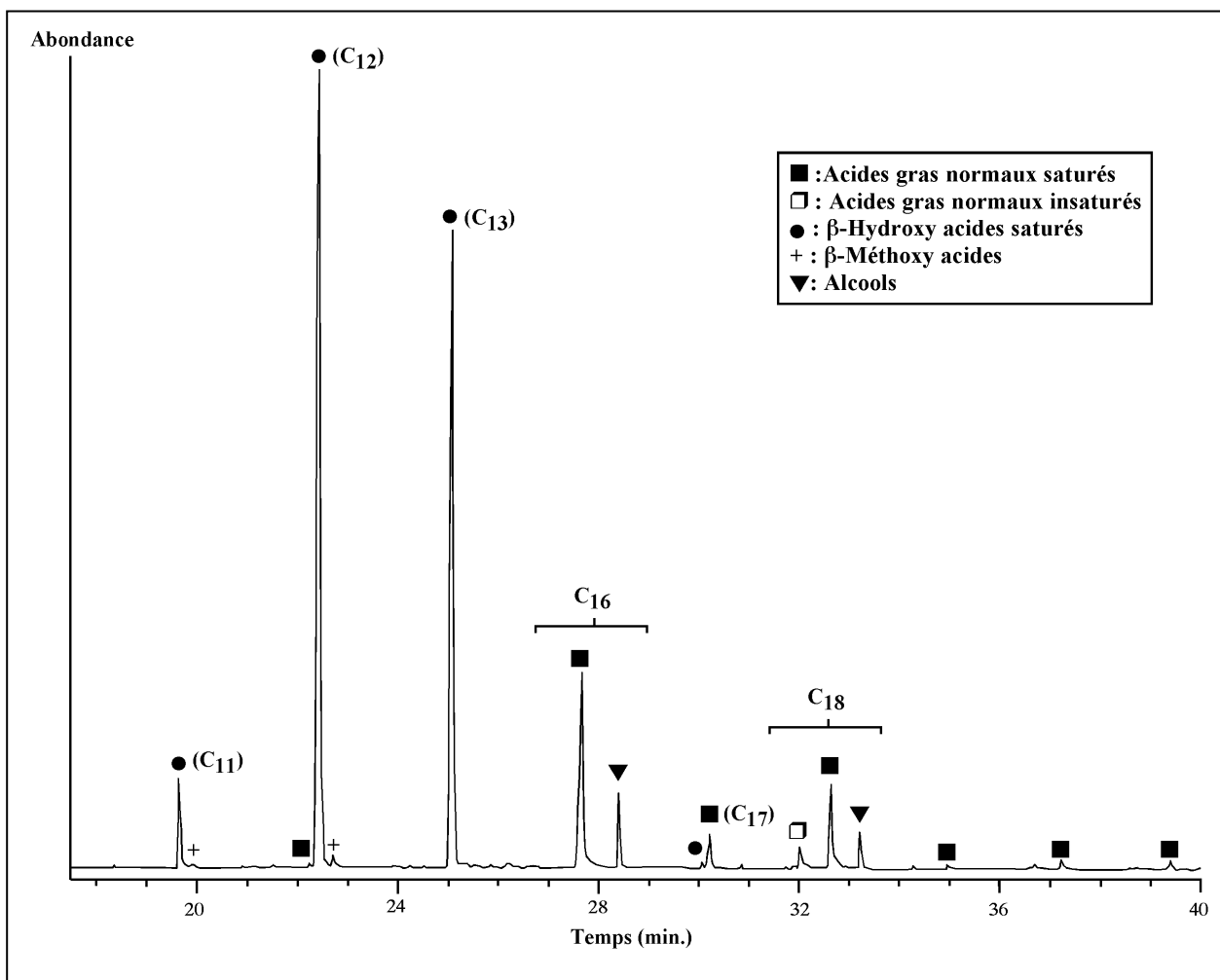


Figure III.32. Courant ionique total des lipides labiles en milieu acide de la culture sur *n*-C₁₉.

Tableau III.7. Composition des lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes normaux.

Lipides	Acétate	<i>n</i>-C₁₉	<i>n</i>-C₂₀	<i>n</i>-C₂₁
<i>Acides gras saturés</i>				
<i>n</i> -12:0	tr	-	tr	0,6
<i>n</i> -13:0	-	5,2	-	0,1
<i>n</i> -14:0	tr	4,6	tr	1,0
<i>n</i> -15:0	-	-	-	2,1
<i>n</i> -16:0	3,0	7,9	1,0	4,9
<i>n</i> -17:0	-	1,4	-	0,7
<i>n</i> -18:0	1,8	3,8	tr	1,8
<i>n</i> -19:0	-	0,3	-	-
<i>n</i> -20:0	-	0,4	-	-
<i>n</i> -21:0	-	0,4	-	-
<i>n</i> -22:0	-	0,5	-	0,3
<i>n</i> -23:0	-	0,9	-	-
<i>n</i> -24:0	-	0,5	-	-
<i>Acides gras insaturés</i>				
<i>n</i> -18:1 ω 9	0,8	1,3	-	-
<i>β-hydroxy acides[#]</i>				
<i>n</i> -10:0, OH	0,4	-	0,5	-
<i>n</i> -11:0, OH	-	2,7	-	8,9
<i>n</i> -12:0, OH	93,6	38,8	97,6	64,1
<i>n</i> -13:0, OH	-	22,7	-	11,8
<i>n</i> -14:0, OH	0,1	-	0,2	-
<i>n</i> -15:0, OH	-	0,1	-	-
<i>Alcools</i>				
<i>n</i> -15:0, 1-OH	-	1,0	-	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	-	3,9	-	0,7
<i>n</i> -18:0, 1-OH	-	2,2	-	1,0

[#] Les abondances relatives des β -méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement à celles des β -hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, à partir desquels ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 0,2 % et 1,9 % des lipides totaux.

Tableau III.8. Composition globale des lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes normaux.

Source de carbone Classes de composés	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>n</i> -C ₂₀	<i>n</i> -C ₂₁
Σ alcools	-	7,1	-	1,7
<i>n</i> -acides saturés	4,8	26,2	1,0	11,5
<i>n</i> -acides insaturés	0,8	1,3	-	-
Σ acides	5,6	27,5	1,0	11,5
<i>n</i> -β-hydroxy acides	94,1	64,3	98,3	84,8
β-hydroxy acides ramifiés	-	-	-	-
Σ β-hydroxy acides	94,1	64,3	98,3	84,8
β-hydroxy 12:0*	99,4	60,3	99,3	75,6
Σ composés pair	99,7	63,9	99,3	74,4
Σ composés impair	-	35,0	-	23,6
Σ composés normaux	99,7	98,9	99,3	98,0
Σ composés ramifiés	-	-	-	-

AG: acides gras.

*: % par rapport aux β-hydroxy acides totaux de la présente fraction.

VI. Culture de *M. HYDROCARBONOCLASTICUS* sur hydrocarbures ramifiés

VI.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES

Les lipides extraits de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur hydrocarbures ramifiés comprennent les mêmes classes de composés que ceux extraits des cultures sur *n*-alcanes. Comme le montrent les distributions en lipides rapportées dans les Tableaux III.9, III.11 et III.13, les composés ramifiés sont cependant plus abondants, et des lipides comportant à la fois une ramification et une insaturation ont été détectés. En raison d'un problème de coélution sur les colonnes CG, certains isomères n'ont pu être identifiés qu'en mélange.

Ainsi dans le cas de la culture sur *i*-C₁₉, dans les lipides "non liés", les analyses en CG (Figure III.33a) puis en CG/SM indiquent la présence d'un pic dont le temps de rétention suggère qu'il s'agit d'un ester méthylique insaturé dont la chaîne comporte 17 carbones, et dont la ramification pourrait être de type *iso*. Ceci a pu être clairement établi par analyse en CG, après réduction catalytique du mélange lipidique (Figure III.33b): une augmentation du pourcentage relatif de l'acide *i*-C_{17:0} a ainsi été notée.

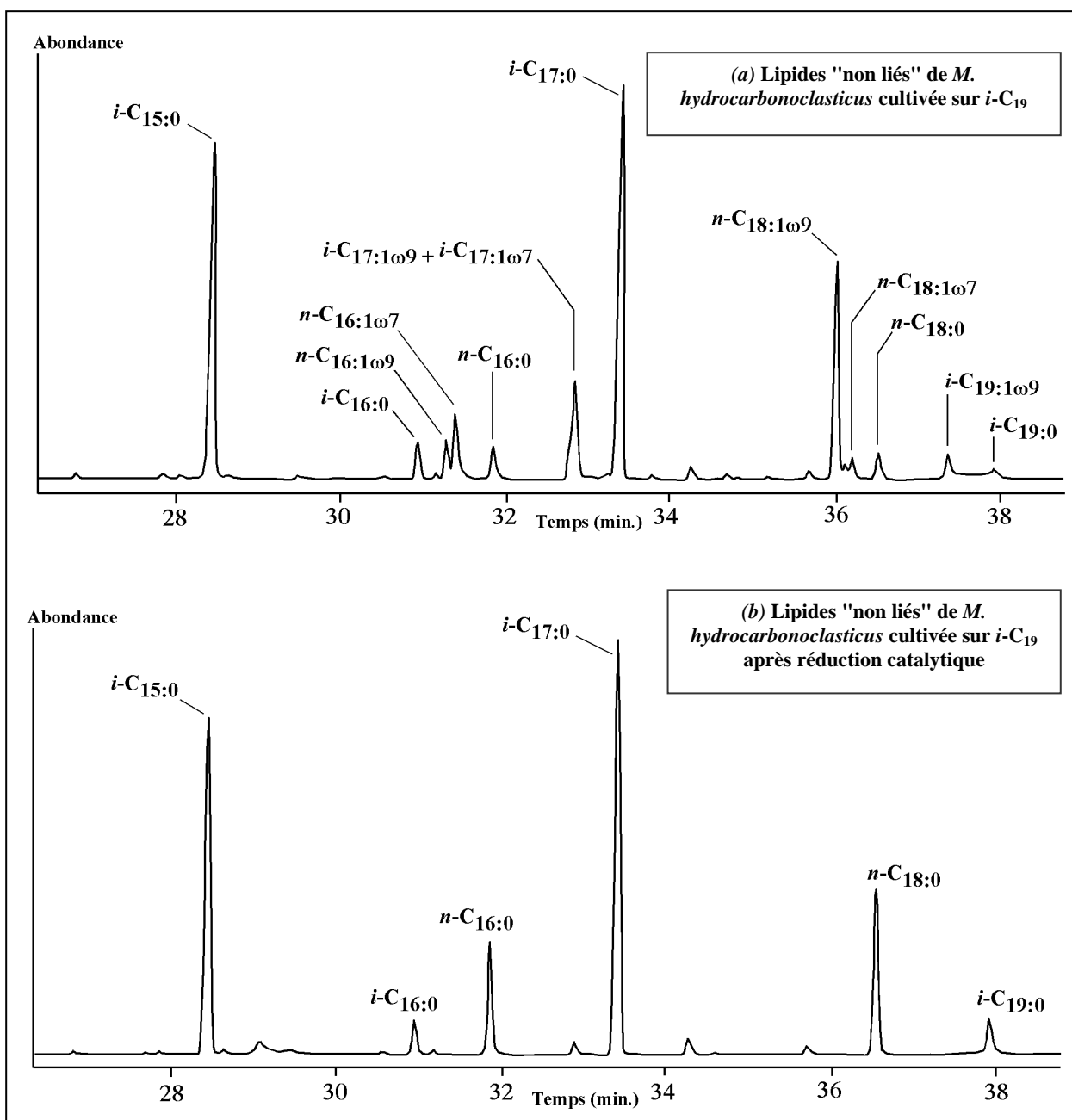


Figure III.33. Courant ionique total des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur *i*-C₁₉ avant (a) et après (b) réduction catalytique.

De plus l'analyse des spectres de masse des dérivés DMDS des lipides de cette fraction montre qu'en fait deux composés *i*-C_{17:1} coéluent, possédant une insaturation respectivement en position ω₉, majoritaire, et ω₇, minoritaire (Figure III.34).

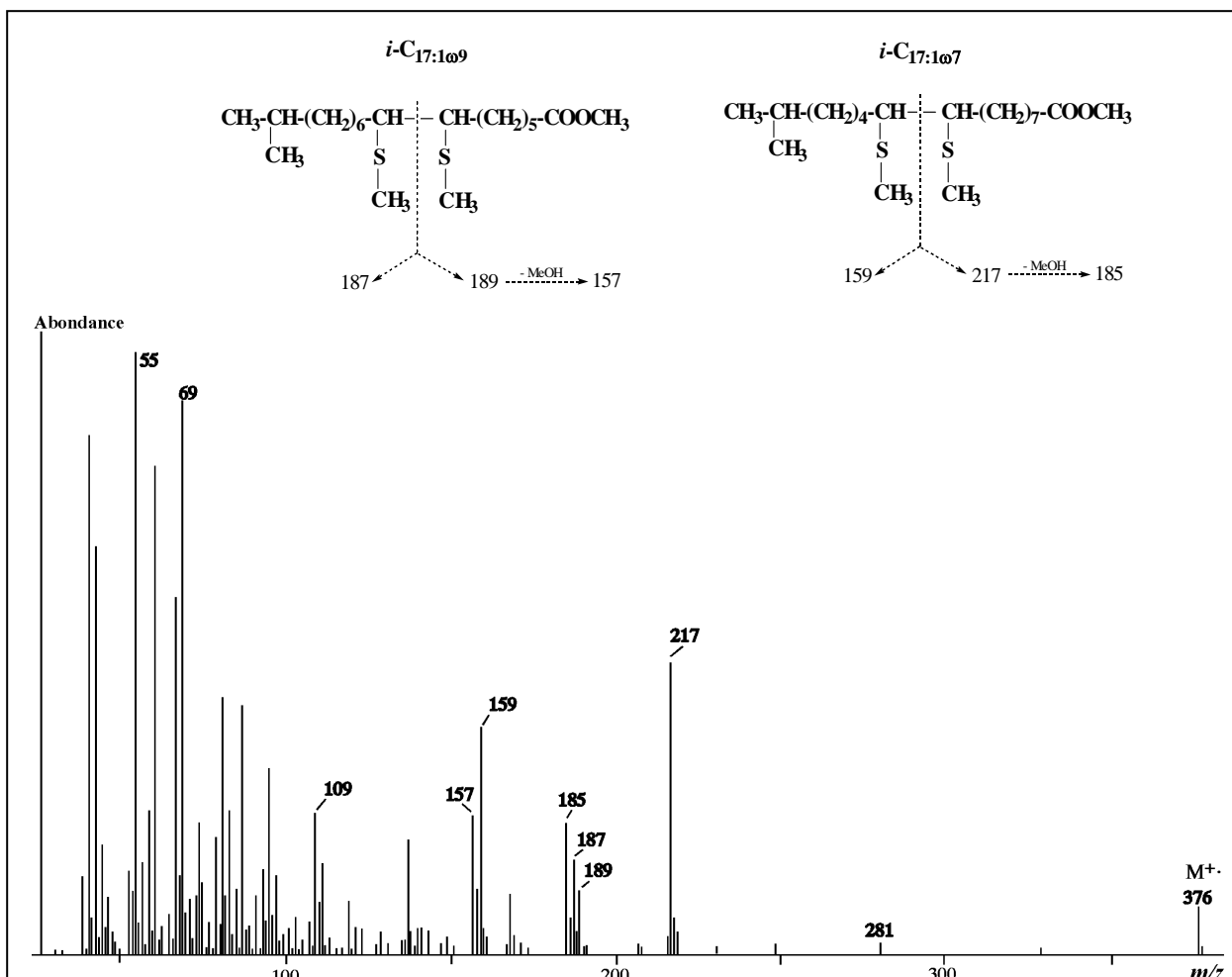


Figure III.34. Spectre de masse des dérivés DMDS des esters méthyliques des acides gras i - $C_{17:1\omega 9}$ et i - $C_{17:1\omega 7}$.

VI.2. LIPIDES "NON LIÉS"

Dans les lipides "non liés", les acides gras sont les constituants les plus abondants, leur abondance relative varie de 84,4 % dans le cas de la culture sur ai - C_{19} à 97,5 % dans le cas de celle sur 10-Me- C_{19} (Tableau III.10).

Dans les cultures sur les alcanes *iso* et *antéiso* des acides gras de parité identique à celle des alcanes fournis aux bactéries et présentant la même substitution *iso* et *antéiso* ont été identifiés dans les lipides "non liés". Les composés dominants sont les acides gras saturés comportant une ramification méthyle: ils constituent de 43,6 % (culture sur i - C_{19}) à 61,4 % (culture sur ai - C_{19}) de cette fraction (Tableau III.10). Les acides gras majoritaires sont l'*iso*- et l'*antéiso*- $C_{17:0}$ dans les cultures sur les alcanes *iso* et *antéiso* à 19 atomes de carbones, avec respectivement 24,7 % et 35,1 % des lipides "non liés". Par contre, dans les cultures sur *iso*- et

antéiso-C₂₀, les acides gras prépondérants sont respectivement l'*iso*- et l'*antéiso*-C_{16:0} (respectivement 32,7 % et 20,4 %; Tableau III.9). On distingue aussi les acides gras *iso* et *antéiso* C_{15:0}, présents respectivement dans les cultures sur *i*-C₁₉ et *ai*-C₁₉, et les acides gras *i*- et *ai*-C_{14:0}, respectivement dans les cultures sur *i*-C₂₀ et *ai*-C₂₀. Une quantité surprenante d'acide gras *antéiso* C_{17:0} (10,3 %) a été détectée dans les lipides non liés de la culture sur *ai*-C₂₀, ce qui suggère l'intervention d'un mécanisme autre que la β -oxydation dans la dégradation de cet alcane.

Par ailleurs, chacune des cultures sur alcanes ramifiés *iso* ou *antéiso* conduit à la formation de deux acides gras ramifiés de même nombre d'atomes de carbone que l'alcane utilisé. Ainsi les cultures sur *i*-C₁₉ et *i*-C₂₀ donnent chacune un acide gras *iso* et un acide gras ramifié par un groupe méthyle en position 2 (par rapport au groupement carboxylique), respectivement à 19 et 20 atomes de carbone. Ces derniers acides sont facilement identifiables grâce à leur spectres de masse présentant deux ions intenses: l'ion 88 obtenu par un réarrangement McLafferty (remplaçant l'ion 74 dans le cas des *n*-acides gras; Figure III.6) et l'ion 101 (remplaçant l'ion 87 pour les *n*-acides gras; Figure III.7). Des résultats similaires sont obtenus avec les cultures sur *ai*-C₁₉ et *ai*-C₂₀: chacune de ces cultures donne un acide gras *antéiso* et un acide gras ramifié en position 3, respectivement à 19 et 20 atomes de carbone. Les pourcentages des acides gras ramifiés en position 2 ou 3 sont inférieurs à ceux des acides gras provenant d'une oxydation du côté le moins encombré.

Des quantités importantes d'acides gras insaturés *iso* ont été aussi détectées dans les cultures sur *i*-C₁₉ et *i*-C₂₀ (respectivement, 9,6 % et 11,3 % ; Tableau III.10), dont l'insaturation se trouve essentiellement en position ω 9 dans la culture sur *i*-C₁₉, alors que dans la culture sur *i*-C₂₀ la position de l'insaturation varie entre les positions ω 6 et ω 10. Par comparaison, les cultures sur alcanes *antéiso* renferment de plus faibles quantités d'acides gras insaturés *antéiso* (2 % et 8,1 % respectivement dans les cultures sur *ai*-C₁₉ et *ai*-C₂₀) comparées aux quantités d'acides gras insaturés *iso* dans les cultures sur les alcanes *iso*. Les insaturations de ces acides gras *antéiso* sont localisées surtout en position ω 9 et ω 7 dans la culture sur *ai*-C₁₉, et surtout en position ω 9 et ω 8 dans le cas de l'hydrocarbure *ai*-C₂₀.

En ce qui concerne les acides gras normaux, la distribution est caractérisée par un maximum au niveau de l'acide oléique (*n*-C_{18:1 ω 9}) et ce pour les quatre cultures sur alcanes *iso* et *antéiso*. L'abondance de cet acide varie entre 8,8 % des lipides "non liés" de la culture sur *ai*-C₁₉ et 16,2 % dans le cas de la culture sur *ai*-C₂₀.

Les résultats obtenus avec la culture sur 10-Me-C₁₉ montrent une composition des lipides "non liés" intermédiaire entre celle des *n*-alcane et celle des alcanes ramifiés *iso* et *antéiso*. En effet, les acides gras ramifiés contribuent pour 38,1 % (37,2 saturés et 0,9 % insaturés) des lipides "non liés", alors que les acides gras normaux contribuent pour 59,4 % (25 % saturés et 34,4 % insaturés) (Tableau III.10). En raison de la symétrie de l'hydrocarbure 10-Me-C₁₉, un seul acide directement dérivé de cet alcane est formé, contrairement aux cultures sur alcanes *iso* et *antéiso*.

Dans les cinq cultures sur alcanes ramifiés, les acides gras insaturés sont en quantités moins importantes que dans les cultures sur *n*-alcane. L'acide oléique (*n*-C_{18:1 ω 9}) est l'acide gras insaturé prédominant des lipides "non liés"

Par ailleurs, de faibles quantités d'acides gras méthylés en position 10 ont été détectées dans les lipides "non liés" des cultures sur *ai*-C₁₉, *i*-C₂₀, *ai*-C₂₀ et 10-Me-C₁₉ : 10-Me-16:0, 10-Me-17:0, 10-Me-18:0, 10-Me-19:0. Ce dernier composé a été identifié uniquement dans la culture sur l'alcane correspondant: il s'agit d'un métabolite provenant de l'oxydation de l'alcane. Par comparaison, une étude effectuée sur une autre souche de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur *n*-alcane de C₁₆ jusqu'à C₃₀ (Doumenq et al., 2001) a montré la présence de quantités significatives d'acides gras portant un groupe méthyle en position 10 dans chaque culture. Ceci avait conduit les auteurs à proposer ces composés comme indicateurs de dégradation des hydrocarbures. Leur présence non systématique dans nos cultures ne corrobore pas cette proposition.

Les alcools constituent de 1,4 % (culture sur 10-Me-C₁₉) à 10,7 % (culture sur *ai*-C₁₉) des lipides "non liés"(Tableau III.10). Dans les cultures sur alcanes *iso* et *antéiso*, deux alcools primaires saturés provenant de l'oxydation des deux groupements méthyles terminaux (1 et ω) ont été identifiés, l'alcool dont le groupement hydroxyle est le plus éloigné de la ramification étant prédominant (Tableau III.9). Dans le cas des cultures sur alcanes *antéiso*, l'oxydation subterminale se produit des deux côtés donnant ainsi de faibles quantités (0,1 %) ou des traces d'alcools secondaires. Pour les cultures sur alcanes *iso*, une seule oxydation subterminale est possible à cause de la ramification méthyle empêchant l'oxydation sur un carbone tertiaire. L'alcool secondaire résultant est observé dans les cultures sur *i*-C₁₉ et *i*-C₂₀, représentant respectivement 0,2 et 0,4 % des lipides "non liés". Dans cette dernière culture, un

alcool primaire *iso* insaturé (ω 9) à 19 atomes de carbone a été également identifié. La culture sur l'alcane ramifié en milieu de chaîne, 10-Me-C₁₉, conduit uniquement à la formation de deux alcools en C₁₉ en raison de la symétrie de la molécule. L'alcool primaire (10-Me-19:0, 1-OH) produit par oxydation terminale représente 0,9 % des lipides "non liés", alors que l'alcool secondaire (10-Me-19:0, 2-OH) formé par oxydation subterminale n'a été détecté qu'à l'état de traces. Des quantités non négligeables d'alcools primaires normaux *n*-C₁₂ – *n*-C₂₂ sont également présentes. La présence de ces derniers composés indépendamment de l'hydrocarbure fourni aux bactéries montre que ce sont des produits provenant du métabolisme normal des bactéries (indépendamment de la nature de la source de carbone).

Enfin, les lipides "non liés" contiennent pour une faible part (de 0,1 % à 3,6 %; Tableau III.10) des β -hydroxy acides dans leur très grande majorité directement dérivés des hydrocarbures fournis. Ainsi, parmi ces composés on peut citer les β -hydroxy acides *i*-17:0 (3,1 %) et *i*-19:0 (0,5 %) dans la culture sur *i*-C₁₉; *i*-16:0 (0,1 %), *i*-18:0 (1,0 %) et *i*-20:0 (0,2 %) dans la culture sur *i*-C₂₀ ; *ai*-15:0 (0,4 %), *ai*-17:0 (0,7 %) et *ai*-19:0 (0,5 %) dans la culture sur *ai*-C₁₉ ; *ai*-18:0 (< 0,1 %) et *ai*-20:0 (0,1 %) dans la culture sur *ai*-C₂₀ ; et, 6-Me-15:0 (0,2 %), 8-Me-17:0 (0,1 %) et 10-Me-19:0 (0,2 %) dans le cas de la culture sur 10-Me-C₁₉ (Tableau III.9). Tous ces β -hydroxy acides ont la même parité que les hydrocarbures parents ce qui suggère comme nous le verrons plus loin l'intervention d'un mécanisme de β -oxydation pour leur dégradation. Cependant, des β -hydroxy acides de parité différentes ont été retrouvés en faibles quantités, notamment dans le cas des cultures sur *i*-C₂₀, *ai*-C₁₉ et *ai*-C₂₀ (Tableau II.9). Pour la plupart, il ne proviennent pas d'une oxydation des hydrocarbures très minoritaires présents dans les alcanes fournis (Tableau III.1). Leur présence suggère l'intervention parallèle et minoritaire, d'une dégradation par α -oxydation.

Tableau III.9. Composition des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcanes ramifiés.

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>Acides gras saturés</i>					
<i>n</i> -10:0	-	0,2	tr	-	-
<i>n</i> -12:0	-	0,2	0,4	-	tr
<i>i</i> -12:0	-	0,1	-	-	-
<i>n</i> -13:0	-	0,1	tr	0,1	-
<i>i</i> -13:0	0,8	-	-	-	-
<i>ai</i> -13:0	-	-	1,0	-	-
<i>n</i> -14:0	tr	0,2	0,4	0,2	0,6
<i>i</i> -14:0	0,3	13,5	-	-	-
<i>ai</i> -14:0	-	-	0,3	5,9	tr
4-Me-13:0	-	-	-	-	2,8
<i>n</i> -15:0	0,1	-	0,4	0,2	2,6
<i>i</i> -15:0	16,2	2,5	-	0,1	tr
<i>ai</i> -15:0	-	0,1	20,1	1,8	0,2
8-Me-14:0	-	-	tr	-	0,1
<i>n</i> -16:0	2,3	1,1	2,9	2,4	9,7
<i>i</i> -16:0	1,8	32,7	0,7	-	tr
<i>ai</i> -16:0	-	-	-	20,4	-
6-Me-15:0	-	-	-	-	6,9
<i>n</i> -17:0	1,1	1,1	1,1	1,3	10,4
<i>i</i> -17:0	27,1	1,4	-	0,7	tr
<i>ai</i> -17:0	0,2	-	35,1	10,3	-
10-Me-16:0	-	0,3	0,7	1,6	1,1
5-Me-16:0	-	-	-	-	tr
<i>n</i> -18:0	1,3	1,1	1,7	1,3	1,6
<i>i</i> -18:0	0,6	9,2	-	-	-
<i>ai</i> -18:0	-	-	tr	16,2	-
10-Me-17:0	-	-	0,2	-	-
8-Me-17:0	-	-	-	-	23,5
<i>n</i> -19:0	-	-	0,1	0,2	0,1
<i>i</i> -19:0	0,8	0,1	tr	0,1	-
<i>ai</i> -19:0	-	-	2,8	0,3	-
10-Me-18:0	-	-	tr	-	0,3
3-Me-18:0	-	-	0,4	-	-
2-Me-18:0	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -20:0	-	-	-	-	tr
<i>i</i> -20:0	-	0,3	-	-	-
<i>ai</i> -20:0	-	-	-	1,4	-
10-Me-19:0	-	-	-	-	2,2
3-Me-19:0	-	-	-	0,3	-
2-Me-19:0	-	0,2	0,1	-	-
<i>Acides gras insaturés</i>					
<i>n</i> -14:1 ω9	-	-	-	-	0,6
<i>n</i> -14:1 ω7	-	-	-	-	0,2
<i>ai</i> -14:1 ω8	-	-	-	tr	0,6
<i>n</i> -15:1 ω8	-	-	-	-	0,1

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>n</i> -15:1 ω6	-	-	-	1,0	0,1
<i>n</i> -15:1 ω4	-	-	-	-	tr
<i>n</i> -16:1 ω9	1,5	0,8	0,8	0,9	2,0
<i>n</i> -16:1 ω8	-	-	tr	-	-
<i>n</i> -16:1 ω7	2,7	1,7	0,8	2,5	1,4
<i>n</i> -16:1 ω6	-	-	tr	-	-
<i>n</i> -16:1 ω5	-	0,3	0,7	-	0,1
<i>i</i> -16:1 ω10	-	0,7	-	-	-
<i>i</i> -16:1 ω8	-	1,2	tr	-	-
<i>i</i> -16:1 ω6	-	1,2	tr	-	-
<i>ai</i> -16:1 ω9	-	-	-	1,2	-
<i>ai</i> -16:1 ω8	-	-	-	0,6	-
<i>ai</i> -16:1 ω6	-	-	-	0,2	-
<i>n</i> -17:1 ω10	-	0,7	0,6	-	9,5
<i>n</i> -17:1 ω8	0,3	1,1	0,2	1,0	1,9
<i>n</i> -17:1 ω6	-	tr	0,4	tr	-
<i>i</i> -17:1 ω9	6,6	-	-	-	-
<i>i</i> -17:1 ω7	1,5	-	-	-	-
<i>ai</i> -17:1 ω9	-	-	-	0,5	-
<i>ai</i> -17:1 ω7	-	-	0,8	0,3	-
<i>ai</i> -17:1 ω5	-	-	0,1	-	-
<i>n</i> -18:1 ω9	17,4	11,2	8,8	16,2	16,1
<i>n</i> -18:1 ω7	0,3	0,2	1,1	0,3	1,8
<i>n</i> -18:1 ω5	0,2	tr	0,5	tr	0,1
<i>i</i> -18:1 ω10	-	4,1	-	-	-
<i>i</i> -18:1 ω8	-	2,8	-	-	-
<i>ai</i> -18:1 ω9	-	-	-	1,4	-
<i>ai</i> -18:1 ω8	-	-	-	2,1	-
<i>ai</i> -18:1 ω6	-	-	-	0,1	-
8-Me-17:1 ω8	-	-	-	-	0,3
<i>n</i> -19:1 ω10	-	-	-	0,4	tr
<i>n</i> -19:1 ω8	-	-	-	-	0,3
<i>i</i> -19:1 ω9	2,4	0,8	-	-	-
<i>ai</i> -19:1 ω9	-	-	0,5	1,0	-
<i>ai</i> -19:1 ω7	-	-	0,6	tr	-
<i>n</i> -20:1 ω11	-	0,2	-	-	-
<i>n</i> -20:1 ω9	0,6	0,1	0,1	-	0,1
<i>i</i> -20:1 ω9	-	0,3	-	-	-
<i>i</i> -20:1 ω8	-	0,2	-	-	-
<i>ai</i> -20:1	-	-	-	0,7	-
<i>Acides gras cyclopropaniques</i>					
17 ∇ ω7,8	-	-	1,1	-	-
<i>β-hydroxy acides</i>					
<i>n</i> -11:0, OH	-	0,2	-	-	tr
<i>n</i> -12:0, OH	-	0,2	tr	tr	tr
<i>n</i> -13:0, OH	-	-	-	-	tr

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>n</i> -13:1 ω 8, OH	-	tr	-	-	-
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	-	-	0,1
<i>ai</i> -15:0, OH	-	-	0,4	-	-
<i>i</i> -16:0, OH	-	0,1	-	-	-
<i>ai</i> -16:0, OH	-	-	tr	-	-
6-Me-15:0, OH	-	-	-	-	0,2
<i>i</i> -17:0, OH	3,5	-	-	-	-
<i>ai</i> -17:0, OH	-	-	0,7	tr	-
<i>n</i> -18:0, OH	tr	-	-	-	-
<i>i</i> -18:0, OH	-	1,0	-	-	-
<i>ai</i> -18:0, OH	-	-	0,1	tr	-
8-Me-17:0, OH	-	-	-	-	0,1
<i>i</i> -19:0, OH	0,6	0,1	-	-	-
<i>ai</i> -19:0, OH	-	-	0,5	tr	-
<i>i</i> -20:0, OH	-	0,2	-	-	-
<i>ai</i> -20:0, OH	-	-	-	0,1	-
10-Me-19:0, OH	-	-	-	-	0,2
<i>Alcools</i>					
<i>n</i> -12:0, 1-OH	-	0,1	tr	-	tr
<i>n</i> -14:0, 1-OH	-	0,1	tr	tr	0,2
<i>n</i> -15:0, 1-OH	-	tr	0,1	-	-
<i>ai</i> -15:0, 1-OH	-	-	0,1	-	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,2	0,3	1,0	0,2	tr
<i>n</i> -17:0, 1-OH	0,3	tr	-	-	-
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,2	0,1	0,1	-	tr
<i>i</i> -18:0, 1-OH	-	0,1	-	-	-
<i>n</i> -19:0, 1-OH	-	-	-	-	0,1
<i>i</i> -19:0, 1-OH	5,9	-	-	-	-
<i>i</i> -19:1 ω 9, 1-OH	1,7	-	-	-	-
<i>i</i> -19:0, 2-OH	0,2	-	-	-	-
<i>ai</i> -19:0, 1-OH	-	-	7,8	0,2	-
<i>ai</i> -19:0, 2-OH	-	-	0,1	-	-
3-Me-18:0, 1-OH	-	-	1,3	-	-
3-Me-18:0, 2-OH	-	-	0,1	-	-
2-Me-18:0, 1-OH	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -20 :0, 1-OH	-	-	0,1	-	0,2
<i>i</i> -20:0, 1-OH	-	2,1	-	-	-
<i>i</i> -20:0, 2-OH	-	0,4	-	-	-
<i>ai</i> -20:0, 1-OH	-	-	-	1,9	-
<i>ai</i> -20:0, 2-OH	-	-	-	0,1	-
10-Me-19:0, 1-OH	-	-	-	-	0,9
10-Me-19:0, 2-OH	-	-	-	-	tr
3-Me-19:0, 1-OH	-	-	-	1,0	-
3-Me-19:0, 2-OH	-	-	-	0,1	-
2-Me-19:0, 1-OH	-	0,9	-	-	-
<i>n</i> -22:0, 1-OH	-	0,1	tr	-	-

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment

significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 0,5 % et 2,0 % des lipides totaux.

Tableau III.10. Composition globale des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcanes ramifiés.

<i>Source de carbone</i>	<i>i-C₁₉</i>	<i>i-C₂₀</i>	<i>ai-C₁₉</i>	<i>ai-C₂₀</i>	<i>10-Me-C₁₉</i>
<i>Classes de composés</i>					
<i>n</i> -alcan-1-ols	0.7	0.7	1.3	0.2	0.5
alcan-1-ols ramifiés	6.9	3.4	9.2	3.1	0.9
alcan-2-ols ramifiés	0.2	0.4	0.2	0.2	tr
Σ Alcools	7.8	4.5	10.7	3.5	1.4
<i>n</i> -acides saturés	13.0	4.0	7.0	5.7	25.0
<i>n</i> -acides insaturés	21.1	16.3	14.0	22.3	34.4
acides ramifiés saturés	43.6	60.4	61.4	59.1	37.2
acides ramifiés insaturés	9.6	11.3	2.0	8.1	0.9
Σ acides	87.3	92.0	84.4	95.2	97.5
Σ β-hydroxy acides	3.6	1.8	1.7	0.1	0.6
Σ composés pairs	35.6	89.5	20.8	77.7	72.6
Σ composés impairs	63.1	8.8	77.1	21.1	26.9
Σ composés normaux	34.8	21.4	22.3	28.2	60.0
Σ composés ramifiés	63.9	76.9	75.6	70.6	39.5
Σ AG saturés	56.6	64.4	68.4	64.8	62.2
Σ AG insaturés	30.7	27.6	16.0	30.4	35.3
Σ AG <i>n</i> -C ₁₆	5.8	3.9	5.2	5.8	13.2
Σ AG <i>n</i> -C ₁₇	1.3	2.9	2.3	2.3	21.8
Σ AG <i>n</i> -C ₁₈	26.4	12.5	12.1	17.8	19.6

AG: acides gras

VI.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE

La composition des lipides obtenus par un traitement basique des biomasses bactériennes déjà extraites aux solvants est caractérisée par la dominance des β -hydroxy acides, excepté dans le cas de la culture sur 10-Me-C₁₉. La somme des β -hydroxy acides varie de 47,9 % (culture sur 10-Me-C₁₉) à 65,6 % (culture sur *ai*-C₂₀) de cette fraction lipidique (Tableaux III.11 et 12) avec une forte contribution des *n*- β -hydroxy acides (> 90 %) de C₁₀ à C₁₄. Le β -hydroxy acide *n*-C_{12:0} est le composé prédominant dans cette série, constituant plus que 65 % des β -hydroxy acides (Tableau III.11). Les β -hydroxy acides ramifiés sont très minoritaires et parmi eux, ceux comportant plus de quatorze carbones ne sont présents qu'à l'état de trace. Une relation directe entre la structure de l'hydrocarbure ramifié et celle des β -hydroxy acides se dégage dans la plupart des cas. Cependant, les cultures sur les alcanes *antéiso* contiennent de faibles quantités de β -hydroxy acides *iso*, et la culture sur *i*-C₂₀ renferme des traces de β -hydroxy acides *antéiso*. Les β -hydroxy acides présents dans cette fraction sont essentiellement saturés: entre 82 % (culture sur *ai*-C₁₉) et 96 % (culture sur 10-Me-C₁₉). Les β -méthoxy acides sont également présents dans cette fraction mais leur origine artéfactuelle a été déjà discutée.

La distribution des acides gras dans les lipides labiles en milieu basique varie considérablement en fonction de la structure de l'hydrocarbure. Les acides gras saturés prédominent dans toutes les cultures avec une grande contribution des composés ramifiés *iso*, *antéiso* et ramifiés en milieu de chaîne (approximativement 2/3 des acides gras saturés), selon la structure de l'alcane utilisé (Tableaux III.11 et III.12). Par contre, la distribution des acides gras insaturés est dominée par les composés normaux (*n*-C_{18:1 ω 9} et *n*-C_{14:1 ω 9}; Tableau III.11).

Dans les deux fractions des lipides "non liés" et labiles en milieu basique de la culture sur *ai*-C₁₉, de faibles quantités d'acide gras cyclopropane 17 ∇ ω 7,8 ont été détectées (respectivement 1,1 % et 0,3 %; Tableaux III.11 et III.12). Sa caractérisation a été effectuée par comparaison du spectre de masse avec celui d'un standard.

Tableau III.11. Composition des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcanes ramifiés.

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>Acides gras saturés</i>					
<i>n</i> -10:0	-	0,1	0,1	-	-
<i>n</i> -12:0	2,4	3,0	4,0	0,7	0,2
<i>n</i> -13:0	-	0,5	0,4	0,3	-
<i>i</i> -13:0	-	0,1	tr	-	-
<i>ai</i> -13:0	-	-	0,8	tr	-
3-Me-12:0	-	-	-	-	2,0
<i>n</i> -14:0	1,0	0,3	0,2	tr	0,1
<i>i</i> -14:0	-	2,4	-	0,6	-
<i>ai</i> -14:0	-	-	0,1	6,3	-
<i>n</i> -15:0	-	-	-	0,4	tr
<i>i</i> -15:0	6,5	-	-	-	-
<i>ai</i> -15:0	-	-	7,2	0,3	tr
<i>n</i> -16:0	2,6	2,1	2,8	2,4	3,4
<i>i</i> -16:0	0,9	8,3	0,1	-	0,2
<i>ai</i> -16:0	-	-	-	2,9	-
6-Me-15:0	-	-	-	-	3,4
<i>n</i> -17:0	0,4	0,5	0,4	0,6	4,9
<i>i</i> -17:0	10,6	0,3	-	0,4	-
<i>ai</i> -17:0	-	-	13,6	2,7	-
10-Me-16:0	-	-	-	0,2	-
<i>n</i> -18:0	1,5	1,1	1,6	1,7	0,5
<i>i</i> -18:0	-	1,8	-	0,1	-
<i>ai</i> -18:0	-	-	-	2,8	-
10-Me-17:0	-	-	0,3	-	-
8-Me-17:0	-	-	-	-	13,0
<i>i</i> -19:0	0,2	-	-	-	-
<i>ai</i> -19:0	-	-	0,5	0,2	-
<i>n</i> -20:0	-	tr	0,2	-	-
<i>i</i> -20:0	-	tr	-	-	-
<i>ai</i> -20:0	-	-	-	0,6	-
10-Me-19:0	-	-	-	-	0,6
<i>Acides gras insaturés</i>					
<i>n</i> -13:1 ω7	-	-	-	0,3	-
<i>n</i> -13:1 ω4	-	0,5	-	-	-
<i>i</i> -13:1 ω7	-	0,2	-	-	-
3-Me-12:1 ω8	-	-	-	-	1,8
<i>n</i> -14:1 ω9	5,1	5,5	2,9	1,7	1,6
<i>n</i> -14:1 ω7	-	0,1	1,4	-	0,8
<i>n</i> -14:1 ω5	-	tr	tr	-	0,1
<i>i</i> -14:1 ω8	-	tr	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω9	1,3	0,2	0,5	tr	0,6
<i>n</i> -16:1 ω7	1,1	0,3	0,4	tr	0,2
<i>i</i> -16:1 ω8	-	tr	-	-	-
<i>i</i> -16:1 ω6	-	0,1	-	-	-

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>ai</i> -16:1 ω8	-	-	-	0,1	-
<i>ai</i> -16:1 ω6	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -17:1 ω10	-	0,2	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω9	-	0,3	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω8	-	-	-	tr	5,9
<i>i</i> -17:1 ω7	2,3	-	-	-	-
<i>ai</i> -17:1 ω9	-	-	tr	-	-
<i>ai</i> -17:1 ω7	-	-	tr	-	-
<i>n</i> -18:1 ω9	6,4	3,9	3,4	5,1	9,2
<i>n</i> -18:1 ω7	0,1	tr	1,3	0,1	-
<i>i</i> -18:1 ω10	-	0,8	-	-	-
<i>i</i> -18:1 ω8	-	0,5	-	-	-
<i>ai</i> -18:1 ω8	-	-	-	0,5	-
<i>i</i> -19:1 ω9	-	0,1	-	-	-
<i>ai</i> -19:1 ω9	-	-	0,3	-	-
<i>ai</i> -19:1 ω7	-	-	0,1	-	-
<i>Acides gras cyclopropaniques</i>					
17 ∇ ω7,8	-	-	0,3	-	-
<i>β-hydroxy acids</i>[#]					
<i>n</i> -10:0, OH	0,2	0,7	1,2	0,2	0,1
<i>n</i> -11:0, OH	0,4	3,5	2,3	1,3	7,1
<i>ai</i> -11:0, OH	-	-	tr	-	-
<i>n</i> -12:0, OH	50,6	44,5	36,5	53,7	31,8
<i>n</i> -12:1ω7, OH	1,7	5,5	5,6	2,4	0,4
<i>i</i> -12:0, OH	-	0,1	-	-	-
<i>ai</i> -12:0, OH	-	-	-	0,6	-
<i>n</i> -13:0, OH	0,3	2,1	1,4	1,8	5,6
<i>n</i> -13:1ω8, OH	0,3	3,2	1,9	1,7	2,3
<i>n</i> -13:1ω6, OH	-	tr	0,1	-	-
<i>i</i> -13:0, OH	0,6	tr	0,7	tr	-
<i>ai</i> -13:0, OH	-	tr	1,6	tr	tr
<i>n</i> -14:0, OH	0,2	0,4	0,3	0,5	0,1
<i>n</i> -14:1ω9, OH	1,5	3,3	2,1	2,7	0,5
<i>n</i> -14:1ω7, OH	-	0,1	-	-	-
<i>n</i> -14:1ω5, OH	-	tr	-	-	-
<i>i</i> -14:0, OH	-	tr	tr	tr	-
<i>ai</i> -14:0, OH	-	tr	tr	0,7	-
<i>ai</i> -15:0, OH	-	-	0,1	-	-
<i>i</i> -17:0, OH	tr	-	-	-	-
<i>ai</i> -17:0, OH	-	-	tr	-	-
<i>i</i> -19:0, OH	tr	-	-	-	-
<i>ai</i> -19:0, OH	-	-	tr	-	-
<i>Alcools</i>					
<i>n</i> -12:0, 1-OH	-	0,3	tr	-	-
<i>n</i> -14:0, 1-OH	-	0,6	0,3	0,3	tr
<i>n</i> -15:0, 1-OH	-	-	0,2	-	-
<i>ai</i> -15:0, 1-OH	-	-	tr	-	-

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,1	0,4	0,4	0,4	0,1
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,1	0,1	0,3	0,1	0,1
<i>n</i> -18:1 ω 9, 1-OH	-	-	-	-	1,2
<i>i</i> -19:0, 1-OH	0,3	-	-	-	-
<i>n</i> -20:0, 1-OH	-	0,1	0,1	-	-
<i>i</i> -20:0, 1-OH	-	0,1	-	-	-
2-Me-19:0, 1-OH	-	0,1	-	-	-
<i>ai</i> -20:0, 1-OH	-	-	-	1,3	-

Les abondances relatives des β -méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement a celles des β -hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, à partir desquels ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 1,2 % et 2,1 % des lipides totaux.

Tableau III.12. Composition globale des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcanes ramifiés.

<i>Source de carbone</i>	<i>i</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₂₀	<i>ai</i> -C ₁₉	<i>ai</i> -C ₂₀	10-Me-C ₁₉
<i>Classes de composés</i>					
Σ alcools	0,5	1,7	1,3	2,1	1,4
<i>n</i> -acides saturés	7,9	7,6	9,7	6,1	9,1
<i>n</i> -acides insaturés	14,0	11,0	9,9	7,2	18,4
acides ramifiés saturés	18,2	12,9	22,6	17,1	19,2
acides ramifiés insaturés	2,3	1,7	0,4	0,6	1,8
Σ acides	42,4	33,2	42,6	31,0	48,5
<i>n</i> - β -hydroxy acides	55,2	63,3	51,4	64,3	47,9
β -hydroxy acides ramifiés	0,6	0,1	2,4	1,3	tr
Σ β -hydroxy acides	55,8	63,4	53,8	65,6	47,9
β -hydroxy 12:0*	90,7	70,2	67,8	81,9	66,4
Σ composés normaux	77,3	83,4	72,3	78,4	76,8
Σ composés ramifiés	21,4	14,9	25,7	20,3	21,0
Σ composés pairs	76,8	86,8	66,1	88,5	68,2
Σ composés impairs	21,9	11,5	31,9	10,2	29,6
Σ AG <i>n</i> -C ₁₆	5,0	2,6	3,7	2,4	4,2
Σ AG <i>n</i> -C ₁₇	0,4	1,0	0,4	0,6	10,8
Σ AG <i>n</i> -C ₁₈	8,0	5,0	6,3	6,9	9,7

AG: acides gras.

*: % par rapport aux β -hydroxy acides totaux de la présente fraction.

VI.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE

Comme dans le cas des cultures sur *n*-alcanes, les lipides labiles en milieu acide des cultures sur alcanes ramifiés sont caractérisés par une nette prédominance des β -hydroxy acides représentant de 78,1 % de cette fraction dans le cas de la culture sur *ai*-C₂₀ à 93,4 % dans le cas de la culture sur *i*-C₁₉ (Tableau III.14). Le composé le plus abondant est encore le β -hydroxy acide *n*-12:0 (Tableaux III.13 et III.14). Comme dans le cas des lipides labiles en milieu basique les β -hydroxy acides ramifiés sont présents en très faible quantité à l'exception de la culture sur *ai*-C₁₉. Dans cette dernière les β -hydroxy acides *antéiso* contribuent pour 12,7 % de cette fraction (avec notamment 11,9 % d'*ai*- β -13:0; Tableau III.13). Par contre, seule une faible quantité de β -hydroxy acides *antéiso* a été identifiée dans le cas de la culture sur *ai*-C₂₀ (1,3 % ; Tableau III.13). Dans la culture sur 10-Me-C₁₉, seules des traces de β -hydroxy acides ramifiés ont été identifiés; les β -hydroxy acides *n*-11:0 et *n*-13:0 étant pour leur part des composés abondants (respectivement, 7,3 % et 12,4 % ; Tableau III.13). Les distributions des acides gras dans les lipides labiles en milieu acide sont quant à elles assez complexes et varient en fonction de l'hydrocarbure fourni (Tableau III.13).

Tableau III.13. Composition des lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcanes ramifiés.

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>Acides gras saturés</i>					
<i>n</i> -10:0	-	tr	0,1	-	-
<i>n</i> -12:0	-	0,3	0,8	5,4	-
<i>ai</i> -12:0	-	-	-	0,4	-
<i>n</i> -13:0	-	-	-	0,6	1,8
<i>ai</i> -13:0	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -14:0	2,3	0,1	tr	tr	0,1
<i>i</i> -14:0	-	0,2	-	1,0	-
<i>ai</i> -14:0	-	-	-	3,0	-
<i>n</i> -15:0	-	-	0,1	0,1	0,2
<i>ai</i> -15:0	-	-	0,2	-	-
<i>n</i> -16:0	-	3,7	2,4	0,3	1,0
<i>i</i> -16:0	-	0,2	-	-	-
<i>ai</i> -16:0	-	-	-	1,8	-
<i>n</i> -17:0	0,4	0,4	0,2	0,3	0,7
<i>i</i> -17:0	0,4	tr	-	-	-
<i>ai</i> -17:0	-	-	1,1	1,5	-
10-Me-16:0	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -18:0	0,2	2,0	2,2	0,2	tr
<i>i</i> -18:0	-	0,3	-	tr	-
<i>ai</i> -18:0	-	-	-	0,8	-
<i>n</i> -19:0	-	0,1	-	-	-
<i>ai</i> -19:0	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -20:0	-	0,2	-	-	-
<i>ai</i> -20:0	-	-	-	tr	-
<i>Acides gras insaturés</i>					
<i>n</i> -13:1 ω8	-	-	-	0,4	-
<i>n</i> -14:1 ω9	-	-	-	1,8	-
<i>n</i> -16:1 ω9	-	0,1	-	0,2	-
<i>n</i> -16:1 ω7	-	tr	-	0,2	-
<i>ai</i> -16:1 ω8	-	-	-	0,4	-
<i>ai</i> -16:1 ω6	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -17:1 ω8	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -18:1 ω9	-	5,4	-	0,5	0,8
<i>n</i> -18:1 ω7	-	0,1	-	0,3	tr
<i>n</i> -18:1 ω5	-	0,2	-	-	-
<i>n</i> -18:2	-	0,9	-	-	-
<i>i</i> -18:1 ω10	-	0,1	-	-	-
<i>i</i> -18:1 ω8	-	tr	-	-	-
<i>ai</i> -18:1 ω8	-	-	-	0,3	-
<i>β-hydroxy acides</i>[#]					
<i>n</i> -10:0, OH	0,5	1,0	0,2	0,6	-
<i>n</i> -11:0, OH	0,7	4,3	1,7	2,8	7,3
<i>ai</i> -11:0, OH	-	-	0,2	-	-
<i>i</i> -11:0, OH	-	tr	-	-	-

Lipides	<i>i</i>-C₁₉	<i>i</i>-C₂₀	<i>ai</i>-C₁₉	<i>ai</i>-C₂₀	10-Me-C₁₉
<i>n</i> -12:0, OH	87,8	68,5	65,5	62,6	71,0
<i>n</i> -12:1 ω7, OH	0,4	-	tr	3,6	-
<i>i</i> -12:0, OH	-	1,1	0,1	-	-
<i>ai</i> -12:0, OH	-	-	0,2	0,7	-
<i>n</i> -13:0, OH	0,7	5,0	4,6	2,0	12,4
<i>n</i> -13:1 ω8, OH	-	-	tr	2,0	-
<i>i</i> -13:0, OH	1,9	0,2	3,0	tr	-
<i>ai</i> -13:0, OH	-	tr	11,9	tr	tr
<i>n</i> -14:0, OH	1,0	1,7	2,2	0,4	0,5
<i>n</i> -14:1 ω9, OH	0,4	-	0,1	2,8	-
<i>i</i> -14:0, OH	-	0,1	tr	tr	-
<i>ai</i> -14:0, OH	-	tr	0,2	0,6	-
<i>n</i> -15:0, OH	-	tr	tr	-	tr
<i>ai</i> -15:0, OH	-	-	0,2	-	-
<i>ai</i> -17:0, OH	-	-	tr	-	-
<i>i</i> -19:0, OH	tr	-	-	-	-
<i>ai</i> -19:0, OH	-	-	tr	-	-
<i>i</i> -20:0, OH	-	tr	-	-	-
Alcools					
<i>n</i> -12:0, 1-OH	-	0,1	0,2	-	-
<i>n</i> -14:0, 1-OH	0,1	0,1	0,1	0,1	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,6	1,0	0,8	0,2	1,0
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,4	0,6	0,6	0,1	0,6
<i>n</i> -18:1, 1-OH	-	-	-	-	0,3
<i>ai</i> -19:0, 1-OH	-	-	0,1	-	-
<i>n</i> -20:0, 1-OH	-	tr	-	0,1	-
<i>i</i> -20:0, 1-OH	-	0,2	-	-	-
<i>ai</i> -20:0, 1-OH	-	-	-	tr	-
2-Me-19:0, 1-OH	-	0,1	-	-	-
<i>n</i> -22:01-OH	-	0,2	0,2	-	-

Les abondances relatives des β-méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement a celles des β-hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, à partir desquels ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 0,7 % et 4,1 % des lipides totaux.

Tableau III.14. Composition globale des lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcanes ramifiés.

Source de carbone	<i>i</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₂₀	<i>ai</i> -C ₁₉	<i>ai</i> -C ₂₀	10-Me-C ₁₉
<i>Classe de composé</i>					
Σ alcools	2,0	2,3	2,0	0,5	1,9
<i>n</i> -acides saturés	2,9	6,8	5,8	6,9	3,8
<i>n</i> -acides insaturés	-	6,7	-	3,5	0,8
acides ramifiés saturés	0,4	0,7	1,3	8,7	-
acides ramifiés insaturés	-	0,1	-	0,8	-
Σ acides	3,3	14,3	7,1	19,9	4,6
<i>n</i> -β-hydroxy acides	91,5	80,5	74,3	76,8	91,2
β-hydroxy acides ramifiés	1,9	1,4	15,8	1,3	tr
Σ β-hydroxy acides	93,4	81,9	90,1	78,1	91,2
β-hydroxy 12:0*	94,0	83,6	72,7	80,2	77,9
Σ composés pair	93,0	91,3	79,7	89,7	75,4
Σ composés impair	4,8	7,2	17,5	8,8	22,3
Σ composés normaux	96,2	96,0	86,3	83,9	96,3
Σ composés ramifiés	1,6	2,5	12,9	14,6	1,4

AG: acides gras.

*: % par rapport aux β-hydroxy acides totaux de la présente fraction.

VI. 5. CONCLUSIONS PARTIELLES SUR L'INFLUENCE DES ALCANES LINEAIRES

VI.5.1. Influence de la parité des alcanes sur la composition lipidique

En considérant uniquement le nombre total d'atomes de carbone des alcanes utilisés sans tenir compte de l'absence ou de la présence de ramifications, il apparaît que la composition lipidique dépend de la parité de l'alcane utilisé comme source de carbone. La distribution des lipides "non liés", qui représentent la partie lipidique la plus importante, montre que:

* Les alcanes à nombre pair d'atomes de carbone (*n*-C₂₀, *i*-C₂₀, *ai*-C₂₀ et 10-Me-C₁₉) conduisent essentiellement à des lipides à nombre pair d'atomes de carbone. Inversement, les alcanes à nombre impair d'atomes de carbone (*n*-C₁₉, *n*-C₂₁, *i*-C₁₉ et *ai*-C₁₀) conduisent essentiellement à des lipides à nombre impair d'atomes de carbone (Tableaux III.4 et III.10). Ces résultats sont en accord avec les travaux de Doumenq et al. (2001) sur l'influence de la parité des *n*-alcanes sur la composition en acides gras de *M. hydrocarbonoclasticus* (souche 617). Différentes études sur la dégradation des alcanes par des bactéries aérobies ont conduit au même résultat (Dunlap et Perry, 1967; Makula et Finnerty, 1968a; Hug et Fiechter, 1973; King et Perry, 1975; Rehm et Reiff, 1981). Parmi ces bactéries on peut citer: *Pseudomonas*

aeruginosa, *Micrococcus cerificans*, *Acinetobacter sp* et *Mycobacterium vaccae*. Des résultats similaires ont été également constatés chez des bactéries sulfato-réductrices (*Desulfobacter sp.*, *Desulfolobus sp.* et *Désulfovibrio desulfiricans*) (Taylor et Parkes, 1983). Par contre, Aeckersberg et al. (1998) ont observé des résultats différents chez d'autres bactéries sulfato-réductrices. En effet, chez ces dernières, les acides gras à nombre impair d'atomes de carbone sont dominants dans les cultures sur hexadécane et vice versa, les cultures sur heptadécane contiennent essentiellement des acides gras pairs.

* Les cultures sur alcanes pairs sont caractérisées par la prédominance d'acides gras à 16 et 18 atomes de carbone. Les acides gras saturés ont un maximum à 16:0 (*n*, *i* ou *ai* selon l'hydrocarbure) et les insaturés à *n*-18:1 quelque soit la structure de l'hydrocarbure. La culture sur 10-Me-C₁₉ fait exception, avec l'acide 8-Me-17:0 prépondérant et les acides gras 17:0 sont plus abondants que les acides 16:0. L'utilisation d'alcanes à nombre impair d'atomes de carbone conduit à une diminution du pourcentage des acides gras à 16 et 18 atomes de carbone. Cette diminution est compensée par une augmentation des pourcentages des acides gras saturés et insaturés à 17 atomes de carbone, à l'exception des cultures sur *i*- et *ai*-C₁₉ pour lesquelles les acides gras 18:1 sont les acides insaturés prédominants. Les Figures III.35 et III.36 montrent respectivement la distribution des acides gras saturés 16:0 et 17:0, et les acides gras insaturés 17:1 et 18:1 (sommés de tous les isomères) en fonction de la source de carbone.

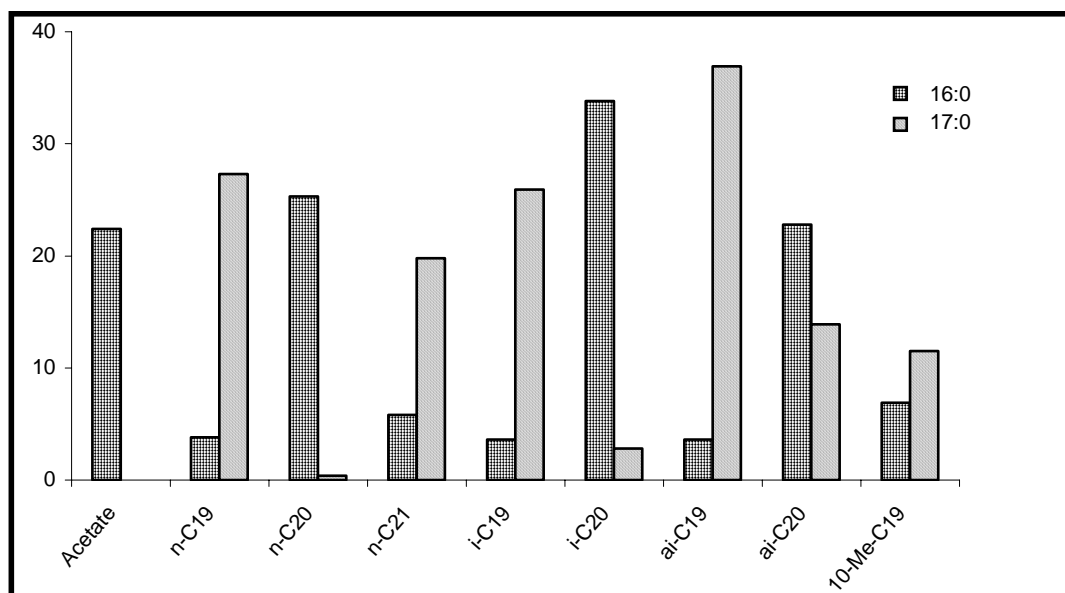


Figure III.35. Abondance relative (%) des acides gras saturés à 16 et 17 atomes de carbone en fonction de l'alcane testé.

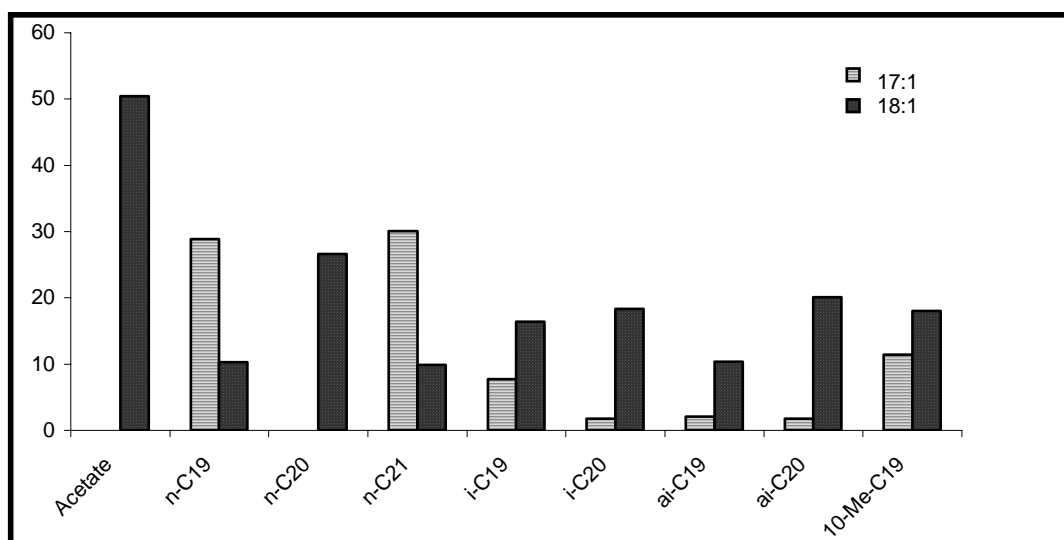


Figure III.36. Abondance relative (%) des acides gras insaturés à 17 et 18 atomes de carbone en fonction de l'alcane testé.

Les lipides labiles en milieu basique sont dominés par les acides gras normaux à nombre pair d'atomes de carbone en raison, en particulier, de la présence de grandes quantités de β -hydroxy acides n -12:0. La culture sur n -C₁₉ est la seule où les acides impairs dominent la distribution lipidique (Tableau III.6). Les lipides labiles en milieu acide sont très faiblement influencés par la source de carbone. Ils contiennent essentiellement des composés normaux à nombre pair d'atomes de carbone et ce quelque soit la source de carbone (Tableaux III.8 et III.14).

VI.5.2. Influence de la ramification des alcanes sur la composition lipidique

La distribution des lipides "non liés" se trouve fortement influencée par la position de la ramification méthyle sur la chaîne hydrocarbonée. Les cultures sur alcanes normaux conduisent essentiellement à des composés normaux. Ils constituent entre 94,6 % et 98,9 % : une partie des n -acides gras proviennent de l'oxydation de l'hydrocarbure fournit aux bactéries et l'autre partie est synthétisée à partir des unités C₂ produites au cours de la dégradation. Inversement, dans les cultures sur alcanes ramifiés, les composés ramifiés sont majoritaires à l'exception de la culture sur 10-Me-C₁₉ où les composés normaux constituent 60 % des lipides "non liés" (Tableaux III.4 et III.10).

Les acides gras *iso*, *antéiso*, et ramifiés en milieu de chaîne sont surtout présents respectivement dans les cultures sur alcanes *iso*, *antéiso* et 10-Me-C₁₉ (Figure III.37). Dans les cultures sur *n*-alcanes, seules de faibles quantités d'acides gras *iso* sont présents dans les cultures sur *n*-C₁₉ et *n*-C₂₁, alors qu'ils sont absents dans les cultures sur acétate d'ammonium et sur *n*-C₂₀.

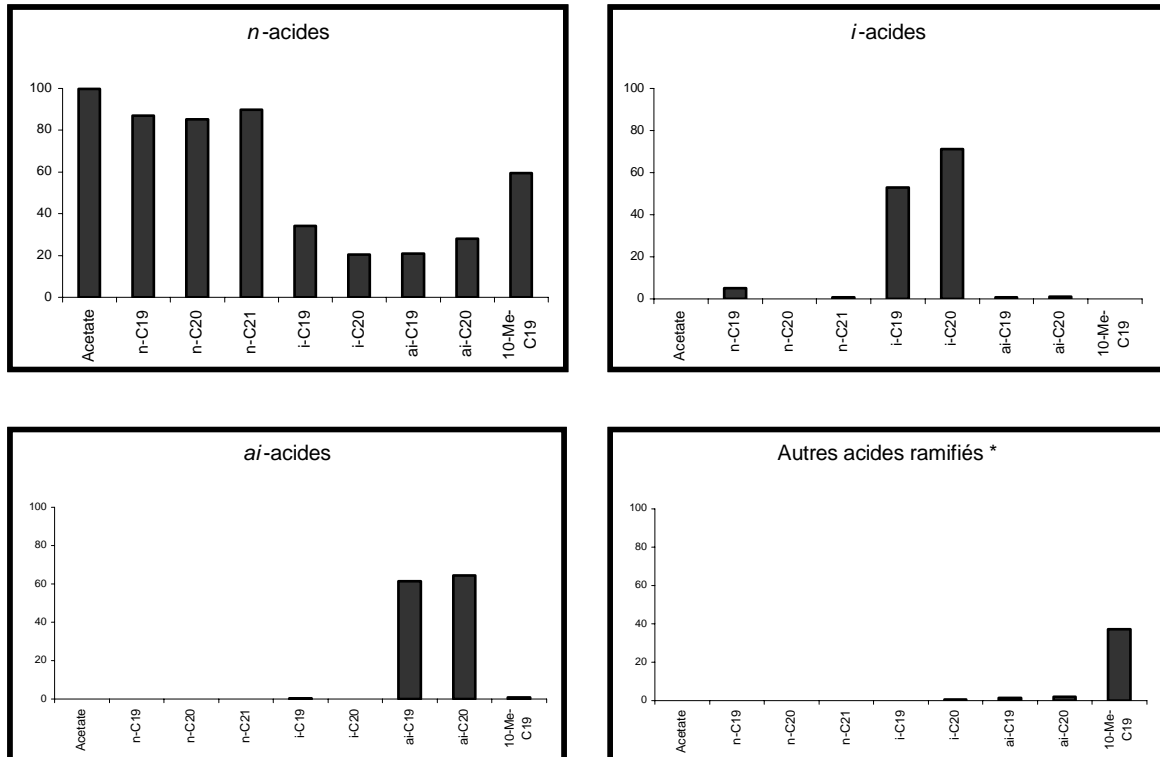


Figure III.37. Abondance relative (%) des acides gras normaux et ramifiés dans les lipides "non liés" en fonction de l'alcane utilisé (*: acides provenant de l'oxydation du côté de la ramification et acides avec un groupement méthyle en milieu de chaîne).

Dans les cultures sur hydrocarbures ramifiés, le pourcentage des acides gras insaturés (normaux + ramifiés) est plus faible que dans les cultures sur hydrocarbures normaux. Cette diminution s'accompagne d'une très forte augmentation des acides gras saturés ramifiés (Figure III.38). Cette redistribution au profit de ces acides pourrait être liée à l'homéoviscosité membranaire, phénomène permettant aux membranes de conserver une certaine fluidité, en incorporant dans les lipides soit des acides à chaîne hydrocarbonée courte, soit des acides gras insaturés soit des acides gras ramifiés, acides gras ayant des points de fusion plus bas que ceux des acides gras normaux saturés. (Sinensky, 1974; Suutari et Laakso, 1994; Chattopadhyay et Jagannadham, 2003).

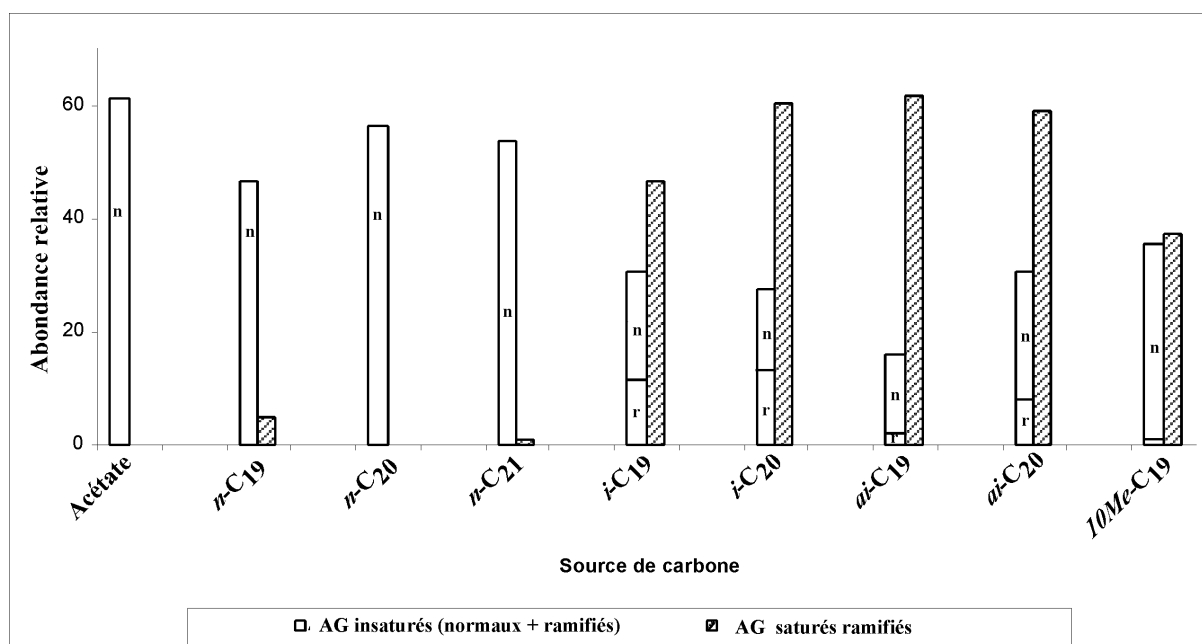


Figure III.38. Abondance relative (%) des acides gras insaturés (normaux + ramifiés) et des acides gras ramifiés saturés en fonction de la source de carbone.

La présence des acides gras ramifiés en position 10 (10-Me-16:0, 10-Me-17:0, 10-Me-17:0 10-Me-18:0 et 10-Me-19:0) est aléatoire. Aucune relation entre la parité des alcanes et la présence de ces acides gras n'est possible à l'exception du 10-Me-19:0 qui est le produit de l'oxydation terminale du 10-Me-C₁₉. L'acide gras 10-Me-16:0 est généralement considéré comme spécifique de *Desulfobacter* sp (Parkes et al., 1993 ; Guezennec et Fiala-Medioni, 1996 ; Doumenq et al., 1999) il a été détecté dans toutes les cultures de *M. hydrocarbonoclasticus* (617) sur hydrocarbures (Doumenq et al., 2001).

Les alcools sont présents dans les lipides "non liés" de toutes les cultures, leur distribution est très dépendante de la source de carbone. Cependant de faibles quantités d'alcools normaux ($\leq C_{18}$) sont présentes dans toutes les cultures sur alcanes ramifiés. Les alcools ramifiés *iso*, *antéiso* et en milieu de chaîne sont présents respectivement dans les cultures sur les alcanes *iso*, *antéiso* et 10-Me-C₁₉ (Figure III.39). Ces composés proviennent de l'oxydation primordiale en positions terminale et subterminale (si aucun groupe méthyle n'est présent à cette position) des alcanes correspondants. Quatre alcools ramifiés sont ainsi formés à partir des hydrocarbures *anteiso*, trois à partir des hydrocarbures *iso* et deux à partir du 10-Me-C₁₉.

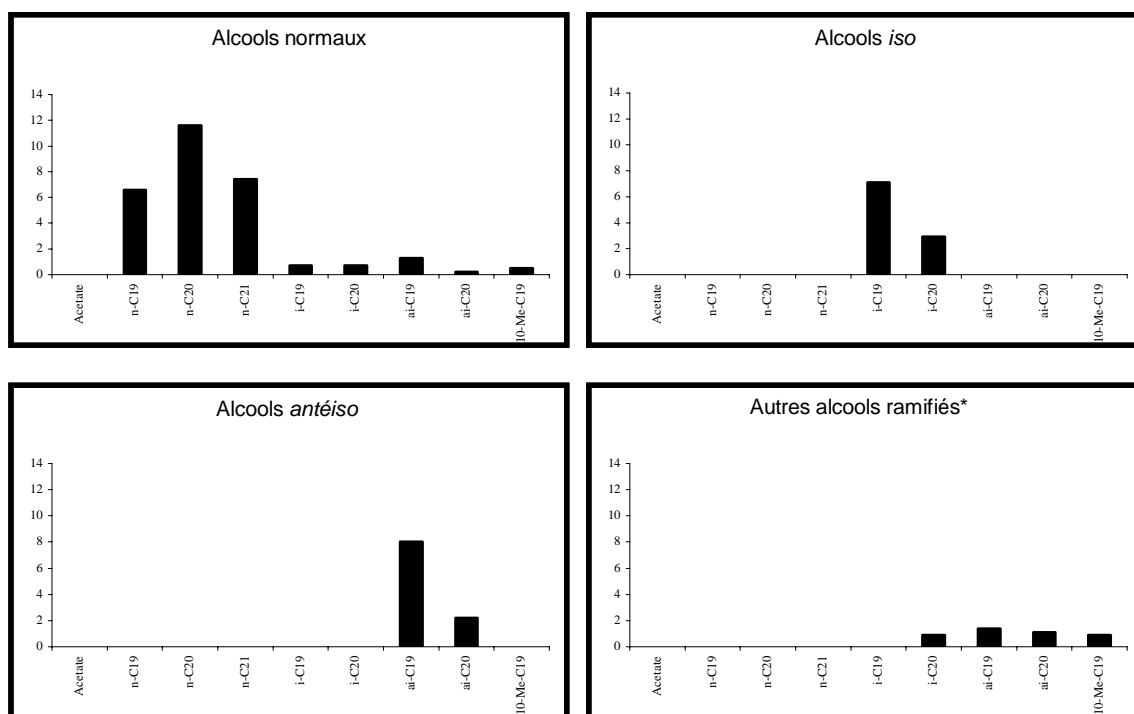


Figure III.39. Abondance relative (%) des alcools normaux et ramifiés dans les lipides "non liés" en fonction de l'alcane utilisé (*: alcools provenant de l'oxydation du côté de la ramification et alcools avec un groupement méthyle en milieu de chaîne).

Les β -hydroxy acides à longues chaînes sont présents en faibles quantités dans les lipides "non liés" des cultures sur hydrocarbures. Seuls ceux correspondant à une oxydation du côté le moins encombré de la chaîne hydrocarbonée ont pu être détectés. Ils sont accompagnés de deux à trois de leurs homologues inférieurs.

VI.5.3. Voies de dégradation des alcanes linéaires par *M. hydrocarbonoclasticus*

Les distributions des composés présents dans les lipides "non liés" (Tableaux III.3 et III.9), c'est à dire membranaires et ceux provenant de la dégradation des hydrocarbures, fournissent des informations sur le métabolisme des alcanes linéaires chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

En ce qui concerne les *n*-alcanes, il apparaît, comme cela été proposé (Lattuari et al., 2002), que leur dégradation s'effectue essentiellement *via* une oxydation en alcools primaires, eux même oxydés vraisemblablement en aldéhydes (non détectés ici), puis en acides, la dégradation se poursuivant *via* le cycle de β -oxydation classique (Figure III.40). Il est probable que les alcools secondaires résultant d'une oxydation subterminale, détectés en

faibles quantités, sont dégradés *via* une voie mineure, mettant en jeu les cétones correspondantes issues de leur oxydation, elles mêmes oxydées selon un processus de type Bayer-Villiger, en esters. Les alcools primaires qui en dérivent seraient à leurs tours oxydés en acides gras. Parallèlement, les séries insaturées pourraient provenir d'une désaturation des alcools, et des acides (Tableau III.3). Enfin les unités acétates formées dans le cycle de β -oxydation sont parallèlement reprises dans la synthèse *de novo* des acides gras, conduisant à des acides à nombre de carbone essentiellement pair, ce recyclage intervenant dans le métabolisme de tous les alcanes étudiés ici.

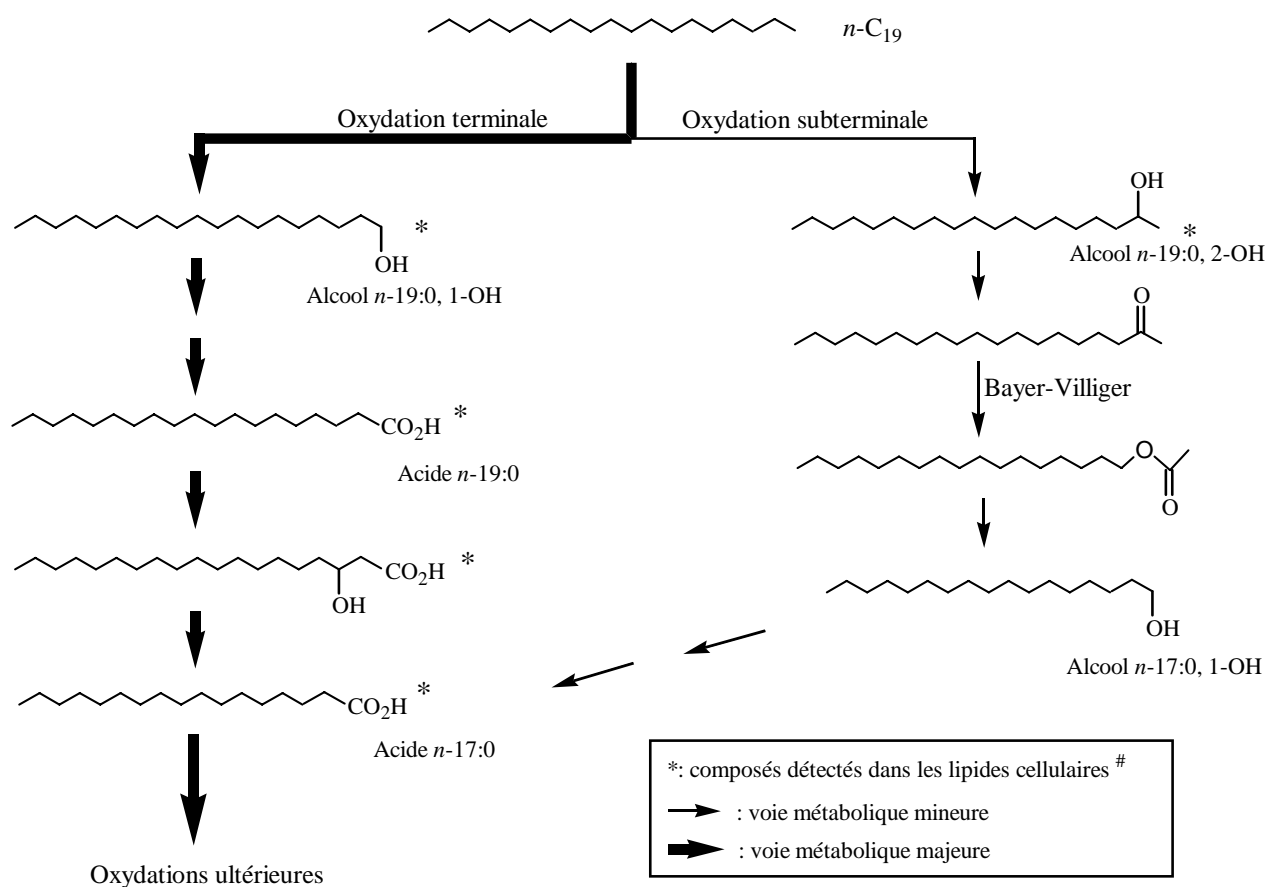


Figure III.40. Voies métaboliques proposées pour la dégradation des *n*-alcanes chez *M. hydrocarbonoclasticus* (#: membranaires + ceux dérivés du métabolisme présents dans le cytoplasme).

La Figure III.41 illustre le processus de dégradation des *iso*-alcanes chez *M. hydrocarbonoclasticus*. Les données analytiques (Tableau III.9) montrent que l'oxydation terminale du côté le moins encombré est favorisée, avec formation de l'alcool primaire et de

l'acide correspondant. Ce dernier pris dans un cycle de β -oxydations conduit à la série d'acides *iso* de même parité que l'*iso*-alcane de départ. L'oxydation subterminale du côté le moins encombré de l'*iso*-alcane conduit également, *via* une oxydation de type Bayer-Villiger, à un acide *iso* de même parité que l'alcane. La présence d'une série mineure *iso* de parité inverse, suggère l'intervention d'une α -oxydation des acides *iso* prépondérants. Enfin, l'alcool primaire terminal issu de l'oxydation de l'un des deux méthyles du groupe *iso*-propyle (voie mineure), serait oxydé en acide. Une β -oxydation de celui-ci conduirait à un acide gras normal à nombre impair d'atomes de carbone à partir d'un *iso* alcane pair (Figure III.41) et inversement à un acide gras normal à nombre pair d'atomes de carbone à partir d'un *iso* alcane impair.

Dans le cas des *antéiso* alcanes, si l'oxydation terminale en alcool primaire puis en acide gras, pris ensuite dans un cycle de β -oxydation, est toujours la voie principale de dégradation, les processus sont pour ce type d'hydrocarbures, plus complexes (Figure III.42). Tout d'abord, si à partir d'un *anteiso* alcane à nombre de carbone impair, la série analogue d'acide à nombre pair d'atomes de carbone est très minoritaire, la situation inverse n'est pas observée à partir de l'*anteiso* alcane C₂₀. Dans ce cas, l'acide *anteiso* 17:0 représente plus de 10 % dans les lipides "non liés": sans être prépondérante comme la β -oxydation, l' α -oxydation n'est pas dans ce cas une voie très mineure. Par ailleurs, dans le cas de l'*anteiso*-alcane "impair", les oxydations terminale et subterminale du côté le plus encombré concourent vraisemblablement à la formation *via* des oxydations successives, de l'acide gras *n*-15:0. De ce point de vue, l'identification du *n*-pentadecan-1-ol, en faible quantité, suggère qu'il s'agirait d'un métabolite résultant d'une oxydation de type Bayer-Villiger.

Enfin, pour ce qui concerne l'hydrocarbure ramifié en milieu de chaîne, le 10-méthyl-nonadécane, son métabolisme s'effectue essentiellement *via* l'alcool primaire correspondant, oxydé en acide, lui même dégradé via un processus de β -oxydation. Comme cela est illustré sur la Figure III.43, la dégradation d'un métabolite intermédiaire, l'acide 2-méthyl-undécanoïque, par perte d'unité C₃, doit conduire à l'acide *n*-nonanoïque. Ce dernier pris dans un processus d'élongation classique par addition d'unité C₂ conduirait à l'acide *n*-17:0, acide "impair" dont le taux élevé dans les lipides "non liés" (Tableau III.9), a priori, peut apparaître surprenant. Parallèlement, les unités C₂ libérées dans la dégradation seraient également reprises dans la synthèse *de novo* conduisant aux acides gras pairs (Figure III.43).

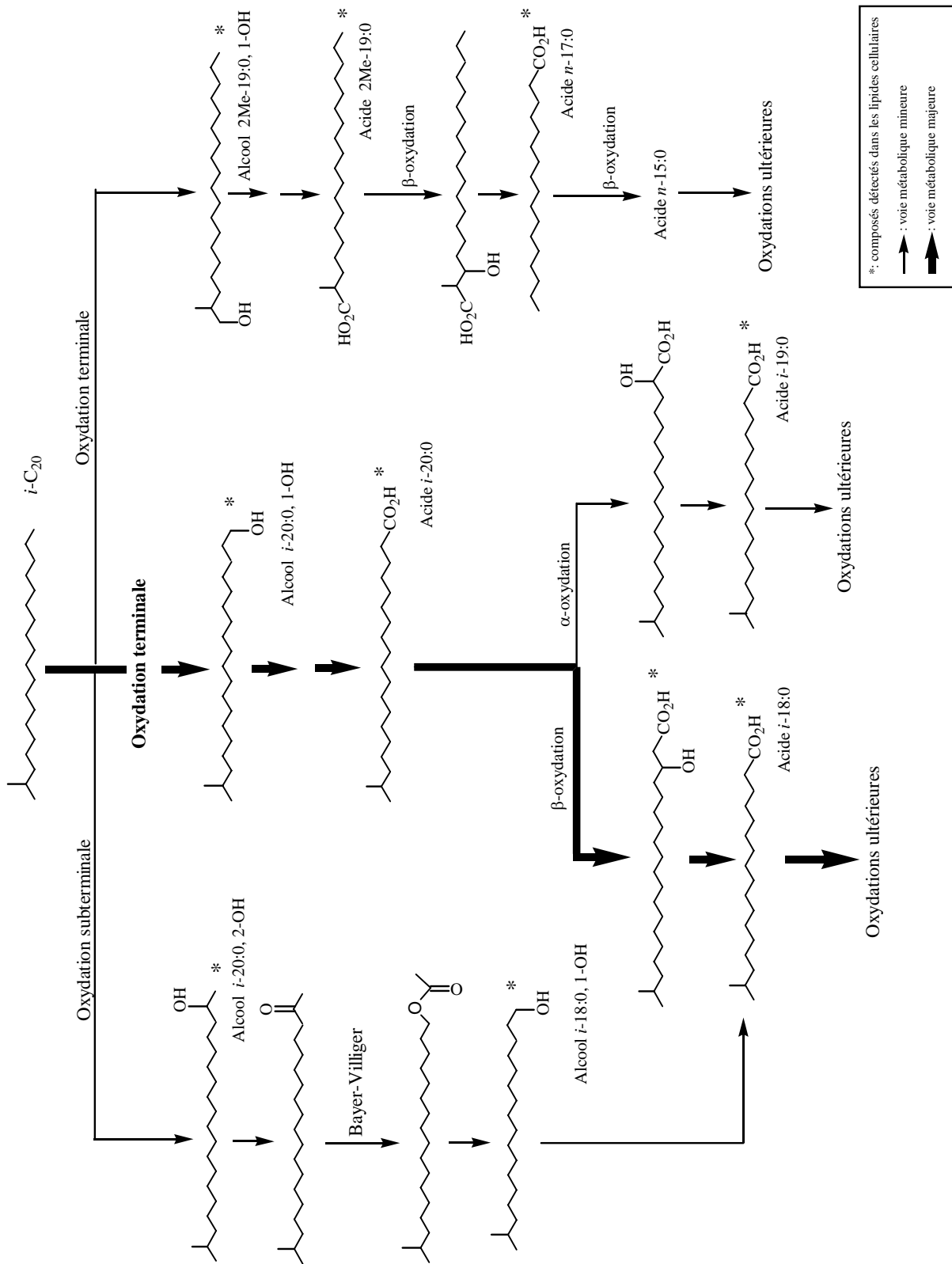


Figure III.41. Voies métaboliques proposées pour l'*iso*-icosane ($i\text{-C}_{20}$) chez *M. hydrocarbonoclasticus* (ni les unités C_2 issues des β -oxydations et de la réaction de Bayer-Villiger, ni la synthèse *de novo* à partir de ces unités ne figurent sur ce schéma).

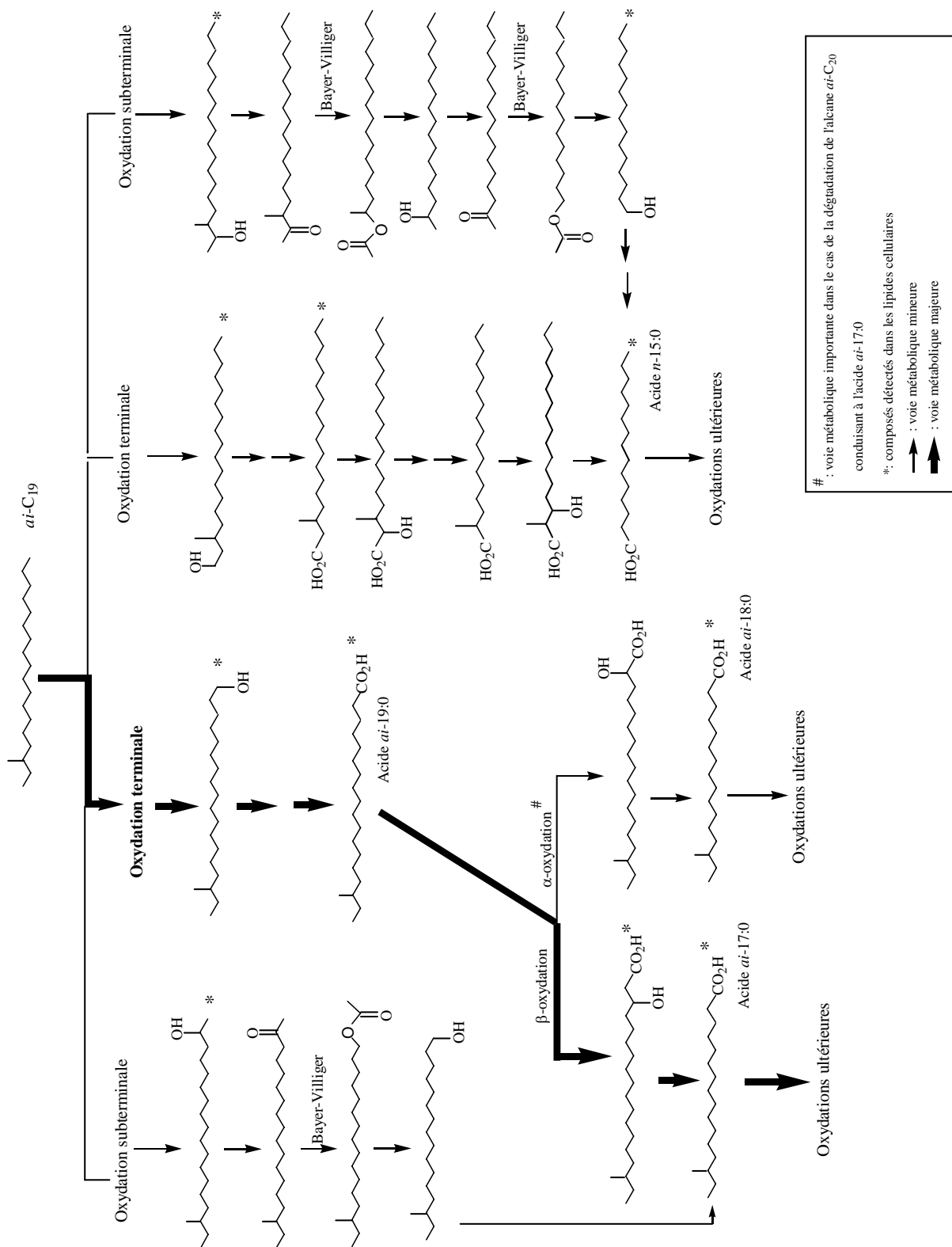


Figure III.42. Voies métaboliques proposées pour l'*anteiso*-nonadécane ($ai-C_{19}$) chez *M. hydrocarbonoclasticus* (ni les unités C_2 issues des β -oxydations et de la réaction de Bayer-Villiger ni la synthèse *de novo* à partir de ces unités ne figurent sur ce schéma).

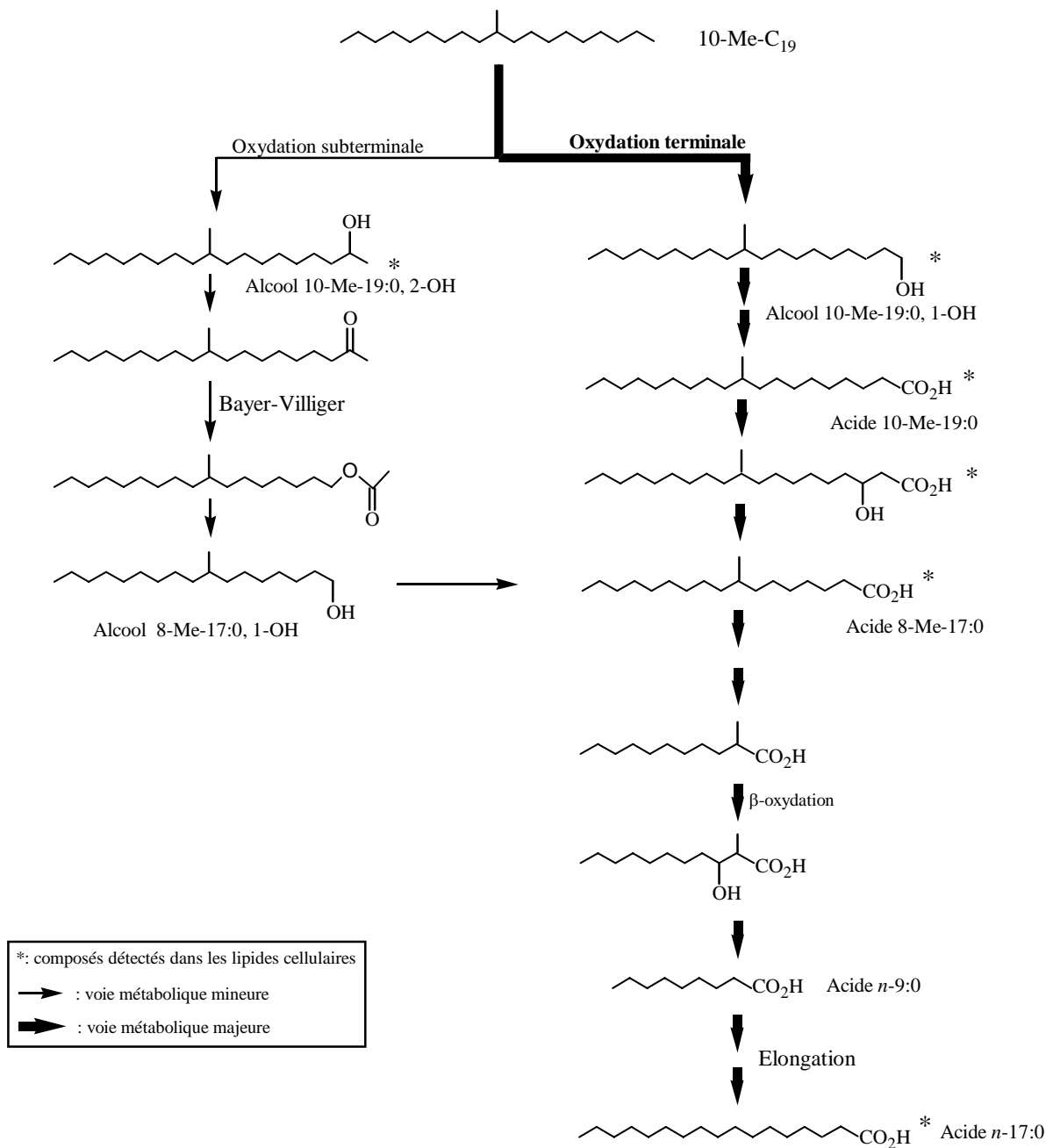


Figure III.43. Voies métaboliques proposées pour le 10-Me-nonadécane chez *M. hydrocarbonoclasticus* (ni les unités C₂ issues des β-oxydations et de la réaction de Bayer-Villiger ni la synthèse *de novo* à partir de ces unités ne figurent sur ce schéma).

VII. CULTURE DE *M. HYDROCARBONOCLASTICUS* SUR ALCÈNE: *n*-NONADEC-1-ÈNE.

VII.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES.

La principale différence que l'on note entre les distributions de lipides de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur alcène (Tableau III.15) et alcanes (Tableaux III.3, 5, 7, 9, 11 et 13) concerne la plus grande abondance de composés insaturés, avec l'apparition de composés mono-insaturés en position ω 1 et de composés di-insaturés comportant également une insaturation en position ω -1. Cette double liaison en ω 1 témoigne de leur relation directe avec l'hydrocarbure parent.

Les Figures III.44, III.45 et III.46 présentent les spectres de masse et leurs interprétations de trois types de composés spécifiques de la culture sur alcène terminal. Le nondécane-1,2-diol a été identifié grâce à son spectre de masse présentant trois ions caractéristiques à m/z 429 (M-CH₃), m/z 103 et m/z 341. Ces deux derniers correspondent aux deux ions obtenus par la rupture simple de la liaison entre les deux carbones porteurs des deux fonctions hydroxyles triméthylsilylées (Figure III.44).

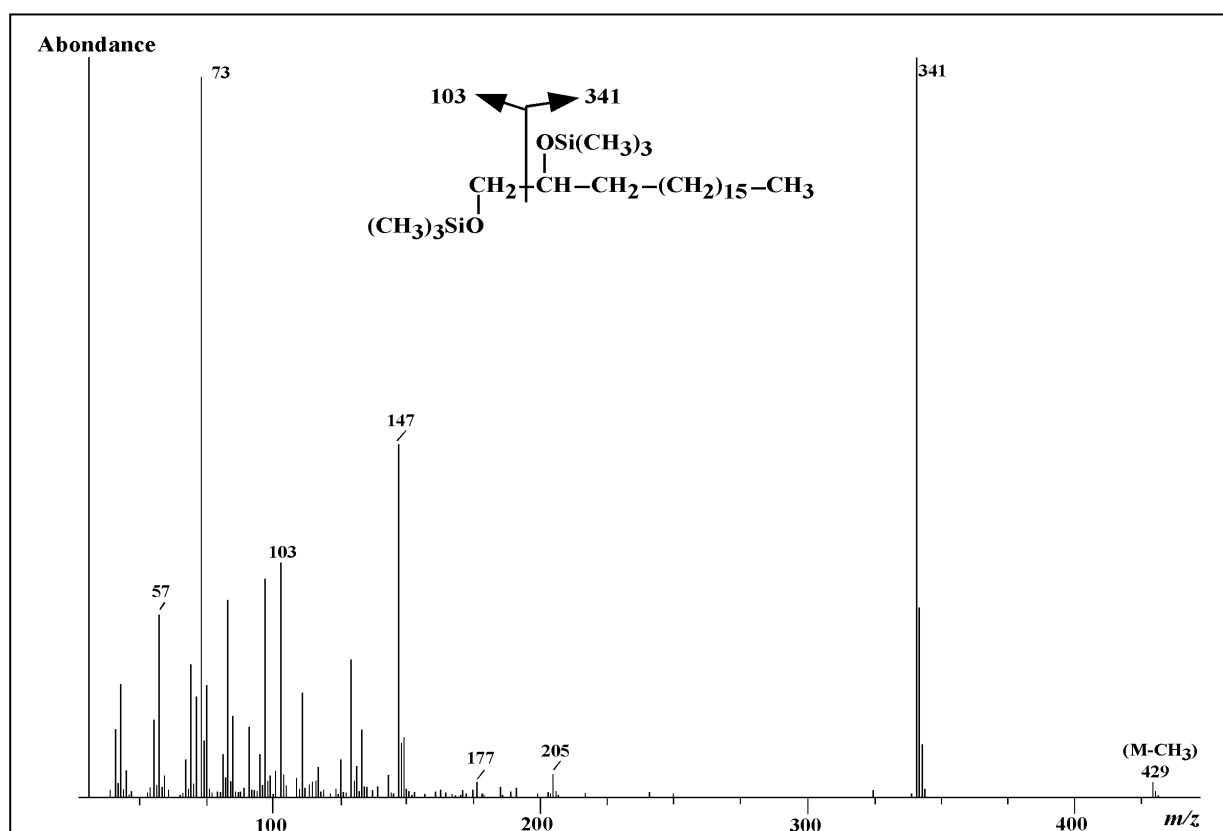


Figure III.44. Spectre de masse du dérivé di-TMS du nonadécane-1,2-diol.

Un α -hydroxy acide en C_{19} a été également détecté. Pour sa caractérisation, nous avons utilisé la triméthylsilylation qui permet l'identification de ce type de composé grâce à ses ions spécifiques (Figure III.45). La Figure III.46 montre le spectre de masse de l' α -hydroxy acide n -19:0 présentant deux pics intenses à m/z 385 et m/z 341 correspondant respectivement à M-CH₃ et M-59 obtenus par ruptures simples.

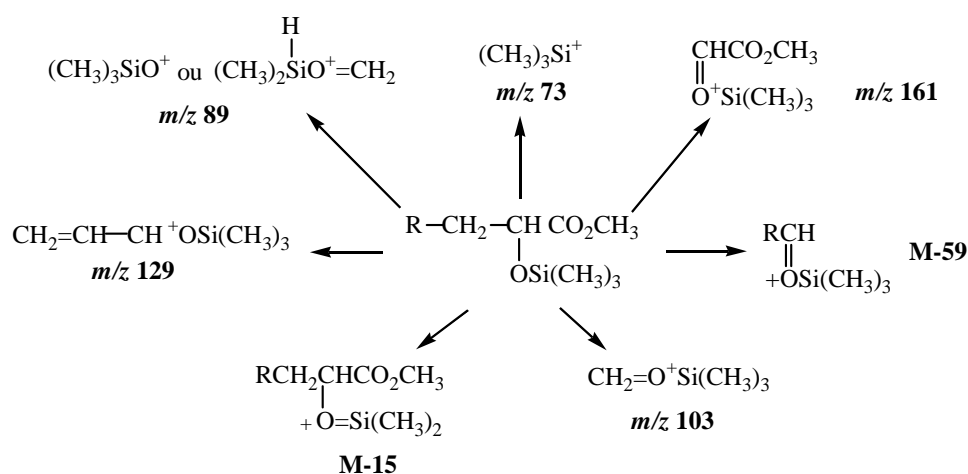


Figure III.45. Principaux ions fragments du spectre de masse des α -hydroxy methyl ester triméthylsilylé (Eglinton et Hunneman, 1968).

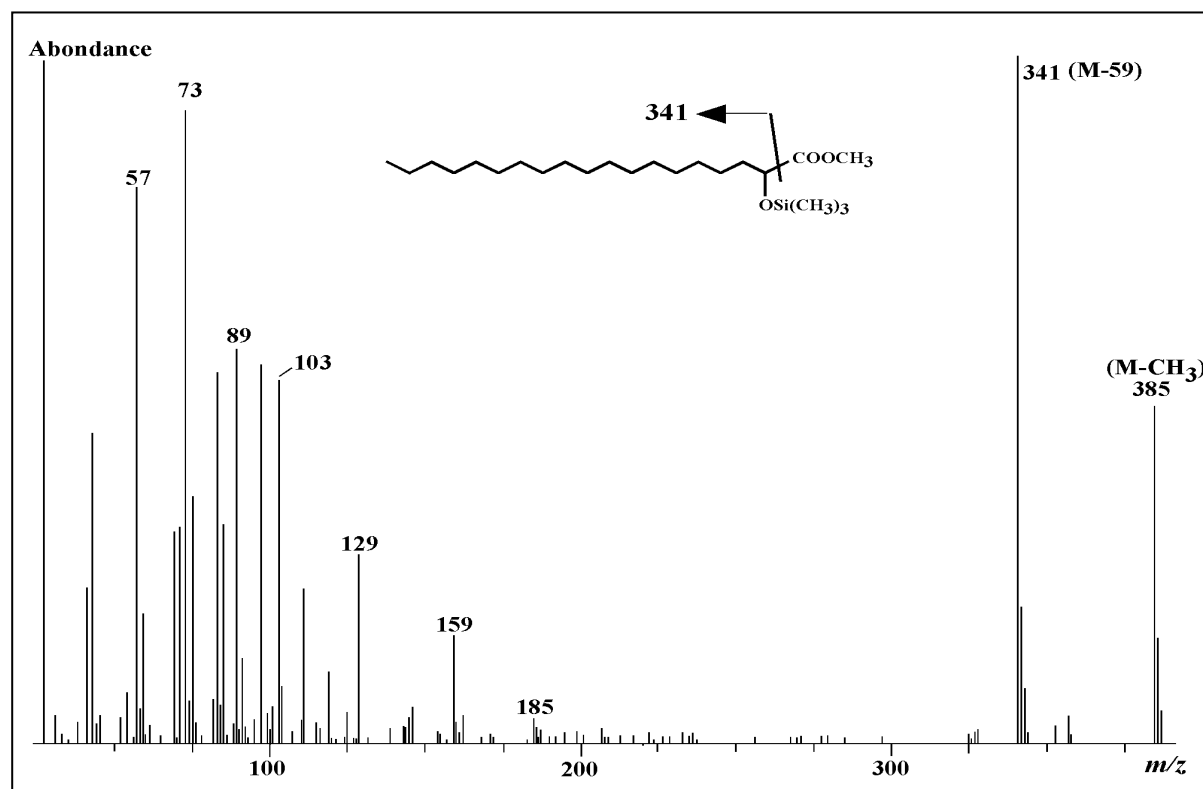


Figure III.46. Spectre de masse du dérivé TMS de l' α -hydroxy acide n - $C_{19:0}$ (méthyl ester).

Par ailleurs, comme le montre la Figure III.47, l'analyse des spectres de masse des dérivés DMDS des composés di-insaturés a permis de localiser les deux doubles liaisons.

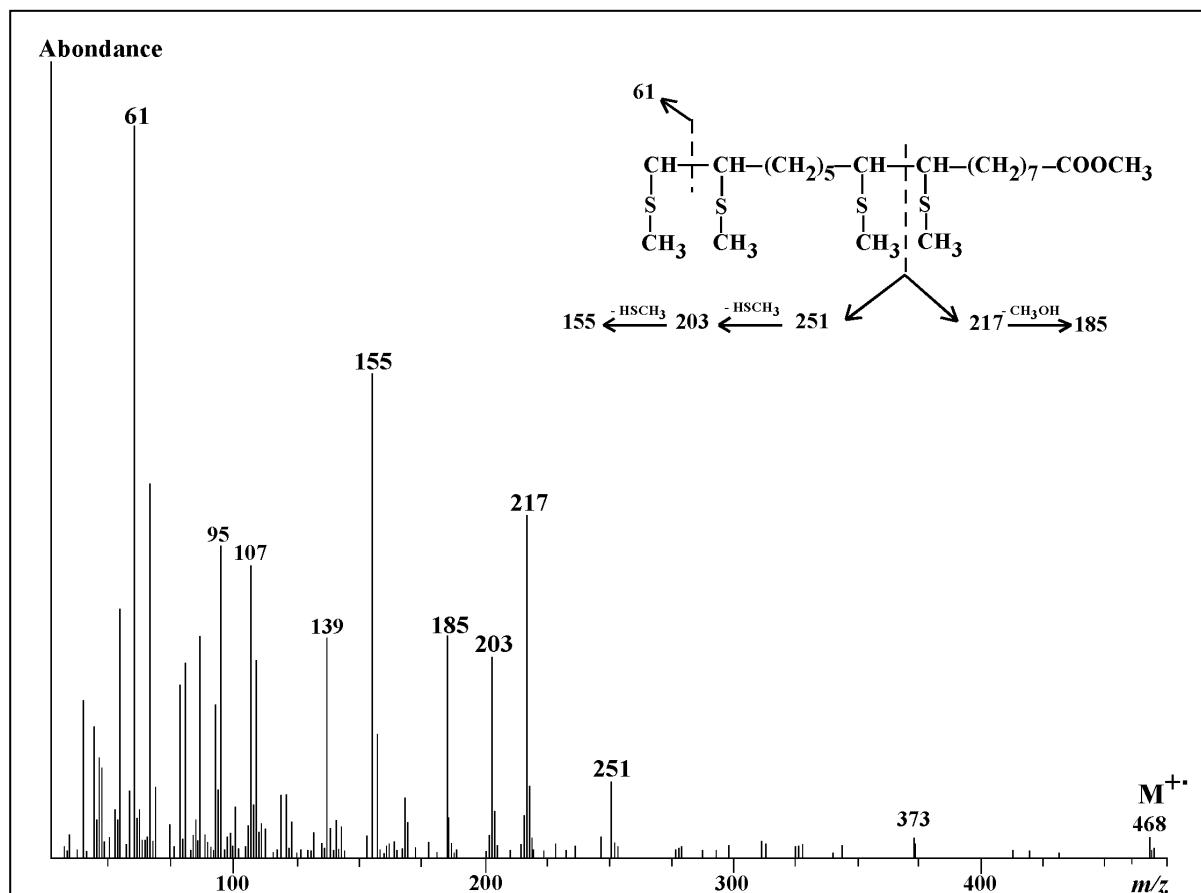


Figure III.47. Spectre de masse du dérivé DMDS de l'ester méthylique de l'acide 17:2 ω 1,8.

VII.2. LIPIDES "NON LIÉS"

L'analyse par CG et CG/MS/IE des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur nonadéc-1-ène indique la présence prédominante d'acides gras de C₁₄ à C₁₉ (Tableau III.15 et Figure III.48). Ils représentent plus de 90 % des lipides "non liés". Les acides gras mono-insaturés sont les plus abondants, ils représentent 54,5 % des lipides "non liés" suivis par les acides gras saturés et di-insaturés avec approximativement 20 % chacun (Figure III.49). L'analyse des dérivés DMDS des lipides "non liés" a montré que la double liaison se trouve essentiellement en ω 1 dans les acides gras monoinsaturés à nombre impair d'atomes de carbone alors qu'elle est surtout en ω 9 pour ceux à nombre pair d'atomes de carbone.

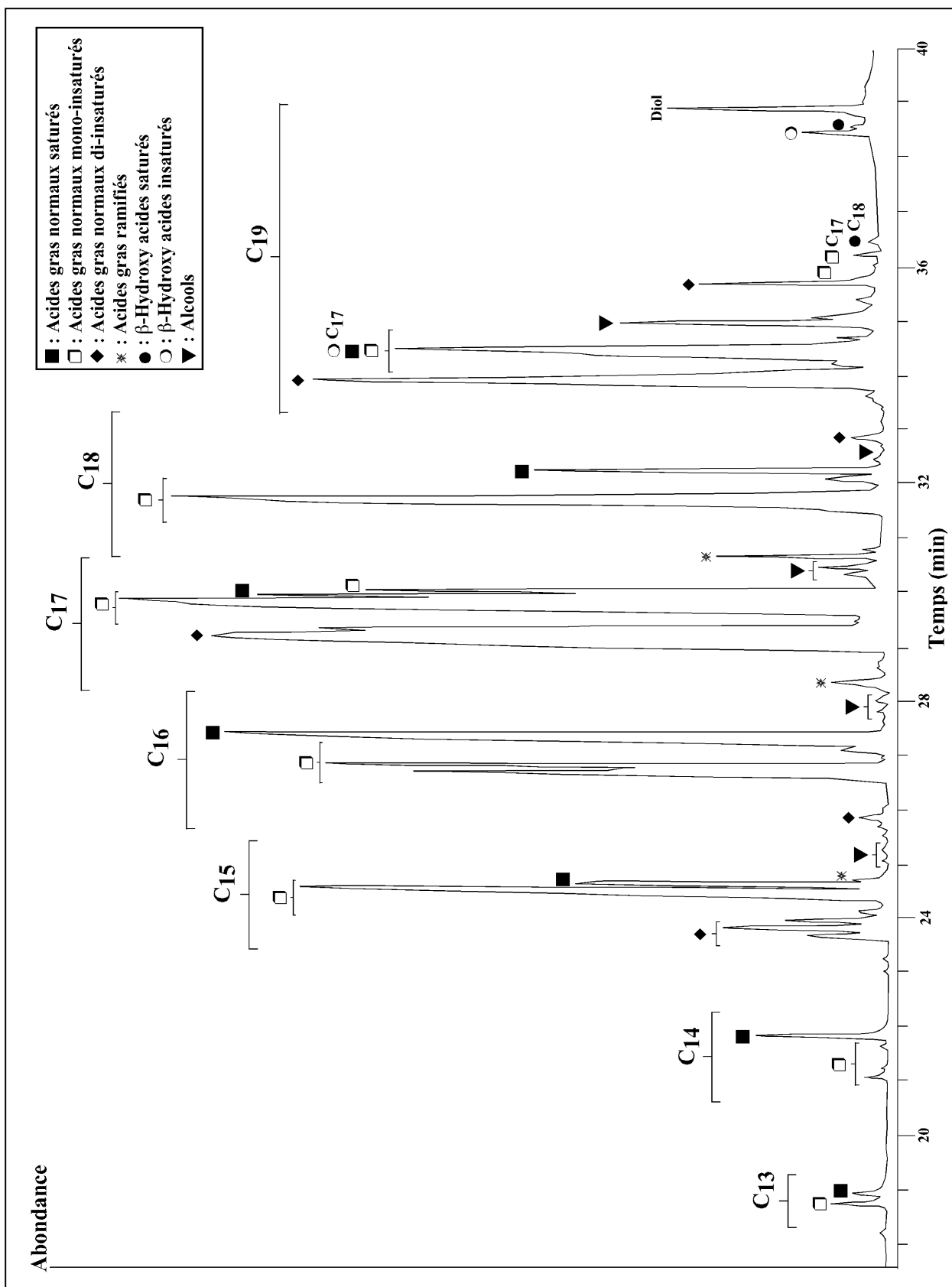


Figure III.48. Courant ionique total des lipides "non liés" de *M.hydrocarbonoclasticus* (dans la zone C₁₃-C₁₉) cultivée sur nonadéc-1-ène.

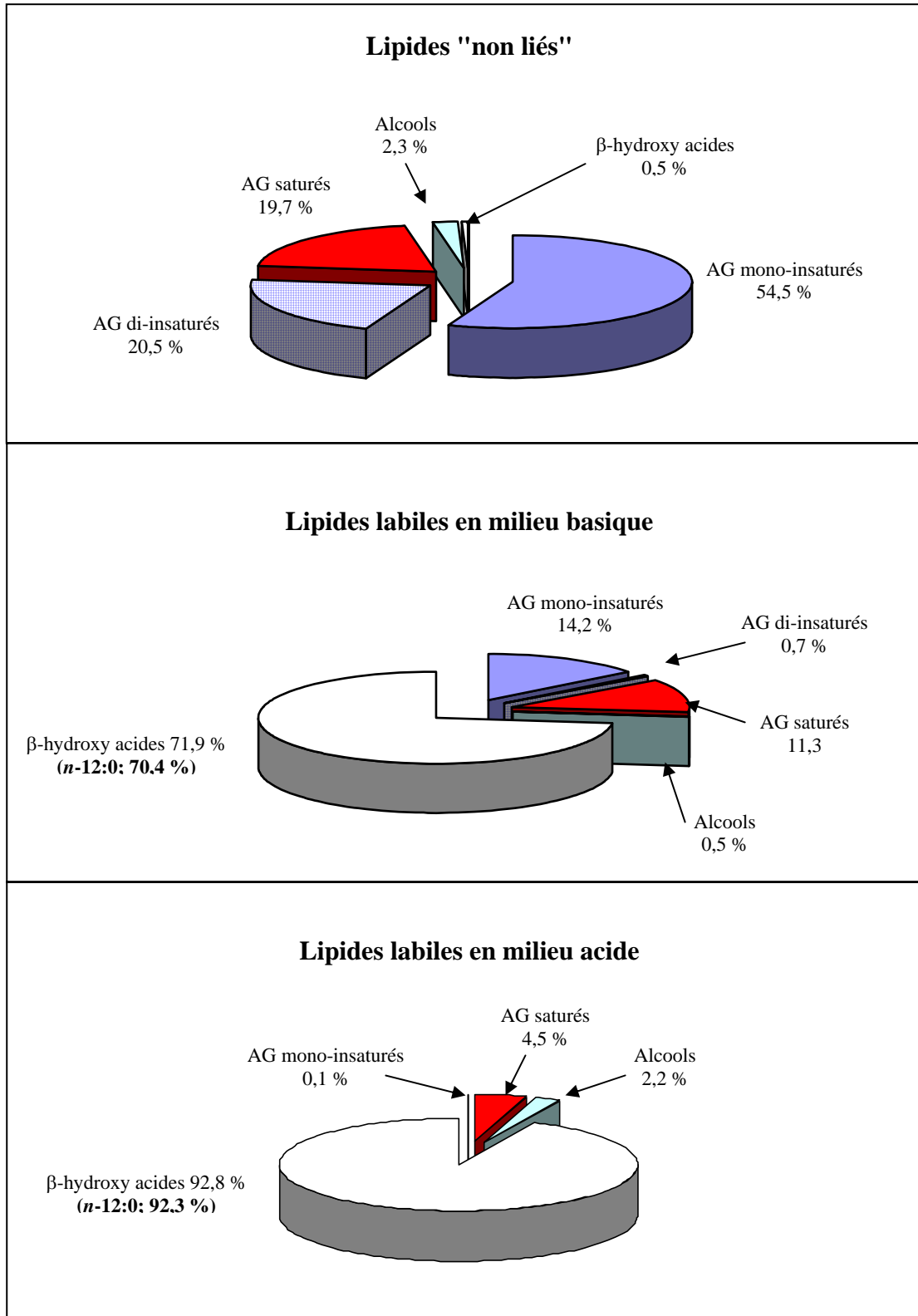


Figure III.49. Distribution des différentes classes de composés dans les trois fractions de lipides de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur nonadéc-1-ène.

La présence des insaturations en $\omega 1$ et $\omega 9$ montre l'origine biosynthétique de ces composés: dans le premier cas les acides gras proviennent de l'oxydation de l'alcène par des mécanismes de β -oxydation alors que dans le deuxième cas ils sont les produits de la désaturation d'acides gras résultant de la synthèse *de novo*. Par contre, l'origine de l'acide *n*-17:1 ω 2 (Tableau III.15) peut être expliquée par l'oxydation par la bactérie du nonadéc-2-ène présent en tant qu'impureté dans le nonadéc-1-ène fourni (Tableau III.1). De faibles quantités d'acides gras ω -insaturés à 14, 16 et 18 atomes de carbone (jusqu'à 0,1 % des lipides "non liés") ont été également observées. La présence de ces trois derniers composés suggère comme nous le verrons plus loin, la possibilité d'un mécanisme d' α -oxydation au niveau de la terminaison saturée du nonadéc-1-ène.

Les acides gras di-insaturés sont à nombre impair d'atomes de carbone de C_{15} à C_{19} avec prédominance des acides gras 17:2 (67,8 % des acides gras di-insaturés), possédant une insaturation en $\omega 1$, la deuxième variant entre les positions $\omega 8$ et $\omega 10$; l'acide di-insaturé prédominant est le *n*-17:2 $\omega 1,8$ (6,3 % des lipides "non liés"; Tableau III.15). Les acides gras saturés sont pour la plus grande part normaux à nombre pair d'atomes de carbone, avec un maximum à $C_{16:0}$ (11,3 % ; Tableau III.15), seules une faible quantité d'acide *i*- $C_{17:0}$ et des traces de *i*- $C_{18:0}$ ont été détectées dans cette fraction.

Deux séries d'alcools, (a) saturés et uniquement primaires de *n*- C_{15} à *n*- C_{18} , et (b) mono-insaturés en $\omega 1$, de *n*- C_{15} à *n*- C_{19} , tous primaires à l'exception d'un alcool secondaire subterminal C_{19} , ont été identifiés. De plus un alcool primaire en C_{19} , di-insaturé dont les positions des insaturations n'ont pas pu être établies, et un alcool primaire 19:1 ω 2, ont été identifiés. Si l'origine des alcools C_{19} peut être reliée à l'oxydation des nonadéc-1-ène et -2-ène, celles des autres alcools est plus problématique.

L'extraction de l'ion chromatogramme *m/z* 175 des lipides "non liés" triméthylsilylés a permis la caractérisation de deux β -hydroxy acides normaux constituant chacun 0,2 % (Tableau III.15): un β -hydroxy acide ω -insaturé à 19 atomes de carbone (*n*-19:1 ω 1, β -OH) et un β -hydroxy acide saturé à 18 atomes de carbone (*n*-18:0, β -OH). Ces deux β -hydroxy acides pourraient être les produits de la β -oxydation des acides gras *n*-19:1 ω 1 et *n*-18:0, eux mêmes dérivant respectivement de l'oxydation du méthyle terminal et de l'insaturation du nonadéc-1-ène.

VII.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE

Comme dans les cultures sur alcanes, les lipides liés par liaisons esters de la culture sur nonadéc-1-ène sont dominés par les *n*- β -hydroxy acides essentiellement de C₁₀ à C₁₄ (Figure III.50) qui représentent 71,9 % (Figure III.49). Le β -hydroxy acide *n*-12:0 est le composé le plus abondant avec 50,6 % des lipides (plus de 70 % des β -hydroxy acides totaux ; Tableau III.15 et Figure III.49). Cette fraction contient aussi des quantités importantes de β -hydroxy acides insaturés en ω 1 à nombre impair d'atomes de carbone (10,4 %) et en ω 2 (5,0 %). Ces derniers composés pourraient provenir de β -oxydations successives des acides gras insaturés en ω 2; quant aux β -hydroxy acides insaturés en ω 1, ils sont des métabolites de la dégradation du nonadéc-1-ène. Les acides gras saturés et mono-insaturés constituent respectivement 11,3 % et 14,2 % des lipides liés par liaisons esters (Figure III.49) alors que les acides gras di-insaturés sont des composés marginaux. Les principaux acides gras identifiés correspondent aux acides *n*-12:0, *n*-16:0, *n*-14:1 ω 9, *n*-17:1 ω 1 et *n*-18:1 ω 9 (Tableau III.15). Le 1,2-diol à 19 atomes de carbone est également présent dans cette fraction mais en quantité plus faible que celle trouvée dans les lipides "non liés".

VII.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE

Les lipides labiles en milieu acide sont fortement dominés par les β -hydroxy acides qui représentent 92,8 % de cette fraction avec une forte contribution du β -hydroxy acide *n*-12:0 (92,3 % des β -hydroxy acides totaux ; Figure III.49). La Figure III.51 montre le courant ionique total des lipides liés par liaisons amides de cette culture. Quelques *n*- β -hydroxy acides saturés et monoinsaturés à courtes chaînes sont aussi présents (10:0, 11:0, 13:0 et 13:1 ; Tableau III.9). Les acides gras saturés, présents en faibles quantités (4,6 %), sont essentiellement à nombre pair d'atomes de carbone alors que les acides gras insaturés sont pratiquement absents: seul le *n*-19:1 ω 9 a été détecté (0,1 %; Tableau III.9).

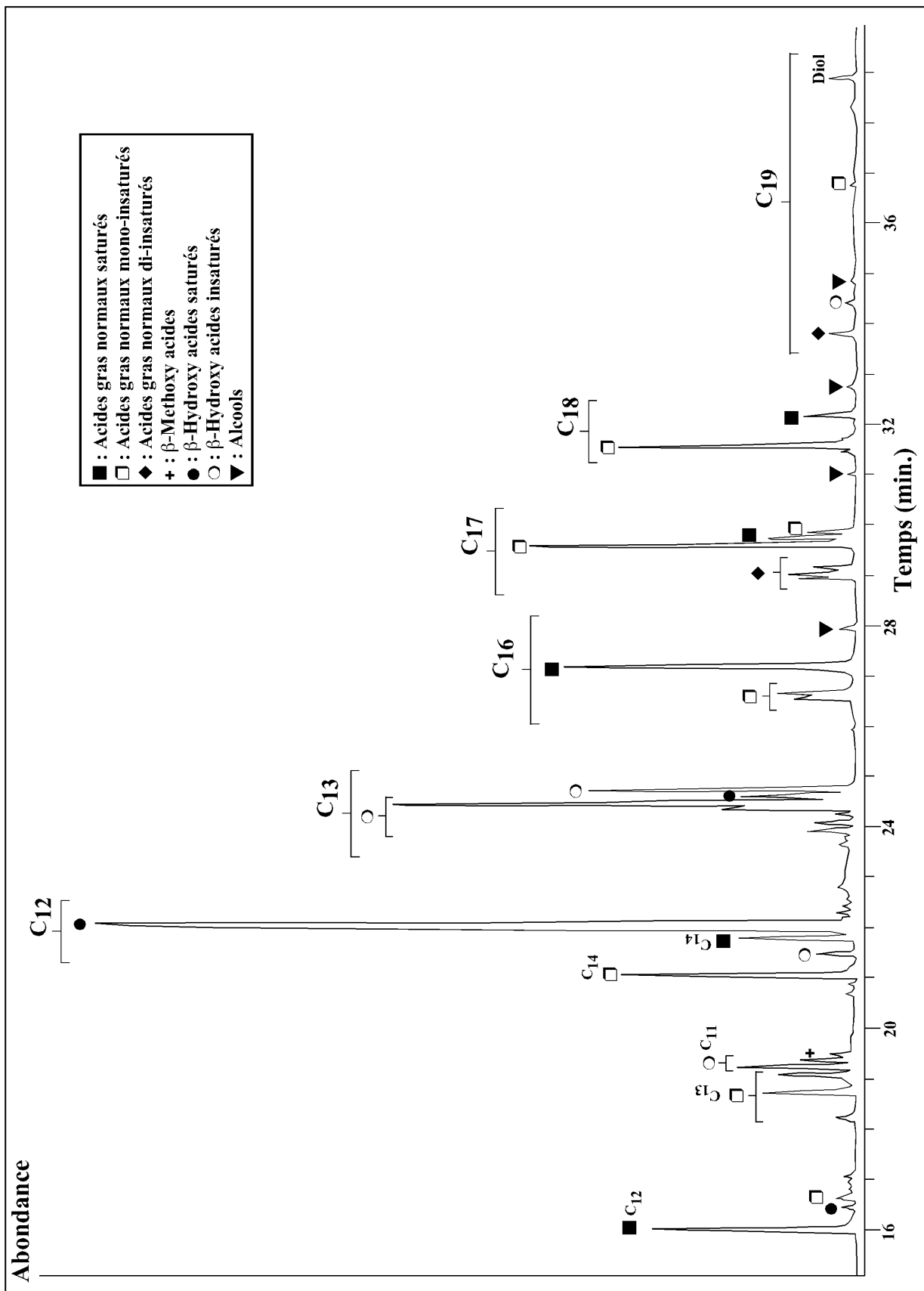


Figure III.50. Courant ionique total des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur nonadéc-1-ène.

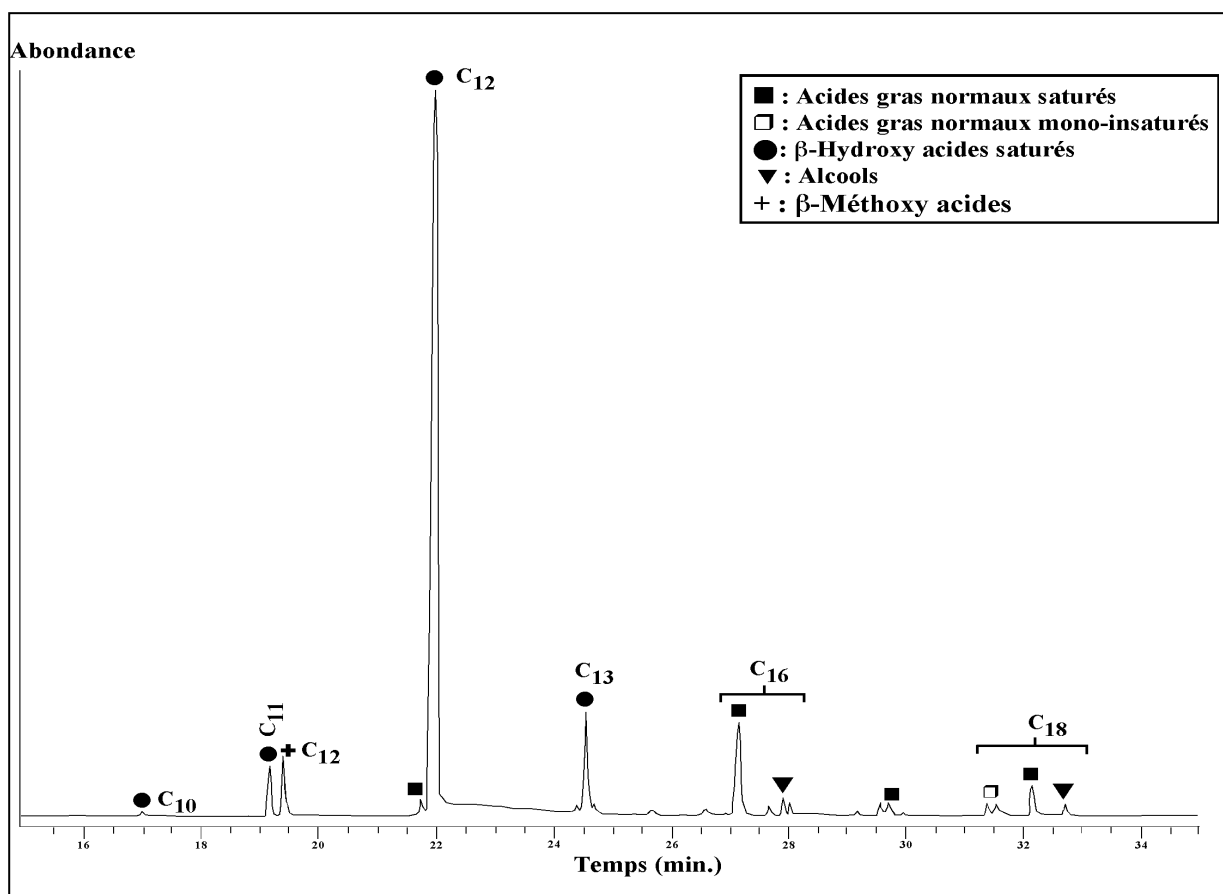


Figure III.51. Courant ionique total des lipides labiles en milieu acide de *M.hydrocarbonoclasticus* cultivée sur nonadec-1-ène.

Tableau III.15. Composition lipidique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur *n*-nonadéc-1-ene.

Lipides	"Non liés"	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide
<i>Acides gras saturés</i>			
<i>n</i> -10:0	-	0,3	-
<i>n</i> -12:0	0,1	4,8	-
<i>n</i> -13:0	0,1	0,1	-
<i>n</i> -14:0	1,1	0,6	1,9
<i>n</i> -15:0	2,0	-	-
<i>n</i> -16:0	11,3	4,5	0,8
<i>i</i> -17:0	0,4	-	-
<i>n</i> -17:0	3,3	0,4	0,9
<i>n</i> -18:0	1,0	0,5	0,7
<i>n</i> -19:0	0,4	-	-
<i>n</i> -20:0	-	0,1	0,2
<i>Acides gras mono-insaturés</i>			
<i>n</i> -11:1 ω1	-	0,1	-
<i>n</i> -12:1 ω1	-	tr	-
<i>n</i> -13:1 ω8	-	0,3	-
<i>n</i> -13:1 ω2	-	0,9	-
<i>n</i> -13:1 ω1	0,2	0,8	-
<i>n</i> -14:1 ω9	0,2	3,3	-
<i>n</i> -14:1 ω1	tr	-	-
<i>n</i> -15:1 ω9	0,6	-	-
<i>n</i> -15:1 ω6	1,7	-	-
<i>n</i> -15:1 ω2	-	tr	-
<i>n</i> -15:1 ω1	7,8	tr	-
<i>n</i> -16:1 ω9	3,5	0,4	-
<i>n</i> -16:1 ω7	3,0	0,7	-
<i>n</i> -16:1 ω5	0,2	-	-
<i>n</i> -16:1 ω1	tr	-	-
<i>n</i> -17:1 ω8	1,9	0,3	-
<i>n</i> -17:1 ω2	1,4	0,2	-
<i>n</i> -17:1 ω1	18,7	3,4	-
<i>i</i> -18:1 ω9	0,6	-	-
<i>n</i> -18:1 ω9	13,8	3,8	-
<i>n</i> -18:1 ω1	0,1	tr	-
<i>n</i> -19:1 ω10	0,1	-	-
<i>n</i> -19:1 ω9	-	-	0,1
<i>n</i> -19:1 ω8	0,4	-	-
<i>n</i> -19:1 ω1	tr	tr	-
<i>n</i> -20:1 ω9	0,3	-	-
<i>Acides gras di-insaturés</i>			
<i>n</i> -15:2 ω1,9	0,3	-	-
<i>n</i> -15:2 ω1,8	1,0	-	-
<i>n</i> -17:2 ω1,10	3,7	0,2	-
<i>n</i> -17:2 ω1,9	3,9	-	-

Lipides	"Non liés"	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide
<i>n</i> -17:2 ω1,8	6,3	0,3	-
<i>n</i> -19:2 ω1,10	2,4	-	-
<i>n</i> -19:2 ω1,9	1,7	-	-
<i>n</i> -19:2 ω1,8	0,6	-	-
<i>n</i> -19:2	0,6	0,2	-
<i>β-Hydroxy acides saturés</i> [#]			
<i>n</i> -10:0, OH	-	0,2	0,8
<i>n</i> -11:0, OH	-	2,1	2,6
<i>n</i> -12:0, OH	-	50,6	85,7
<i>n</i> -13:0, OH	-	1,1	3,1
<i>n</i> -14:0, OH	-	0,2	-
<i>n</i> -18:0, OH	0,2	-	-
<i>n</i> -19:0, OH	0,1	-	-
<i>β-Hydroxy acides insaturés</i> [#]			
<i>n</i> -11:1 ω2, OH	-	0,8	-
<i>n</i> -12:1 ω8, OH	-	0,6	-
<i>n</i> -12:1 ω1, OH	-	0,6	-
<i>n</i> -13:1 ω8, OH	-	0,5	-
<i>n</i> -13:1 ω2, OH	-	4,2	-
<i>n</i> -13:1 ω1, OH	-	10,1	0,2
<i>n</i> -13:1, OH	-	-	0,4
<i>n</i> -13:2, OH	-	0,6	-
<i>n</i> -17:1 ω1, OH	-	0,3	-
<i>n</i> -19:1 ω1, OH	0,2	-	-
<i>α-Hydroxy acide</i>			
<i>n</i> -19:0, OH	tr	-	-
<i>Alcools saturés</i>			
<i>n</i> -15:0, 1-OH	0,1	-	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,1	0,3	2,0
<i>n</i> -17:0, 1-OH	0,2	-	-
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,1	0,1	0,2
<i>Alcools insaturés</i>			
<i>n</i> -15:1 ω1, 1-OH	tr	-	-
<i>n</i> -17:1 ω1, 1-OH	0,1	-	-
<i>n</i> -19:1 ω1, 1-OH	1,1	0,1	-
<i>n</i> -19:1 ω1, 2-OH	tr	-	-
<i>n</i> -19:1 ω2, 1-OH	tr	-	-
<i>n</i> -19:2, 1-OH	0,4	-	-
<i>Diols</i>			
19:0, 1, 2 dihydroxy	1,8	1,1	0,3

[#] Les abondances relatives des β-méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement à celles des β-hydroxy acides comportant le même nombre d'atomes de carbone, à partir desquels ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 0,0 % et 0,8 % des lipides totaux.

VII.5. CONCLUSIONS PARTIELLES SUR LA DEGRADATION DU NONADÉC-1-ÈNE

VII.5.1. Influence sur la composition lipidique

La composition lipidique de *M. hydrocarbonoclasticus* subit une forte modification lors de sa croissance sur nonadéc-1-ène. Par comparaison avec la culture sur acétate, les modifications majeures se trouvent essentiellement au niveau des lipides "non liés": apparition de composés mono-insaturés en ω 1 et de composés di-insaturés (Tableaux III.3 et III.15), essentiellement à nombre impair d'atomes de carbone. La présence d'une série mineure, insaturée en position ω 2 est liée à l'existence d'une impureté dans l'hydrocarbure commercial, le nonadéc-2-ène. Les lipides labiles en milieu basique se trouvent légèrement influencés par la croissance sur l'alcène: une augmentation des acides gras à courtes chaînes (*n*-12:0) et une notable contribution des acides mono-insaturés ω 1 et di-insaturés. Par contre les lipides liés par liaisons amides ne sont pas sensibles au changement de la source de carbone.

VII.5.2. Voies métaboliques du *n*-nonadéc-1-ène

Les alcools et le diol identifiés dans les lipides "non liés" mettent clairement en évidence les voies métaboliques de la dégradation de l'alcène par *M. hydrocarbonoclasticus* (Figure III.52):

- i)* oxydation du groupement méthyle terminal pour donner l'alcool primaire ω -insaturé qui à son tour sera oxydé en acide *n*-19:1, les β -oxydations ultérieures conduisent aux composés de la série insaturée en ω 1;
- ii)* oxydation subterminale de la terminaison saturée de l'alcène conduisant à la formation d'un alcool secondaire ω -insaturé qui conduira à l'acide *n*-17:1 ω 1, *via* des oxydations successives, dont une oxydation de type Bayer-Villiger;
- iii)* oxydation de la double liaison pour donner vraisemblablement un époxyde (non isolé), hydrolysé dans une deuxième étape en diol-1,2, oxydé ensuite en α -hydroxy acide et enfin en acide stéarique (*n*-18:0) par perte d'une molécule CO₂ suivie d'une oxydation.

En considérant les abondances relatives des composés provenant de chaque voie métabolique, on peut conclure que l'oxydation du groupement méthyle terminal du nonadéc-1-ène est la voie majeure, en deuxième place vient l'attaque de la double liaison, l'oxydation subterminale étant par contre de moindre importance. Des études antérieures sur la dégradation des alcènes par les bactéries avaient établi l'existence de deux mécanismes de dégradation: soit attaque du groupement méthyle terminal soit de la double liaison (Stewart et al., 1960; Van der Linden, 1963; Huybregtse et Van der Linden, 1964; Schwartz et McCoy, 1973; Vaz et al., 1998). Dans cette étude, nous montrons qu'une troisième voie d'attaque des oléfines terminales est également possible, l'importance de chaque voie métabolique étant dépendante de la souche bactérienne.

La distribution des acides issus de l'oxydation des alcools montre qu'ils sont dégradés préférentiellement selon un mécanisme de β -oxydation, et que l' α -oxydation est une voie mineure. En effet, les acides gras insaturés en $\omega 1$ et à nombre impair d'atomes de carbone dominant nettement ceux à nombre pair d'atomes de carbone.

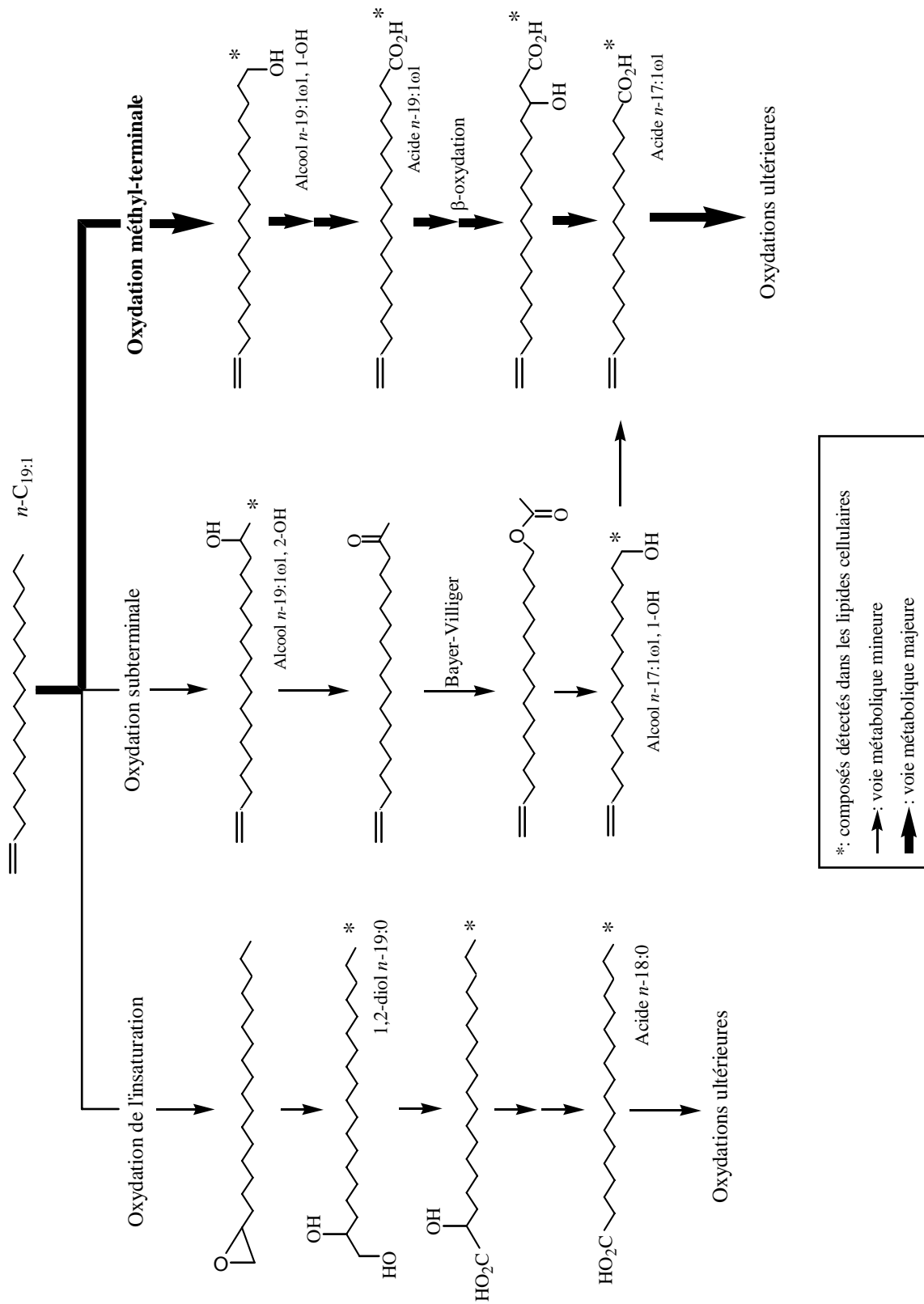


Figure III.52. Voies métaboliques proposées pour le nonadéc-1-ène chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

VIII. CULTURES DE *M. HYDROCARBONOCLASTICUS* SUR CYCLOHEXYL- ET PHENYL-ALCANES

VIII.1. IDENTIFICATION DES LIPIDES

Comme on pouvait s'y attendre, la souche de *Marinobacter* cultivée sur cyclohexyltridécane, phényldodécane et phényltridécane produit à côté des lipides acycliques, des lipides dont les structures ont un lien direct avec celle de l'hydrocarbure fourni: elles comportent soit un noyau cyclohexanique soit un noyau benzénique. Les Figures III.53 et III.54 présentent les spectres de masse et leurs interprétations de deux alcools primaires. La Figure III.55 montre le spectre de masse d'un alcool secondaire en position subterminale.

Les spectres de masse des alcools primaires présentent les mêmes ions caractéristiques $[(M-CH_3)^+]$ et $(CH_3)_2Si=OH^+$ à m/z 75] que les alcools normaux primaires, avec la présence des ions à m/z 91 et m/z 83 respectivement dans les alcools provenant des phénylalcane et du cyclohexyltridécane (Figure III.53 et III.54).

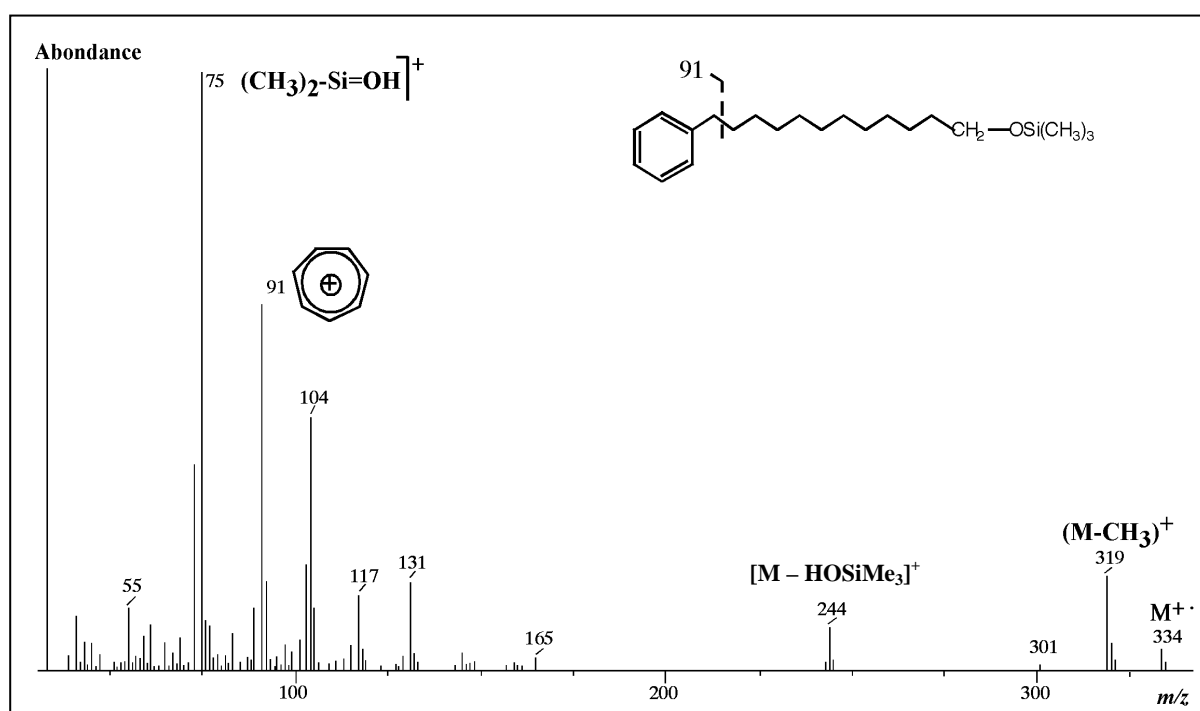


Figure III.53. Spectre de masse (IE) du dérivé TMS du phényltridécane-1-ol.

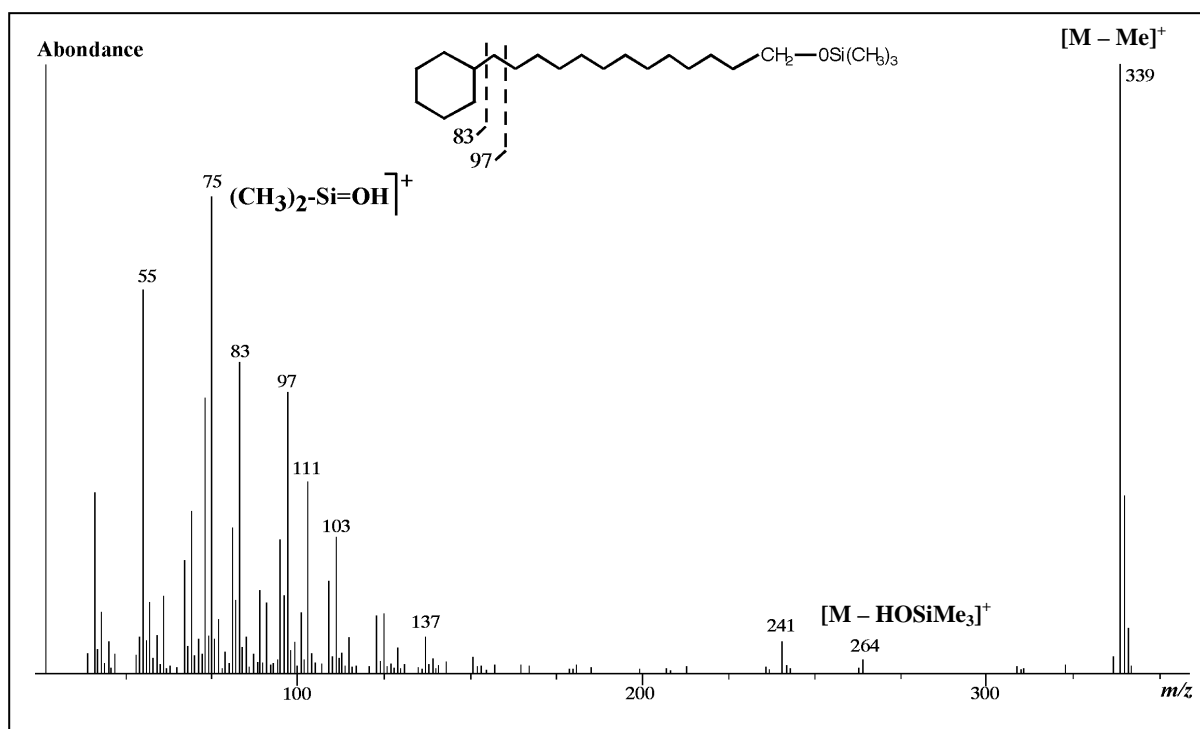


Figure III.54. Spectre de masse (IE) du dérivé TMS du cyclohexyltridécan-1-ol.

La Figure III.55 montre le spectre de masse de l'alcool secondaire phényldodécan-2-ol. L'ion le plus abondant correspond à m/z 117 $[\text{CH}_3\text{CHOSi}(\text{CH}_3)_3]^+$. Trois autres ions caractéristiques à m/z 91, m/z 75 et m/z 73 correspondent respectivement aux ions tropylium, $[(\text{CH}_3)_2\text{Si}=\text{OH}]^+$ et $[(\text{CH}_3)_3\text{Si}]^+$. L'ion fragment $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ à m/z 339 est aussi observé.

Les acides gras phénylalcanoïques sont identifiables grâce à leurs spectres de masse possédant un ion très intense à m/z 91, qui correspond à l'ion tropylium très stable. La Figure III.56 montre le spectre de masse (IE) de l'acide phényldodécanoïque. L'ion moléculaire $[\text{M}^+]$ est détecté en faible abondance à m/z 290. Les pics observés à m/z 74, m/z 87 et m/z 199, sont obtenus par les mêmes mécanismes de réarrangement que les acides gras normaux et sont communs à tous les acides phénylalcanoïques. Un autre ion abondant du spectre à m/z 258 correspond à $[\text{M}-\text{CH}_3\text{OH}]^+$.

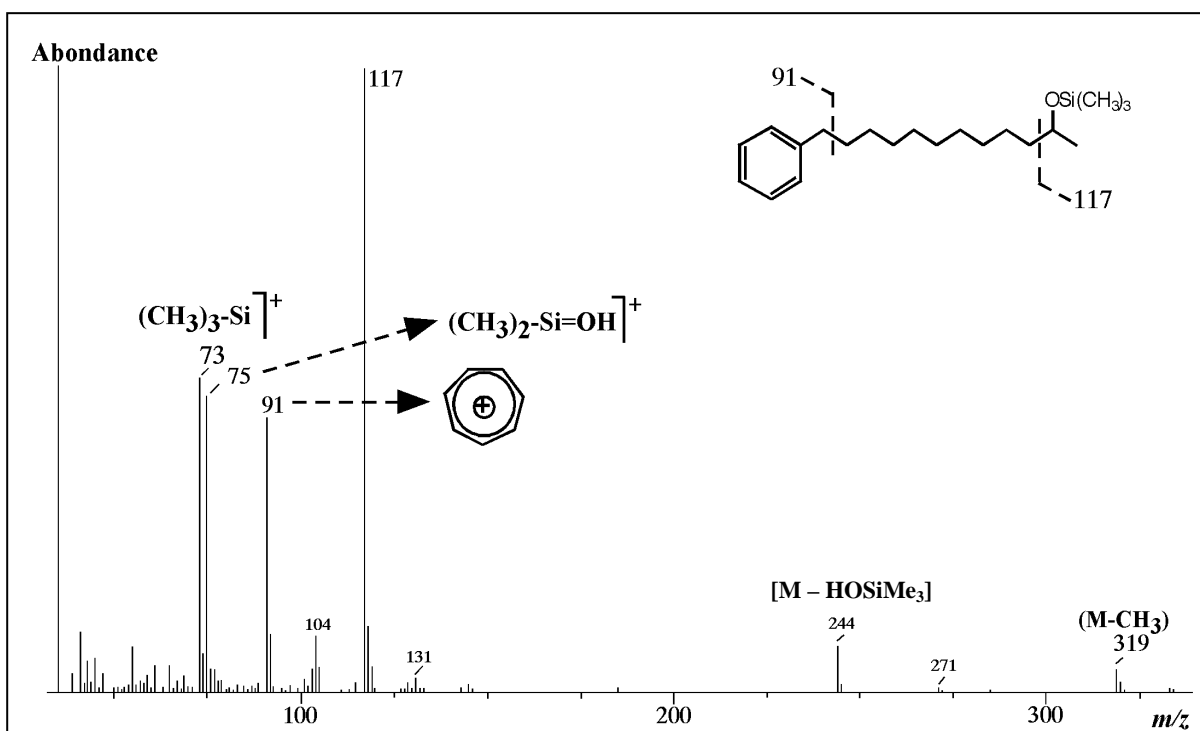


Figure III.55. Spectre de masse (IE) du dérivé TMS du phényldodécan-2-ol.

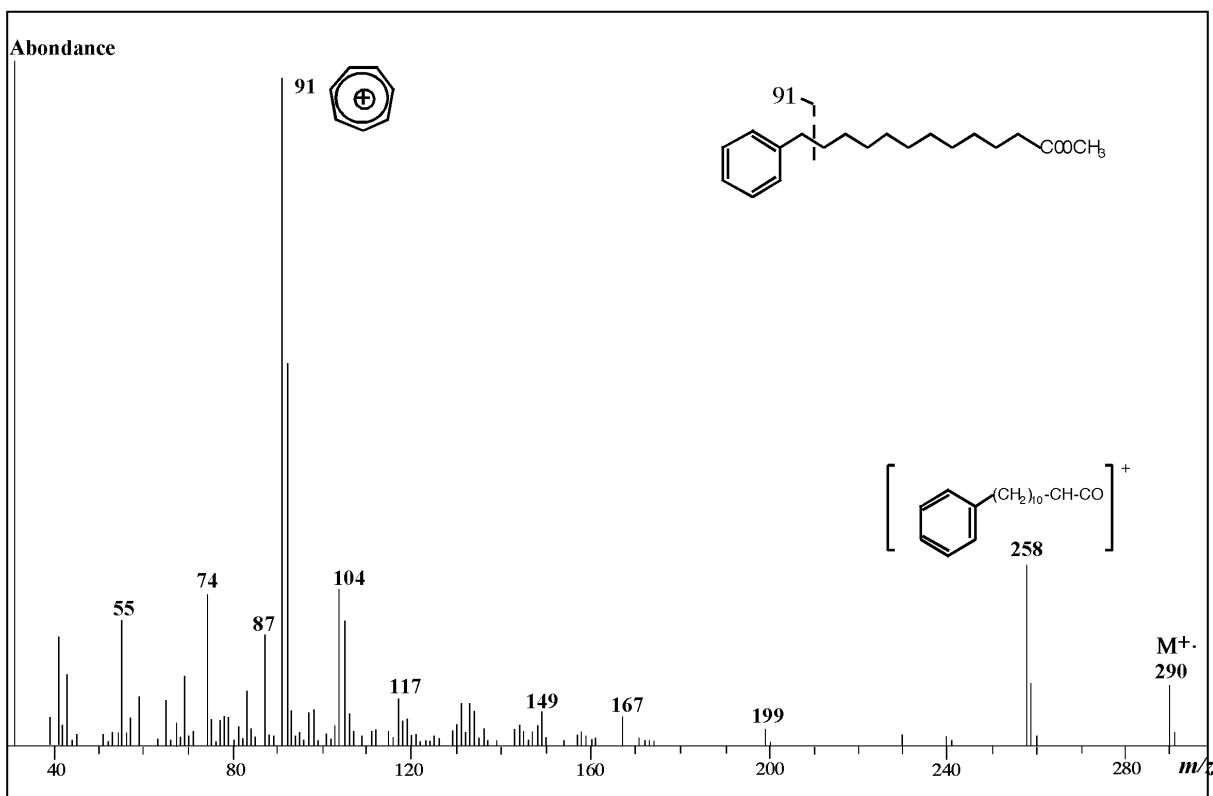


Figure III.56. Spectre de masse (IE) de l'ester méthylique de l'acide phényldodécanoïque.

La spectrométrie de masse (IE) des acides gras cyclohexylalcanoïques conduit à la formation d'ions identiques à ceux issus des acides gras normaux saturés, à savoir les ions à m/z 74, m/z 87, m/z 143, m/z 199, $[(M-31)^+]$ et $[(M-43)^+]$. Un ion caractéristique de ces composés est l'ion m/z 83 obtenu par une rupture simple entre le premier carbone de la chaîne alkyle et le cyclohexyle. La Figure III.57 montre le spectre de masse de l'acide cyclohexylalcanoïque le plus abondant dans les lipides "non liés" de la culture sur cyclohexyltridécanoïque: l'acide cyclohexylundécanoïque.

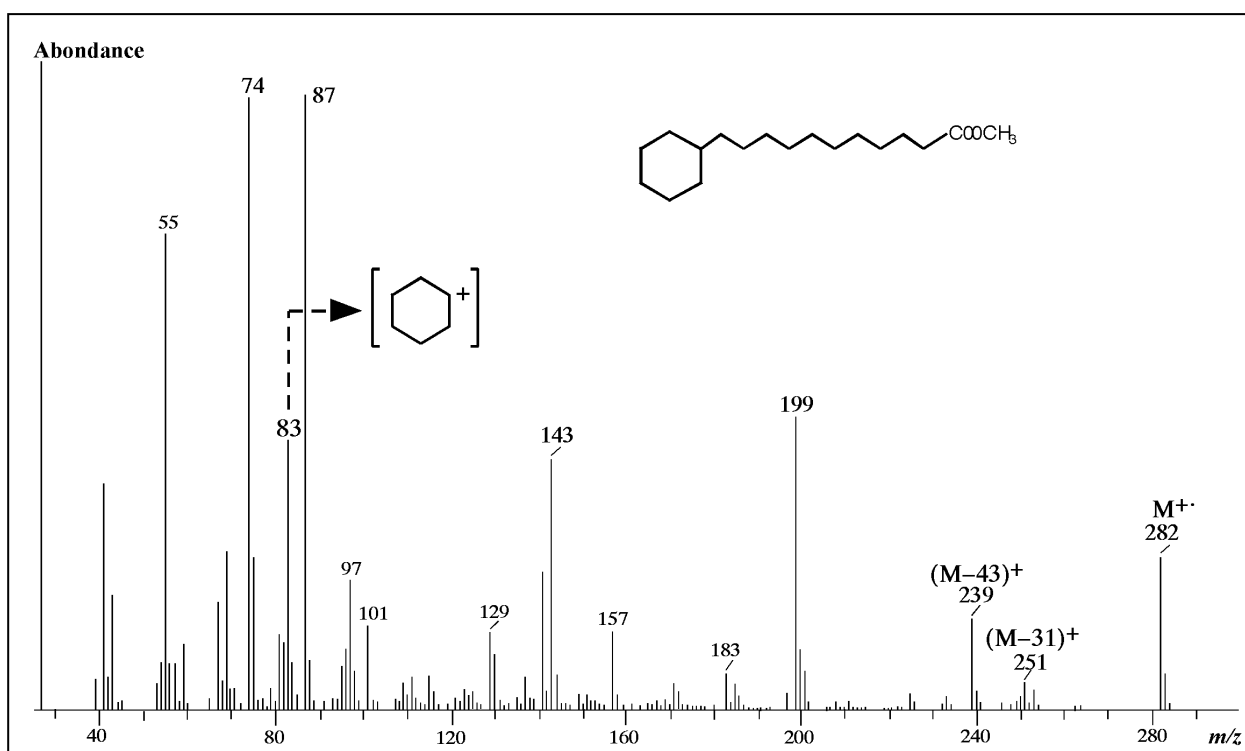


Figure III.57. Spectre de masse (IE) de l'ester méthylique de l'acide cyclohexylundécanoïque.

Les spectres de masse des β -hydroxy acides cyclohexyl-et phényl-alcanoïques montrent des ions fragments à m/z 175 et $[M-Me]^+$. Pour les β -hydroxy acides phényl-alcanoïques l'ion tropylium correspond au pic le plus intense grâce à sa grande stabilité (Figure III.58, spectre de masse du dérivé TMS du β -hydroxy acide phényldodécanoïque, méthyl ester) alors que pour les β -hydroxy acides cyclohexylalcanoïques, l'ion caractéristique à m/z 83 est toujours présent mais de faible intensité (Figure III.59, spectre de masse du dérivé TMS du β -hydroxy acide cyclohexyltridécanoïque, méthyl ester).

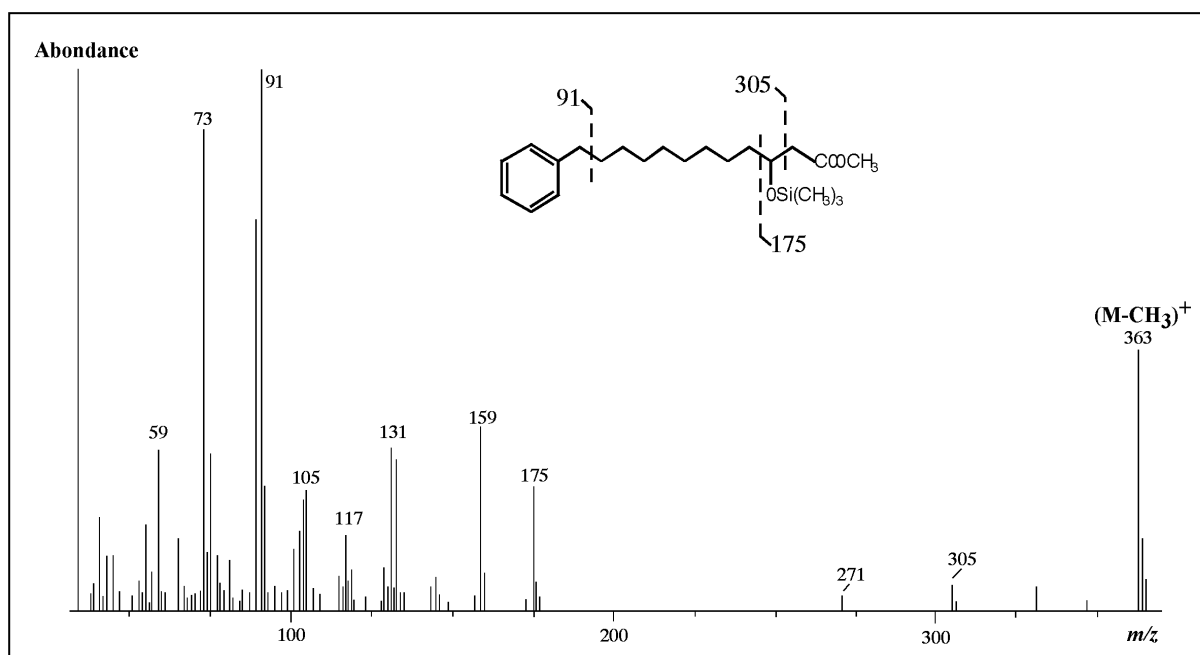


Figure III.58. Spectre de masse du dérivé TMS du β -hydroxy acide phényldodécanoïque, méthyl ester.

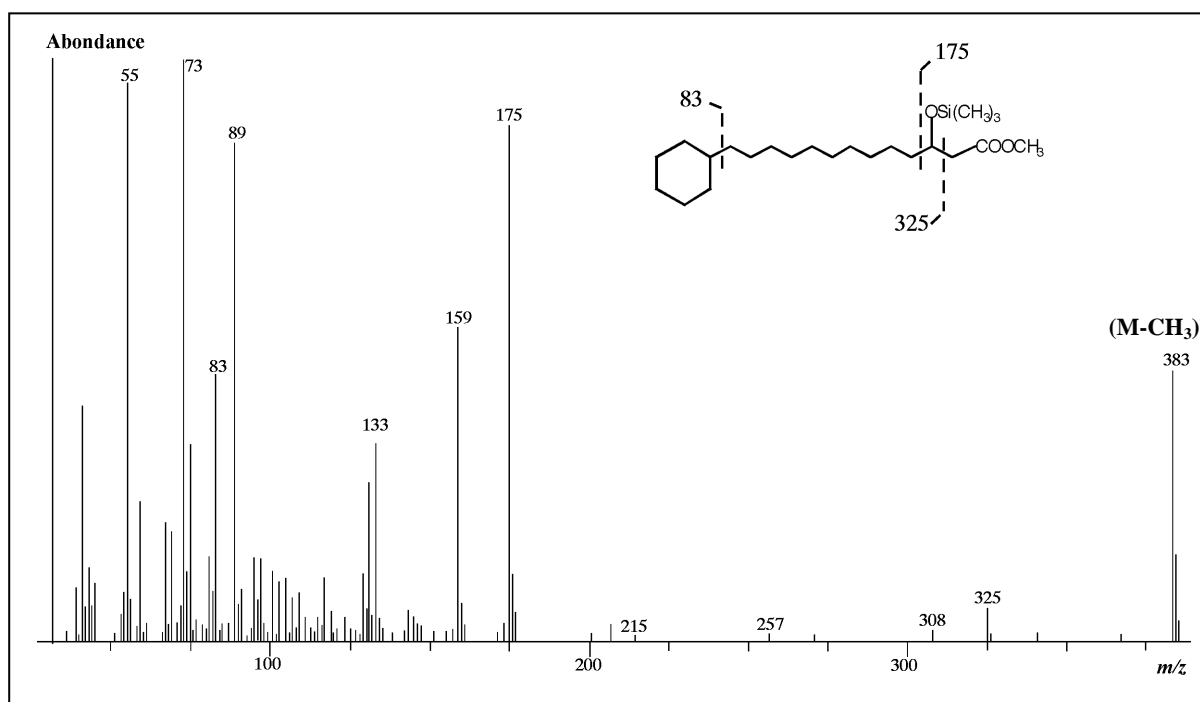


Figure III.59. Spectre de masse du dérivé TMS du β -hydroxy acide cyclohexyltridécanoïque, méthyl ester.

VIII.2. LIPIDES "NON LIÉS"

Les lipides "non liés" des trois cultures sont caractérisés par la prédominance des acides gras normaux, essentiellement à 16 et 18 atomes de carbone, représentant de 53 à 68 % des lipides "non liés" selon les cultures. Parmi ceux-ci les acides insaturés sont prépondérants représentant approximativement 40 % des lipides "non liés" dans chaque culture (Figure III.60). L'analyse par CG/SM des dérivés DMDS a montré que la position de l'insaturation varie entre les positions $\omega 5$ et $\omega 9$, la contribution de l'acide oléique étant importante dans tous les cas (de 29,6 % à 34,2 % des lipides "non liés" ; 72 % à 87,6 % des acides gras insaturés). Le seul acide gras insaturé à nombre impair d'atomes de carbone détecté est le *n*-19:1 ω 8, constituant 0,4 % des lipides "non liés" de la culture sur phényltridécane (Tableau III.16). La distribution des acides gras saturés est caractérisée par la prédominance des composés à nombre pair d'atomes de carbone avec un maximum à *n*-16:0 (acide palmitique) et une très faible contribution des produits ramifiés *iso* et *antéiso* dans les lipides "non liés" des cultures sur cyclohexyl- (3,1 %) et phenyl-tridécane (1,6 %). Après les acides classiques, les acides comportant un groupe cyclohexyle ou phényle selon l'hydrocarbure fourni aux bactéries, constituent une part importante des lipides "non liés" (Figure III.60). La longueur des chaînes alkyles de ces acides varie de C₉ à C₁₃ dans les cultures sur cyclohexyltridécane et phényltridécane, et de C₈ à C₁₄ pour la culture sur phényldodécane (Tableaux III.16 et III.17). Les acides gras "cycliques" dominants possèdent respectivement des longueurs de chaînes alkyles C₁₁, C₁₃ et C₁₂ (Tableau III.16 et III.17). Les chaînes alkyles des acides "cycliques" sont essentiellement de même parité que les hydrocarbures.

La détection de l'acide phényltétradécanoïque dans les lipides "non liés" de la culture sur phényldodécane suggère l'intervention d'un mécanisme d'élongation de la chaîne alkyle par incorporation d'une unité C₂. Cette suggestion est basée sur le fait que le phényldodécane ne contient aucune trace de phényltétradécane.

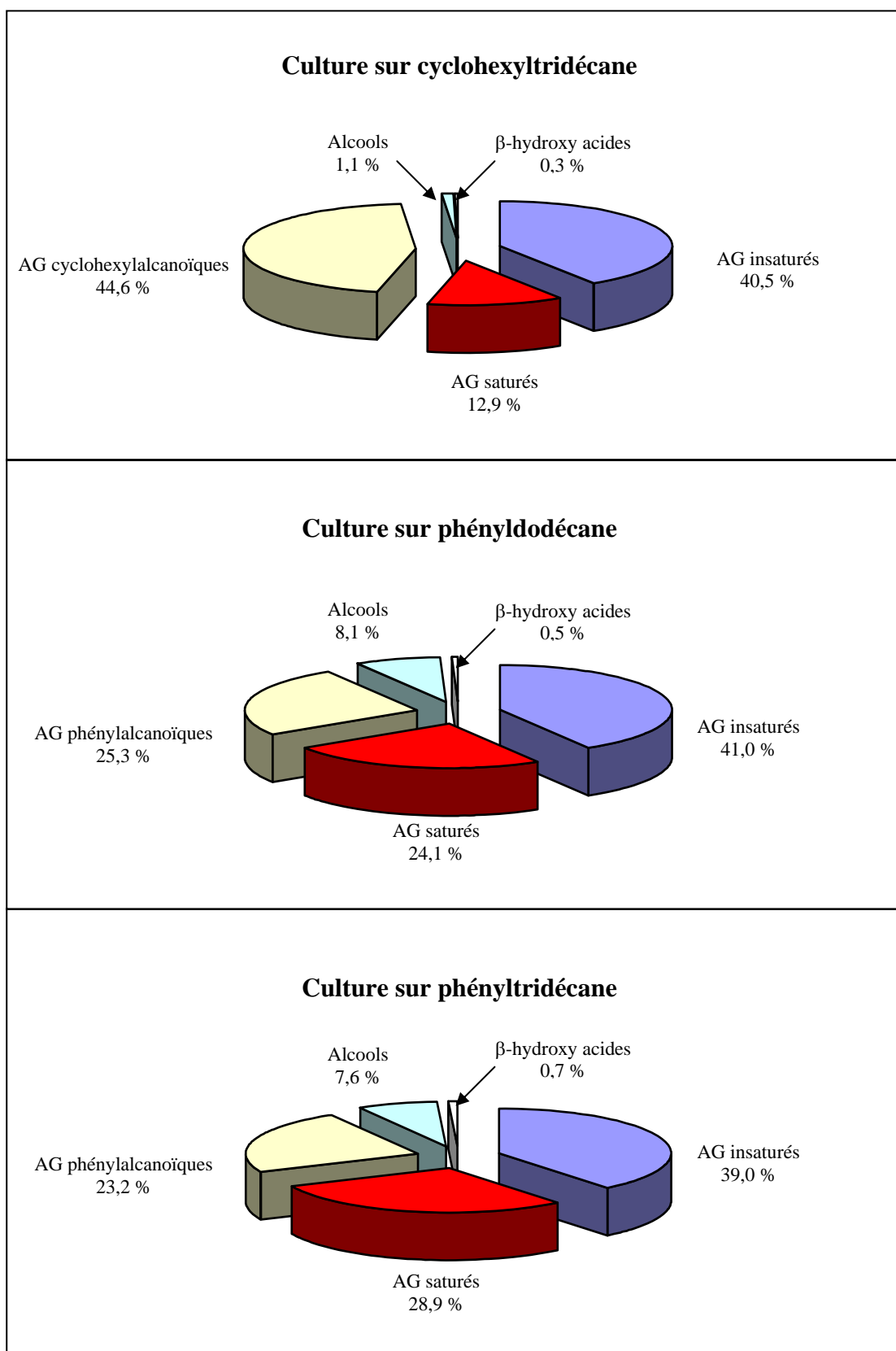


Figure III.60. Abondances relatives (%) des différentes classes de lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur cyclohexyltridécane et phénylalcane.

Les alcools présents dans les lipides "non liés", représentant de 1,1 % des lipides "non liés" (culture sur cyclohexyltridécane) à 8,1 % (culture sur phényldodécane) sont caractérisés par une forte prédominance (> 70 %) de l'alcool primaire provenant de l'oxydation du groupement méthyle terminal de la chaîne alkyle de l'hydrocarbure (Tableau III.16 et III.17). Les alcools secondaires, produits de l'oxydation subterminale des hydrocarbures sont présents dans les cultures sur phénylalcane, mais en faibles quantités par rapport à leur homologues primaires. Dans la culture sur tridecylcyclohexane, l'alcool secondaire n'a pas été détecté.

Les β -hydroxy acides présents dans les lipides "non liés" sont essentiellement des métabolites de la dégradation des hydrocarbures suivant un mécanisme de β -oxydation. Ces composés se trouvent en faibles quantités dans la culture sur cyclohexyltridécane (0,2 % ; Tableau III.17) alors qu'ils sont un peu plus abondants dans le cas des cultures sur phénylalcane (0,5 % et 0,7 % respectivement dans les cultures sur phényldodécane et phényltridécane ; Tableau III.16). Le seul β -hydroxy acide linéaire identifié dans les lipides "non liés" est le *n*-12:0 décelé dans la culture sur cyclohexyltridécane.

VIII.3. LIPIDES LABILES EN MILIEU BASIQUE

La distribution des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* est caractérisée par la prépondérance des β -hydroxy acides: 64,9 % des lipides de cette fraction dans le cas de la culture sur cyclohexyltridécane et de l'ordre de 48 % dans les cultures sur phénylalcane (Figure III.61). Dans tous ces extraits, les *n*- β -hydroxy acides sont les composés dominants et parmi eux le β -*n*-12:0 (représentent plus de 95 % des β -hydroxy acides; Figure III.61 et Tableaux III.16 et III.17). Deux β -hydroxy acides provenant de la dégradation des hydrocarbures et portant une chaîne alkyle C₇ et C₆ ont été observés (0,1 % dans le cas du cyclohexyltridécane; Tableau III.17). Les acides gras saturés sont essentiellement normaux à nombre pair d'atomes de carbone, ils constituent approximativement 30 % dans les cultures sur phénylalcane et uniquement 17,7 % pour la culture sur cyclohexyltridécane. Le composé majoritaire est l'acide laurique (12-16 % des lipides labiles en milieu basique, Tableaux III.16 et III.17) suivi par l'acide palmitique, dans les trois cultures. Les acides gras insaturés de C_{14:1} à C_{18:1} ont été également observés dans les trois cultures, ils représentent de 12 à 15 % des lipides de cette fraction (Figure III.61), l'acide *n*-14:1 ω 9 étant le plus abondant dans tous les cas.

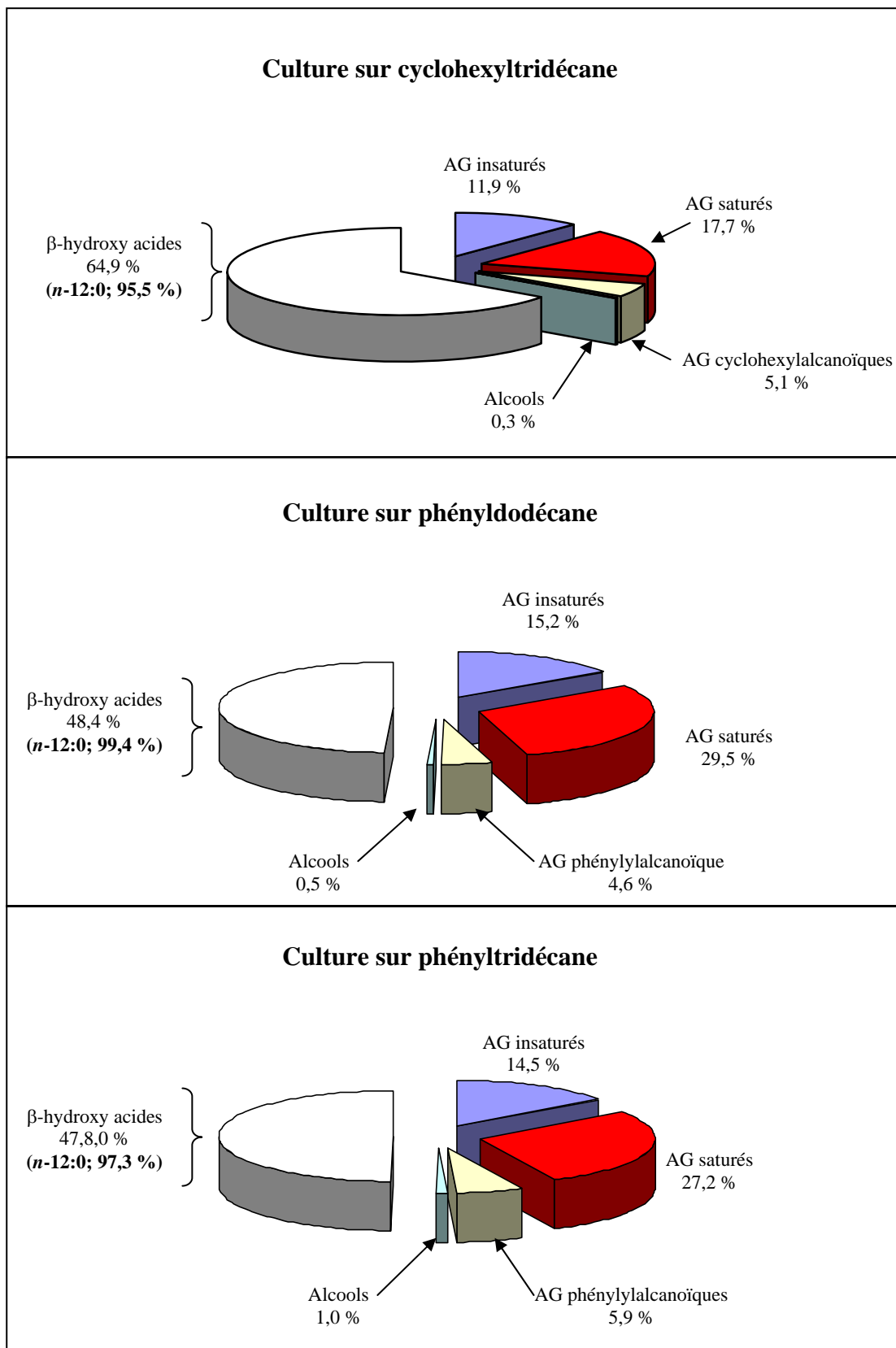


Figure III.61. Abondances relatives (%) des différentes classes de lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur cyclohexyltridécane et phénylalcane.

Les acides cyclohexyl- et phényl-alcanoïques sont moins abondants que dans les fractions lipides "non liés". Leurs distributions respectives sont cependant assez proches de celles trouvées dans les lipides "non liés".

VIII.4. LIPIDES LABILES EN MILIEU ACIDE

Les lipides labiles en milieu acide des trois cultures sur phénylalcane et cyclohexyltridécane possèdent des distributions assez semblables à celles trouvées dans le cas des cultures sur les hydrocarbures linéaires. Ces lipides sont caractérisés par la prédominance des β -hydroxy acides de n -C₁₀ à n -C₁₄: ils constituent de 54 % (culture sur phényltridécane) à 91,1 % de cette fraction (culture sur cyclohexyltridécane), avec le n -12:0 fortement dominant (Figure III.62 et Tableaux III.16 et III.17). Des homologues supérieurs (C₁₃ et C₁₄) et inférieurs (C₁₀ et C₁₁) ont été identifiés, ils sont tous en faible abondance. En plus des β -hydroxy acides normaux, le β -hydroxy acide cyclohexylheptanoïque a été également identifié dans les lipides labiles en milieu basique dans la culture sur cyclohexyltridécane. Par contre aucun β -hydroxy acide provenant de la dégradation des phénylalcane n'a été détecté. Les acides gras identifiés dans cette troisième fraction sont relativement plus abondants dans la culture sur phényltridécane comparés aux cultures sur phényldodécane et cyclohexyltridécane. Ils représentent respectivement 32,1 %, 8,8 % et 4,5 %. Ces composés correspondent surtout aux acides gras normaux, saturés et insaturés. Ils sont caractérisés par un maximum à n -16:0 et n -18:1 et par la présence d'une forte dominance paire (Figure III.62 et Tableaux III.16 et III.17). Enfin, les alcools ont été détectés en faibles quantités: de 0,4 % de la fraction pour la culture sur phényldodécane à 5,2 % pour la culture sur phényltridécane. Pour cette dernière culture, le phényltridécanol représente 1,3 % de la fraction (Tableau III.16); par contre aucun alcool "cyclique" n'a été détecté dans les deux autres cultures.

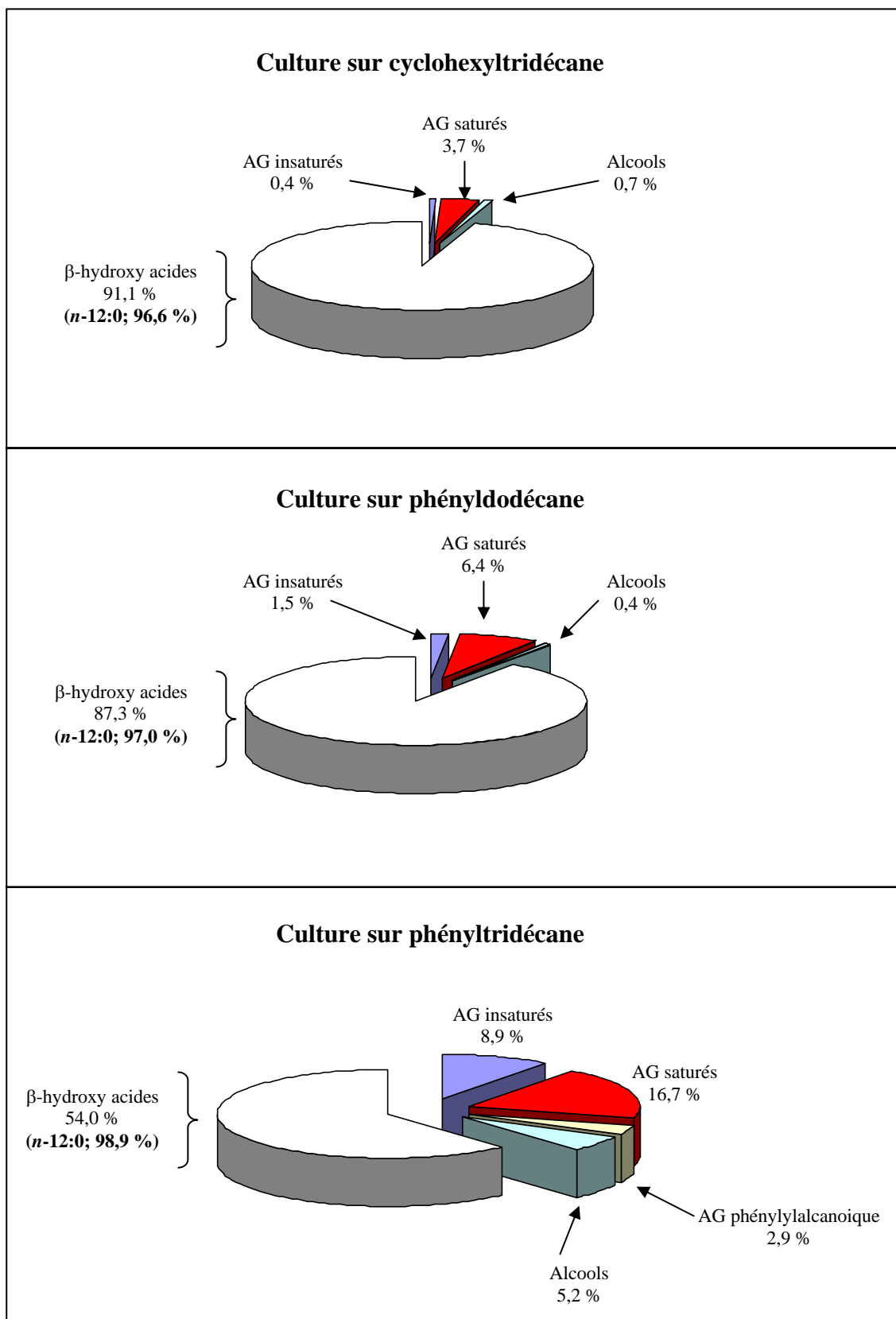


Figure III.62. Abondances relatives (%) des différentes classes de lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur cyclohexyltridécane et phénylalcane.

Tableau III.16. Composition lipidique de *M.hydrocarbonoclasticus* cultivée sur phényldodécane et sur phényltridécane.

Lipides	Phényldodécane			Phényltridécane		
	"Non liés"	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide	"Non liés"	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide
<i>Acides gras saturés</i>						
<i>n</i> -8:0	-	0,6	-	0,2	-	-
<i>n</i> -9:0	-	0,2	-	-	-	-
<i>n</i> -10:0	-	3,4	-	-	0,8	-
<i>n</i> -11:0	-	0,1	-	-	0,1	-
<i>n</i> -12:0	-	15,9	0,7	0,1	12,6	0,4
<i>n</i> -13:0	-	0,3	0,3	-	0,3	0,5
<i>n</i> -14:0	0,1	0,4	0,6	1,0	5,1	0,8
<i>n</i> -15:0	0,4	tr	0,2	0,1	0,4	0,8
<i>i</i> -15:0	-	-	-	0,2	0,3	0,2
<i>ai</i> -15:0	-	-	-	1,1	-	-
<i>n</i> -16:0	16,4	6,8	2,6	16,6	4,3	6,5
<i>i</i> -16:0	-	-	-	0,5	-	-
<i>n</i> -17:0	1,1	-	0,3	0,2	0,3	1,1
<i>i</i> -17:0	-	-	-	1,3	-	-
<i>n</i> -18:0	5,6	1,8	1,2	6,1	2,3	4,9
<i>n</i> -19:0	0,5	-	0,3	-	0,3	0,5
<i>n</i> -20:0	-	-	0,2	1,5	0,4	1,0
<i>Acides gras insaturés</i>						
<i>n</i> -12:1	-	0,2	-	-	-	-
<i>n</i> -14:1 ω9	-	7,3	-	-	6,4	-
<i>n</i> -14:1 ω7	-	0,2	-	-	0,4	-
<i>n</i> -14:1 ω5	-	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -16:1 ω9	2,8	1,0	0,1	2,6	1,0	1,0
<i>n</i> -16:1 ω7	0,6	0,2	1,0	1,6	0,4	1,5
<i>n</i> -17:1	-	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -18:1 ω9	29,6	6,2	0,1	34,2	6,2	6,0

Lipides		Phényldodécane		Phényltridécane		
<i>n</i> -18:1 ω7	6,7	0,1	0,3	-	-	0,2
<i>n</i> -18:1 ω5	0,3	-	-	0,2	0,1	-
<i>n</i> -19:1 ω8	-	-	-	0,4	-	0,2
<i>n</i> -20:1 ω9	1,0	-	-	-	-	-
<i>n</i> -21:1	-	-	-	-	-	0,3
<i>Acides gras phénylalcanoïques</i>						
Ph-6:0	-	0,4	-	-	-	-
Ph-8:0	0,2	0,2	-	-	-	-
Ph-9:0	-	-	-	0,1	4,3	-
Ph-10:0	6,5	0,8	-	0,2	-	-
Ph-11:0	-	-	-	9,3	0,7	-
Ph-12:0	17,1	3,0	0,1	-	tr	-
Ph-13:0	tr	-	-	12,9	0,9	2,9
Ph-14:0	1,5	0,2	-	-	-	-
Ph-13:1	-	-	-	0,7	-	-
<i>β-hydroxy acides[#]</i>						
<i>n</i> -10:0, OH	-	-	0,4	-	0,5	0,1
<i>n</i> -11:0, OH	-	-	1,8	-	0,2	0,1
<i>n</i> -12:0, OH	-	48,1	84,7	-	46,5	53,4
<i>n</i> -12:1, OH	-	-	-	-	0,2	-
<i>n</i> -13:0, OH	-	-	0,4	-	0,4	0,1
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	-	-	-	0,1
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	-	-	-	0,2
<i>Acides β-hydroxy phénylalcanoïques</i>						
Ph-8:0, OH	0,3	0,2	-	-	-	-
Ph-10:0, OH	0,1	0,1	-	-	-	-
Ph-11:0, OH	-	-	-	0,2	-	-
Ph-12:0, OH	0,1	tr	-	-	-	-
Ph-13:0, OH	-	-	-	0,5	tr	-
<i>Alcools</i>						
<i>n</i> -14:0, 1-OH	0,1	tr	-	0,1	0,1	0,2

Lipides	Phényldodécane				Phényltridécane	
<i>n</i> -15:0, 1-OH	-	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,1	0,2	0,2	0,4	0,4	1,7
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,2	0,1	0,2	0,5	0,3	2,0
<i>n</i> -19:0, 1-OH	-	-	-	-	0,1	-
Ph-12:0, 2-OH	1,0	-	-	-	-	-
Ph-13:0, 2-OH	-	-	-	tr	-	-
Ph-12:0, 1-OH	6,7	0,2	-	-	-	-
Ph-13:0, 1-OH	-	-	-	6,6	tr	1,3

Ph: acide phénylalcanoïque

Les abondances relatives des β -méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement à celles des β -hydroxy acides comportant le même nombre d'atomes de carbone, à partir desquels sont ils dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentant entre 0,4 % et 5,7 % des lipides totaux.

Tableau III.17. Composition lipidique de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur cyclohexyltridécane.

Lipids	"non liés	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide
<i>Acides gras saturés</i>			
<i>n</i> -10:0	-	0,3	-
<i>n</i> -12:0	-	12,8	-
<i>n</i> -13:0	-	0,1	-
<i>n</i> -14:0	0,1	0,3	-
<i>i</i> -15:0	-	0,4	-
<i>n</i> -15:0	0,1	0,2	-
<i>n</i> -16:0	6,5	2,7	2,3
<i>i</i> -17:0	1,6	-	-
<i>n</i> -17:0	0,5	0,2	0,2
<i>i</i> -18:0	-	0,1	-
<i>n</i> -18:0	3,8	0,4	1,1
<i>i</i> -19:0	-	0,1	-
<i>n</i> -19:0	0,3	0,1	-
<i>n</i> -20:0	-	-	0,1
<i>Acides gras insaturés</i>			
<i>n</i> -14:1 ω9	-	10,4	-
<i>n</i> -16:1 ω9	2,2	0,2	-
<i>n</i> -16:1 ω7	2,9	0,1	-
<i>n</i> -16:1 ω5	0,1	0,1	-
<i>n</i> -18:1 ω9	33,0	1,0	0,2
<i>n</i> -18:1 ω7	2,2	0,1	0,2
<i>n</i> -18:1 ω5	0,1	-	-
<i>Acides cyclohexylalcanoïques</i>			
6:0	-	0,2	-
7:0	-	0,1	-
9:0	2,2	0,5	-
10:0	0,2	tr	-
11:0	35,3	3,1	-
12:0	0,1	tr	-
13:0	6,6	1,2	-
13:1	0,2	-	-
<i>β-hydroxy acides</i>[#]			
<i>n</i> -10:0, OH	-	0,6	-
<i>n</i> -11:0, OH	-	0,3	-
<i>n</i> -12:0, OH	0,1	62,0	88,0
<i>n</i> -12:1, OH	-	1,4	-
<i>n</i> -13:0, OH	-	0,1	0,5
<i>n</i> -13:1, OH	-	0,1	1,3
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	1,3
<i>n</i> -14:1, OH	-	0,4	-
Cycl 11:0, OH	0,2	-	-
Cycl 13:0, OH	tr	-	-
<i>Alcools</i>			

Lipids	"non liés"	Labiles en milieu basique	Labiles en milieu acide
<i>n</i> -16:0	0,2	0,1	0,5
<i>n</i> -18:0	0,1	0,1	0,2
Cycl 13:0, 1-OH	0,8	0,1	-

Cycl: acide cyclohexylalcanoïque

Les abondances relatives des β -méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement à celles des β -hydroxy acides comportant le même nombre d'atomes de carbone, à partir desquels ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentent entre 0,5 % et 3,8 % des lipides totaux.

VIII.5. CONCLUSION PARTIELLE SUR LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES CYCLIQUES PAR *M. hydrocarbonoclasticus*

M. hydrocarbonoclasticus est capable de croître sur trois des hydrocarbures cycliques testés. Comme il a été mentionné au début de ce chapitre, le cyclohexyldodécane n'a pas assuré la croissance de la bactérie. En effet, la dégradation des cyclohexylalcanes à nombre pair d'atomes de carbone est plus difficile que celle de leurs homologues comportant des chaînes alkyles impaires (Fieberge et al., 1980; Rontani et Bonin, 1992). Les organismes capables de croître sur le cyclohexyldodécane comme source unique de carbone accumulent l'acide cyclohexylacétique dans le milieu de culture (Beam et Perry, 1974a). Cet acide est très récalcitrant à la biodégradation (Davis et Raymond, 1961 ; Beam et Perry, 1974a) à cause de la position du groupement carboxylique par rapport au cycle, qui bloque la β -oxydation. L'assimilation de ce composé nécessite l'intervention de mécanismes particuliers tels que l' α -oxydation et l'aromatisation (en passant par l'acide para-hydroxylphénylacétique) (Rontani et Bonin, 1992). En général, la minéralisation complète des cyclohexylalcanes portant des chaînes alkyles à nombre pair d'atomes de carbone nécessite l'intervention de plusieurs espèces bactériennes (Beam et Perry, 1974b ; Feinberg et al., 1980). Néanmoins, l'absence de croissance de *M. hydrocarbonoclasticus* sur cyclohexyldodécane, ne peut s'expliquer seulement par des difficultés à dégrader l'acide cyclohexylacétique. Les unités acétates issues des β -oxydations situées en avant de cet acide auraient dû assurer la croissance de la bactérie. En effet, il apparaît que cette bactérie effectue une dégradation essentiellement partielle des phénylalcanes et du cyclohexyltridécane: juste assez pour assurer sa croissance. L'absence de croissance sur l'éthylbenzène et sur le propylbenzène (Tableau III.1) confirme cette hypothèse. Dans le cas du cyclohexyltridécane, le métabolite le plus léger détecté est l'acide cyclohexylhexanoïque, ce qui a été observé chez plusieurs bactéries (Trudgill, 1984; Beam et Perry, 1974a; Dutta et Harayama, 2001).

VIII.5.1. Influence des cyclohexyl- et phényl-alcanes sur la composition en acides gras de *M. hydrocarbonoclasticus*

Les lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* sont fortement influencés par la croissance des cellules sur hydrocarbures cycliques par rapport à la culture sur l'acétate d'ammonium. La principale différence réside essentiellement dans la présence d'acides

phényl- ou cyclohexyl-alcanoïques. Les unités C₂ libérées lors de la dégradation de ces hydrocarbures sont par la suite utilisées pour la synthèse *de novo* des acides gras, essentiellement normaux à nombre pair d'atomes de carbone, saturés et insaturés. Les acides gras à 16 et 18 atomes de carbone sont les composés les plus abondants. La position ω₉ des acides gras insaturés se trouve privilégiée. Les acides gras normaux impairs ou ramifiés sont des composés très minoritaires. La distribution de ces acides gras (normaux et ramifiés) est proche de celle trouvée dans les lipides "non liés" de la culture sur acétate d'ammonium (Figure III.63).

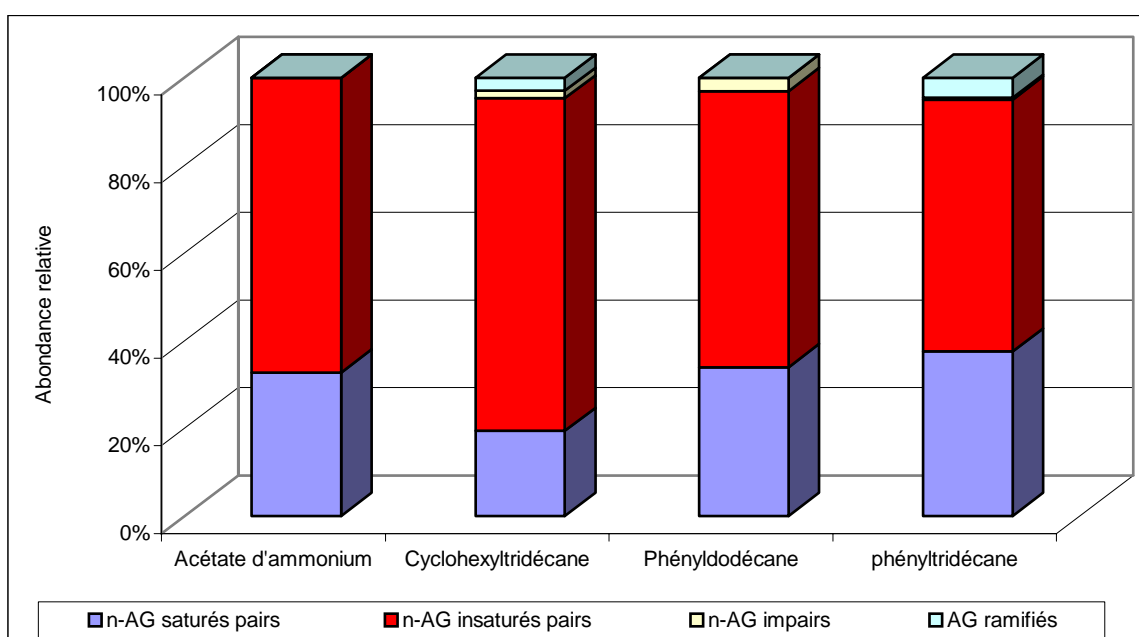


Figure III.63. Comparaison des distributions des acides gras normaux pairs (saturés et insaturés), impairs et ramifiés présents dans les lipides "non liés" des cultures sur acétate, cyclohexyltridécane et phénylalcane

Les acides gras et les β-hydroxy acides des lipides labiles en milieu basique présentent des distributions similaires à celles observées dans le cas de la culture sur acétate d'ammonium. Dans ces fractions, les métabolites de dégradation sont moins abondants que dans les lipides "non liés" et ne constituent pas des composés prédominants. Les lipides labiles en milieu acide sont les moins influencés par la source de carbone, l'acide *n*-β-hydroxy 12:0 est toujours très dominant.

VIII.5.2. Voies métaboliques des cyclohexyl- et phényl-alcane

La dégradation des phénylalcane et du cyclohexyltridécan par *M. hydrocarbonoclasticus* s'effectue de la même façon que celle des alcanes linéaires. L'oxydation initiale se produit au niveau de la terminaison alkyle, elle est essentiellement monoterminale et très minoritairement subterminale. L'oxydation terminale conduit à la formation de l'alcool primaire cyclohexyltridécan-1-ol ou phénylalkan-1-ol selon l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone, puis l'aldéhyde (non détecté dans aucune des trois cultures) et l'acide correspondant. La β -oxydation de ces acides conduit à la formation d'acides dont les chaînes alkyles sont de même parité que celles des hydrocarbures initiaux alors que l' α -oxydation (très minoritaire ici) produit des acides avec des chaînes alkyles de parités différentes. Aucun α -hydroxy acide intermédiaire n'a été détecté dans les extraits lipidiques. L'oxydation de la chaîne alkyle essentiellement par β -oxydation peut se poursuivre pour donner des acides phénylalcanoïques et cyclohexylalcanoïques à courtes chaînes.

Enfin, dans nos conditions de culture cette bactérie est incapable d'oxyder ces composés au niveau des cycles. Les Figures III.64 et III.65 représentent respectivement les voies métaboliques de dégradation des phénylalcane et du cyclohexyltridécan, ainsi que les acides obtenus dans chaque cas.

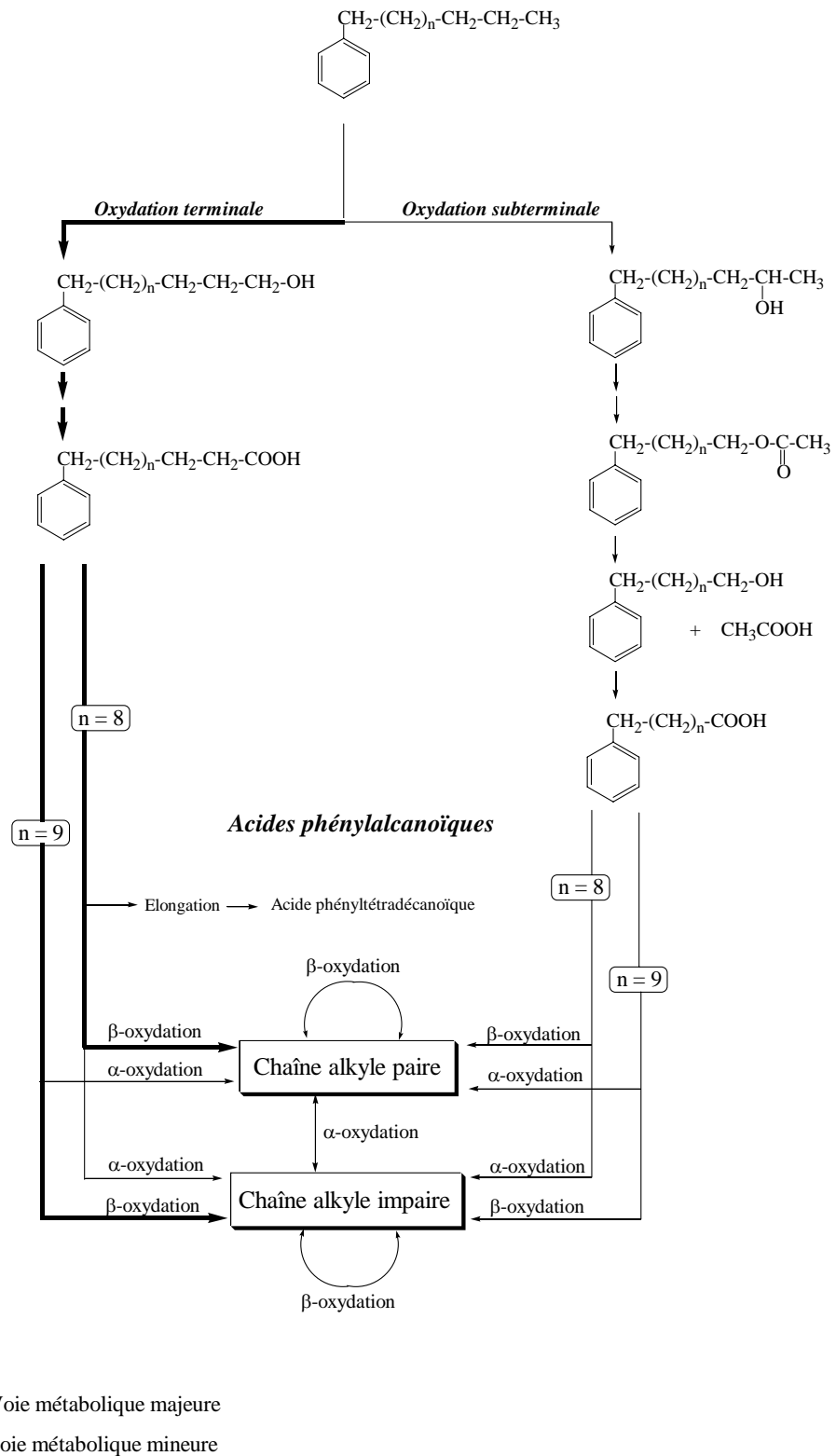
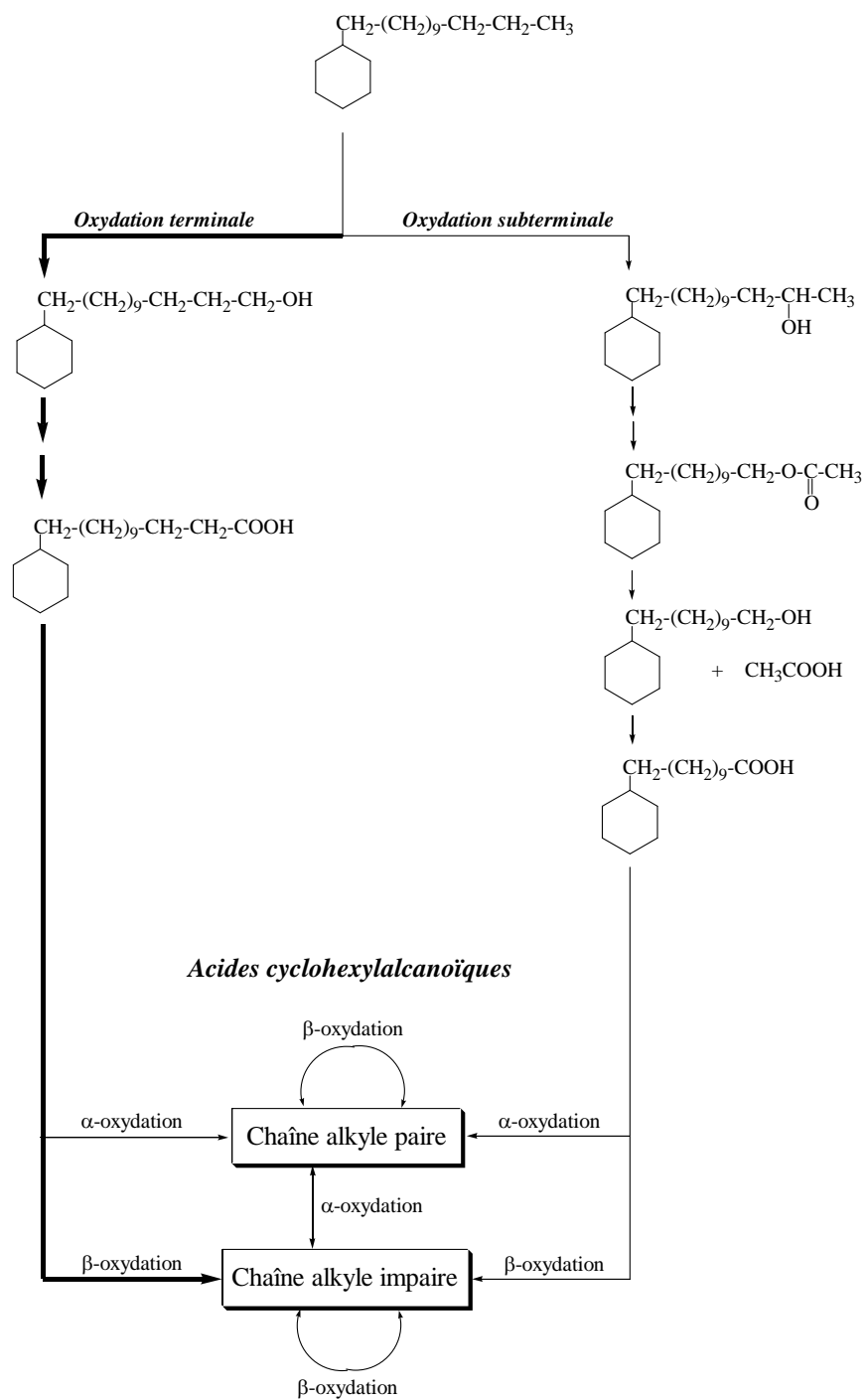


Figure III.64. Voies métaboliques de la dégradation des phénylalkanes en fonction de la parité des chaînes alkyles.



→ : Voie métabolique majeure
→ : Voie métabolique mineure

Figure III.65. Voies métaboliques de la dégradation du cyclohexyltridécanoïque.

IX. Les hydroxy acides indicateurs de l'activité bactérienne

Un grand nombre d'hydroxy acides (α , β , ω et $\omega-1$) et de di-hydroxy acides ont été identifiés dans les sédiments et dans les colonnes d'eau (Eglinton et al., 1968; Volkman et al., 1980; Kawamura et Ishiwatari, 1982; Cardoso et Eglinton, 1983; Mendoza et al., 1987b; Fukushima et al., 1992a,b; Wakeham, 1999; van Dongen, 2000; Wakeham et al., 2003; Keinänen et al., 2003; Garcette-Lepecq et al., 2003 soumis). Parmi ces composés, les α - et les β -hydroxy acides ont été retrouvés dans un grand nombre de microorganismes, incluant les bactéries, les levures, les champignons (Ratledge et Wilkinson, 1988) et les microalgues (Matsumoto et Nagashima, 1984; Matsumoto et al., 1988; Volkman et al., 1998). Ces composés sont considérés comme des métabolites intermédiaires de l' α - et la β -oxydation microbienne des acides carboxyliques; la β -oxydation est plus courante que l' α -oxydation, bien que cette dernière soit rencontrée chez les animaux, les plantes et les bactéries (Volkman et al., 1998). A titre d'exemple, Eglinton et al. (1968) ont identifié des α -et des β -hydroxy acides (de C₁₀ à C₂₄) dans des sédiments lagunaires âgés de 5000 ans qu'ils ont attribué à l'oxydation microbienne des acides gras.

La nature et le mode de présence de ces hydroxy acides dans les échantillons environnementaux (sous forme "libre": extractible par les solvants organiques, ou "liés": obtenus par saponification ou par hydrolyse acide), ainsi que leurs distributions, permet la discrimination entre les hydroxy acides provenant de l'oxydation des acides gras et ceux synthétisés par les microorganismes. Ils peuvent être également très importants dans la détermination des organismes sources. A titre d'exemple Cranwell (1981a), a montré par une étude stéréochimique que les β -hydroxy acides "non liés" caractérisés par une configuration S, présents dans des sédiments récents, sont des produits de l'oxydation par les microorganismes. Au contraire, les β -hydroxy acides liés, présentant une dominance des composés de configuration R de C₁₄ à C₁₈ sont associés aux lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives. En effet, les études stéréochimiques de Lehninger (1975) sur les mécanismes conduisant à la formation des β -hydroxy acides ont montré que les composés de configuration S sont des intermédiaires dans les métabolismes de dégradation alors que les composés de configuration R sont des intermédiaires dans la biosynthèse des acides gras. Des études plus récentes sur la composition lipidique de différentes bactéries Gram-négatives et sur des échantillons sédimentaires ont suggéré que les β -hydroxy acides liés par liaisons amides et obtenus par une hydrolyse acide des résidus de l'extraction aux solvants sont exclusivement

d'origine bactérienne (Goossens et al., 1986, 1989b; Wakeham, 1999; Wakeham et al., 2003). Ces derniers composés sont essentiellement normaux, de longueur de chaîne variant entre C₁₀ et C₁₈, caractérisés par une forte prédominance des composés pairs avec généralement un maximum à C_{14:0}. Cette distribution est caractéristique des lipopolysaccharides des bactéries Gram-négatives (Wilkinson, 1988; Skerratt et al., 1992; Lattuati et al., 2002; Wakeham et al., 2003). Ces β -hydroxy acides liés par liaisons amides sont moins sensibles aux transformations microbiennes et peuvent donc donner des informations sur les organismes sources (Cranwell, 1981a; Kawamura et Ishiwatari, 1984; Goossens et al., 1986; Klock et al., 1988).

La procédure analytique utilisée dans la présente étude pour extraire les lipides des biomasses bactériennes de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur différents hydrocarbures nous a permis de différencier entre:

- (i) les β -hydroxy acides provenant de l'oxydation des hydrocarbures, présents dans les lipides "non liés";
- (ii) les β -hydroxy acides engagés dans les liaisons esters dans les LPS.
- (iii) les β -hydroxy acides engagés dans les liaisons amides, présents dans les LPS.

Les β -hydroxy acides présents dans les lipides "non liés" possèdent le même squelette que l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone et ne constituent qu'une faible partie de cette fraction. Ces hydroxy acides comportent des chaînes alkyles de même parité que l'hydrocarbure: le β -hydroxy acide provenant de l'oxydation du groupement méthyle terminal est généralement accompagné de ses homologues immédiatement inférieurs comportant 2 et 4 atomes de carbone de moins. Les β -hydroxy acides liés par liaisons esters aux lipopolysaccharides constituent une grande part des lipides labiles en milieu basique (de 24,8 à 71,9 %). La distribution de ces composés est caractérisée par une forte prédominance du n - β -12:0 (> 16 % des lipides de cette fraction et > 59 % des β -hydroxy acides présents) qui est accompagné de ses homologues supérieurs (n - β -13:0 et n - β -14:0) et inférieurs (n - β -10:0 et n - β -11:0). Les β -hydroxy acides obtenus par hydrolyse acide constituent la plus grande partie des lipides labiles en milieu acide et sont caractérisés par une forte prédominance de n - β -12:0 (> 38,8 % des lipides de cette fraction et > 59 % des β -hydroxy acides présents). Les homologues supérieurs (n - β -13:0 et n - β -14:0) et inférieurs (n - β -10:0 et n - β -11:0) de ce

dernier composé sont également présents mais en faibles quantités. Ces hydroxy acides obtenus probablement par synthèse cellulaire se trouvent engagés dans des liaisons amides aux unités polysaccharidiques membranaires. L'incorporation des β -hydroxy acides provenant de l'oxydation des hydrocarbures aux LPS de *M. hydrocarbonoclasticus* dépend de la structure chimique de ces sources de carbone. En effet, on remarque la présence dans les lipides labiles en milieu basique et labiles en milieu acide des β -hydroxy acides normaux, *iso* et *anteiso* essentiellement de C₁₁ à C₁₄ respectivement dans les cultures sur alcanes normaux, *iso* et *anteiso*, mais leur pourcentage varie en fonction de l'alcane. Aucun β -hydroxy acide comportant un groupement phényle, cyclohexyle ou une ramification en milieu de chaîne n'a été identifié dans la fraction labile en milieu acide respectivement dans les cultures sur phénylalcane, cyclohexyltridécanoate et 10-Me-C₁₉. De faibles quantités de β -hydroxy acides provenant de l'oxydation de l'hydrocarbure ont été uniquement identifiés dans les lipides labiles en milieu basique des cultures sur phénylalcane.

Il apparaît donc que, la détection de β -hydroxy acides "longs" dans les lipides "non liés" des sédiments et des colonnes d'eau puisse être utilisée comme indicateur de l'activité bactériologique et donc signaler la possibilité d'une pollution par les hydrocarbures. Par contre la présence de β -hydroxy acides "liés" courts de C₁₀ à C₁₄, est une indication de la présence de bactéries Gram-négatives, avec dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*, une forte prédominance du *n*- β -12:0.

X. CONCLUSION

Cette étude montre que *M. hydrocarbonoclasticus* est capable de métaboliser une grande variété d'hydrocarbures incluant des alcanes normaux, ramifiés, des phényl- et cyclohexyl-alcanes ou encore des alcènes. L'analyse CG/SM des lipides bactériens produits a mis en évidence un grand nombre de composés pouvant être classés en trois types principaux: alcools, acides et β -hydroxy acides.

L'identification de nombreux intermédiaires dans le processus métabolique de chaque hydrocarbure a permis de proposer non seulement une voie principale de dégradation *via* l'oxydation en alcool primaire par hydroxylation du groupement méthyle terminal le moins encombré, puis en acide pris ensuite dans un cycle de β -oxydation, mais aussi des voies secondaires en fonction de la structure de l'hydrocarbure. Il s'agit en particulier (i) de l'oxydation subterminale en alcool secondaire suivie d'une réaction de type Bayer-Villiger, et oxydation ultérieure de l'alcool qui en résulte l'acide, (ii) de l' α -oxydation notamment dans le cas des composés possédant un groupement méthyle en β , ou encore (iii) de l'époxidation des oléfines terminales. Aucune attaque directe des groupements phényle ou cyclohexyle n'a en revanche été détectée, et les cyclohexylalcanes à chaîne hydrocarbonée comportant un nombre pair d'atomes de carbone, comme le cyclohexyldodécane, ou les hydrocarbures polyramifiés comme le pristane se sont révélés récalcitrants à la dégradation par *M. hydrocarbonoclasticus*.

Cette étude a également montré que *M. hydrocarbonoclasticus* peut modifier de façon très importante sa composition en lipides membranaires. En effet, alors que sur un substrat simple comme l'acétate d'ammonium ou sur un milieu nutritif complexe, les acides C_{16:0}, C_{16:1} et C_{18:1} sont dominants, sur hydrocarbures, la distribution est très fortement remaniée, avec des proportions significatives ou même très importantes d'acides gras, *iso*, *anteiso*, ramifiés en milieu de chaînes, insaturés en position terminale ou comportant des groupes phényle ou cyclohexyle en ω , selon l'hydrocarbure fourni. Ainsi, dans ce cas sur hydrocarbures *iso* et *anteiso*, le profil en acides gras est assez similaire à celui d'un grand nombre de bactéries Gram-positives.

Par conséquence, les β -hydroxy acides contenus dans les lipopolysaccharides de la membrane extérieure sont beaucoup moins sensibles au changement de la structure des hydrocarbures. En effet, le β -hydroxy acide *n*-12:0, spécifique des LPS de *M. hydrocarbonoclasticus* est toujours dominant, et quasiment exclusif dans certains cas. Il

apparaît de plus que seuls des β -hydroxy acides dont la chaîne hydrocarbonée comporte un carbone en plus ou en moins, ou dans une moindre mesure une ramification de type *iso* ou *anteiso*, ou encore une double liaison terminale puissent être incorporés dans les LPS. Par ailleurs, ces β -hydroxy acides présents dans les LPS comportant un nombre d'atome de carbone compris entre 10 et 14, donc beaucoup plus faible que celui des β -hydroxy acides directement issus de la dégradation des hydrocarbures. Cette différence pourrait permettre de distinguer dans les sédiments ou dans les colonnes d'eau les β -hydroxy acides propres aux bactéries Gram-négatives.

Afin de savoir si ces conclusions sont généralisables, l'étude de quelques autres bactéries hydrocarbonoclastes paraît nécessaire.

CHAPITRE IV

Influence de la source de carbone sur la composition lipidique de bactéries Gram-négatives, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas oleovorans*. Distribution des β -hydroxy acides de la membrane extérieure.

I. INTRODUCTION

Après avoir étudié l'influence de la structure des hydrocarbures sur la composition lipidique de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, nous avons voulu savoir si nos résultats étaient ou non généralisables sur d'autres bactéries. Pour cela trois espèces Gram-négatives ont été sélectionnées. Il s'agit de *Marinobacter aquaeolei* et *Acinetobacter calcoaceticus*, deux bactéries dégradant les *n*-alcane de C₁₀ à C₂₄ et *Pseudomonas oleovorans*, une bactérie pouvant utiliser des *n*-alcane et des *n*-alcènes de C₆ à C₁₂. Chacune de ces trois bactéries a été cultivée sur l'acétate d'ammonium, un alcane normal et un alcane ramifié comme source unique de carbone et d'énergie. Le *n*-nonadécane et le 2-méthyl-octadécane ont été choisis pour cultiver *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* alors que pour *P. oleovorans*, nous avons utilisé le *n*-octane et le 2-méthylheptane. Les cultures sur hydrocarbures ont été réalisées en suivant le même protocole expérimental que dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Dans ce quatrième chapitre, après une description des caractéristiques physiologiques et biochimiques des trois bactéries étudiées, nous exposons et discutons les données analytiques recueillies. Les données concernant *M. aquaeolei* seront comparées à celle obtenues pour *M. hydrocarbonoclasticus* dans la perspective de dégager des tendances dans le genre *Marinobacter*. Enfin, nous essaierons de déterminer quelle est l'influence des hydrocarbures comportant des chaînes aliphatiques sur la distribution des β-hydroxy acides de ces quatre bactéries Gram-négatives.

II. PRESENTATION DES BACTERIES ETUDIEES

II.1. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE *Marinobacter aquaeolei*

La bactérie *Marinobacter aquaeolei* a été isolée lors d'une étude microbiologique dans un champ pétrolier en mer, situé à proximité de la ville côtière Ving Tau au sud du Vietnam (Huu et al., 1999). Il s'agit d'une bactérie Gram-négative, en forme de bâtonnet, anaérobie facultative, capable d'utiliser le *n*-hexadécane, le pristane et divers constituants du pétrole brut comme source unique de carbone et d'énergie: elle peut oxyder 41 % des hydrocarbures saturés, 52 % des hydrocarbures aromatiques et 20 % des asphaltènes en 7 jours à 30 °C.

M. aquaeolei peut croître dans des milieux de culture dont la concentration en NaCl peut atteindre 3,4 M, avec un optimum de croissance à 0,85 M. Elle peut tolérer des variations de température de 13 à 50 °C et de pH de 5 à 10; les valeurs optimales de croissance sont respectivement 30 °C et pH 7,3. La croissance peut avoir lieu en anaérobiose en présence de nitrate sur succinate, citrate ou acétate, alors que le glucose n'assure pas la croissance dans de telles conditions. Cette bactérie peut utiliser par exemple les composés suivants comme source unique de carbone et d'énergie: le DL-lactate, l'acétate, le citrate, le glutamate, le butyrate et certains acides aminés.

La capacité de cette bactérie à utiliser une large gamme de sucres, d'acides organiques et d'acides aminés comme source unique de carbone, ainsi que d'autres composés pouvant se trouver dans le milieu marin et la possibilité de croître dans des milieux de salinités variables expliquent le caractère ubiquiste de cette bactérie dans le milieu marin. Le nom de *Marinobacter aquaeolei* a été adopté en raison des similarités physiologiques et phénotypiques avec *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Gauthier et al., 1992), et de son potentiel à dégrader les hydrocarbures en milieu aquatique (*aquaeolei*: "aqua" eau et *oleum* pétrole). Les principales différences entre ces deux espèces se manifestent essentiellement par des taux différents de Guanine-Cytosine dans l'ADN et un taux d'hybridation ADN-ADN inférieur à 65 % justifiant à lui seul la création d'une nouvelle espèce (Huu et al., 1999). En ce qui concerne la distribution des acides gras totaux, elle est assez voisine de celle rencontrée chez *M. hydrocarbonoclasticus*, avec cependant une proportion d'acide oléique plus faible, compensée par une proportion plus élevée d'acide palmitoléique. A notre connaissance le métabolisme d'hydrocarbures par *M. aquaeolei* n'avait jusqu'ici pas été étudié.

II.2. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES D'Acinetobacter calcoaceticus

Acinetobacter calcoaceticus initialement nommée *Micrococcus cerificans* a été isolée pour la première fois par Beijerinck (1911). Elle a été par la suite classée comme *Pseudomonas calcoaceticus*, pour être enfin caractérisée sous le nom d'*Acinetobacter calcoaceticus* (Baumann et al., 1968).

Cette bactérie Gram-négative, strictement aérobie est capable de croître dans un milieu de culture minéral avec l'acétate comme source unique de carbone et l'ammoniaque ou le nitrate comme source d'azote. Elle peut également utiliser une grande variété de composés organiques comme source unique de carbone; parmi ces composés on peut citer: les

hydrocarbures, les acides gras, les acides aminés, les sucres (pentoses) et les composés aromatiques. Par contre, elle est incapable de croître par exemple en présence de méthanol, formate ou glycérol (Bouvet et Grimont, 1986; Baumann et al., 1968). Les valeurs optimales de température et de pH pour la croissance de cette bactérie sont respectivement 30 °C et pH 6,8.

Cette bactérie est capable de croître sur le pétrole brut et il a été montré qu'elle dégrade plus facilement les alcanes (jusqu'à C₃₃) que les composés aromatiques et les asphaltènes (Pines et Gutnick, 1986; Marin et al., 1995, 1996; Lal et Khanna, 1996). Par exemple, la souche *Acinetobacter calcoaceticus* S30 peut dégrader en 15 jours 29 % du pétrole brut de Gujarat (Inde) dont les alcanes ont été six fois plus dégradés que les aromatiques. Les bactéries du genre *Acinetobacter* sont généralement rencontrées dans les sites contaminés par le pétrole et elles ont été largement utilisées pour l'étude de l'oxydation des *n*-alcanes (Asperger et Kleber, 1991).

A. calcoaceticus présente la particularité rare, chez les bactéries, de synthétiser et d'accumuler des cires, esters d'acides gras et d'alcools gras, notamment du palmitate de palmityle (C₁₆-C₁₆), dans les milieux carencés en azote (Fixter et al., 1986). Cette propriété est largement répandue dans le genre *Acinetobacter* (Makula et al., 1975; Bryn et Jantzen, 1977, Ishige et al., 2002), et elle se manifeste notamment lors de la croissance sur *n*-alcanes.

La biodégradation des *n*-alcanes chez les bactéries du genre *Acinetobacter* a été très étudiée depuis plus de 20 ans. Cependant à ce jour les voies métaboliques ne sont pas totalement éclaircies en raison de l'intervention d'un nombre très important d'enzymes. Si la voie classique *via* la formation d'un alcool primaire et l'oxydation en acide se manifeste chez la souche S30 d'*A. calcoaceticus* (Lal et Khanna, 1996), l'intervention d'une dioxygénase conduisant à la formation d'un hydroperoxyde serait privilégiée chez la souche M-1 d'*Acinetobacter sp.* (Sakai et al., 1996). Ce peroxyde évoluerait ensuite vers un aldéhyde, donc sans la formation d'un alcool comme intermédiaire, cet aldéhyde étant ensuite oxydé en acide. Par contre chez la souche HO1-N, le peroxyde serait d'abord réduit en alcool avant d'être oxydé en aldéhyde (Finnerty, 1990a, b).

II.3. CARACTERISTIQUES PHYSIOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE *Pseudomonas oleovorans*

Pseudomonas oleovorans a été isolée pour la première fois par Lee et Chandler en 1941. Il s'agit d'une bactérie Gram-négative, strictement aérobie, capable d'oxyder les

composés aliphatiques: elle peut croître dans un milieu de culture contenant un *n*-alcane ou un *n*-alcène de C₆ à C₁₂ comme source unique de carbone et d'énergie (Baptist et al., 1963; Nieder et Shapiro, 1975). Elle peut également époxyder les alcènes terminaux à des taux très élevés (Schwartz et McCoy, 1973; May et al., 1972). Les conditions optimales de croissance se situent à 30 °C et pH 6,8.

Un des aspects du métabolisme de *P. oleovorans*, comme de nombreuses *Pseudomonas*, dans des conditions de carence d'azote ou de nutriments et en présence d'un excès de la source de carbone, consiste à synthétiser et à accumuler comme produit de réserve, des poly-β-hydroxyalcanoates (butyrate essentiellement) (Anderson et Daws, 1990; Diard et al., 2002). Ces polyesters biodégradables peuvent être utilisés dans des applications médicales ou industrielles en raison de leurs propriétés physico-chimiques (Anderson et Dawes, 1990; Madison et Huismann, 1999).

La voie métabolique des *n*-alcanes chez *P. oleovorans* est bien établie. L'oxygène moléculaire est introduit par une monooxygénase pour donner un alcool primaire (Ueda et al., 1972; Batipst et al., 1963). L'alcool produit est ensuite déshydrogéné en aldéhyde. Celui-ci est successivement pris en charge par une aldéhyde déshydrogénase et une acyl-CoA synthétase pour donner un dérivé acyl-CoA intégrant alors le métabolisme (van Beilen et al., 1994). L'enzyme responsable de l'hydroxylation est également capable d'époxyder la double liaison des *n*-alcènes terminaux (May et Abott, 1973).

III. RESULTATS QUANTITATIFS

Pour étudier l'influence de la source de carbone sur la composition lipidique de *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* par comparaison avec *M. hydrocarbonoclasticus*, chacune de ces deux bactéries a été cultivée sur un substrat soluble: l'acétate d'ammonium, un alcane normal: *n*-C₁₉ et un alcane ramifié: *i*-C₁₉. Les cultures sur ces hydrocarbures ont été réalisées en suivant la même procédure que pour *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les biomasses bactériennes sèches, récupérées par ultracentrifugation suivie d'une lyophilisation ont été extraites en suivant la même procédure analytique, représentée à la Figure II.1 du chapitre II. Les résultats quantitatifs concernant les trois fractions lipidiques ("non liés", labiles en milieu basique et labiles en milieu acide) obtenues par extractions successives des biomasses bactériennes de *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* en fonction de la

source de carbone sont réunies dans le Tableau IV.1. Les résultats relatifs à *M. hydrocarbonoclasticus* y figurent également pour comparaison.

Le pourcentages des lipides totaux des cultures sur *n*-C₁₉ et *i*-C₁₉ constituent respectivement 7,0 et 6,1 % des biomasses bactériennes sèches dans le cas de *M. aquaeolei* et, 7,1 et 14,4 % dans les cas d'*A. calcoaceticus*. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec les cultures sur acétate d'ammonium: 5,3 % dans le cas de *M. aquaeolei* et 2,8 % dans le cas d'*A. calcoaceticus*. Ces variations concordent avec les résultats obtenus pour *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur différents types d'hydrocarbures (Tableau III.1) ainsi qu'avec des études antérieures sur la variation des lipides totaux des bactéries hydrocarbonoclastes lors du passage d'une culture sur un substrat simple et soluble à des cultures sur hydrocarbures (Makula et Finnerty, 1968a; Goutx et al., 1990; Doumenq et al., 1999).

Chez les quatre bactéries, les lipides "non liés" constituent toujours la fraction lipidique prédominante quelque soit la nature de la source de carbone (ils constituent entre 49,3 % et 83,2 % des lipides totaux, Tableau IV.1), suivis des lipides labiles en milieu basique avec des valeurs comprises entre 12,7 et 45,8 % des lipides totaux. Les lipides labiles en milieu acide représentent de 3,8 % à 15,7 % des lipides totaux.

La structure chimique des composés présents dans chaque fraction a été déterminée par analyse en CG/SM des dérivés TMSi, DMDS et *N*-acylpyrrolidides. La structure de certains composés a été confirmée par coinjections avec des standards et dans certains cas par comparaison avec les lipides d'*Escherichia coli* dont la composition est bien connue.

Tableau IV.1. Abondance des différentes fractions lipidiques de *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans* en fonction de la source de carbone. Comparaison avec les résultats obtenus avec *M. hydrocarbonoclasticus*

<i>BACTERIE</i>	Source de carbone	<i>Pourcentage par rapport à la biomasse sèche</i>				<i>Pourcentage par rapport aux lipides totaux</i>		
		Lipides totaux	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	Acétate d'ammonium	5,2	3,5	1,1	0,6	67,3	21,2	11,5
	<i>n</i> -C ₁₉	12,7	8,7	3,1	0,9	68,6	24,1	7,3
	<i>i</i> -C ₁₉	12,3	10,2	1,6	0,5	83,2	12,7	4,1
M. aquaeolei	Acétate d'ammonium	5,3	3,8	1,3	0,2	71,7	24,5	3,8
	<i>n</i> -C ₁₉	7,0	4,7	1,7	0,6	67,1	24,3	8,6
	<i>i</i> -C ₁₉	6,1	4,6	1,2	0,3	75,4	19,7	4,9
A. calcoaceticus	Acétate d'ammonium	2,8	2,1	0,4	0,3	75,0	14,3	10,7
	<i>n</i> -C ₁₉	7,1	5,2	1,6	0,3	73,2	22,5	4,2
	<i>i</i> -C ₁₉	14,4	7,1	6,6	0,7	49,3	45,8	4,9
P. oleovorans	Acétate d'ammonium	*	*	*	*	73,6	16,2	10,2
	<i>n</i> -C ₈	*	*	*	*	59,1	27,3	13,6
	2-Me-C ₇	*	*	*	*	61,4	22,9	15,7

*: ces pourcentages n'ont pas pu être déterminés en raison de la présence de quantités importantes de sel avec les biomasses bactériennes.

IV. IDENTIFICATION DES LIPIDES

Les lipides extraits des biomasses bactériennes cultivées sur les trois sources de carbone testées (acétate d'ammonium, hydrocarbure normal et hydrocarbure ramifié), contiennent les mêmes classes de composés que *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur ces mêmes substrats. Les principales différences que l'on peut noter en comparant les distributions des lipides de *M. hydrocarbonoclasticus* (Tableaux III.3, III.4 et III.5) avec celles de *M. aquaeolei* (Tableau IV.5) et d'*A. calcoaceticus* (Tableau IV.6) concernent respectivement l'apparition de quantités appréciables d'acides gras saturés comportant deux ramifications méthyles et d' α -hydroxy acides.

La détermination du nombre et des positions des ramifications a été effectuée grâce aux dérivés *N*-acylpyrrolidides obtenus par l'action de la pyrrolidine sur les esters méthyliques. Les Figures IV.1 et IV. 2 représentent respectivement les spectres de masse des dérivés *N*-acylpyrrolidides du méthylester des acides gras 8,15-Me₂-C_{16:0} et 10,15-Me₂-C_{16:0}, ainsi que leurs interprétations

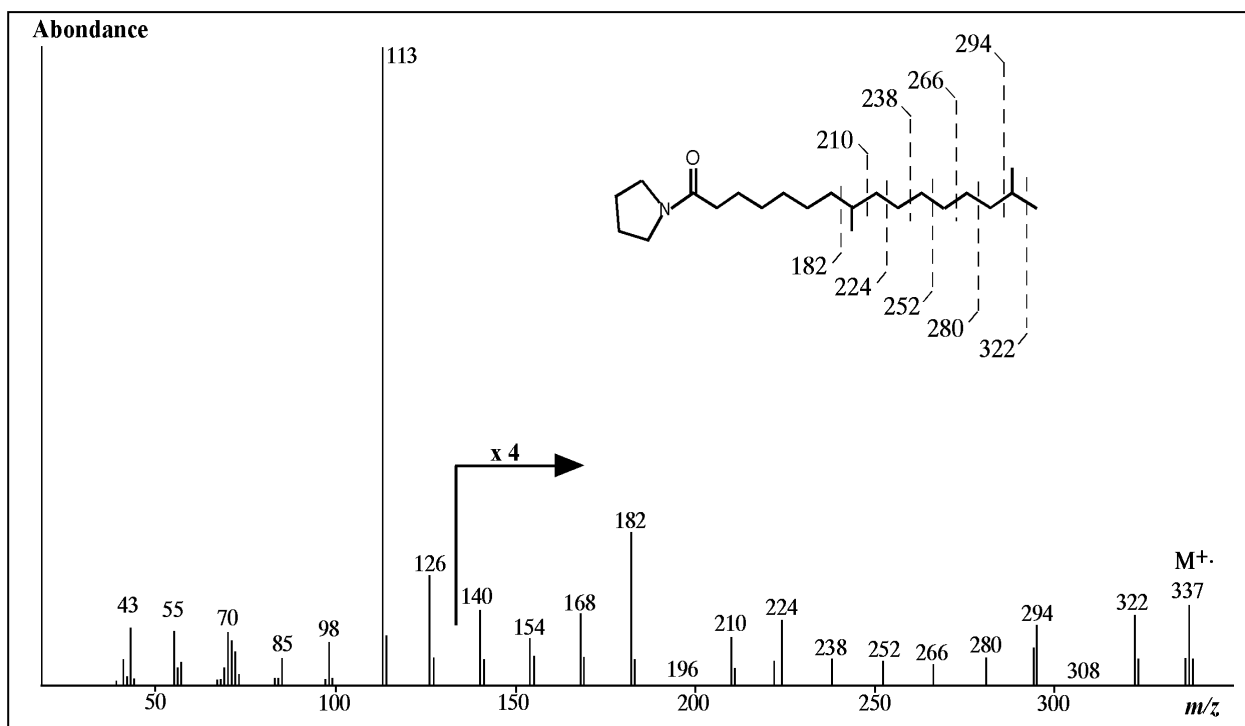


Figure IV.1. Spectre de masse du dérivé *N*-acylpyrrolidide du méthyl ester de l'acide gras 8,15-Me₂-C_{16:0}.

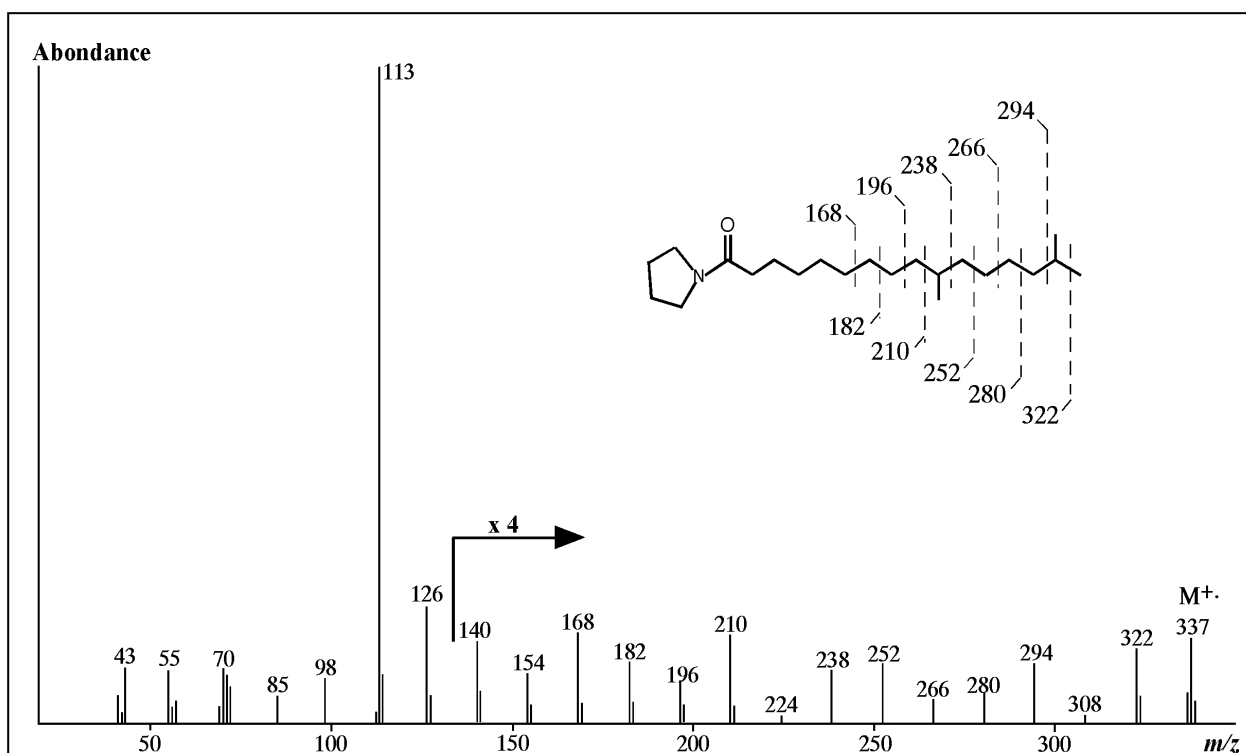


Figure IV.2. Spectre de masse du dérivé *N*-acylpyrrolidone du méthyl ester de l'acide gras 10,15-Me₂-C_{16:0}.

Des α -hydroxy acides ont été détectés chez *A. calcoaceticus* dans les lipides labiles en milieu basique et ceux labiles en milieu acide. Ces composés ont été caractérisés grâce à leurs dérivés triméthylsilylés qui présentent des coupures spécifiques en spectrométrie de masse (Figure III.42). Les Figures IV.3 et IV.4 montrent les spectres de masse des dérivés TMSi des deux α -hydroxy acides (méthyl esters) les plus abondants: α -OH, *n*-11:0 et α -OH, *n*-12:0.

Les lipides d'*A. calcoaceticus* cultivée sur *n*-nonadécane sont caractérisés par la présence d' α -méthyl- β -hydroxy acides. Les spectres de masse des dérivés TMSi de ces composés présentent des ions caractéristiques permettant leur identification (Figure IV.5).

Les Figures IV.6 et IV.7 présentent respectivement les spectres de masse des α -méthyl- β -hydroxy méthyl esters triméthylsilylés à 13 et 14 atomes de carbone. Dans chaque spectre on distingue deux pics intenses à m/z 189 et m/z M-15. Le pic à m/z 189 correspond au fragment résultant de la coupure de la liaison C _{β} -C _{γ} . A notre connaissance ce type de composés n'avait été identifié à ce jour que dans les lipopolysaccharides de *Bordetella pertussis* (Haeffner et al., 1977)

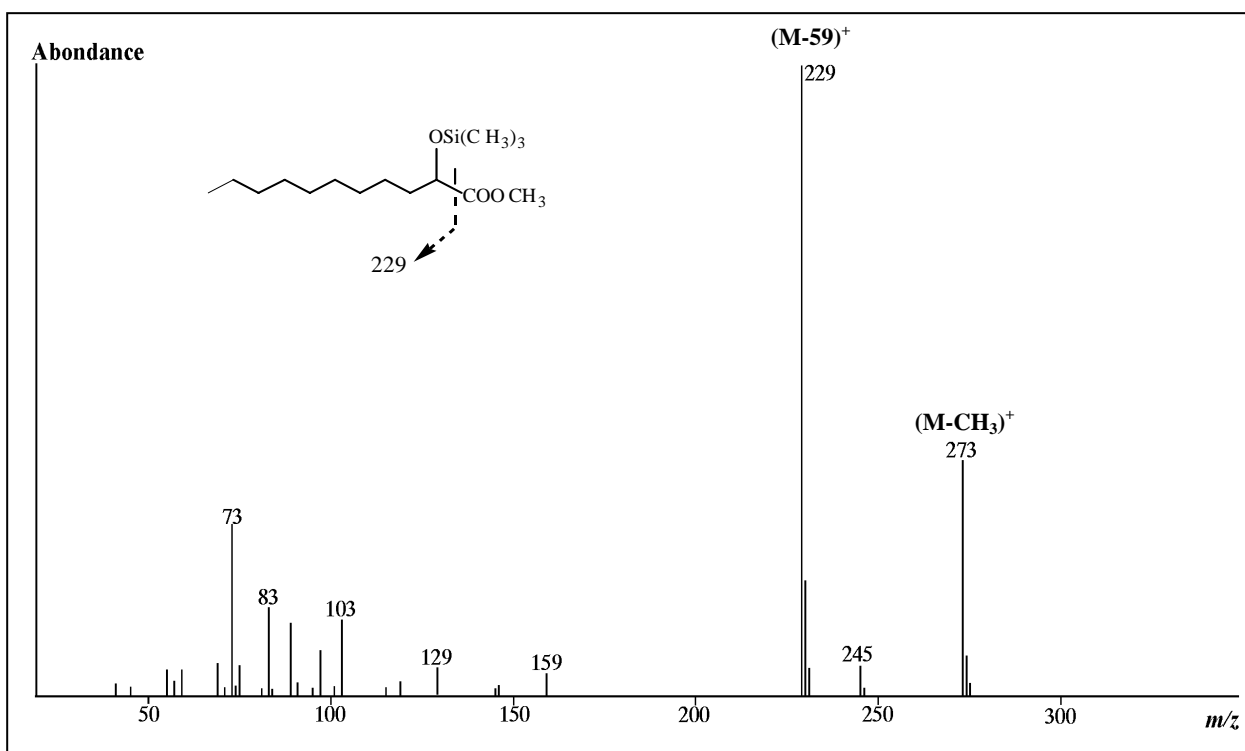


Figure IV.3. Spectre de masse du dérivé TMSi de l' α -hydroxy acide n -C_{11:0} (méthyl ester).

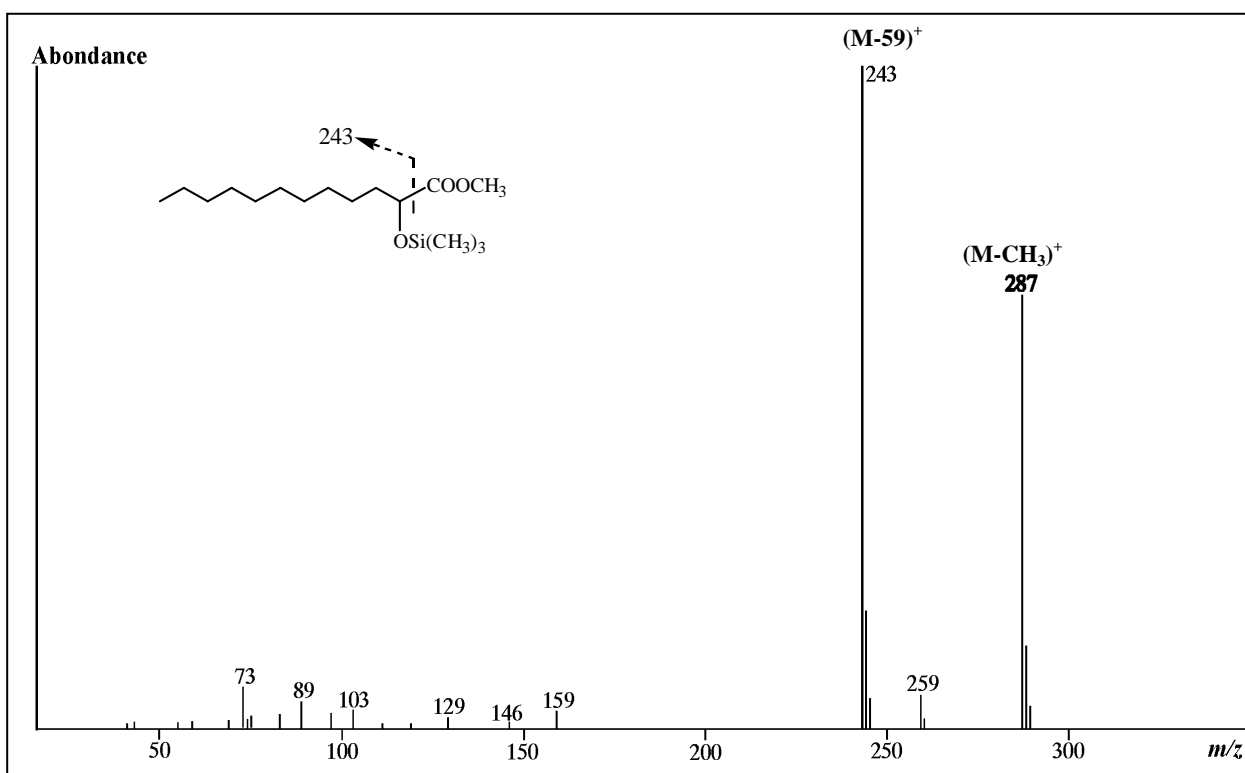


Figure IV.4. Spectre de masse du dérivé TMSi de l' α -hydroxy acide n -C_{12:0} (méthyl ester).

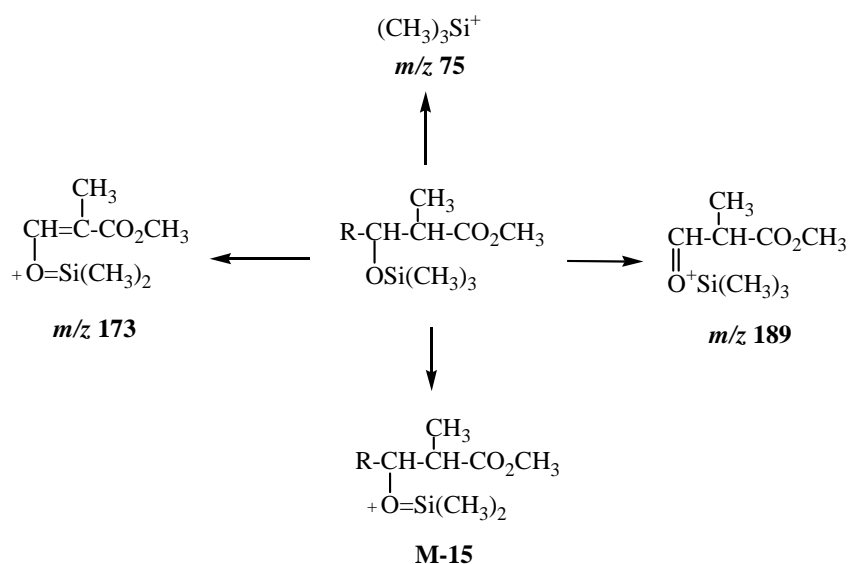


Figure IV.5. Principaux ions fragments en spectrométrie de masse des dérivés silylés des α -méthyl- β -hydroxy acides (méthyl ester).

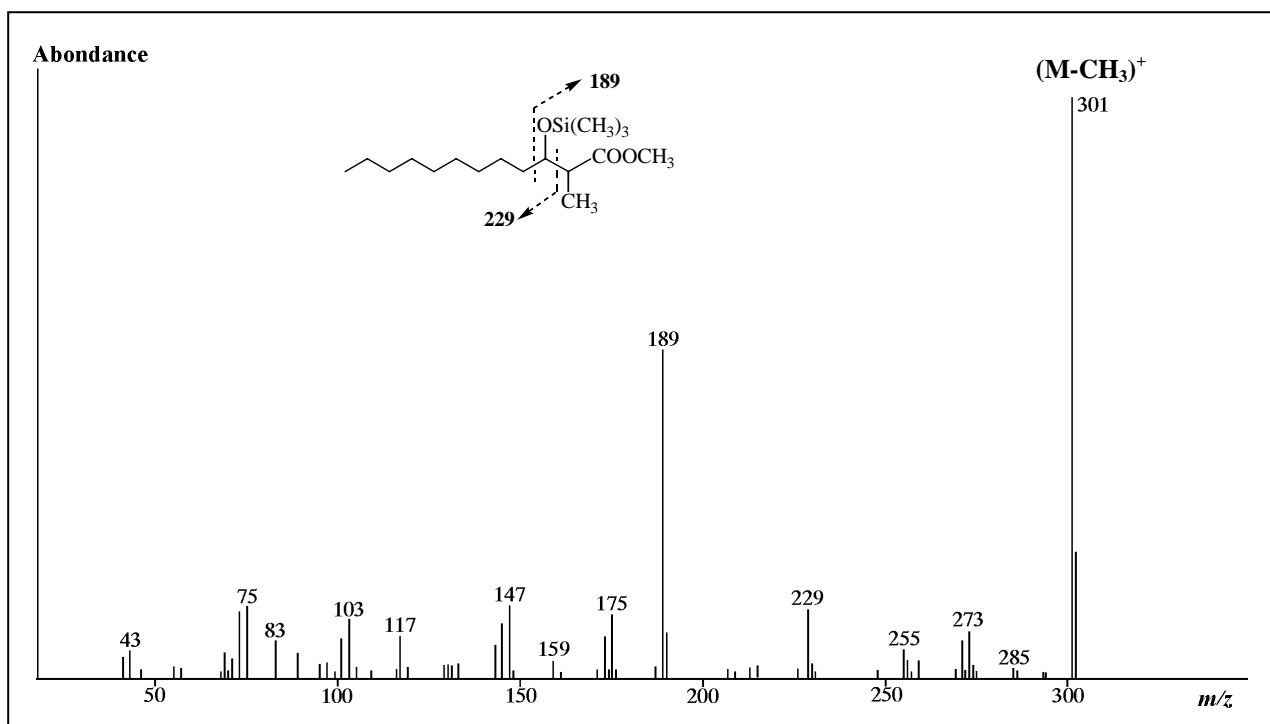


Figure IV.6. Spectre de masse du dérivé TMSi de l'acide 2-méthyl-3-hydroxy-dodécanoïque (méthyl ester).

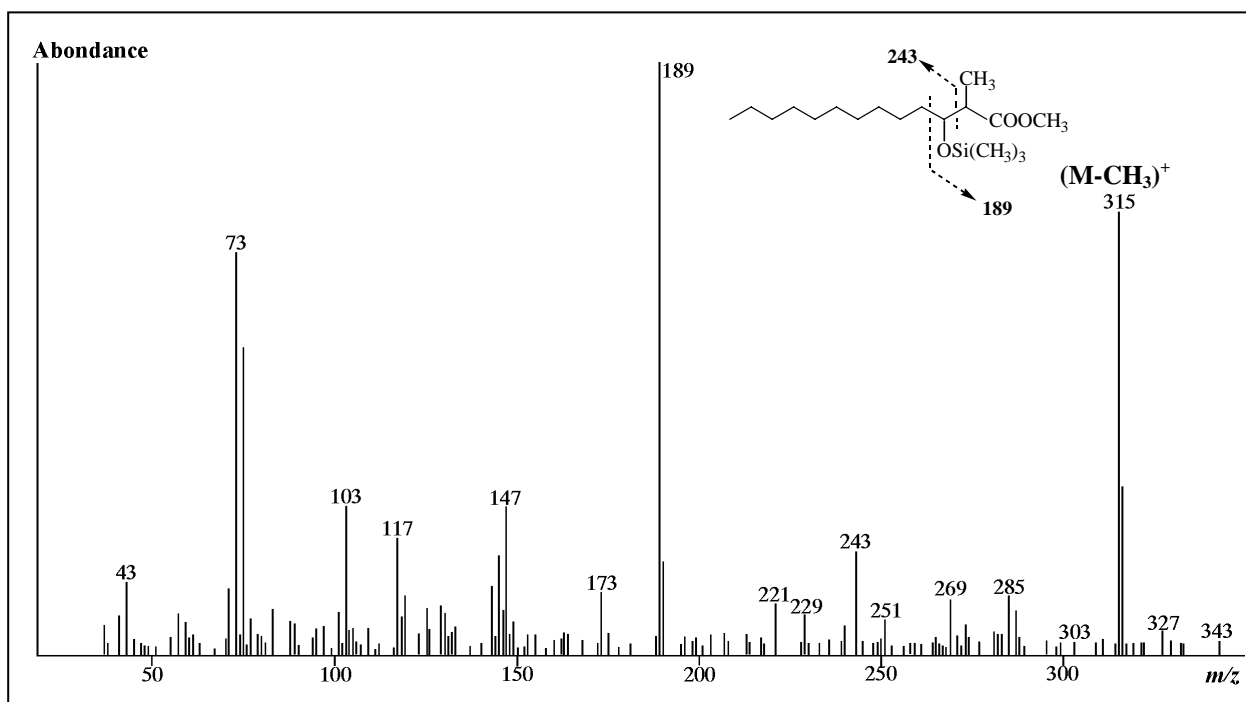


Figure IV.7. Spectre de masse du dérivé TMSi de l'acide 2-méthyl-3-hydroxy tridécanoïque (méthyl ester).

V. DISTRIBUTION DES LIPIDES DE *M. AQUAEOLEI* EN FONCTION DE LA SOURCE DE CARBONE et comparaisons avec *M. HYDROCARBONOCLASTICUS*

V.1. RESULTATS

Les lipides extraits de *M. aquaeolei* cultivée sur acétate d'ammonium, *n*-C₁₉ et *i*-C₁₉ contiennent les mêmes familles de composés que *M. hydrocarbonoclasticus*, à savoir des acides gras saturés et monoinsaturés, des hydroxy acides et des alcools saturés et monoinsaturés. La distribution de ces différentes familles dans les trois fractions lipidiques en fonction de la source de carbone est résumée dans les tableaux IV.2, IV.3 et IV.4. Les résultats relatifs à *M. hydrocarbonoclasticus* y figurent également pour comparaison. Les résultats quantitatifs détaillés relatifs à chaque famille de composé sont rassemblés dans le tableau IV.5.

V.1.1. Cultures sur acétate d'ammonium

V.1.1.1. Lipides "non liés"

Les lipides "non liés" de *M. aquaeolei* cultivée sur acétate d'ammonium comme source unique de carbone et d'énergie sont caractérisés par la présence prédominante des acides gras saturés et insaturés, essentiellement normaux à nombre pair d'atomes de carbone de C₁₂ à C₂₀ (plus de 98 % des lipides "non liés", tableau IV.2). Ces acides gras normaux saturés et insaturés représentent, respectivement, 40,5 et 55,8 % des lipides de cette fraction (Tableau IV.2). Les acides gras saturés les plus abondants sont les mêmes que dans les lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur le même substrat (Lattuati et al., 2002). Ils s'agit (en abondance relative) des acides *n*-C_{16:0} (31,6 %), *n*-C_{14:0} (4,6 %) et *n*-C_{18:0} (3,9 %). Des acides gras normaux à nombre impair d'atomes de carbone (C₁₅, C₁₇ et C₁₉; Tableau IV.5) ont été également identifiés en faible quantité (0,3 %) alors qu'ils ne représentaient que des traces dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*. Cette fraction est également caractérisée par la présence de quantités non négligeables d'acides gras ramifiés essentiellement en position 10 (2,0 % des lipides "non liés"; Tableau IV.5), alors que ces composés sont totalement absents dans cas de *M. hydrocarbonoclasticus*. Quatre acides gras ramifiés en position 10 ont été identifiés: deux à nombre impair d'atomes de carbone 10-Me-C_{16:0} et 10-Me-C_{18:0} représentant respectivement 1,7 et 0,3 %, et deux à nombre pair d'atomes de carbone 10-Me-C_{15:0} et 10-Me-C_{17:0} présents à l'états de traces. Par comparaison l'analyse des lipides de *M. aquaeolei* par Huu et al. (1999) avait révélé uniquement la présence de deux acides gras ramifiés en milieu de chaîne: 10-Me-C_{16:0} et 10-Me-C_{17:0}.

Les acides gras insaturés présents dans les lipides "non liés" sont caractérisés par une distribution simple avec prédominance des composés *n*-C_{16:1} et *n*-C_{18:1} (plus de 98 % des acides gras insaturés) dont les positions d'insaturations se trouvent essentiellement en ω9 et ω7 comme chez *M. hydrocarbonoclasticus*. Nous observons également une très faible quantité d'acides gras insaturés à nombre impair d'atomes de carbone (essentiellement *n*-C_{17:1ω8}, Tableau IV.5) dans les lipides de *M. aquaeolei* alors qu'ils étaient absents chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les alcools (0,7 %) et les β-hydroxy acides (traces) sont des constituants mineurs des lipides "non liés" de *M. aquaeolei* cultivée sur acétate; comme chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

Tableau IV.2. Composition des lipides "non liés" de *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* en fonction de la source de carbone.

Source de carbone Lipides	M. hydrocarbonoclasticus			M. aquaeolei			A. calcoaceticus		
	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉
<i>n</i> -alcan-1-ols	tr	6,0	0,7	0,7	1,2	0,5	3,5	3,0	0,3
<i>n</i> -alcan-2-ols	-	0,6	-	-	tr	-	-	0,2	-
alcan-1-ols ramifiés	-	-	6,9	-	-	0,7	-	-	0,4
alcan-2-ols ramifiés	-	-	0,2	-	-	tr	-	-	-
∑ Alcools	tr	6,6	7,8	0,7	1,2	1,2	3,5	3,2	0,7
<i>n</i> -acides saturés	29,7	40,8	13,0	40,5	46,0	7,3	37,4	35,6	2,4
<i>n</i> -acides insaturés	70,0	46,3	21,1	55,8	44,1	20,4	57,8	59,8	1,7
Acides ramifiés saturés	-	5,0	43,6	2,0	6,5	52,4	-	-	55,2
Acides ramifiés insaturés	-	-	9,6	-	-	16,4	-	-	38,1
∑ Acides	99,7	92,1	87,3	98,3	96,6	96,5	95,3	95,4	97,4
∑ hydroxy acides	tr	0,9	3,6	tr	0,1	0,3	0,9	0,6	1,4
∑ Composés pairs	99,1	20,6	35,6	96,1	20,7	35,3	98,5	9,9	14,3
∑ Composés impairs	0,6	79,0	63,1	2,6	77,2	62,7	1,1	89,3	85,2
∑ Composés normaux	97,7	94,6	34,8	96,7	91,9	28,4	99,6	99,2	5,8
∑ Composés ramifiés	-	5,0	63,9	2,0	6,5	69,5	-	tr	93,7
∑ AG saturés	29,7	45,8	56,6	42,5	52,5	59,7	37,4	35,6	57,6
AG insaturés <i>cis</i>	70,0	46,3	30,7	55,8	44,1	36,8	57,8	59,4	39,5
AG insaturés <i>trans</i>	-	-	-	-	-	-	-	0,4	0,3
∑ AG insaturés	70,0	46,3	30,7	55,8	44,1	36,8	57,8	59,8	39,8
∑ AG-C ₁₆	40,8	5,9	7,5	58,3	12,8	11,9	60,8	3,3	10,0
∑ AG-C ₁₇	tr	56,2	33,6	2,0	55,5	48,0	0,5	68,2	46,7
∑ AG-C ₁₈	54,7	13,5	26,9	32,3	7,4	21,8	32,8	5,7	2,6

AG: acides gras.

Tableau IV.3. Composition des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* en fonction de la source de carbone.

Source de carbone Lipides	M. hydrocarbonoclasticus			M. aquaeolei			A. calcoaceticus		
	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉
∑ Alcools	-	0,6	0,5	0,5	0,3	0,1	14,0	1,0	0,5
<i>n</i> -acides saturés	34,5	35,0	7,9	36,2	25,2	19,7	40,2	34,1	12,0
<i>n</i> -acides insaturés	34,1	35,9	14,0	19,1	13,6	10,3	10,5	12,6	2,3
Acides ramifiés saturés	-	1,8	18,2	0,9	2,2	14,8	-	-	13,5
Acides ramifiés insaturés	-	-	2,3	-	-	2,5	-	-	9,8
∑ Acides	68,6	72,7	42,4	56,2	41,0	47,3	50,7	46,7	37,6
<i>n</i> -β-hydroxy acides	30,6	26,6	55,2	42,5	56,9	49,5	20,4	31,6	30,8
β-hydroxy acides ramifiés	-	-	0,6	-	-	2,0	-	-	-
α-hydroxy acides	-	-	-	-	-	-	13,9	19,7	27,3
∑ hydroxy acides	30,6	26,6	55,8	42,5	56,9	51,5	34,3	51,3	58,1
β-hydroxy 12:0*	99,0	60,2	91,0	98,6	63,3	92,0	95,1	71,5	94,8
∑ Composés pairs	99,1	36,3	76,8	97,8	48,7	81,3	97,7	62,7	72,9
∑ Composés impairs	0,1	63,6	21,9	1,3	50,6	18,4	1,3	36,3	23,5
∑ Composés normaux	99,2	98,1	77,3	98,3	96,0	79,7	99,0	99,0	73,1
∑ Composés ramifiés	-	1,8	21,4	0,9	2,2	19,3	-	-	23,3
∑ AG saturés	34,5	36,8	26,1	37,1	27,4	34,5	40,2	34,1	25,5
∑ AG insaturés	34,1	35,9	16,3	19,1	13,6	12,8	10,5	12,6	12,1
∑ AG-C ₁₆	11,8	7,8	5,9	24,8	7,5	6,0	11,9	1,1	7,3
∑ AG-C ₁₇	tr	31,6	13,3	0,9	20,5	9,6	tr	11,8	11,5
∑ AG-C ₁₈	14,5	8,4	8,0	10,6	2,2	3,9	9,8	1,5	-

AG: acides gras.

*: % par rapport aux β-hydroxy acides totaux de la présente fraction.

Tableau IV.4. Composition des lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* en fonction de la source de carbone.

Source de carbone Lipides	M. hydrocarbonoclasticus			M. aquaeolei			A. calcoaceticus		
	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉	Acétate d' ammonium	<i>n</i> -C ₁₉	<i>i</i> -C ₁₉
∑ Alcools	-	7,1	2,0	1,3	1,1	1,8	36,1	0,3	0,5
<i>n</i> -acides saturés	4,8	26,2	2,9	5,4	20,7	8,2	8,8	1,3	1,5
<i>n</i> -acides insaturés	0,8	1,3	0,4	0,7	1,7	6,3	1,6	-	-
Acides ramifiés saturés	-	-	-	tr	0,6	19,2	-	-	-
Acides ramifiés insaturés	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-
∑ Acides	5,6	27,5	3,3	6,1	23,0	36,9	10,4	1,3	1,5
<i>n</i> -β-hydroxy acides	94,1	64,3	91,5	91,6	73,4	56,7	50,4	93,8	95,9
β-hydroxy acides ramifiés	-	-	1,9	-	-	2,2	-	-	-
α-hydroxy acides	-	-	-	-	-	-	2,4	0,9	tr
γ-hydroxy acides	-	-	-	-	-	-	-	-	-
∑ hydroxy acides	94,1	64,3	93,4	91,6	73,4	59,9	52,8	94,7	95,9
β-hydroxy 12:0*	99,4	60,3	94,0	99,0	71,4	94,7	34,5	54,6	37,9
β-hydroxy 14:0*	0,1	0,3	1,1	0,7	-	-	61,3	14,9	54,0
∑ Composés pairs	99,7	63,9	93,0	98,2	69,9	73,4	96,7	67,7	90,2
∑ Composés impairs	-	35,0	4,8	0,8	25,6	24,2	2,6	28,6	7,7
∑ Composés normaux	99,7	98,9	96,2	99,0	94,9	73,0	99,3	96,3	97,9
∑ Composés ramifiés	-	-	1,6	tr	0,6	24,6	-	-	-
∑ AG saturés	4,8	26,2	2,9	5,4	21,3	27,4	8,8	1,3	1,5
∑ AG insaturés	0,8	1,3	0,4	0,7	1,7	9,5	1,6	-	-

AG: acides gras.

*: % par rapport aux β-hydroxy acides totaux de la présente fraction.

Tableau IV.5. Composition lipidique de *Marinobacter aquaeolei* en fonction de la source de carbone.

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₁₉			<i>i</i> -C ₁₉		
	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles
Acides gras saturés									
<i>n</i> -10:0	-	tr	-	-	0,1	0,2	-	tr	0,2
<i>i</i> -11:0	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -11:0	-	tr	-	-	1,7	0,3	-	0,1	-
<i>i</i> -12:0	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
<i>n</i> -12:0	tr	14,1	tr	-	1,8	4,0	0,3	15,8	-
<i>i</i> -13:0	-	-	-	-	-	-	-	2,1	0,3
<i>n</i> -13:0	-	tr	tr	1,3	4,0	0,2	-	0,3	-
<i>i</i> -14:0	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-
<i>n</i> -14:0	4,6	3,7	1,1	0,3	0,1	5,1	0,2	0,1	0,2
<i>i</i> -15:0	tr	tr	tr	0,1	0,1	-	9,5	0,5	5,2
<i>n</i> -15:0	0,1	0,2	0,3	10,4	0,1	tr	0,1	0,2	0,1
6,13-Me ₂ -14:0	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
10,13-Me ₂ -14:0	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
10-Me-15:0	tr	tr	-	1,6	0,7	-	-	-	-
<i>i</i> -16:0	-	-	-	-	0,1	-	1,5	2,8	0,5
<i>n</i> -16:0	31,6	17,3	2,6	3,0	3,9	3,8	5,5	2,2	4,7
10-Me-16:0	1,7	0,8	tr	1,0	0,1	0,2	tr	-	1,6
<i>i</i> -17:0	-	tr	-	-	-	-	33,5	6,6	9,1
<i>n</i> -17:0	0,1	0,1	0,3	29,6	13,4	3,2	tr	0,5	0,5
8,15-Me ₂ -16:0	-	-	-	-	-	-	1,5	-	0,8
10,15-Me ₂ -16:0	-	-	-	-	-	-	3,0	-	0,1
10-Me-17:0	tr	-	-	3,5	1,2	0,4	-	-	-
<i>i</i> -18:0	-	-	-	-	-	-	0,7	0,2	0,3
<i>n</i> -18:0	3,9	0,8	1,0	0,4	0,1	3,5	1,2	0,5	2,5
10-Me-18:0	0,3	0,1	-	0,3	tr	-	-	-	-
<i>i</i> -19:0	-	-	-	-	-	-	2,0	1,6	1,2
<i>n</i> -19:0	0,1	tr	tr	1,0	tr	0,1	-	-	-
10,17-Me ₂ -18:0	-	-	-	-	-	-	0,3	-	0,1
<i>i</i> -20:0	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -20:0	0,1	tr	0,1	-	tr	0,3	-	tr	-

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₁₉			<i>i</i> -C ₁₉		
	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles
<i>Acides gras insaturés</i>									
<i>n</i> -13:1 ω8	-	-	-	-	1,3	-	-	0,4	-
<i>n</i> -14:1 ω9	0,1	1,5	-	-	0,1	-	-	5,2	-
<i>n</i> -14:1 ω7	-	0,3	-	-	0,1	-	-	0,3	-
<i>n</i> -14:1 ω5	tr	-	-	-	0,5	-	-	tr	-
<i>i</i> -15:1 ω8	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
<i>n</i> -15:1 ω10	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω9	tr	-	-	0,3	-	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω8	-	-	-	2,4	0,6	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω6	-	-	-	2,6	-	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω9	17,7	7,1	0,2	5,6	1,8	0,7	3,2	0,5	1,1
<i>n</i> -16:1 ω7	8,7	0,4	tr	2,3	0,8	0,3	1,6	0,3	0,5
<i>n</i> -16:1 ω5	0,3	tr	-	0,3	0,2	-	0,1	0,2	-
<i>i</i> -17:1 ω9	-	-	-	-	-	-	2,9	0,3	0,4
<i>i</i> -17:1 ω7	-	-	-	-	-	-	11,5	1,9	2,8
<i>n</i> -17:1 ω10	-	-	-	4,5	-	0,1	0,1	-	0,1
<i>n</i> -17:1 ω9	-	-	-	2,1	5,8	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω8	0,2	tr	-	17,8	1,2	0,5	-	0,3	-
<i>n</i> -17:1 ω7	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-
<i>i</i> -18:1 ω8	-	-	-	-	-	-	tr	0,2	-
<i>n</i> -18:1 ω9	25,0	9,3	0,4	3,4	0,8	0,1	15,3	3,0	4,5
<i>n</i> -18:1 ω7	3,4	0,5	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	tr	0,1
<i>i</i> -19:1 ω9	-	-	-	-	-	-	2,0	-	-
<i>n</i> -19:1 ω10	-	-	-	1,0	0,3	-	tr	0,1	-
<i>n</i> -19:1 ω9	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:1 ω8	0,1	-	-	0,5	-	-	tr	-	-
<i>β-hydroxy acides</i>									
<i>n</i> -10:0, OH	-	0,5	0,1	-	tr	-	-	0,4	0,2
<i>i</i> -11:0, OH	-	-	-	-	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -11:0, OH	-	0,1	0,1	tr	11,2	13,9	-	0,6	0,5
<i>n</i> -12:1, OH	-	tr	-	-	0,1	-	-	0,3	-

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₁₉			<i>i</i> -C ₁₉		
	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles
<i>n</i> -12:0, OH	tr	41,9	90,7	tr	36,0	52,4	0,2	47,4	55,8
<i>i</i> -13:0, OH	-	-	-	-	-	-	-	2,0	2,2
<i>n</i> -13:1 ω8, OH	-	-	-	-	2,0	0,3	-	0,1	-
<i>n</i> -13:1, OH	-	-	-	-	0,2	-	-	tr	-
<i>n</i> -13:0, OH	-	tr	0,1	-	7,4	6,8	-	0,2	0,2
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	0,6	-	-	tr	-	0,5	-
<i>i</i> -15:0, OH	-	-	-	-	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -16:0, OH	-	-	tr	-	-	-	-	tr	-
<i>i</i> -17:0, OH	-	-	-	-	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -17:0, OH	-	-	-	tr	-	-	-	-	-
<i>n</i> -18:0, OH	tr	-	-	-	-	-	-	0,1	-
<i>i</i> -19:0, OH	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	-
<i>n</i> -19:0, OH	-	-	-	0,1	tr	-	-	-	-
Alcools									
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,5	0,3	0,9	0,1	0,1	tr	0,3	-	1,0
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,2	0,2	0,4	0,1	0,1	1,0	0,2	0,1	0,8
2Me-18:0, 1-OH	-	-	-	-	-	-	tr	-	-
<i>i</i> -19:1, 1-OH	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-
<i>i</i> -19:0, 1-OH	-	-	-	-	-	-	0,1	tr	tr
<i>i</i> -19:0, 2-OH	-	-	-	-	-	-	tr	-	-
<i>n</i> -19:1ω10, 1-OH	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:1ω9, 1-OH	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:1ω8, 1-OH	-	-	-	tr	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:0, 1-OH	-	tr	-	0,6	0,1	tr	-	-	-
<i>n</i> -19:0, 2-OH	-	-	-	tr	-	-	-	-	-
<i>n</i> -20:0, 1-OH	-	tr	tr	-	tr	0,1	-	tr	-

Les abondances relatives des β-méthoxy acides présents ont été additionnées aux β-hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, dont ils sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influence sur ces lipides) représentent seulement entre 0,2 % et 2,3 % des lipides totaux.

En résumé, chez les deux espèces de *Marinobacter* que nous avons cultivées sur acétate, les principaux composés sont par ordre de grandeur décroissante les acides gras:

16:0 > 18:1 > 16:1 ω 9 > 16:1 ω 7, *M. aquaeolei*

18:1 > 16:0 > 16:1 ω 9 > 16:1 ω 7, *M. hydrocarbonoclasticus*

Chez *M. aquaeolei*, les plus fortes proportions d'acide palmitique (31,6 % contre 22,4 %) et d'acide 16:1 ω 9 (17,7 % contre 10,6 %) sont contrebalancées par une présence moindre d'acide oléique (25,0 % contre 44,3 %).

V.1.1.2. Lipides labiles en milieu basique

La composition des lipides labiles en milieu basique de *M. aquaeolei* cultivée sur acétate d'ammonium présente des similitudes avec celle de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur le même substrat. La distribution de ces lipides est caractérisée par la prédominance des acides gras saturés et insaturés (au total 56,2 %) et des quantités importantes de β -hydroxy acides constituant 42,5 % de cette fraction (Tableau IV.3). Ces deux classes de composés correspondent respectivement à 68,6 et 30,6 % des lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les acides gras saturés sont nettement plus abondants que les insaturés. Ils représentent respectivement 36,2 et 19,1 % chez *M. aquaeolei* alors qu'ils sont dans des proportions presque égales dans le cas de cas de *M. hydrocarbonoclasticus*. Dans ces deux bactéries, la distribution des acides gras est caractérisée par une forte prédominance de composés normaux à nombre pair d'atomes de carbone. Les acides gras *n*-C_{12:0} et *n*-C_{16:0} sont les plus abondants (Tableau IV.5). Seuls deux acides gras ramifiés ont été observés: 10-Me-C_{16:0} et 10-Me-C_{18:0}, respectivement 0,8 et 0,1 % des lipides labiles en milieu basique.

Les acides *n*-C_{16:1} et *n*-C_{18:1} (ω 9 et dans une moindre mesure ω 7) sont les acides gras insaturés prédominants (plus de 90 % des acides gras insaturés)(Tableau IV.5 et IV.6) alors qu'ils ne représentent qu'approximativement 50 % dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*. Cette dernière bactérie se caractérise par des proportions importantes d'acides gras insaturés à courtes chaînes *n*-12:1 et *n*-14:1 (Tableau III.4, Lattuari et al., 2002).

Les β -hydroxy acides représentent une partie importante des lipides labiles en milieu basique. Ils sont essentiellement normaux à nombre pair d'atomes de carbone, caractérisés par une forte prédominance du *n*- β -12:0 (plus de 98 % des β -hydroxy acides, Tableau IV.3). Des β -méthoxy acides ont été également identifiés dans cette fraction, mais en raison de leur

origine artificielle (voir chapitre III), leur pourcentage a été inclus avec celui des β -hydroxy acides.

V.1.1.3. Lipides labiles en milieu acide

Comme dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*, les lipides obtenus par hydrolyse acide des résidus des biomasses bactériennes de *M. aquaeolei* présentent une forte abondance en β -hydroxy acides, ces composés constituant 91,6 % de cette fraction contre 94,1 % chez *M. hydrocarbonoclasticus* (Tableau IV.4). Le *n*- β -12:0 est le composé prédominant cette série (99,0 %; Tableau IV.4), comme pour *M. hydrocarbonoclasticus*; les homologues inférieurs (*n*-10:0 et *n*-11:0) et supérieurs (*n*-13:0 et *n*-14:0) sont des composés très mineurs.

Les acides gras sont également présents dans cette fraction, mais constituent des composés de moindre importance comparés aux deux fractions précédentes: 6,1 % (Tableau IV.4). Les acides *n*-16:1 et *n*-18:1 sont les seuls acides gras insaturés présents dans les lipides labiles en milieu acide de *M. aquaeolei* (Tableau IV.5).

Les alcools constituent 1,3 % de la fraction labile en milieu acide, alors qu'ils étaient complètement absents dans la même fraction chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

V.1.2. Cultures sur *n*-nonadécane

Les lipides de *M. aquaeolei* cultivée sur *n*-nonadécane contiennent les mêmes classes de composés que chez la bactérie cultivée sur acétate d'ammonium. Les distributions de ces lipides sont rapportées dans le tableau IV.5.

V.1.2.1. Lipides "non liés"

Les lipides "non liés" de *M. aquaeolei* cultivée sur *n*-C₁₉ sont dominés par les acides gras, constituant plus de 96 % de cette fraction (Tableau IV.2). Les acides gras saturés et insaturés principaux sont les composés normaux à nombre impair d'atomes de carbone de C₁₃ à C₁₉ (Tableaux IV.2 et IV.5). Les acides gras normaux saturés et insaturés sont dans des proportions presque égales (approximativement 45 % chacun; Tableau IV.2). Les principaux acides gras saturés identifiés sont (en abondance relative) les acides *n*-C_{17:0} (29,6 %) et *n*-C_{15:0} (10,4 %). D'autres acides gras normaux tels que *n*-C_{13:0}, *n*-C_{16:0} et *n*-C_{19:0} sont également

présents. En ce qui concerne les acides gras ramifiés, ils représentent 6,5 % : on observe essentiellement des composés ramifiés en position 10. Contrairement à la culture sur acétate d'ammonium les acides 10-Me-C_{15:0} et 10-Me-C_{17:0} sont plus abondants que leur homologues à chaîne principale paire.

Les acides gras insaturés sont dominés par les acides *n*-C_{17:1} (au total 24,9 %) dont l'insaturation se trouve par ordre d'importance décroissance en ω8, ω10, ω9, comme chez *M. hydrocarbonoclasticus*. Deux autres séries d'acides gras insaturés à nombre impair d'atomes de carbone sont également présents: *n*-C_{15:1} (5,6 %) et *n*-C_{19:1} (1,9 %). En ce qui concerne les acides gras normaux à nombre pair d'atomes de carbone, les acides *n*-C_{16:1} et *n*-C_{18:1} (ω9 prédominants) sont présents en plus faibles quantités que dans le cas de la culture sur acétate d'ammonium (8,2 et 3,5 % contre 26,7 et 28,4 % respectivement).

Les alcools saturés et insaturés sont des produits mineurs: 1,2 % des lipides "non liés". Les principaux composés sont ceux dérivant directement du *n*-nonadécane. Comme chez *M. hydrocarbonoclasticus*, l'alcool saturé primaire *n*-19:0,1-OH est prédominant (0,6 %), suivi du composé monoinsaturé *n*-19:1,1-OH (0,4 %). L'analyse par spectrométrie de masse des adduits DMDS de ces derniers composés, coéluant en CG, montre également la présence de trois isomères, par ordre d'importance décroissante: ω9, ω10 et ω8. Des traces d'alcool secondaire *n*-19:0,2-OH ont été aussi détectées.

Enfin, quatre β-hydroxy acides ont été identifiés: *n*-19:0 (0,1 %), *n*-17:0, *n*-12:0 et *n*-11:0, ces trois derniers à l'état de traces. Seuls les β-hydroxy acides *n*-19:0 et *n*-17:0 avaient été détectés chez *M. hydrocarbonoclasticus*.

V.1.2.2. Lipides labiles en milieu basique

Les lipides labiles en milieu basique de *M. aquaeolei* cultivée sur *n*-nonadécane contiennent les mêmes classes de composés que les fractions "non liés", avec cependant une distribution plus complexe.

Les acides gras et les β-hydroxy acides normaux sont les constituants les plus abondants: ils constituent respectivement 41,0 et 56,9 % de cette fraction (Tableau IV.3), alors que dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus* les acides gras sont les composés prédominants (72,7 %; Tableau III.6).

La distribution des β -hydroxy acides est caractérisée par une forte contribution du n - β -12:0 (63,3 % des β -hydroxy acides présents; Tableau IV.3). Des quantités appréciables de ses homologues supérieurs et inférieurs β -OH-11 (11,2 %) et β -OH-13 (9,6 %, saturés + insaturés) ont été également détectées (Tableau IV.5). Leur présence suggère qu'ils sont des métabolites de la dégradation du n -nonadécane. Un autre métabolite de la dégradation du n -nonadécane a été identifié à l'états de traces: il s'agit du n - β -19:0. Ces résultats sont similaires avec ceux obtenus dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus* où l'hydroxy acide prédominant est n - β -12:0 (60,2 % des β -hydroxy acides de cette fraction; tableau IV.3), accompagné de quantités importantes de ses deux homologues inférieur et supérieur à 11 et 13 atomes de carbone (Tableau III.4).

Parmi les acides gras, les saturés sont prédominants (27,4 %: 25,2 % normaux et 2,2 % ramifiés; Tableau IV.3). Ils représentent environ le double de leur homologues insaturés (13,6 %; Tableau IV.3), alors qu'ils étaient dans des proportions presque égales dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*. Les acides gras normaux saturés sont essentiellement à nombre impair d'atomes de carbone. Les acides gras à courtes chaînes à 10, 11 et 12 atomes de carbone sont des composés minoritaires (< 5 %), l'acide n -C_{17:0} étant le composé le plus abondant (Tableau IV.5).

Les acides gras insaturés sont en grande partie à nombre impair d'atomes de carbone; les composés n -17:1 (ω 9 et ω 8) sont prédominants (7 % des lipides de cette fraction, Tableau IV.5) comme chez *M. hydrocarbonoclasticus* (insaturation en position ω 8 et ω 10).

V.1.2.3. Lipides labiles en milieu acide

Comme dans le cas des cultures de *M. hydrocarbonoclasticus* sur alcanes normaux, les lipides labiles en milieu acide de *M. aquaeolei* cultivée sur n -nonadécane sont caractérisés par la prédominance des β -hydroxy acides à chaîne courte (73,4 % de cette fraction, Tableau IV.4). Le composé le plus abondant est le n - β -12:0, constituant 52,4 % (Tableau IV.5). Les β -hydroxy acides à nombre impair d'atomes de carbone sont aussi présents en quantités importantes: le n - β -11:0 et n - β -13:0 contribuent respectivement pour 13,9 et 6,8 % de cette fraction (Tableau IV.5).

Par ailleurs, les acides gras constituent 23,0 % des lipides labiles en milieu acide (Tableau IV.4). La distribution de ces acides est caractérisée par la prédominance des composés saturés (plus de 90 % des acides gras de cette fraction). Ils sont essentiellement normaux à nombre pair d'atomes de carbone de $n\text{-C}_{10:0}$ à $n\text{-C}_{20:0}$, les composés les plus abondants comportent 14, 16 et 18 atomes de carbone.

Enfin, les alcools sont des composés minoritaires dans cette fraction (1,1 %; Tableau IV.4). Ils présentent une distribution similaire à celle observée chez *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur le même substrat: une prédominance des composés pairs essentiellement à 18 atomes de Carbone (Tableaux IV.5 et III.5).

V.1.3. Culture sur *iso*-nonadécane

V.1.3.1. Lipides "*non liés*"

L'analyse par CG et CG/SM des lipides "*non liés*" de *M. aquaeolei* cultivée sur $i\text{-C}_{19}$, montre la prédominance des acides gras de C_{12} à C_{20} (Tableaux IV.5), représentant plus de 96 % de cette fraction. Les acides gras ramifiés sont les composés les plus abondants avec 68,8 % (52,4 % saturés et 16,4 % insaturés; Tableau IV.2). Ces acides sont essentiellement *iso* à nombre impair d'atomes de carbone. Les acides gras normaux sont présents en moindre quantité (27,7 %) par comparaison aux cultures sur acétate d'ammonium et $n\text{-C}_{19}$.

Le composé majoritaire des acides gras saturés ramifiés est l' $iso\text{-C}_{17:0}$ (33,5 %; Tableau IV.5). Deux autres acides gras *iso* ont été identifiés en quantités importantes: il s'agit des acides $i\text{-C}_{15:0}$ et $i\text{-C}_{19:0}$. Une quantité appréciable d'acides gras portant deux ramifications méthyles (5,2 %; Tableau IV.5) est présente: il s'agit des 10,13- $\text{Me}_2\text{-14:0}$, 8,15- $\text{Me}_2\text{-16:0}$, 10,15- $\text{Me}_2\text{-16:0}$ et 10,17- $\text{Me}_2\text{-18:0}$; les composés portant une ramification méthyle en position 10 sont ici minoritaires par rapport à la culture sur $n\text{-C}_{19}$. Les acides gras ramifiés insaturés sont près de deux fois plus abondants dans les lipides "*non liés*" de *M. aquaeolei* que de *M. hydrocarbonoclasticus* (Tableau IV.2). Les acides gras ramifiés insaturés les plus abondants chez ces deux bactéries sont: $i\text{-C}_{19:1}$ ($\omega 9$) et $i\text{-C}_{17:1}$ ($\omega 9$ et $\omega 7$). De faibles quantités d'acides gras saturés *iso* à nombre pair d'atomes de carbone (2,2 %) sont également présentes.

En ce qui concerne les acides gras normaux, la distribution chez *M. aquaeolei* est caractérisée par un maximum au niveau de l'acide oléique ($n\text{-C}_{18:1\omega 9}$) tout comme *M. hydrocarbonoclasticus*.

Les alcools constituent 1,2 % des lipides "non liés" de *M. aquaeolei* (Tableau IV.2). Quatre alcools à 19 atomes de carbones ont été identifiés (Tableau IV.5): $i\text{-19:0,1-OH}$; $i\text{-19:1,1-OH}$; $i\text{-19:0,2-OH}$ et 2-Me-18:0,1-OH .

Enfin, seuls deux β -hydroxy acides ont été identifiés: $i\text{-}\beta\text{-19:0}$ (0,1 %) et $n\text{-}\beta\text{-12:0}$ (0,2 %) (Tableau IV.5).

V.1.3.2. Lipides labiles en milieu basique

Comme dans le cas des cultures sur acétate d'ammonium et sur $n\text{-C}_{19}$, les lipides labiles en milieu basique sont caractérisés par la prépondérance des β -hydroxy acides: 51,5 %, avec une forte contribution du $n\text{-}\beta\text{-12:0}$ (représentant plus de 90 % des β -hydroxy acides de cette fraction; Tableau IV.3). Les homologues inférieurs et supérieurs sont présents mais en faibles quantités. De plus une série de β -hydroxy acides iso, à nombre impair d'atomes de carbone a été identifiée. Son composé principal est l' $i\text{-}\beta\text{-OH-13:0}$ (2,0 %; Tableau IV.5).

Les acides gras saturés sont plus abondants que leurs homologues insaturés (34,5 %: 19,7 % normaux et 14,8 % ramifiés; Tableau IV.3). Les acides gras saturés les plus abondants sont $n\text{-C}_{12:0}$ et $i\text{-C}_{17:0}$, 15,8 et 6,6 % respectivement (Tableau IV.5). Parmi les acides gras insaturés, les composés principaux sont $n\text{-C}_{14:1\omega 9}$ et $n\text{-C}_{18:1\omega 9}$.

Les alcools présents dans cette fraction sont peu nombreux et en faible quantité, ils sont normaux à nombre pair d'atomes de carbone.

V.1.3.3. Lipides labiles en milieu acide

Comme dans les cultures sur acétate d'ammonium et sur $n\text{-C}_{19}$, les lipides labiles en milieu acide de *M. aquaeolei* cultivée sur $i\text{-C}_{19}$ sont caractérisés par la prédominance des β -hydroxy acides (59,0 % de cette fraction, Tableau IV.4). Le $n\text{-}\beta\text{-12:0}$ est le composé le plus abondant dans de cas de *M. aquaeolei* (94,7 % des β -hydroxy acides de cette fraction;

Tableau IV.4) comme chez *M. hydrocarbonoclasticus* (94 %). Les autres β -hydroxy acides sont ses homologues inférieurs *n*-10 et *n*-11, et supérieurs *n*-13, et l'*iso*-13:0.

Les acides gras labiles en milieu acide constituent 36,9 % de cette fraction (Tableau IV.4). Leur distribution est très complexe: les acides gras saturés sont les plus abondants (approximativement 75 % des acides gras de cette fraction), les composés ramifiés sont essentiellement *iso* impair caractérisés par de fortes contributions des acides à 17 et 15 atomes de carbone; les acides gras normaux saturés sont essentiellement pairs (*n*-C_{16:0} et *n*-C_{18:0} sont les deux composés les plus abondants; Tableau IV.5). Ces acides gras qui sont des composés minoritaires dans la fraction lipidique équivalente de *M. hydrocarbonoclasticus* ne parviennent pas d'une extraction incomplète des lipides labiles en milieu basique. En effet, le *n*-C_{12:0}, l'acide gras majoritaire labile en milieu basique, n'a pas été détecté dans cette fraction.

Des alcools ont été aussi détectés dans cette fraction leur distribution est similaire à celle de *M. hydrocarbonoclasticus*: ils sont normaux, à 16 et 18 atomes de carbone.

V.2. DISCUSSION

V.2.1. Influence de la nature de la source de carbone sur la composition lipidique

Les compositions lipidiques des deux espèces de *Marinobacter* offrent de nombreuses similitudes: la structure des lipides, notamment des acides gras, dépend fortement de celle du substrat. Dans les deux cas, une source de carbone à nombre de carbone pair induit la formation d'acides gras à nombre pair d'atomes de carbone, essentiellement C₁₆ et C₁₈. Le contraire est observé dans le cas d'un substrat à nombre d'atomes de carbone impair, comme les alcanes *n*-C₁₉ et *i*-C₁₉. On peut cependant noter une plus grande abondance des composés C₁₈ par rapport au C₁₆ chez *M. hydrocarbonoclasticus*, alors que l'inverse se manifeste chez *M. aquaeolei*.

La principale différence entre les deux espèces concerne les composés ramifiés en milieu de chaîne. Alors que leur présence est aléatoire chez *M. hydrocarbonoclasticus*, ils sont toujours présents chez *M. aquaeolei*. Chez cette dernière leur structure varie en fonction du substrat. Lors de la culture sur acétate d'ammonium, les deux acides méthylés principaux détectés ont une chaîne alkyle comportant un nombre d'atomes de carbone pair: 10-Me-16:0 et 10-Me-18:0, dans la culture sur *n*-C₁₉, à ces deux acides, s'ajoutent deux composés dont la chaîne principale comporte un nombre impair d'atomes de carbone: 10-Me-15:0 et 10-Me-17:0. Enfin, dans la culture sur *i*-C₁₉, tous ces composés mono-méthylés ont quasiment disparu au profit d'acides gras diméthylés comportant un méthyle en position subterminale (*iso*) et un en milieu de chaîne en position 10: 10,13-Me₂-14:0, 10,15-Me₂-16:0 et 10,17-Me₂-18:0, en position 8: 8,15-Me₂-14:0 ou en position 6: 6,13-Me₂-14:0. La structure de ces composés suggère qu'ils dérivent d'acides gras monoinsaturés normaux pour les acides monométhylés, ou monoinsaturés *iso* pour les acides diméthylés, par méthylation d'une insaturation, la S-adenosylméthionine agissant probablement comme donneur de groupement méthyle. L'intervention d'une telle réaction a été démontrée pour la biosynthèse de l'acide tuberculostéarique (10-Me-18:0) chez *Mycobacterium tuberculosis* (Fulco, 1983).

La présence des acides méthylés en position 10 chez *M. aquaeolei* confirme qu'ils ne sont pas spécifiques des bactéries du genre *Desulfovibrio* (Parkes et al., 1993; Doumenq et al., 1999, 2000) ou *Mycobacterium* (Brennan, 1988).

V.2.2. Variation de la composition en β -hydroxy acides

L'influence de la source de carbone sur la structure des β -hydroxy acides de *M. aquaeolei* est très similaire à celle révélée dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus* aussi bien en ce qui concerne ceux dérivant du métabolisme des hydrocarbures que ceux liés aux LPS. Ces derniers, de très loin les plus abondants, sont dominés par le β -hydroxy acide n - β -OH-12:0. Ceci suggère pour le lipide A des LPS des deux espèces de *Marinobacter*, une structure telle que celle présentée dans la Figure IV.8, certains groupements hydroxyyles des chaînes alkyles étant estérifiés par des acides gras saturés. Une proportion appréciable de β -hydroxy acides normaux à nombre de carbone impair, est acceptée dans les LPS lorsque la bactérie est cultivée sur C_{19} , jusqu'à 21 % dans le cas des β -hydroxy acides liés par liaison amide. Par comparaison seule une faible proportion de β -hydroxy acide *iso* peuvent être inclus dans les LPS.

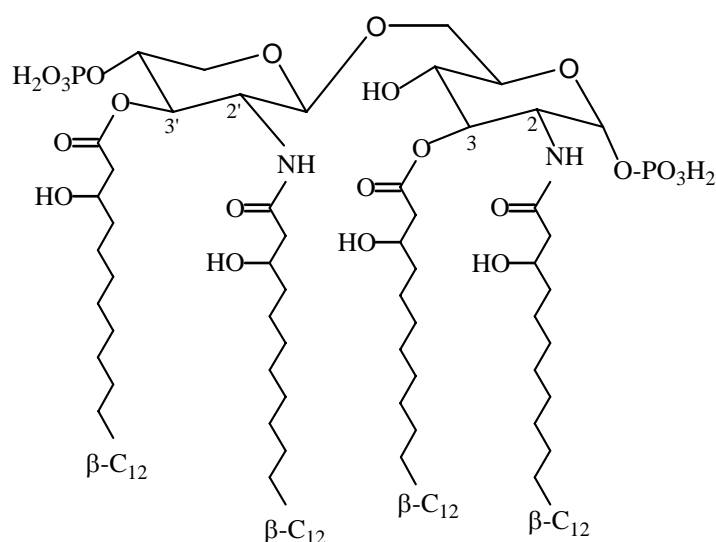


Figure IV.8. Structure simplifiée du lipide A des deux espèces de *Marinobacter*.

V.2.3. Métabolisme des hydrocarbures

Au vu des résultats des analyses des lipides non liés de *M. aquaeolei*, il apparaît que la dégradation des hydrocarbures s'effectue comme chez *M. hydrocarbonoclasticus*: oxydation terminale en alcools, puis en acides, suivie d'une β -oxydation. L'oxydation subterminale en alcool secondaire, tout comme l'oxydation terminale du côté de la terminaison stériquement encombrée sont des voies minoritaires.

VI. DISTRIBUTION DES LIPIDES D'*A. CALCOACETICUS* EN FONCTION DE LA SOURCE DE CARBONE ET COMPARAISON AVEC *M. HYDROCARBONOCLASTICUS*

VI.1. Résultats

Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, une des principales caractéristiques d'*A. calcoaceticus* du point de vue de la composition lipidique est la présence d' α -hydroxy acides en quantité substantielle, alors qu'un seul de ces composés a été trouvé à l'état de trace dans une culture de *M. hydrocarbonoclasticus*. L'analyse détaillée des lipides isolés des cultures sur acétate, *n*-nonadécane et *iso*-nonadécane a révélé plusieurs autres différences.

VI.1.1. Culture sur acétate

VI.1.1.1. Lipides "non liés"

Comme chez les deux espèces de *Marinobacter* cultivées sur le même substrat, les acides gras représentent plus de 95 % des lipides "non liés" (Tableau IV.2). De même les acides palmitique (16:0) et oléique (18:1 ω 9) sont les acides prépondérants (34,8 % et 30,5 %, respectivement; Tableau IV.6); viennent ensuite les acides gras monoinsaturés 16:1 ω 7 (palmitoléique) et 16:1 ω 9, dont les proportions sont inversées par rapport à *M. aquaeolei* (ici 20,2 et 5,2 % respectivement). Aucun acide gras à chaîne hydrocarbonée ramifiée n'a été détecté. Au total les acides gras insaturés étaient dominants (57,8 %) par rapport aux saturés (37,4 %) (Tableau IV.2). De plus seuls trois acides gras à nombre impair d'atomes de carbone ont été identifiés, *n*-15:0 (0,5 %), *n*-17:0 (0,1 %) et *n*-17:1 ω 8 (0,4 %) (Tableau IV.6).

Une série d'une dizaine d'alcools allant de C₁₂ à C₁₈, représentaient au total 3,5 % des lipides extractibles (Tableau IV.2), les principaux étant les composés 16:0, 1-OH (1,2 %) et 18:1, 1-OH (1,0 %).

Enfin, une très faible quantité de β -hydroxy acides a été décelée (\approx 1 %), essentiellement l'acide *n*- β -OH-12:0 (0,9 %; Tableau IV.6).

Tableau IV.6. Composition lipidique d'*Acinetobacter calcoaceticus* en fonction de la source de carbone.

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₁₉			<i>i</i> -C ₁₉		
	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles
Acides gras saturés									
<i>n</i> -10:0	-	1,2	0,3	-	5,3	-	-	-	-
<i>n</i> -11:0	-	-	tr	-	7,1	-	-	-	-
<i>n</i> -12:0	0,2	24,5	1,4	-	12,6	-	-	8,4	-
<i>n</i> -13:0	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
<i>n</i> -14:0	0,4	2,3	0,1	0,2	0,2	0,6	tr	tr	-
<i>i</i> -15:0	-	-	-	tr	-	-	5,9	2,5	-
<i>n</i> -15:0	0,5	0,7	0,2	8,1	2,9	tr	-	-	-
<i>i</i> -16:0	-	-	-	-	-	-	5,9	1,2	-
<i>n</i> -16:0	34,8	9,4	5,6	2,8	1,1	0,4	2,4	3,8	1,5
<i>i</i> -17:0	-	-	-	tr	-	-	41,1	9,8	-
<i>n</i> -17:0	0,1	tr	0,3	23,1	4,1	0,1	-	-	-
<i>i</i> -18:0	-	-	-	-	-	-	1,1	-	-
<i>n</i> -18:0	1,4	2,1	0,9	0,3	0,1	0,2	-	-	-
2Me-18:0	-	-	-	-	-	-	tr	-	-
<i>i</i> -19:0	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-
<i>n</i> -19:0	-	-	-	1,1	0,1	-	-	-	-
Acides gras insaturés									
<i>n</i> -11:1 ω8	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
<i>n</i> -12:1 ω9	-	0,3	-	-	0,3	-	-	-	-
<i>n</i> -13:1 ω10	-	-	-	-	2,2	-	-	-	-
<i>i</i> -15:1 ω9	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
<i>n</i> -15:1 ω10	-	-	-	0,2	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω9	-	-	-	0,1	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω8	-	-	-	tr	0,1	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω6	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω9	5,2	0,3	-	0,1	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω8	tr	-	-	-	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω7	20,2	2,2	0,2	0,4	tr	-	1,7	2,3	-
<i>n</i> -16:1 ω6	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>i</i> -17:1 ω9	-	-	-	-	-	-	3,0	0,7	-

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₁₉			<i>i</i> -C ₁₉		
	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles
<i>i</i> -17:1 ω8	-	-	-	-	-	-	0,4	0,7	-
<i>i</i> -17:1 ω7 <i>c</i>	-	-	-	-	-	-	2,0	0,3	-
<i>i</i> -17:1 ω7 <i>t</i>	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
<i>n</i> -17:1 ω10	-	-	-	2,2	-	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω9	-	-	-	23,0	3,7	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω8 <i>c</i>	0,4	-	-	17,7	4,0	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω8 <i>t</i>	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω7	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω6	-	-	-	0,9	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -17:1 ω5	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>i</i> -18:1 ω8 <i>c</i>	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-
<i>i</i> -18:1 ω8 <i>t</i>	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
<i>n</i> -18:1 ω9 <i>c</i>	30,5	7,4	1,4	5,4	1,4	-	-	-	-
<i>n</i> -18:1 ω9 <i>t</i>	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -18:1 ω7	0,9	-	-	-	tr	-	-	-	-
<i>i</i> -19:1 ω9	-	-	-	-	-	-	30,5	8,1	-
<i>n</i> -19:1 ω10	-	-	-	5,7	0,8	-	-	-	-
<i>n</i> -19:1 ω9	-	-	-	1,7	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -19:1 ω8	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:1 ω7	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
<i>β</i>-hydroxy acides									
<i>n</i> -10:0, OH	tr	0,2	-	tr	0,5	-	-	-	-
<i>n</i> -11:0, OH	-	tr	-	tr	5,9	1,5	-	0,4	-
<i>n</i> -12:0, OH	0,9	19,4	17,4	0,5	22,6	51,3	0,9	29,2	36,4
<i>i</i> -13:0, OH	-	-	-	-	-	-	-	tr	-
<i>n</i> -13:0, OH	-	0,3	2,1	-	2,3	26,8	tr	0,6	6,4
<i>n</i> -14:1, OH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -14:0, OH	tr	0,5	30,9	tr	0,3	14,0	-	0,6	51,8
<i>n</i> -15:0, OH	-	-	-	-	tr	0,2	-	-	1,3
<i>n</i> -16:0, OH	tr	tr	tr	-	-	tr	-	-	-
<i>n</i> -18:0, OH	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:0, OH	-	-	-	0,1	tr	-	-	-	-

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₁₉			<i>i</i> -C ₁₉		
	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH-labiles	H ⁺ -labiles
<i>α</i> -Me- <i>n</i> -13:0, OH	-	-	-	-	tr	tr	-	-	-
<i>α</i> -Me- <i>n</i> -14:0, OH	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
<i>α</i> -Me- <i>n</i> -15:0, OH	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
<i>α</i>-hydroxy acides									
<i>n</i> -10:0, OH	-	tr	-	-	0,4	tr	-	-	-
<i>n</i> -11:0, OH	-	-	-	-	1,2	tr	-	tr	-
<i>n</i> -12:0, OH	-	13,9	2,4	-	17,0	0,9	0,5	26,9	tr
<i>n</i> -13:0, OH	-	-	-	-	1,1	tr-	-	0,4	-
Alcools									
<i>n</i> -12:0, 1-OH	0,1	0,1	0,3	-	-	0,1	-	-	-
<i>n</i> -14:0, 1-OH	0,1	0,3	0,6	tr	-	tr	-	-	-
<i>n</i> -15:0, 1-OH	0,1	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω ₉ , 1-OH	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω ₇ , 1-OH	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>n</i> -16:0, 1-OH	1,2	4,9	12,4	0,1	0,3	0,1	0,2	0,3	0,5
<i>n</i> -17:0, 1-OH	tr	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<i>n</i> -18:1ω ₉ , 1-OH	1,0	5,0	14,2	-	0,4	-	-	-	-
<i>n</i> -18:1ω ₇ , 1-OH	0,1	0,8	1,5	-	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,4	2,6	6,8	0,1	0,2	0,1	0,1	0,2	tr
2-Me-18:0, 1-OH	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
<i>i</i> -19:0, 1-OH	-	-	-	-	-	-	0,3	tr	-
<i>n</i> -19:1ω ₉ , 1-OH	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-
<i>n</i> -19:0, 1-OH	-	0,3	-	1,5	0,1	-	-	-	-
<i>n</i> -19:0, 2-OH	-	-	-	0,2	tr	-	-	-	-
<i>n</i> -20:0, 1-OH	tr	tr	0,3	-	tr	-	-	-	-

Les abondances relatives des β-méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement aux β-hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, à partir desquels sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentant entre 0,3 % et 3,6 % des lipides totaux.

c: *cis*, *t*: *trans*

VI.1.1.2. Lipides labiles en milieu basique

Dans cette fraction, les acides voient leur part diminuer à 50,7 % (Tableau IV.3). On assiste à une forte diminution des acides insaturés 16:1 et 18:1, et saturé 16:0, en partie au profit de l'acide laurique 12:0 (24,5 %) alors que celui-ci n'était qu'un composé très mineur dans la fraction précédente.

Les hydroxy acides constituent 34,3 % des lipides labiles en milieu basique, se répartissant en dérivés β (20,4 %) et α (13,9 %) (Tableau IV.3). Le composé n -12:0 correspond à la quasi totalité des α -hydroxy acides et à environ 95 % des β -hydroxy acides (Tableau IV.3 et IV.6). Dans le cas des α -hydroxy acides, des traces de n -10:0 ont été décelées, et dans celui des β de faibles proportions de n -10:0, n -13:0 et n -14:0 ont été observées.

Quant aux alcools, ils représentaient 14,0 % des lipides labiles en milieu basique (Tableau IV.3). Ce taux assez surprenant par sa forte valeur comparée aux autres bactéries, correspond à 2 % des lipides totaux. De même, le taux des alcools de la fraction extractible précédente (lipides "non liés") correspond à 3,5 % de la fraction et 2,6 % des lipides totaux. Les alcools prépondérants sont n -16:0, 1-OH (4,9 %), n -18:1 ω 9, 1-OH (5,0 %) et n -18:0, 1-OH (2,6 %).

VI.1.1.3. Lipides labiles en milieu acide

Les acides gras ne représentent que 10,4 % des lipides dans cette fraction, ils sont essentiellement saturés (8,8 %) et pairs, de C₁₀ à C₁₈ (Tableaux IV.4 et IV.6). L' α -hydroxy acide n -12:0 est ici un composé mineur (2,4 %). Par contre, les β -hydroxy acides totalisent 50,4 % des lipides labiles en milieu acide. Ils se partagent essentiellement en dérivés n -14:0 (30,9 %) et n -12:0 (17,4 %) auxquels s'ajoute un dérivé n -13:0 minoritaire (2,1 %).

La proportion d'alcools est ici inhabituelle: 36,1 % des lipides labiles en milieu acide, soit 3,9 % des lipides totaux. Au total la somme des pourcentages des alcools, par rapport aux lipides totaux atteint 8,5 %. Les alcools principaux de cette fraction sont toujours n -16:0, 1-OH (12,4 %), n -18:1 ω 9, 1-OH (14,2 %) et n -18:0, 1-OH (6,8 %).

VI.1.2. Culture sur *n*-nonadécane

VI.1.2.1. Lipides "non liés"

Les proportions d'une part des acides par rapport aux lipides de cette fraction, et d'autre part des saturés par rapport aux insaturés, sont très voisines de celles observées dans les lipides "non liés" de la culture sur acétate; de plus il s'agit uniquement de composés normaux (Tableau IV.2). Le changement de substrat entraîne une modification de la parité des acides: les acides à nombre de carbones pair, *n*-14 à *n*-18 (saturés + insaturés) totalisent 5,2 % des lipides, alors que ceux impairs en totalisent 90,2 %. Les acides gras à 17 carbones représentent 68,2 % des lipides contre environ 55 % chez les deux espèces de *Marinobacter* (Tableau IV.2). Trois composés se détachent: *n*-17:0 (23,1 %), *n*-17:1 ω 9 (23,0 %) et *n*-17:1 ω 8 (17,7 %). Chacune des séries d'acides *n*-C₁₅ et *n*-C₁₉ (saturés + insaturés) participent pour 9 % aux lipides "non liés".

Quelques β -hydroxy acides ont été identifiés dont les β -OH-*n*-19:0 et β -OH-*n*-12:0 (respectivement 0,1 et 0,5 % des lipides "non liés"; Tableau IV.6).

La proportion d'alcool est similaire à celle observée lors de la culture sur acétate (Tableau IV.2). Les composés principaux sont ceux dérivant de l'oxydation du *n*-nonadécane, c'est à dire *n*-19:0, 1-OH (1,5 %), *n*-19:0, 2-OH (0,2 %) et *n*-19:1 ω 9, 1-OH (1,1 %) (Tableau IV.6)

VI.1.2.2. Lipides labiles en milieu basique

Les acides saturés, représentant 34,1 % des lipides labiles en milieu basique sont essentiellement à courte chaîne: *n*-10:0, *n*-11:0 et *n*-12:0 (respectivement 5,3 %, 7,1 % et 12,6 %; Tableau IV.6). Parmi les acides insaturés (12,6 %; Tableau IV.3), les composés à nombre de carbone impair dominant, dont *n*-17:1 ω 8 (4 %) et ω 7 (3,7 %).

Les hydroxy acides, relativement plus abondants que dans la culture sur acétate (51,3 % des lipides labiles en milieu basique contre 34,3 %), ont une distribution assez semblable. Comme différence on peut noter cependant une augmentation des proportions d'hydroxy acides à nombre impair d'atomes de carbone (11 et 13) aussi bien α que β . Les α et β -hydroxy acides *n*-12:0 sont les composés largement prépondérants (respectivement 17,0 et 22,6 % des

lipides labiles en milieu basique; Tableau IV.6); ils représentent 86 % et 71,5 % des α - et β -hydroxy acides, respectivement.

La proportion d'alcools chute considérablement par rapport à la fraction labile en milieu basique de la culture sur acétate d'ammonium (1 % contre 14 %, Tableau IV.3), les principaux étant les alcools primaires n -16:0, n -18:1 ω 9 et n -18:0.

VI.1.2.3. Lipides labiles en milieu acide

La part des acides gras devient marginale (1,3 %), ce sont les composés saturés, normaux à 14, 16, 17 et 18 carbones. En ce qui concerne les α -hydroxy acides; l' α -hydroxy n -12:0 ne représente que 0,9 % des lipides labiles en milieu acide. La proportion des β -hydroxy acides atteint 93,8 %, essentiellement répartis entre les dérivés n -12:0 (51,3 %), n -13:0 (26,8 %) et n -14:0 (14 %). Une série de trois β -hydroxy acides, α -méthylés, allant de n -12:0 à n -14:0 a été tentativement identifiée. Ces composés rarement identifiés chez les microorganismes (Haeffner et al., 1977), n'étaient cependant présents qu'à l'état de traces.

Les alcools quant à eux n'occupent qu'une place marginale (0,3 %).

VI.1.3. Culture sur *iso*-nonadécane

VI.1.3.1. Lipides "non liés"

La proportion d'acides gras atteint près de 97 %, comme chez *M. aquaeolei* cultivée sur le même substrat (Tableau IV.2). Le fait remarquable est la prépondérance massive des composés ramifiés par rapport aux composés normaux. En effet, les acides gras ramifiés représentent près de 96 % des acides gras, contre 70 % chez *M. aquaeolei* et 61 % chez *M. hydrocarbonoclasticus* cultivées sur le même *iso*-alcane. Deux composés dominant: chez les saturés, i -17:0 (41,1 % des lipides extractibles) et chez les insaturés, l'acide i -19:1 ω 9 (30,5 %) (Tableau IV.6). Parmi les acides gras normaux, seul l'acide palmitique a été détecté en quantité appréciable (2,4 %).

Par ailleurs, aucun β -hydroxy acide (ni α , d'ailleurs) dérivé de l'oxydation de l'*iso*-nonadécane n'a été identifié. Seuls les α - et β -hydroxy acides n -12:0 étaient présents (respectivement 0,5 et 0,9 % des lipides extractibles). Quant aux alcools leur proportion chutait à 0,7 %; ils comprenaient deux alcools primaires dérivés de l'oxydation de l'*iso*-

nonadécane à chacune des deux extrêmités: *i*-19:0, 1-OH (0,3 %) et 2-Me-18:0, 1-OH (0,1 %), et deux alcools normaux *n*-16:0, 1-OH et *n*-18:0, 1-OH (0,2 % et 0,1 % respectivement).

VI.1.3.2. Lipides labiles en milieu basique

Par rapport aux lipides "non liés" la part relative des acides gras normaux augmente (14,3 %) par rapport à celle des ramifiés (23,3 %) (Tableau IV.3). Les premiers sont représentés essentiellement par les acides laurique (8,4 %) et palmitique (3,8 %), et les seconds par les acides *i*-17:0 (9,8 %) et *i*-19:1 ω 9 (8,1 %) (Tableau IV.6).

Les hydroxy acides (58,1 %) sont plus abondants que dans les mêmes fractions lipidiques des cultures sur acétate et *n*-nonadécane (Tableau IV.3). Dans la répartition entre dérivés α et β , la proportion des premiers (46,9 % des hydroxy acides labiles en milieu basique) est voisine de ce qu'elle était dans le cas de la culture sur acétate (40,5 %). Les hydroxy acides *n*-12:0 représentent 98 % des dérivés α , et 95 % des dérivés β . Aucun hydroxy acides *iso* n'a été décelé.

VI.1.3.3. Lipides labiles en milieu acide

Les proportions entre alcools, acides et hydroxy acides dans les lipides labiles en milieu acide de la culture sur alcane *i*-C₁₉ sont les mêmes que dans le cas de la culture sur *n*-C₁₉. Les β -hydroxy acides sont très prépondérants (95,9 %; Tableau IV.4), avec par ordre décroissant: *n*-14:0 (51,8 %), *n*-12:0 (36,4 %) et *n*-13:0 (6,4 %), c'est à dire une distribution très différente de celle observée dans le cas de la culture sur *n*-C₁₉ (Tableau IV.6). Les acides et les alcools sont très minoritaires (1,5 et 0,5 % des lipides labiles en milieu acide, respectivement).

VI.2. Discussion

VI.2.1. Influence de la nature de la source de carbone sur la composition lipidique

L'influence de la source de carbone sur la composition en acides gras d'*A. calcoaceticus* est beaucoup plus marquée que chez les deux espèces de *Marinobacter*, tant du point de vue de la parité que de la ramification. En effet, sur *n*-C₁₉, environ 90 % des lipides "non liés" ont un nombre impair d'atomes de carbone, contre environ 1 % lors de la culture

sur acétate, et sur *i*-C₁₉ plus de 90 % de lipides sont de type *iso*. Cette très forte proportion de lipides *iso*, est typique de certaines bactéries Gram-positives (O'Leary et Wilkinson, 1988; Kaneda, 1991). Une telle variation dans la composition lipidique des membranes cellulaires montre qu'il faut être prudent lorsque de tels composés sont utilisés à des fins taxonomiques.

VI.2.2. Influence de la source de carbone sur la composition en alcools

Deux types d'alcools peuvent être considérés chez *A. calcoaceticus*. Les alcools gras à nombre d'atomes de carbone pair, essentiellement C₁₆ et C₁₈, et ceux à nombre impair, c'est à dire C₁₉. Comme nous l'avons vu lors de la présentation de cette bactérie, une de ses caractéristiques est la synthèse et l'accumulation d'esters d'acides gras et d'alcools gras essentiellement en C₁₆ et C₁₈ (Fixter et al., 1986). En raison de leur faible polarité, ces esters sont extraits au chloroforme/méthanol et leurs parties acides gras et alcools gras se retrouvent donc dans la fraction des lipides "non liés". L'origine des alcools gras présents en très fortes proportions dans la culture sur acétate dans les lipides labiles en milieu basique et labiles en milieu acide (respectivement 14 et 36 %), est beaucoup plus incertaine. Dans le cas des alcools présents dans les lipides labiles en milieu basique, une extraction incomplète au chloroforme/méthanol pourrait être avancée. Une telle hypothèse est difficilement envisageable dans le cas des alcools labiles en milieu acide. A notre connaissance, seule une liaison de type "glycoside-liaison ether", en position 1 d'une partie sucre, pourrait être avancée (Voir chapitre III). Cependant l'existence de tels composés si tant est qu'elle se vérifie, ne permet pas d'expliquer la forte chute des proportions d'alcools C₁₆ et C₁₈ pour les lipides labiles en milieu basique et en milieu acide dans les cultures d'*A. calcoaceticus* sur hydrocarbures.

En ce qui concerne les alcools C₁₉ normaux et ramifiés, ils dérivent de l'oxydation des hydrocarbures *n*-C₁₉ et *i*-C₁₉, respectivement.

VI.2.3. Variation de la composition en hydroxy acides

A. calcoaceticus présente le profil en hydroxy acides le plus complexe de toute notre étude. En effet, lors du traitement basique de la biomasse obtenue lors de la culture sur acétate, un mélange d' α - et de β -hydroxy acides 12:0, dans un rapport α/β de 2/3 est obtenu. Ces deux acides estérifient dans les lipides A des LPS les fonctions OH en position 3 et 3' des dimères de glucosamine. Par ailleurs, l'hydrolyse acide des fonctions amides situées aux

positions 2 et 2' libère un mélange de β -hydroxy acides 12:0 et 14:0, approximativement dans un rapport 2/3. Cette distribution est concordante avec celle trouvée par Goossens et al (1989a) pour une autre souche, mais elle diffère de celle établie par Wollenweber et al.(1984) qui n'ont pas détecté de β -hydroxy acide 14:0. La Figure IV.9 présente une des structures possibles du lipide A d'*A. calcoaceticus*. En plus de ces hydroxy acides prépondérants, quelques autres, mineurs, sont également présents.

Le remplacement de l'acétate par les hydrocarbures n -C₁₉ et i -C₁₉ a peu d'influence sur la distribution des hydroxy acides libérés en milieu basique: les α - et β -hydroxy acides 12:0 sont toujours dominants. On peut cependant noter une augmentation de la proportion des β -hydroxy acides à nombre d'atomes de carbone impairs (11:0 et 13:0), et l'apparition d' α -hydroxy acides également à nombre d'atomes impairs (11:0 et 13:0) dans le cas de la culture sur n -C₁₉. Par comparaison les β -hydroxy acides liés par liaisons amides apparaissent beaucoup moins spécifiques. En effet, dans la culture sur n -C₁₉, une grande proportion de β -hydroxy acide 13:0 a été identifiée, dans les lipides labiles en milieu acide.

Il apparaît donc que la spécificité *vis à vis* des longueurs de chaînes des β -hydroxy acides dépend de la nature de la liaison, ester ou amide.

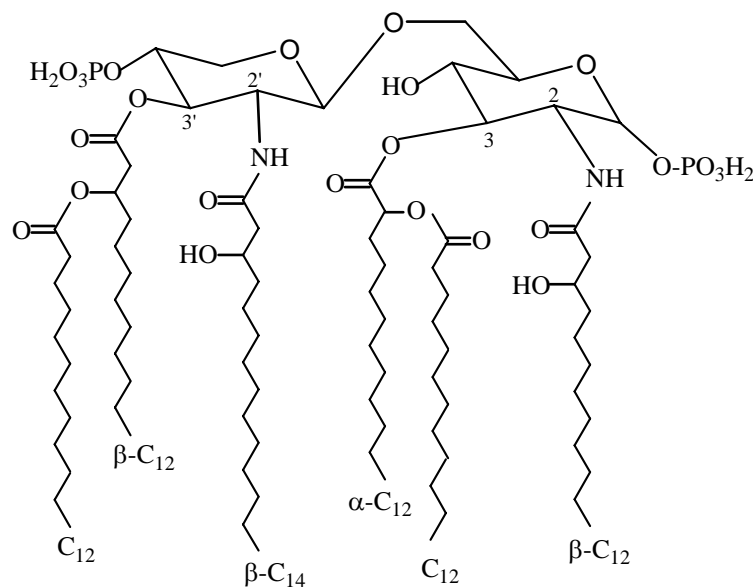


Figure IV.9. Une des structures possibles du lipide A d'*A. calcoaceticus*.

VI.2.4. Métabolisme des hydrocarbures

L'identification des alcools C₁₉ suggère fortement que le métabolisme des hydrocarbures procède chez cette souche d'*A. calcoaceticus* selon la voie classique d'oxydation en alcool primaire au moyen d'hydroxylases suivie d'une oxydation en acides gras puis par β -oxydations successives, et non par l'oxydation au moyen de dioxygénases (Sakai et al., 1996). L'oxydation en alcool du côté le moins encombré est privilégiée, et l'oxydation subterminale est une voie minoritaire par rapport à l'oxydation terminale.

VII. INFLUENCE DE LA SOURCE DE CARBONE SUR LA COMPOSITION LIPIDIQUE DE *PSEUDOMONAS OLEOVORANS* 59.11T

VII.1. RESULTATS

P. oleovorans dégradant les alcanes et les alcènes à chaînes courtes (de C₆ à C₁₂) a été sélectionnée pour étendre cette étude. Elle a été cultivée sur le même substrat soluble que les précédentes bactéries, à savoir l'acétate d'ammonium, ainsi que sur deux alcanes (*n*-C₈ et 2-Me-C₇) comme source unique de carbone et d'énergie. Les cultures sur ces deux alcanes ont été effectuées en suivant le même protocole utilisé pour *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus*. Les biomasses bactériennes sèches récupérées des milieux de culture par ultracentrifugation suivie d'une lyophilisation ont été extraites en suivant la procédure analytique représentée à la Figure II.1.

L'identification des composés lipidiques présents dans chaque fraction ("non liés", labiles en milieu basique et labiles en milieu acide) obtenue à partir des cultures sur chaque source de carbone, a été réalisée en CG/SM par analyse des spectres de masse des dérivés TMSi, DMDS et N-acylpyrrolidides. La structure de certains composés a été déterminée par comparaison avec les spectres de masse des composés standards notamment les acides gras comportant un cyclopropane dans la chaîne aliphatique. Des coinjections en CG avec des standards ont été également effectuées.

Les lipides extraits des biomasses bactériennes de *P. oleovorans* cultivée sur acétate d'ammonium, *n*-C₈ et 2-Me-C₇ contiennent les mêmes classes de composés que les lipides de *M. hydrocarbonoclasticus* cultivée sur acétate d'ammonium et sur alcanes. Ces lipides comprenaient des acides gras normaux et ramifiés, des alcools et des β -hydroxy acides. Le

Tableau IV.7 montre la distribution des ces composés dans chaque fraction pour les trois cultures.

VII.1.1. Culture sur acétate d'ammonium

VII.1.1.1. Lipides "non liés"

Les acides gras largement prédominants (97,6 %) se répartissent en composés normaux saturés (18,3 %), normaux insaturés (73,3 %) et cyclopropaniques (6,0 %) (Figure IV.10). Leurs distributions sont relativement simples. En effet, l'acide palmitique (15,7 %) domine largement les saturés, et l'acide *cis*-vaccénique, 18:1 ω 7 c (55,6 %) les insaturés. Ce dernier est accompagné par l'acide palmitoléique, 16:1 ω 7 c (12,3 %), ainsi que par leurs isomères respectifs *trans*, 18:1 ω 7 t (2,3 %) et 16:1 ω 7 t (3,1 %) (Tableau IV.7). Deux acides cyclopropaniques, 17 ∇ ω 7,8 et 19 ∇ ω 7,8 sont présents (respectivement 4,8 et 1,2 %; Tableau IV.7). Une très faible quantité de β -hydroxy acide *n*-12:0 a été décelée (0,1 %) ainsi que des quantités plus substantielles d'alcools primaires à nombre de carbone pair de C₁₂ à C₁₈ (1,6 % au total).

VII.1.1.2. Lipides labiles en milieu basique

La distribution dans cette fraction diffère de la précédente essentiellement par une chute importante de la proportion des acides gras insaturés (12,3 %) compensée par un fort taux d'acide laurique (32,7 %) et de β -hydroxy acides (38,6 %) (Figure IV.11, Tableau IV.7). L'acide β -hydroxy-*n*-10:0 est largement dominant (plus de 93 % des β -hydroxy acides), il est accompagné du β -hydroxy acide *n*-12:0.

VII.1.1.3. Lipides labiles en milieu acide

Les β -hydroxy acides représentent 91,5 % des lipides labiles en milieu acide; à plus de 98 % il s'agit du β -hydroxy-*n*-12:0 (Figure IV.12), accompagné de quantités mineures de ses homologues inférieurs *n*-10:0 et *n*-11:0 et supérieurs *n*-13:0 et *n*-14:0 (Tableau IV.7). Les acides gras normaux saturés et les alcools correspondent respectivement à 4,7 % et 1,9 % de cette fraction lipidique.

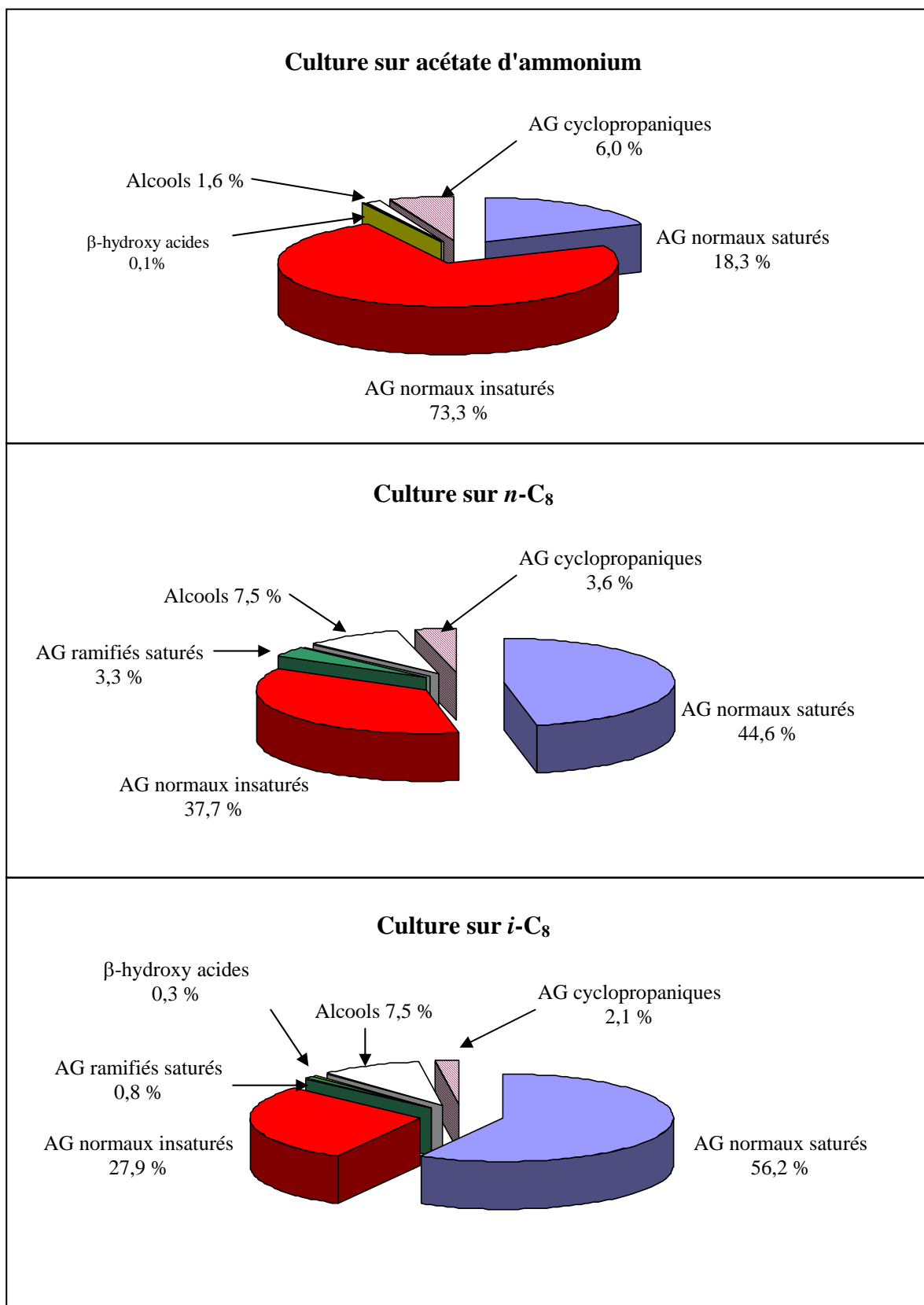


Figure IV.10. Abondances relatives des différentes classes de lipides "non liés" de *P. oleovorans* cultivée sur Acétate d'ammonium, n -C₈ et i -C₈.

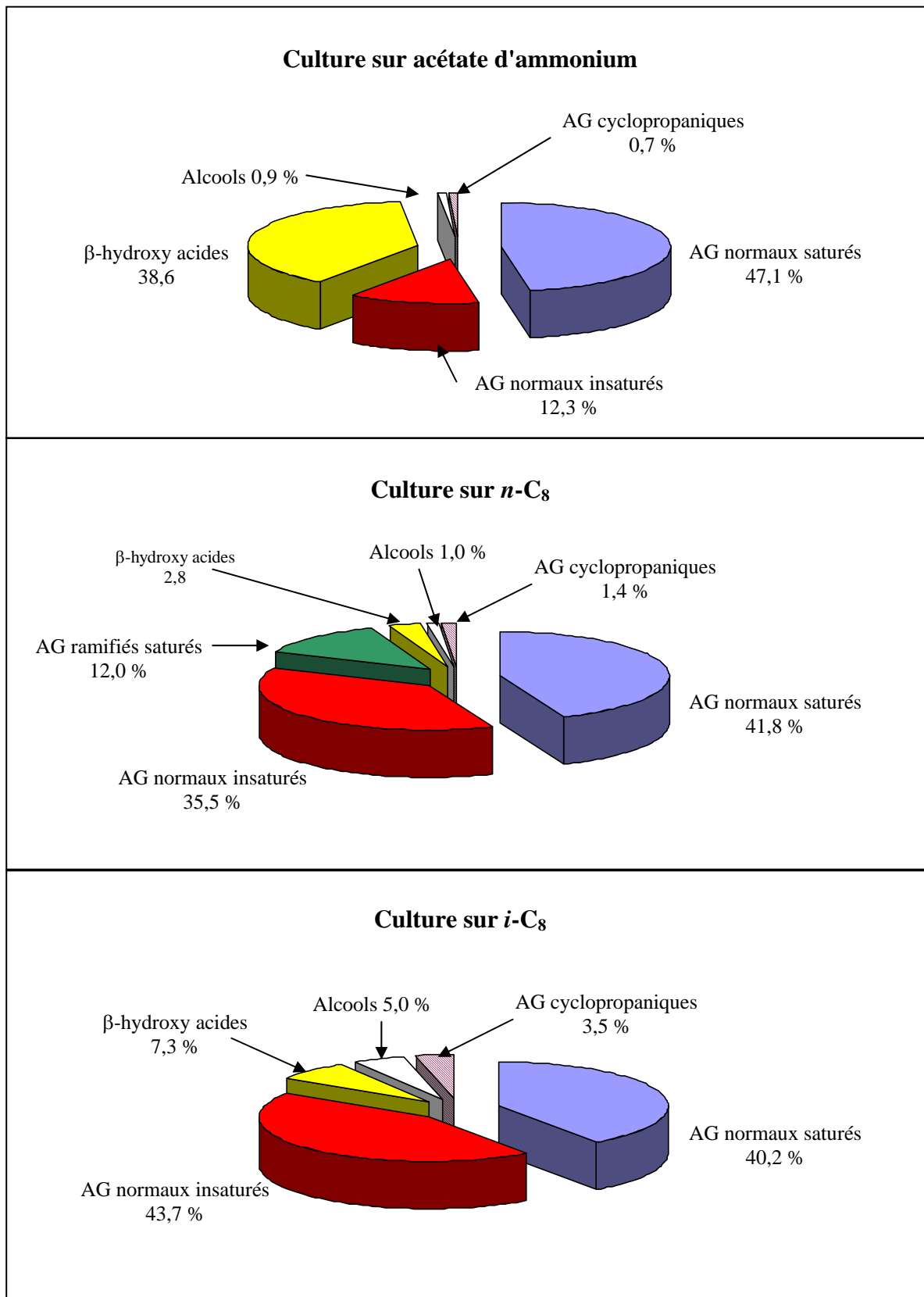


Figure IV.11. Abondances relatives des différentes classes de lipides labiles en milieu basique de *P. oleovorans* cultivée sur Acétate d'ammonium, *n*-C₈ et *i*-C₈.

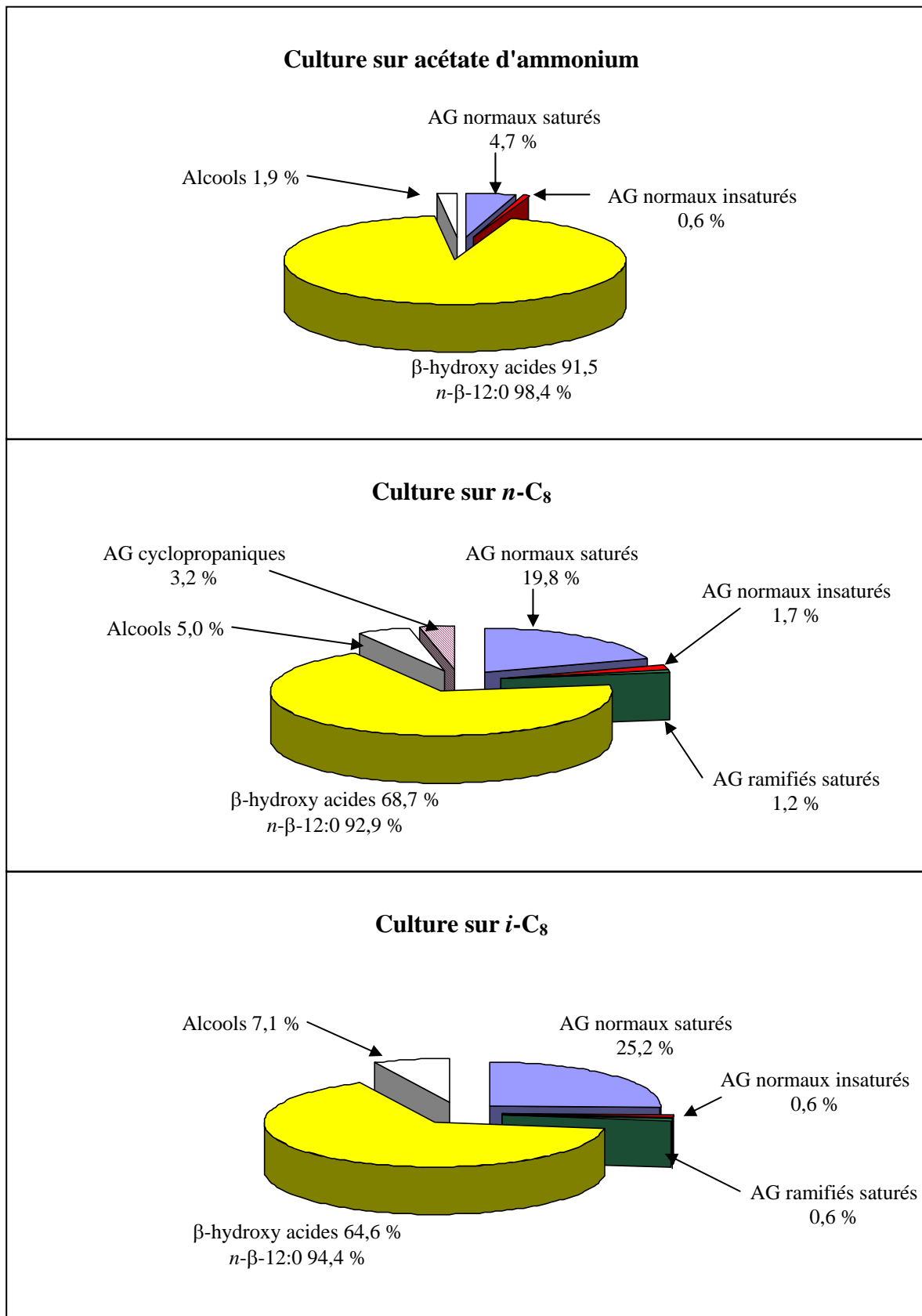


Figure IV.12. Abondances relatives des différentes classes de lipides labiles en milieu acide de *P. oleovorans* cultivée sur Acétate d'ammonium, *n*-C₈ et *i*-C₈.

Tableau IV.7. Composition lipidique de *Pseudomonas oleovorans* en fonction de la source de carbone.

Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i> -C ₈			2-Me-C ₇		
	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles	"Non liés"	OH ⁻ -labiles	H ⁺ -labiles
<i>Acides gras saturés</i>									
<i>n</i> -12:0	0,1	32,7	-	1,6	16,2	0,1	2,2	0,7	0,6
<i>n</i> -13:0	tr	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-
<i>i</i> -14:0	-	-	-	0,1	0,4	-	-	-	-
<i>n</i> -14:0	0,4	0,2	0,2	2,0	0,7	2,5	5,8	tr	2,4
<i>i</i> -15:0	-	-	-	1,0	2,8	0,1	-	-	0,1
<i>ai</i> -15:0	-	-	-	1,7	6,4	0,3	0,2	-	0,1
<i>n</i> -15:0	tr	0,7	0,3	2,4	0,7	0,5	5,4	2,8	1,6
<i>i</i> -16:0	-	-	-	0,5	1,8	0,8	0,5	-	-
<i>n</i> -16:0	15,7	11,8	2,2	27,9	22,0	9,8	27,3	23,7	14,8
<i>i</i> -17:0	-	-	tr	-	0,2	-	0,1	-	0,1
<i>ai</i> -17:0	-	-	-	-	0,4	-	-	-	0,3
<i>n</i> -17:0	0,1	0,6	0,2	1,1	0,4	0,8	7,9	8,5	1,6
<i>n</i> -18:0	1,8	1,1	1,3	9,0	1,7	5,1	6,9	4,1	3,8
<i>n</i> -19:0	0,2	-	0,2	-	tr	0,5	0,6	0,2	0,2
<i>n</i> -20:0	-	tr	0,3	0,5	tr	0,5	0,1	0,2	0,2
<i>Acides gras insaturés</i>									
<i>n</i> -12:1 ω7	-	0,2	-	-	0,7	-	-	-	-
<i>n</i> -14:1 ω7	-	0,8	-	-	1,4	-	-	-	-
<i>n</i> -15:1 ω10	-	-	-	-	-	-	0,2	1,1	-
<i>n</i> -15:1 ω9	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-
<i>n</i> -16:1 ω10	-	-	-	-	0,7	-	1,0	1,5	-
<i>n</i> -16:1 ω9	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
<i>n</i> -16:1 ω7 <i>c</i>	12,3	1,5	-	6,6	6,5	0,3	1,7	9,6	-
<i>n</i> -16:1 ω7 <i>t</i>	3,1	0,7	-	0,3	3,4	tr	0,1	2,4	-
<i>n</i> -17:1 ω10	-	-	-	-	-	-	-	5,1	-
<i>n</i> -17:1 ω9 <i>c</i>	-	-	-	-	-	-	7,3	tr	-
<i>n</i> -17:1 ω9 <i>t</i>	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
<i>n</i> -17:1 ω8 <i>c</i>	-	-	-	tr	0,2	-	7,0	7,9	-
<i>n</i> -17:1 ω8 <i>t</i>	-	-	-	-	0,1	-	0,6	0,2	-

<i>n</i> -18:1 ω9 <i>c</i>	-	0,2	-	21,5	4,7	-	5,9	3,2	-
Lipides	Acétate d'ammonium			<i>n</i>-C₈			2-Me-C₇		
	"Non liés"	OH⁻-labiles	H⁺-labiles	"Non liés"	OH⁻-labiles	H⁺-labiles	"Non liés"	OH⁻-labiles	H⁺-labiles
<i>n</i> -18:1 ω9 <i>t</i>	-	-	-	-	0,1	-	0,4	-	-
<i>n</i> -18:1 ω7 <i>c</i>	55,6	8,5	0,3	8,3	15,2	1,4	1,4	11,5	0,6
<i>n</i> -18:1 ω7 <i>t</i>	2,3	0,4	0,3	0,7	2,5	tr	tr	0,3	-
<i>n</i> -19:1 ω10	-	-	-	-	-	-	0,8	0,9	-
<i>n</i> -19:1 ω9	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-
Acides gras cyclopropaniques									
17∇ω7,8	4,8	0,5	-	2,4	1,0	2,1	1,5	2,6	-
19∇ω7,8	1,2	0,2	-	1,2	0,4	1,1	0,6	0,9	-
β-hydroxy acides									
<i>n</i> -10:0, OH	-	36,0	0,4	-	2,4	3,7	-	0,3	0,8
<i>n</i> -11:0, OH	-	-	0,3	-	tr	0,6	-	tr	tr
<i>n</i> -12:0, OH	0,1	2,6	90,0	tr	0,4	63,8	0,3	7,0	61,0
<i>n</i> -13:0, OH	-	-	0,4	-	-	-	-	-	0,2
<i>n</i> -14:0, OH	-	-	0,4	-	-	0,6	-	tr	2,6
Alcools									
<i>n</i> -12:0, 1-OH	0,1	0,1	0,1	0,1	tr	0,1	0,3	-	0,4
<i>n</i> -14:0, 1-OH	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,7	tr	0,9
<i>n</i> -16:0, 1-OH	0,8	0,4	1,0	5,3	0,6	3,1	5,0	1,3	4,0
<i>n</i> -18:0, 1-OH	0,6	0,3	0,7	1,9	0,3	1,6	1,5	3,7	1,8

[#] Les abondances relatives des β-méthoxy acides présents ont été additionnées respectivement aux β-hydroxy acides comportant les mêmes nombres d'atomes de carbone, à partir desquels sont dérivés.

* L'ensemble des produits mineurs non identifiés dans ces fractions lipidiques ainsi que des produits identifiés (mais non répertoriés dans ce tableau car présents à l'état de trace et pas vraiment significatifs en terme de métabolisme des hydrocarbures par la bactéries et d'influencer sur ces lipides) représentant entre 0,2 % et 5,4 % des lipides totaux.

c: *cis*, *t*: *trans*

VII.1.2. Culture sur *n*-octane

VII.1.2.1. Lipides "non liés"

Le *n*-octane affecte profondément la répartition entre les types de lipides: forte augmentation des acides gras normaux saturés (de 18,3 % à 44,6 %) et des alcools (de 1,6 à 7,5 %), apparition d'acides à chaînes ramifiées par des groupes méthyles (3,3 %), et corrélativement baisse de la proportion des acides gras cyclopropaniques (de 6 à 3,6 %) et des acides normaux insaturés (de 73,3 à 37,7 %) (Figure IV.10).

Parmi les principales modifications observées entre culture sur acétate et culture sur *n*-octane on peut citer (Tableau IV.7):

- * augmentation de la teneur en acide palmitique (de 15,7 à 27,9 %) et stéarique (de 1,8 à 9 %);
- * diminution des pourcentages de l'acide *cis*-vaccénique 18:1 ω 7*cis* (de 55,6 à 8,3 %), en partie au profit de l'acide oléique (qui passe de 0 à 21,5 %) et diminution de l'acide palmitoléique *n*-16:1 ω 7*cis* de (12,3 à 6,6 %);

Par ailleurs, l'acide β -hydroxy-*n*-12:0 est détecté à l'état de trace, et les alcools sont principalement constitués d'alcools primaires 16:0 (5,3 %) et 18:0 (1,9 %).

VII.1.2.2. Lipides labiles en milieu basique

Par rapport à la culture sur acétate d'ammonium on observe (Figure IV.11 et Tableau IV.7):

- * une diminution du pourcentage total d'acides gras normaux saturés, de 47,1 à 41,6 %. Cette légère variation cache une profonde modification de la répartition, le taux d'acide laurique étant divisé par deux (16,2 % contre 32,7 %), celui de l'acide palmitique évoluant en sens inverse (22,0 contre 11,8 %);
- * une augmentation du pourcentage total d'acides gras insaturés (de 12,3 à 35,5 %), dont les composés 18:1 et 16:1, aussi bien *cis* que *trans*;
- * une forte baisse du pourcentage des β -hydroxy acides (2,8 % contre 38,6 %);
- * l'apparition d'acides gras ramifiés saturés (12 %)

VII.1.2.3. *Lipides labiles en milieu acide*

Le changement de substrat, acétate → *n*-octane, se manifeste essentiellement par une augmentation des acides gras normaux saturés (4,7 à 19,8 %) et des alcools (de 1,9 à 5 %). Corrélativement, la proportion de β-hydroxy acides diminue de 91,5 à 68,7 %. La distribution de ces dérivés demeure cependant inchangée. On note l'apparition d'une faible quantité d'acides gras ramifiés saturés (1,2 %).

VII.1.3. Culture sur 2-méthylheptane

VII.1.3.1. *Lipides "non liés"*

Par rapport à la culture sur *n*-octane on observe:

- * une plus grande abondance d'acide gras normaux saturés (56,2 % contre 44,6 %);
- * corrélativement une diminution de l'abondance des acides gras normaux insaturés (27,9 % contre 37,7 %);
- * une diminution du pourcentage des acides non normaux, aussi bien cyclopropaniques (2,1 % contre 3,6 %) que *iso* et *antéisos* (0,8 % contre 3,3 %).

Parmi les acides gras normaux, les composés à nombre de carbone impair voient leurs pourcentage augmenter fortement. Au total les acides saturés *n*-15:0 + *n*-17:0 représentent 13,3 % des lipides "non liés", contre 3,5 % dans le cas de la culture sur *n*-octane, et les acides insaturés *n*-15:1 et *n*-17:1 totalisent 16,1 % alors que seules des traces de *n*-17:1 avaient été détectées dans ce dernier cas.

Par ailleurs, la répartition des alcools se trouve quasiment inchangée.

VII.1.3.2. *Lipides labiles en milieu basique*

La répartition entre types de lipides est peu modifiée par rapport à la culture sur *n*-octane (Figure IV.11 et Tableau IV.7), si l'on excepte la disparition des acides gras saturés ramifiés *iso* et *anteiso*. Chez les acides saturés et insaturés, une plus forte abondance des composés normaux à nombre impair d'atomes de carbone est ici aussi notée (respectivement 11,5 et 15,2 % contre 1,1 et 0,3 %). Cependant l'absence d'acides gras ramifiés est surprenante, surtout si l'on réfère à leurs taux de 12,0 % dans la même fraction lipidique de la culture sur *n*-octane.

Toujours en comparant les cultures sur les deux hydrocarbures, une inversion de la répartition des β -hydroxy acides n -10:0 et n -12:0 apparaît. Dans le cas présent le composé à chaîne plus longue est prépondérant.

VII.1.3.3. Lipides labiles en milieu acide

Le changement d'hydrocarbure n'apporte pas de modification majeure dans la répartition ni par types de lipides (sauf l'absence des acides gras cyclopropaniques qui étaient observés en faible quantité dans le cas du n -C₈) ni par composés (Figure IV.12 et Tableau IV.7). Ceci est notamment le cas des β -hydroxy acides dont le composé largement prépondérant est le β -hydroxy- n -12:0.

VII.2. DISCUSSION

VII.2.1. Influence de la source de carbone sur la composition lipidique

Le remplacement dans le milieu de culture d'une source de carbone soluble comme l'acétate d'ammonium par un hydrocarbure entraîne une profonde modification de la composition lipidique de *P. oleovorans*. Un tel remaniement lipidique a été déjà rapporté chez cette bactérie (Chen et al., 1995 a,b). Les auteurs ont étudié les lipides membranaires extraits par un mélange chloroforme/méthanol 1:2, v/v, ce qui correspond donc aux lipides que nous avons appelés "non liés". Ils ont noté que le n -octane induisait la formation d'une plus grande quantité d'acide 18:1, au dépend des acides 16:1, de même ils notaient une plus grande abondance d'acides mono-insaturés *trans*. Le résultat de ces changements s'est traduit par une augmentation de la température de transition des lipides membranaire d'environ 20 °C. En effet, les acides gras longs et les acides gras insaturés *trans* possèdent des points de fusion supérieurs respectivement aux acides à chaîne hydrocarbonée plus courte et aux acides gras insaturés *cis*. L'effet de la conversion des acides gras insaturés *cis* en *trans* est similaire à la substitution des acides gras insaturés *cis* par des acides gras saturés, ils conduit à une diminution de la fluidité membranaire (Cronan et Gelmann, 1975; Diefenbach et al., 1992). Cette augmentation de la température de fusion compense les effets fluidifiants du n -octane sur la membrane (Lohner, 1991).

Dans notre étude les résultats que nous avons obtenus sont différents de ceux de Chen et al. (1995 a,b). En effet, nous observons une forte baisse du pourcentage d'acides 18:1*cis*: de 55 à 28 %, qui s'opère essentiellement au profit des acides gras normaux saturés. Il apparaît donc que la présente souche de *P. oleovorans* privilégie la synthèse d'acides gras saturés pour répondre à l'augmentation de la fluidité liée à la présence de *n*-octane. Naturellement plus riche en acide gras insaturés 16:1, la souche étudiée par Chen et collaborateurs (1995 a,b), favorisait la synthèse d'acides gras à plus longue chaîne, ainsi que l'isomérisation *cis-trans* des acides gras monoinsaturés.

Si maintenant nous revenons aux résultats obtenus avec *M. hydrocarbonoclasticus* (Lattuari et al., 2002), le passage d'un milieu sur acétate d'ammonium à un milieu sur *n*-icosane (solide à température ambiante) se traduisait par une baisse du pourcentage d'acide oléique (point de fusion 16 °C) en partie au profit d'acides 16:1 (point de fusion environ 4°C). Dans ce cas il est vraisemblablement que le contact avec l'hydrocarbure *n*-C₂₀ diminue la fluidité membranaire. Pour la rétablir, la bactérie serait conduite à synthétiser et à incorporer dans sa membrane des acides gras à chaînes plus courtes. Le manque de fluidité des hydrocarbures à longues chaînes, tout comme la grande fluidité des hydrocarbures à chaînes courtes, agirait donc sur la composition des acides gras des membranes bactériennes, mais en sens opposé.

Dans le cas de *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* ces effets sont plus difficiles à établir en raison de l'utilisation d'hydrocarbures à nombre impair d'atomes de carbone.

Par ailleurs, un des faits notables observé lors du passage de l'acétate d'ammonium aux hydrocarbures, en particulier au *n*-octane concerne l'acide *cis*-vaccénique (18:1 ω 7). Cet acide considéré comme marqueur bactérien (Cranwell, 1978; Perry et al., 1979; Gillan et Sandstrom, 1985) représente plus de 55 % des lipides "non liés" de la culture sur acétate, mais seulement 8,3 et 1,4 % de ceux des cultures sur *n*-octane et 2-méthylheptane, respectivement. Dans le cas de la culture sur *n*-octane, cette diminution s'opère en partie au profit de l'acide oléique, absent dans la culture sur acétate.

VII.2.2. Variation de la composition en β -hydroxy acides

Comme chez de nombreuses bactéries Gram-négatives (Wilkinson, 1988), chez *P. oleovorans* les β -hydroxy acides liés par liaison ester sont différents de ceux liés par liaison amide dans les lipopolysaccharides: ce sont respectivement les β -hydroxy acides n - β -10:0 et n - β -12:0. Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, les lipides A des lipopolysaccharides comportent quatre acides, généralement des β -hydroxy acides, directement liés au dimère de *N*-acétylglucosamine, et deux acides, généralement des acides gras saturés, estérifiés aux β -hydroxy acides.

Les résultats des analyses des lipides labiles en milieu basique et labiles en milieu acide de *P. oleovorans* cultivée sur acétate d'ammonium suggèrent la présence aux positions 3 et 3' d'acide β -hydroxy décanoïque (libéré lors de l'hydrolyse basique) et aux positions 2 et 2' d'acide β -hydroxy dodécanoïque (libéré lors de l'hydrolyse acide). Par ailleurs, l'hydrolyse basique produit en plus de l'acide β -hydroxy- n -10:0, une quantité presque équivalente d'acide laurique (36 % et 32,7 %, respectivement). Ceci suggère que deux groupes hydroxyles des quatre β -hydroxy acides sont estérifiés par l'acide laurique comme nous le proposons dans la Figure IV.13.

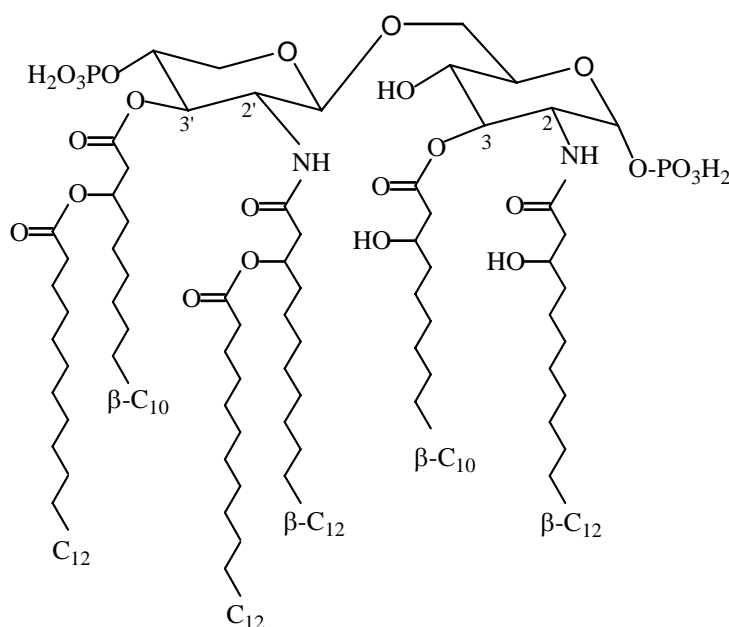


Figure IV.13. Une des structures possibles du lipide A de *P. oleovorans*.

Lors de la culture sur *n*-octane la proportion de β -hydroxy acides libérée en milieu basique chute dramatiquement, suggérant que les positions 3 et 3' sont maintenant estérifiées majoritairement par des acides gras saturés. Cependant, la nature de ces acides gras saturés du lipide A est difficile à établir à partir des variations observées dans la distribution des acides gras saturés totaux.

Comme dans le cas des lipides membranaires, la présence de *n*-octane tend à augmenter la fluidité de la partie lipophile des LPS. Les variations observées dans la composition en β -hydroxy acides pourraient être également un moyen de maintenir la fluidité des membranes. Dans ce point de vue, il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux obtenus dans le cas de *P. syringae* (Kumar et al., 2002). Ces auteurs ont noté qu'une augmentation de la température de culture de cette bactérie originaire de l'Antarctique de 4 °C à 22 °C, introduisait une forte diminution de la teneur en hydroxy acides (Kumar et al., 2002), leur proportion par rapport aux acides des LPS passe de 72 à 45 %.

Enfin, il apparaît que la structure de l'alcane fourni n'a aucune incidence sur celles des β -hydroxy acides. Aucun β -hydroxy acides ramifiés n'a été identifié dans la culture sur 2-méthylheptane, ni dans les lipides labiles en milieu basique, ni dans ceux labiles en milieu acide.

VII.2.3. Métabolisme des alcanes courts par *P. oleovorans*

Les composés identifiés dans les trois fractions lipidiques de *P. oleovorans* cultivée sur alcanes ne permettent pas de proposer une voie métabolique pour la dégradation du *n*-C₈ et *i*-C₈ par cette bactérie. En effet, aucun métabolite de l'oxydation de ces derniers composés n'a pu être identifié. Néanmoins, ceci peut essentiellement traduire une perte de ces composés au cours des extractions et/ou de l'élimination des solvants. Cependant, des études antérieures sur la dégradation des alcanes courts (C₆-C₁₂) par cette bactérie ont montré que ces composés sont oxydés en alcools primaires qui sont à leur tour oxydés en aldéhydes puis en acides alcanoïques (Thijsse et Van Der Linden, 1961, 1963; Nieder et Shapiro, 1975; Yuste et al., 1998).

VIII. CONCLUSION

Les analyses des lipides de *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* cultivées sur acétate d'ammonium, *n*-nonadécane et *i*-nonadécane et leurs comparaisons avec celles décrites dans le chapitre précédent sur *M. hydrocarbonoclasticus* nous ont permis de mettre en évidence l'influence de la source de carbone sur la distribution des acides gras des LPS présents dans les membranes externes.

Nous avons pu montrer que chez ces trois bactéries, la nature de la source de carbone peut influencer dans une large mesure la distribution de ces acides gras: substitution d'acides gras à nombre pair d'atomes de carbone par des acides à nombre impair d'atomes de carbone, substitution d'acides normaux par des acides ramifiés.

Par comparaison, les hydroxy acides des LPS, α ou β selon les genres bactériens, sont beaucoup moins susceptibles d'être interchangeés par des composés de structures différentes: si des composés à chaînes normales à nombre impair d'atomes de carbone sont incorporés dans les LPS à un taux appréciable les ramifications de type *iso* ne sont que très faiblement tolérées.

Enfin, avec *P. oleovorans* cultivée sur acétate, *n*-octane et 2-méthyl heptane nous avons pu montrer que l'effet fluidifiant des hydrocarbures à chaîne courte se manifeste aussi bien sur la distribution des acides gras membranaires que sur la composition en β -hydroxy acides des LPS.

Les β -hydroxy acides présents dans les lipides labiles en milieu basique des quatre bactéries étudiées sont essentiellement normaux pairs de C₁₀ à C₁₄, le composé prédominant dépendant de l'espèce bactérienne. Les β -hydroxy acides issus de la dégradation des alcanes sont présents mais constituent des composés de moindre importance. La Figure IV.14 illustre la distribution relative des β -hydroxy acides des LPS, labiles en milieu basique.

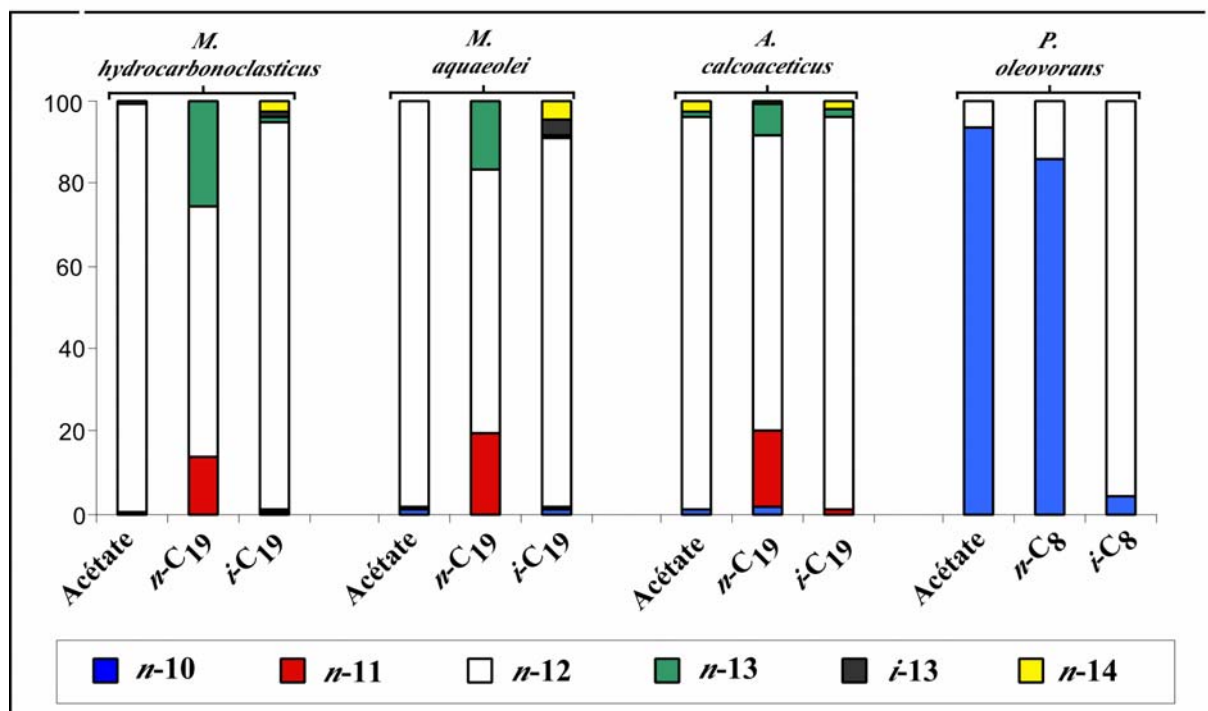


Figure IV.14. Comparaison des distributions des β -hydroxy acides dans les lipides labiles en milieu basique de *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans* en fonction de la source de carbone.

Les β -hydroxy acides liés par liaisons amides aux lipopolysaccharides sont les constituants les plus abondants des lipides labiles en milieu acide. Ces composés sont essentiellement normaux à nombre pair d'atomes de carbone. La nature du β -hydroxy acide prédominant dépend également de l'espèce bactérienne: il s'agit du n - β -12:0 dans le cas de *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei* et *P. oleovorans* alors que dans le cas d'*A. calcoaceticus* les composé n -12:0 et n -14:0 sont les plus abondants (Figure IV.15). Pour *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus*, les β -hydroxy acides normaux impair à 11 et 13 atomes de carbone et le i - β -13:0 ont été identifiés en quantités appréciables respectivement dans les cultures sur n -C₁₉ et i -C₁₉.

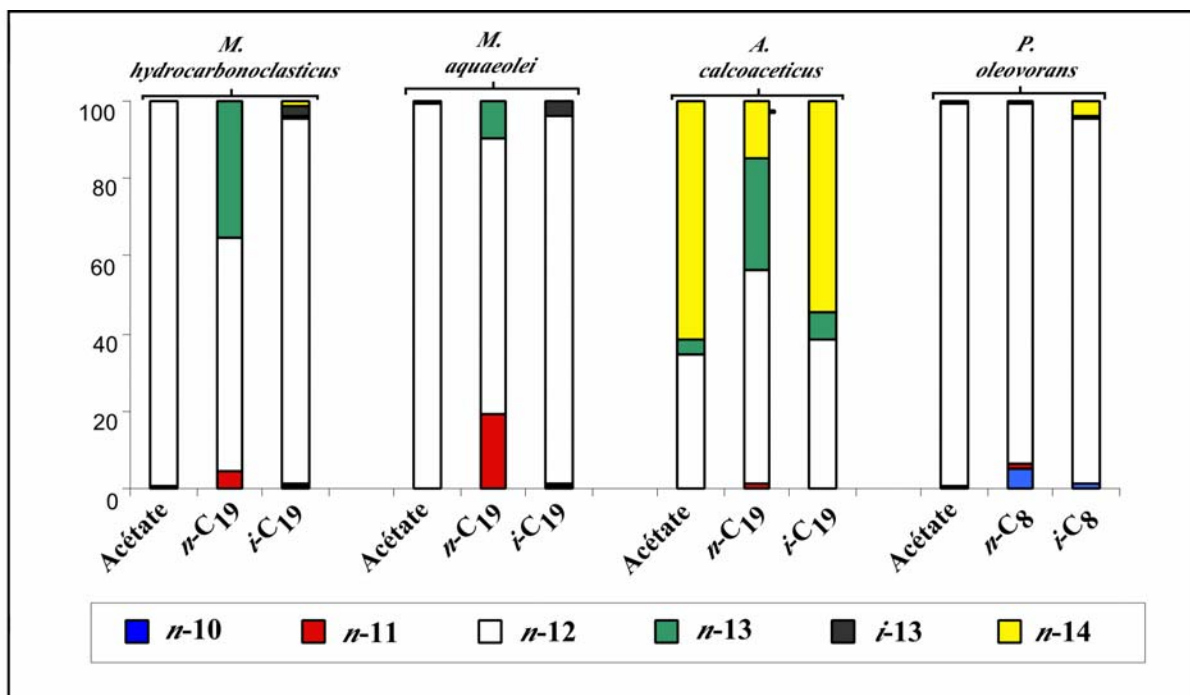


Figure IV.15. Comparaison des distributions des β -hydroxy acides dans les lipides labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus*, *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans* en fonction de la source de carbone.

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

En débutant ce travail de recherche, notre objectif consistait à étudier la composition lipidique de quatre bactéries hydrocarbonoclastes Gram-négatives cultivées sur des hydrocarbures de structures différentes, dans le but de préciser l'influence de ces composés notamment sur la distribution en acides gras et en hydroxy acides et de déterminer quelles étaient leurs voies métaboliques. Nous cherchons également à savoir dans quelle mesure les hydroxy acides pouvaient servir de marqueurs de ces activités métaboliques.

La première partie de notre travail de recherche a montré que *M. hydrocarbonoclasticus* est capable de métaboliser une grande variété d'hydrocarbures comportant des chaînes alkyles: alcanes normaux, mono-ramifiés, des phényl- et des cyclohexyl-alcanes ou encore des alcènes terminaux. La souche cultivée s'est avérée cependant incapable d'utiliser les hydrocarbures polyramifiés de type isoprénoides tels que le pristane et le squalane, les cyclohexyl-alcanes à chaîne hydrocarbonée comportant un nombre pair d'atomes de carbone comme le cyclohexyldodécane et les phényl-alcanes à chaînes hydrocarbonées courtes (ethyl-benzène et propyl-benzène). La présence de nombreux métabolites dans les lipides "non liés" a permis de préciser les voies métaboliques. L'oxydation de l'hydrocarbure en alcool primaire par hydroxylation du groupement méthyle terminal le moins encombré, puis en acide entrant ensuite dans un cycle de β -oxydation est la voie principale de dégradation. Des voies de dégradation secondaires en fonction de la structure de l'hydrocarbure ont été aussi mises en évidence. Il s'agit en particulier (i) de l'oxydation subterminale en alcool secondaire suivie d'une réaction de type Bayer-Villiger, et oxydation ultérieure de l'alcool qui en résulte en acide, (ii) de l' α -oxydation notamment dans le cas des composés possédant un groupement méthyle en β , ou encore (iii) de l'époxidation des oléfines terminales. Aucune attaque directe des groupements phényl ou cyclohexyl n'a en revanche été détectée.

L'analyse qualitative et quantitative des trois fractions lipidiques de cette bactérie a montré que la fraction "non liée" est la plus influencée par la nature de l'hydrocarbure utilisé comme source de carbone. En effet, la parité des lipides (C_{pair} ou C_{impair} dominant) suit celle de l'hydrocarbure fourni. Des quantités importantes d'acides gras *iso* et *antéiso* ont été aussi identifiées respectivement dans les cultures sur alcanes ramifiés *iso* et *antéiso*. Dans ces deux cas les distributions en acides gras étaient plus proches de celles observées chez les bactéries Gram-positives que chez les Gram-négatives. Par ailleurs, l'utilisation d'un alcène terminal,

des phényl- et cyclohexyl-alcanes s'accompagne de l'incorporation dans les lipides membranaires de quantités significatives des acides correspondants.

Les lipides labiles en milieux basique et acide se caractérisent quant à eux par une forte contribution de β -hydroxy acides provenant de l'hydrolyse des LPS. Le β -*n*-12:0 est toujours dominant, et quasiment exclusif dans certains cas. L'homologue inférieur et supérieur de ce dernier composé ont été également identifiés mais en plus faibles quantités. Des β -hydroxy acides comportant une ramification méthyle en position *iso* ou *antéiso*, ou encore une double liaison terminale selon l'hydrocarbure utilisé peuvent être incorporés dans les LPS dans une faible proportion. Par ailleurs, seuls de très faibles pourcentages de β -hydroxy acides phényl- ou cyclohexyl-alcanoïques ont été incorporés dans les LPS. Il apparaît que chez *M. hydrocarbonoclasticus* les β -hydroxy acides des LPS, comportent un nombre d'atomes de carbone compris entre 10 et 14, c'est à dire bien inférieure à celui des β -hydroxy acides issus de la dégradation des hydrocarbures.

Afin de savoir si les résultats obtenus avec *M. hydrocarbonoclasticus* étaient généralisables à d'autres bactéries Gram-négatives., nous avons étudié dans la seconde partie de ce travail l'influence de la source de carbone sur la composition lipidique de trois autres espèces: *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans*. Les deux premières bactéries ont été cultivées sur l'acétate d'ammonium et les alcanes *n*-C₁₉ et *i*-C₁₉, et la troisième sur le même substrat soluble et deux hydrocarbures à chaînes courtes *n*-C₈ et 2-Me-C₇.

Les résultats obtenus avec *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus* corroborent ceux obtenus avec *M. hydrocarbonoclasticus*, il s'agit notamment de la parité des lipides qui suit celle des substrats ou de l'influence de la ramification *iso* qui se retrouve chez la plupart des lipides. La distribution des hydroxy acides des LPS (α ou β selon le genre bactérien) est très faiblement influencée par la nature de la source de carbone, seules de faibles quantités de β -hydroxy acides issus de la dégradation des alcanes ont été notées.

Dans le but de maintenir une fluidité membranaire optimale, *P. oleovorans* cultivée sur hydrocarbures courts effectue non seulement une redistribution de ses acides gras membranaires mais aussi des β -hydroxy acides des LPS: synthèse d'acides gras saturés et diminution de la proportion des β -hydroxy acides liés par liaisons esters.

Par ailleurs, les résultats obtenus dans la deuxième partie de notre travail de recherche montrent que les hydroxy acides (α ou β) des LPS de ces trois bactéries Gram-négatives

comportent un nombre d'atomes de carbone compris entre 10 et 14 dépendant de l'espèce bactérienne. La présence d'une ramification sur l'hydrocarbure métabolisé n'a de plus que peu d'influence sur la structure des hydroxy acides des LPS.

Il apparaît donc que chez les bactéries Gram-négatives l'utilisation des hydrocarbures de types aliphatiques modifie faiblement la nature des hydroxy acides engagés dans les LPS membranaires. Les hydroxy acides extractibles aux solvants sont quant à eux le reflet direct du métabolisme bactérien et peuvent donc être la signature en milieu naturel d'une éventuelle pollution par les hydrocarbures, ou tout du moins de la dégradation des hydrocarbures et lipides naturellement présents dans les sédiments ou les colonnes d'eau.

Jusqu'à présent il était admis que seules de très mineures modifications dans la structure des hydroxy acides étaient tolérées par les bactéries pour qu'ils puissent être intégrés dans les LPS membranaires: elles concernaient uniquement la longueur des chaînes acyles (Williams et al., 1991). Nos résultats montrent que d'autres modifications peuvent être tolérées: il s'agit de la présence de ramifications de type *iso* et *anteiso* ou encore d'insaturations. Une étude exhaustive des lipides A des LPS isolés de cultures de bactéries sur hydrocarbures pourrait permettre de préciser la structure de telles entités lipidiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Aeckersberg, F., Rainey, F.A. and Widdel, F., 1998. Growth, natural relationship, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulphate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* 170, 361-369.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Janvier 2000. Communiqué de Presse: Contamination des produits de la mer par les hydrocarbures suite au naufrage de l'Erika. Premières recommandations de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.
- Aislabe, J., McLeod, M. and Fraser, M., 1998. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology* 49, 210-214.
- Albelo, S.T. and Domenech, C.E., 1997. Carbons from choline present in the phospholipids of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 156, 271-274.
- Albro, P.W., 1976. In: *Chemistry and biochemistry of natural walls* (Colattukudy, P.E., Eds). Elsevier, Amsterdam.
- Albro, P.W. et Dittmer, J.D., 1971. Bacterial hydrocarbons: occurrence, structure and metabolism. *Lipids* 5, 320-325.
- Al-Hadrami, M.N., Lappin-Scott, H.M. and Fisher, P.J., 1995. Bacterial survival and n-alkane degradation Within Omani crude oil and a mousse. *Marine Pollution Bulletin* 30, 403-408.
- Allard, B. and Templier, J., 2001. High molecular weight lipids from the trilaminar outer wall (TLS)-containing microalgae *Chlorella emersonii*, *Scenedesmus communis* and *Tetraedron minimum*. *Phytochemistry* 57, 459-467.
- Al-Mallah, M., Goutz, M., Mille, G., Bertrand, J.C., 1990. Production of emulsifying agents during growth of a marine *Alteromonas* in sea water with eicosane as carbon source, a solid hydrocarbon. *Oil Chemical Pollution* 6, 289-305.
- Al-Mallah, M., 1988. Biodégradation des hydrocarbures dans les milieux sursalés. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille II. 192 p.
- Alugupalli, S. and Larsson, L., 1992. Secondary fatty alcohols of *Mycobacterium xenopi*. *Journal of General Microbiology* 138, 2499-2502.
- Alvarez, H.M., 2003. Relationship between β -oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in *Actinomycetes* bacteria. *International Biodeterioration and biodegradation* 52, 35-42.
- Amund, O.O. and Higgins, I.J., 1985. The degradation of 1-phenylalkanes by an oil-degrading strain of *Acinetobacter iwoffii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 51, 45-56.
- Anders, H.J., Haetzke, A., Kaempfer, P., Ludwig, W. and Fuchs, G., 1995. Taxonic position of aromatic degrading denitrifying *Pseudomonas* strain K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp.nov., and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp.nov., respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 45, 327-333.
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1990. Occurrence metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews* 54, 450-472.
- Anderson, B.A., 1978. Mass spectrometry of fatty acid pyrrolidides. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids* 16, 279-308.
- Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W. and Michaelis, W., 2000. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 518-523.
- Asperger, O. and Kleber, H.P., 1991. Metabolism of alkanes by *Acinetobacter*. In: Towner, K.J., Bergogne-Bérézin, E. and Fewson, C.A. (Eds.), *The biology of Acinetobacter: taxonomy, clinical importance, molecular biology, physiology and industrial relevance*. Plenum, New York, pp.232-350.
- Asselineau, J., 1962. Les lipides bactériens. Isolement, composition, propriétés. *Actualités scientifiques et industrielles* 1297. Hermann. Paris.
- Atlas, R.M. and Bartha, R., 1972. Biodegradation and mineralization of petroleum in seawater at low temperature. *Canadian Journal of Microbiology* 18, 1851-1855.

- Atlas, R.M. and Bartha, R., 1992. Hydrocarbon degradation and oil spill bioremediation. In : Marshali, K.C. (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, Vol. 13, pp. 287-338. Plenum Press, London.
- Atlas, R.M., 1975. Effect of the temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied Microbiology* 30, 396-403.
- Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Reviews* 45, 180-209.
- Atlas, R.M., 1995a. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation* 35, 1-3.
- Atlas, R.M., 1995b. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 31, 4-12.
- Atlas, R.M., Boehm, P.D. and Calder, J.A., 1981. Chemical and biological weathering of oil from the Amoco Cadiz oil spillage in the littoral zone. *Estuarine and Coastal Marine Science in press?*.
- Ayanoglu, E., Walkup, R.D., Sica, D. and Djerrassi, C., 1982. Phospholipid studies of marine organisms: III. New phospholipid fatty acids from *Petrosia ficiformis*. *Lipids* 17, 617-625.
- Azoulay, E., Chouteau, J. and Davidovics, G., 1963. Isolement et caractérisations des enzymes responsable de l'oxydation des hydrocarbures. *Biochimica et Biophysica Acta* 77, 554-567.

B

- Bachofen, R., 1982. Production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* 38, 47-49.
- Ball, H.A., Johnson, H.A., Reinhard, M. and Spormann, A.M., 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *Journal of Bacteriology* 178, 5755-5761.
- Baptist, J.N., Gholson, R.K. and Coon, M.J., 1963. Hydrocarbon oxidation by a bacterial enzyme system. I. Products of Octane oxidation. *Biochemica and Biophysica Acta* 69, 40-47.
- Barouxis, A., Scribe, P., Dagaut, J. and Saliot, A., 1988. Free and bound lipids from equatorial surficial sediments separated as a function of particle size. In: Mattavelli, L. and Novelli, L.(Eds.), *Advances in Organic Geochemistry*, 1987. *Organic Geochemistry* 13, 773-783. Pergamon Press. Oxford.
- Bartha, R. et Atlas, R.M., 1977. the microbiology of aquatic oil spills. *Advances in Applied Microbiology* 22, 225-266.
- Bastin, E., 1926. Microorganisms in oilfields. *Science* 63, 21-24.
- Baumann, P., Doudoroff, M. and Stanier, R.Y., 1968. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology* 95, 1520-1541.
- Beam, H.W. and Perry, J.J., 1974a. Microbial degradation and assimilation of *n*-alkyl-substituted cycloparaffins. *Journal of Microbiology* 118, 394-399.
- Beam, H.W. and Perry, J.J., 1974b. Microbial degradation of cycloparaffinics hydrocarbons via co-metabolism and commensalism. *Journal of General Microbiology* 82, 163-169.
- Beijerinck, M.W., 1911. Uber pigmentbildung bei essigbakterien. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hug. Abt. 2*, 29: 169-176.
- Beller, H.R., Spormann, A.M., Sharma, P.K., Cole, J.R. and Reinhard, M., 1996. Isolation and characterization of a novel toluene-degrading, sulphatereducing-bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 1188-1196.
- Berekaa, M.M. and Steinbüchel, A., 2000. Microbial degradation of the multiply branched alkane 2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosane (squalane) by *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium ratisbonense*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4462-4467.
- Bernard, F.P. and Connan, J., 1992. Indigenous microorganisms in connate waters of many oilfields: a new tool in exploration and production techniques. SPE 24811. In: 67th Annual Technical Conference and Exhibition of the Society of Petroleum Engineers. Washington, DC, October 1992, pp 467-476.
- Bertrand, J.C. et Mille, G., 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre 13, pp. 343-385.
- Bertrand, J.C., Al Mallah, M., Acquaviva, M. and Mille., 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology* 11, 260-263.

- Bertrand, J.C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M. and Mille, G., 1993. Hydrocarbon Biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 168, 125-138.
- Bertrand, J.C., Esteves, J.L., Mulyono, M. and Mille, G., 1986. Use of continuous flow through systems to determine petroleum hydrocarbon evolution in superficial marine sediments. *Chemosphere* 15, 205-210.
- Bertrand, J.C., Rambeloarisoa, J.F., Rontani, J.F., Giusti, G. and Mattei, G., 1983. Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* 5, 567-572.
- Bigot, A., Saliot, A., Cui, X. and Li, J., 1989. Organic geochemistry of surface sediments from the Huanghe Estuary and adjacent Bohai Sea (China). *Chemical Geology* 75, 339-350.
- Blakley, E.R. and Papish, B., 1982. the metabolism of cyclohexanecarboxylic acid and 3-cyclohexanecarboxylic acid by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology* 28, 1324-1329.
- Blasig, R., Schunck, W.H., Jockisch, W., Franke, P. and Müller, H.G., 1984. Degradation of long-chain *n*-alkanes by the yeast *Ledderomyces elongisporus*. I. Products of alkane oxidation in whole cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 19, 241-246.
- Blumer, M., Guillard, R.R.L. and Chase, T., 1971. Hydrocarbons of Marine Phytoplankton. *Marine Biology* 8, 183-189.
- Blumer, M., Mullin, M.M. et Thomas, D.W., 1964. Pristane in the marine environment. *Helgol. Wiss. Meeresunter* 10, 187-201.
- Boon, J.J., de Lange, F., Schuyf, P.J.W., de Leeuw, J.W. and Schenk, P.A., 1977a. Organic geochemistry of Walvis Bay diatomaceous ooze. II. Occurrence and significance of hydroxyl fatty acids. In: Campos, R. Goni, J. (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry 1975*. Enadimas, Madrid, pp. 255-272.
- Boon, J.J., de Leeuw, J.W., Hoek, G.J.V.D. and Vosjan, J.H., 1977b. Significance and taxonomic value of *iso* and *anteiso* monoenoic fatty acids and branched β -hydroxy acids in *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of Bacteriology* 129, 1183-1191.
- Bossard, I. And Bartha, R., 1984. The fat of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, pp. 440-445.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Haeseler, F. et Vandecasteele, J.P., 1996. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement – Propriétés, origines, devenir. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*. Vol. 51, N° 3.
- Bouvet, P.J.M. and Grimont, P.A.D., 1986. Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 228-240.
- Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. and Mueller, J.G., 2001. Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment. *Bioremediation. Journal* 5, 145-157.
- Brennan, P.J., 1988. Mycobacterium and other actinomycetes. In: Ratledge, C. and Wilkinson, S.G.(Eds.), *Microbial lipids*, Volume 1. Academic Press. pp: 203-298.
- Britton, L., 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 89-129. Marcel Dekker, New York, Basel.
- Broderick, L.S. and Cooney, J.J., 1982. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. *Dev. Ind. Microbiol.* 23, 425-434.
- Brown, G.R., Sutcliffe, I.C., Bendell, D. and Cumming, S.P., 2000. The modification of the membrane of *Oceanomonas baumannii* when subject to both osmotic and organic solvent stress. *FEMS Microbiology Letters* 189, 149-154.
- Bryn, K. and Jantzen, E., 1977. Occurrence and patterns of waxes in Neisseriaceae. *Journal of General Microbiology* 102, 33-43.
- Bryn, K. and Rietschel, E., Th., 1978. L-2-hydroxytetradecanoic acid as a constituent of *Salmonella* lipopolysaccharides (lipid A). *European Journal of Biochemistry* 86, 311-315.

Budzinski, H., Raymond, N., Nadalig, T., Gilewicz, M., Garrigues, P., Bertrand, J.C. and Caumette, P., 1998. Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Organic Geochemistry* 28, 337-348.

C

- Camacho-Ibar, V.F., Aveytua-Alcazar, L. and Carriquiry, J.D., 2003. Fatty acid reactivities in sediment cores from the northern Gulf of California. *Organic Geochemistry* 34, 425-439.
- Cantwell, S.G., Lau, E.P., Watt, D.S. and Fall, R.R., 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of Bacteriology* 135, 324-333.
- Cardini, G. and Jurtschuk, P., 1968. Cytochrome P-450 involvement in the oxidation of *n*-octane by cell-free extracts of *Corynebacterium* sp. Strain 7E1C. *Journal of Biological Chemistry* 243, 6071-6075.
- Cardini, G. and Jurtschuk, P., 1970. The enzymatic hydroxylation of *n*-octane by *Corynebacterium* sp. Strain 7E1C. *Journal of Biological Chemistry* 245, 2789-2793.
- Cardoso, J.N. and Eglinton, G., 1983. The use of hydroxyacids as geochemical indicators. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 47, 723-730.
- Carty, S.M., Sreekumar, K.R. and Raetz, C.R.H., 1999. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 9677-9685.
- Cerniglia, D.E., 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. pp. 99-128. Macmillan Publishing Company, New York.
- Chablain, P.A., Zgoda, A.L., Sarde, C.O. and Truffaut, N., 2001. Genetic and molecular organisation of the alkylbenzene catabolism operon in the psychrotrophic strain *Pseudomonas Putida* 01G3. *Applied Microbiology* 67, 453-458.
- Chattopadhyay, M.K. et Jagannadham, M.V., 2003. A branched chain fatty acids promotes cold adaptation in bacteria. *Journal of Bioscience* 28, 363-364.
- Chen, Q., Janssen, D.B. and Witholt, B., 1995b. Growth on octane alters the membrane lipid fatty acids of *Pseudomonas oleovorans* due to the induction of *alkB* and synthesis of octanol. *Journal of Bacteriology* 177, 6894-6901.
- Chen, Q., Nijenhuis, A., Preusting, H., Dolfing, J., Janssen, D.B. and Witholt, B., 1995a. Effects of octane on the fatty acid composition and transition temperature of *Pseudomonas oleovorans* membrane lipids during growth in two-liquid-phase. *Enzyme and Microbial Technology* 17, 647-652.
- Chihib, N.E., da Silva, M.R., Delattre, G., Laroche, M. and Federighi, M., 2003. different cellular fatty acid pattern behaviours of two strains of *Listeria monocytogenes* Scott A and CNL 895807 under different temperature and salinity conditions. *FEMS Microbiology Letters* 218, 155-160.
- Choma, A., 1999. Fatty acid composition of *Mesorhizobium huakuii* lipopolysaccharides. Identification of 27-oxooctacosanoic acid. *FEMS Microbiology Letters* 177, 257-262.
- Clark, R.C. Jr. and Blumer, M., 1967. Distribution of *n*-paraffins in marine organisms and sediment. *Limnol. Oceanogr.* 12, 79-87.
- Congress of the United States- Office of Technology assessment, 1991. Bioremediation of the marine oil spills.
- Connan, J., 1984. Biodegradation of crude oils in reservoirs. In: Brooks, J. and Welte, D.H. (Eds.), *Advances in Petroleum Geochemistry* 1. Academic Press, London, pp. 299-335.
- Connan, J., Lacrampe-Coulomb, G. and Magot, M., 1996. Origin of gases in reservoirs. In: Proc. 1995 International Gas Research Conference, Cannes, France, 6-9 November, 1995.
- Cooney, J.J. and Summers, R.J., 1976. Hydrocarbon-using microorganisms in three freshwater ecosystems, p. 141-156. In: Sharpley, J.M. and Kaplan, A.M. (Eds.), *Proceeding of the the third International Biodegradation Symposium*. Applied Sciences Publishers, Ltd., London.
- Cranwell, P.A., 1978. Extractable and bound lipid components in a freshwater sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 1523-1532.
- Cranwell, P.A., 1981a. The stereochemistry of 2- and 3- hydroxyl fatty acids in recent lacustrine sediment. *Geochimica Cosmochimica Acta* 45, 547-552.
- Cranwell, P.A., 1981b. Diagenesis of free and bound lipids in terrestrial detritus deposited in a lacustrine sediment. *Organic Geochemistry* 3, 79-89.

Cronan, J.E.Jr and Gelmann, E.P., 1975. Physical properties of membrane lipids: biological relevance and regulation. *Bacteriological Reviews* 39, 232-256.

D

- Dagley, S., 1971. Catabolism of aromatic compounds by microorganisms. *Advances in Microbiology Physiology* 6, 1-46.
- Davies, J.S. and Westlake, D.W.S., 1979. Crude oil utilization by fungi. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 146-156.
- Davis, J.B. and Raymond, R.L., 1961. Oxidation of alkyl-substituted cyclic hydrocarbons by *Nocardia* during growth on *n*-alkanes. *Applied Microbiology* 9, 383-388.
- Davis, J.B., 1967. *Petroleum Microbiology*. Elsevier Publishing Co., New York.
- De Leeuw, J.W., Rijpstra, W.I.C. and Nienhuis, P.H., 1995. Free and bound fatty acids in the living and decomposing eelgrass *Zostera marina* L. *Organic Geochemistry* 23, 721-728.
- De Semet, M.J., Kingma, J. and Witholt, B., 1978. the effect of toluene on the structure and permeability of the outer and cytoplasmic membranes of *Echerichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 506, 64-80.
- Delille, D., Basseres, A. and Dessommes, A., 1998. Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biology* 19, 237-241.
- Den Kamp, J.A.F.O., 1979. Lipids asymmetry in membranes. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 47-71.
- Diard, S., Carlier, J.P., Ageron, E., Grimont, P.A.D., Langlois, V., Guerin, P. and Bouvet, O.M.M., 2002. Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate) from octanoate in different *Pseudomonas* belonging to the rRNA homology group I. *Systematic and Applied Microbiology* 25, 183-188.
- Dibble, J.T. and Bartha, R., 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 729-739.
- Diefenbach, R., Heipieper, H.J., Keweloh, H., 1992 The conversion of *cis* into *trans* unsaturated fatty acids in *Pseudomonas putida* P8: Evidence for a role in the regulation of membrane fluidity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38, 382-387.
- Dong, J.Z., Vorkink, W.P. and Lee, M.L., 1993. Origin of long-chain alkylcyclohexanes and alkylbenzenes in coal-bed wax. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 837-849.
- Douglas, A.G., Hall, P.B., Bowler, B. et Williams, P.F.V., 1981. Analysis of hydrocarbons in sediments as indicator of pollution. *Proceeding Royal Society of Edinburgh*, 80B: 113.
- Doumenq, P., Acquaviva, M., Asia, L., Durbec, J.P., Bertrand, J.C., Dreau, Y. and Mille, G., 1999. Changes in fatty acids of *Pseudomonas nautica*, a marine denitrifying bacterium, in reponse to *n*-eicosane as carbon source and various culture conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 28, 151-161.
- Doumenq, P., Aries, E., Asia, L., Acquaviva, M., Artaud, J., Gilewicz, M., Mille, G. and Bertrand, J.C., 2001. Influence of *n*-alkanes and petroleum on the fatty acid composition of a hydrocarbonoclastic bacterium: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain 617. *Chemosphere* 44, 519-528.
- Dowling, N.J.E., Widdel, F. and White, D.C., 1986. Phospholipid ester linked fatty acid biomarkers of acetate-oxidizing sulphate reducers and other sulphide-forming bacteria. *Journal of General Microbiology* 132, 1815-1825.
- Drewry, D.T., Lomax, J.A., Gray, G.W. and Wilkinson, S.G., 1973. *Biochem. J.* 133, 563-571.
- Du, G. and Yu, J., 2002. Metabolic analysis on fatty acid utilization by *Pseudomonas oleovorans*: mcl-poly(3-hydroxyalkanoates) synthesis versus β -oxidation. *Process Biochemistry* 38, 325-332.
- Dubois-Brissonnet, F., Malgrange, C., Guérin-Méchin, L., Heyd, B. and Leveau, J.Y., 2000. Effect of temperature and physiological state on the fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Food Microbiology* 55, 79-81.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Jefferey, S.W. and Barrett, S.M., 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes *Chlorophyceae* and *Prasinophyceae* 2. Lipid classes and fatty acids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161, 115-134.
- Dunlap, K.R. and Perry, J.J., 1967. Effect of substrate on the fatty acid composition of hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Journal of Bacteriology* 94, 1919-1923.

Dutta, T.K. and Harayama, S., 2001. Biodegradation of *n*-alkylcycloalkanes and *n*-alkylbenzenes via new pathway in *Alcanivorax* sp. Strain MBIC 4326. Applied and Environmental Microbiology 64, 1970-1974.

E

- Eglinton, G. and Hunneman, D.H., 1968. Gas chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxy acids.-III. The mass spectra of the methyl esters trimethylsilyl ethers of aliphatic hydroxy acids. A facile method of double bond location. Organic Mass Spectrometry 1, 593-611.
- Eglinton, G., Gonzalez, A.G., Hamilton, R.J. and Raphael, R.A., 1962. Hydrocarbon constituents of the wax coating of plant leaves: a taxonomic survey. Phytochemistry 1, 86-102.
- Eglinton, G., Hunneman, D.H. and Douraghi-Zadeh, K., 1968. Gas-chromatographic-mass spectrometric studies of long chain hydroxyl acids –II. The hydroxyl acids and fatty acids of a 5000-year-old lacustrine sediment. Tetrahedron 24, 5929-5941.
- Ehrenreich, P., Behrends, A., Harder, J. and Widdel, F., 2000. Anaerobic oxidation of alkanes by a newly isolated denitrifying bacteria. Archives of Microbiology 173, 58-64.
- El-Kadi, A.I., 2001. Modeling hydrocarbon biodegradation in tidal aquifers with water-saturation and heat inhibition effects. Journal of Contaminant hydrology 51, 97-125.
- Evans, C.R., Rogers, M.A. and Bailey, N.J.L., 1971. Evolution and alteration of petroleum in Western Canada. Chemical Geology 8, 147-170.
- Evans, P.J., Mang, D.T., Kim, K.S. and Young, L.Y., 1991. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. Applied and Environmental Microbiology 57, 1139-1145.

F

- Fall, R.R., Brown, J.L. and Schaeffer, T.L., 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas Citronellolis*. Applied and Environmental Microbiology 38, 715-722.
- Fang, J. and Barcelona, M.J., 1998. Biogeochemical evidence for microbial community change in jet fuel hydrocarbons-contaminated aquifer. Organic Geochemistry 29, 899-907.
- Fedorack, P.M., Semple, K.M. and Westlake, D.W.S., 1984. Oil degradation capacities of yeast and fungi isolated from coastal marine environments. Canadian Journal of Microbiology 30, 565-571.
- Feinberg, E.L., Ramage, P.I.N. and Trudgill, P.W., 1980. The degradation of *n*-alkylcycloalkanes by a mixed bacterial culture. Journal of General Microbiology 121, 507-511.
- Fernandez-Linares, L., Acquaviva, M., Bertrand, J.C. and Gauthier, M., 1996b. Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by marine halotolerant bacterium. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Systematic and Applied Microbiology 19, 113-120.
- Finnerty, W.R., 1990a. Assay methods for long-chain alkane oxidation in *Acinetobacter*. Methods in Enzymology 188, 10-14.
- Finnerty, W.R., 1990b. Primary alcohols dehydrogenase from *Acinetobacter*. Methods in Enzymology 188, 14-18.
- Finnerty, W.R., 1977. The biochemistry of microbial alkane oxidation: new insights and perspectives. Trends in Biochemical Sciences 2, 73-75.
- Finnerty, W.R., 1988. Lipids of *Acinetobacter*. In: Proceeding of the Word Conference on Biotechnology for Fats and Oil Ondustry, 184-189.
- Fixter, L.M., Nagi, M.N., McCormack, J.G. and Fewson, C.A., 1986. Structure, distribution and function of wax esters in *Acinetobacter calcoaceticus*. Journal of General Microbiology 132, 3147-3157.
- Flahaut, S., Tierny, Y., Watier, D., Hornez, J.P. and jeanfils, J., 2000. Impact of thermal variations on biochemical and physiological traits in *Pectunatus* sp. International Journal of Food Microbiology 55, 53-61.
- Floodgate, D.F., 1984. The fat of petroleum in the marine ecosystems. In: A.W. Bourquin and P.H. Pritchard (Eds.), Proceeding Workshop., Microbial degradation of pollutentin marine environment. EPA-66019-79-012. Environmental research Laboratory, Gulk-Bruze, Flor.

- Floodgate, G.D., 1995. Some environmental aspects of marine hydrocarbon bacteriology. *Aquatic Microbial Ecology* 9, 3-11.
- Foster, J.W., 1962. Hydrocarbons as substrates for microorganisms. *Journal of Microbiology Serology* 28, 241-274.
- Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J. and Tiedje, J.M., 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 2802-2810.
- Fukushima, K., Kondo, H., and Sakata, S., 1992a. Geochemistry of hydroxy acids in sediments-I. Freshwater and brackish water lakes in Japan. *Organic Geochemistry* 18, 913-922.
- Fukushima, K., Kondo, H., and Sakata, S., 1992b. Geochemistry of hydroxy acids in sediments-II. Estuarine and coastal marine environment. *Organic Geochemistry* 18, 923-932.
- Fukuoka, S., Brandenburg, K., Müller, M., Lindner, B., Koch, M.H.J. and Seydel, U., 2001. Physico-chemical analysis of lipid A fractions of lipopolysaccharide from *Erwinia carotovora* in relation to bioactivity. *Biochemica et Biophysica Acta* 1510, 185-197.
- Fulco, A.J., 1983. Fatty acid metabolism in bacteria. *Progress in Lipid Research* 22, 133-160.

G

- Garcette-Lepecq, A., Largeau, C., Bouloubassi, I., Derenne, S., Saliot, A., Lorre, A. and Point V., 2003. Lipids and their mode of occurrence in two surface sediments from the Danube Delta and Northwestern Black Sea: implications for sources and early diagenetic alterations. I. Carboxylic acids. *Soumis à Organic Geochemistry*.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Aquaviva, M., Bonin, P., and Bertrand, J.C., 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 568-576.
- Gelpi, E., Schneider, H.J., Mann, J., Oro, J., 1970. Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic algae. *Phytochemistry* 9, 603-612.
- Gibson, D.T., Koch, J.R. and Callio, R.E., 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* 1, 2653-2662.
- Gibson, D.T., Mahadevan, V., Jerina, D.M., Yagi, H. and Yeh, H.J.C., 1975. Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benz(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science*, 189, 295-297.
- Gibson, T.D. and Subramanian, V., 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 181-252. Marcel Dekker, New York, Basel.
- Gillan, F.T. and Sandstrom, M.W., 1985. Microbial lipids from a nearshore sediment from Bowling Green Bay, North Queensland: the fatty acid composition of intact lipid fraction. *Organic Geochemistry* 8, 321-328.
- Gillan, F.T., Johns, R.B., Verheyen, T.V. and Nichols, P.D., 1983. Mono-unsaturated fatty acids as specific bacterial markers in marine sediments. In: Bjoroy, M. et al.(Eds.), *Advances in Organic Geochemistry, 1981* –John Wiley and Sons, Chichester : 198-206.
- Gillan, T.G., Hogg, R.W., Drew, E.A., 1984. The sterol and fatty acid compositions of seven topical seagrasses from north Queensland, Australia. *Phytochemistry* 23, 2817-2821.
- Gillan, F.T., Johns, R.B., Verheyen, T.V., Nichols, F.D., Estdaille, R. and Bavor, Jr.H.J., 1981. Monounsaturated fatty acids as specific bacterial markers in marine sediments. In: M.D Jordy et al. (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry, John Wiley and sons, Chichester*, pp. 198-206.
- Giovannoni, S. and Rappe, M., 2000. Evolution, diversity and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchmann, D.L. (Ed.), *Microbial ecology of the oceans*. Wiley-Liss, New York, pp. 47-84.
- Goossens, H., De Leeuw, J.W., Rijpstra, W.I.C., Meyburg, G.J. and Schenck, P.A., 1989a. Lipids and their mode of occurrence in bacteria and sediments-I. A methodological study of the lipid composition of *Acinetobacter calcoaceticus* LMD 79-41. *Organic Geochemistry* 14, 15-25.

- Goossens, H., De Leeuw, J.W., Schenck, P.A. and Brassell, S.C., 1984. Tocopherols as likely precursors of pristane in ancient sediments and crude oils. *Nature* 312, 440-442.
- Goossens, H., Duren, R.R., De Leeuw, J.W., and Schenck, P.A., 1989b. Lipids and their mode of occurrence in bacteria and sediments –II. Lipids in the sediment of a stratified, freshwater lake. *Organic Geochemistry* 14, 27-41.
- Goossens, H., Rijpstra, W.I.C., Duren, R.R., de Leeuw, J.W. and Schenck, P.A., 1986. Bacterial contribution to sedimentary organic matter; a comparative study of lipid moieties in bacteria and sediments. *Organic Geochemistry* 10, 683-696.
- Goswami, P. and Singh, D.H., 1991. Different modes of hydrocarbons up-take by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 1-11.
- Goutx, M., Aquaviva, M. and Bertrand, J.C., 1990. Cellular and extracellular carbohydrates and lipids from marine bacteria during growth on soluble substrates and hydrocarbons. *Marine Ecology Progress series* 61, 291-296.
- Grassia, G.S., McLean, K.M., Glenat, P., Bauld, J. and Sheedy, A.J., 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology* 21, 47-58.
- Grassia, G.S., McLean, K.M., Glenat, P., Bauld, J. and Sheedy, A.J., 1996. A systematic survey for thermophilic fermentative bacteria and archaea in high temperature petroleum reservoirs. *FEMS Microbiology Ecology* 21, 47-58.
- Grimalt, J.O. and Albaigés, J., 1990. Characterization of the depositional environments of the Ebro Delta (Western Mediterranean) by the study of the sedimentary lipid markers. *Marine Geology* 95, 207-224.
- Grund, A., Shapiro, J., Fennewald, M., Bacha, P., Leahy, J., Markbreiter, K., Neider, M. and Toepfer, M., 1975. Regulation of alkane oxidation in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology* 123, 546-556.
- Guckert, J.B., Anrworth, C.P., Nichols, O.D. and White, D.C., 1985. Phospholipid, ester linked fatty acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 33, 147-158.
- Guezennec, J. and Fiala-Medioni, A., 1996. Bacterial abundance and diversity in the Barbados Trench determined by phospholipid analysis. *FEMS Microbiology Ecology* 19, 83-93.
- Guezennec, J., 1995. Approches des écosystèmes bactériens par les lipides: force et faiblesse des marqueurs bactériens. *Oceanis* 20, 75-93.
- Guyer, M. and Hegeman, G., 1969. Evidence for a reductive pathway for the anaerobic metabolism of benzoate. *Journal of Bacteriology* 99, 906-907.

H

- Haddad, R.I. and Martens, C.S., 1987. Biogeochemical cycling in an organic-rich coastal basin-IX. Sources and accumulation rates vascular plant-derived organic matter. *Geochimica Cosmochimica Acta* 51, 2991-3001.
- Haddad, R.I., Martens, C.S. and Farrington, J.W., 1992. Quantifying early diagenesis of fatty acids in rapidly accumulating coastal marine sediment. In: Eckardt, C.B., Maxwell, J.R., Later, S.R. and Manning, D.A.C. (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry, 1992*. *Organic Geochemistry*, 19: 205-216. Pergamon Press, Oxford.
- Haeffner, N., Chaby, R. and Szabo, L., 1977. Identification of 3-methyl-3-hydroxydecanoic and 2-methyl-3-hydroxytetradecanoic acids in the "lipid X" fraction of the *Bordetella pertussis* endotoxin. *European Journal of Biochemistry* 77, 535-544.
- Hambrick, G.A., DeLaune, R.D. and Patrick, W.H.Jr., 1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied Environmental Microbiology* 40, 365-369.
- Han, J. and Calvin, M., 1969. Hydrocarbon distribution of algae and bacteria and microbiological activity in sediments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64, 436-443.
- Hardwood, J.L. and Russell, N.J., 1984. *Lipids in plants and microbes*. George Allen and Unwin, London, 162 p.
- Harms, G., Rabus, R. and Widdel, F., 1999. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 172, 303-312.

- Hartgers, W.A., Sinninghe Damste, J.S., Requejo, A.G., Allan, J., Hayes, J.M., Ling, Y., Xie, T.M., Primack, J. and de Leeuw, J.W., 1994. A molecular and carbon isotopic study towards the origin and diagenetic fate of diaromatic carotenoids. In: Telnaes, N., Van Grass, G. and Oygard, K. (Eds.). European Association of Organic Geochemistry, 703-725.
- Harvey, H.R. and Macko, S.A., 1997. Catalysts or contributors? Tracking bacterial metabolism of early diagenesis in the marine water column. *Organic Geochemistry* 34, 425-439.
- Hashimoto, M., Asai, Y., Tamai, R., Jinno, T., Umatani, K. and Ogawa, T., 2003. Chemical structure and immunobiological activity of lipid A from *Prevotella intermedia* ATCC 25611 lipopolysaccharide. *FEBS Letters* 543, 98-102.
- Hazel, J.R. and Williams, E.E., 1990. the role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Progress in Lipid Research* 29, 167-227.
- Heider, J., Spormann, A.F., Beller, H.R. and Widdel, 1999. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* 22, 259-473.
- Heinz, E., Tulloch, A.P. and Spencer, J.F.T., 1969. Streospecific hydroxylation of long chain compounds by a species of *Turolopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 244, 882-886.
- Holmberg, K., 2001. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 6, 148-159.
- Hommel, R.K., 1994. Formation and function of biosurfactant for degradation of water insoluble substrates. In: Ratledge, C. (Ed.). *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht, Boston. Kluwer Academic Publisher, 63-87.
- Hopper, D.J., 1978. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J. (Ed.), *Development in biodegradation of hydrocarbons-1*. Applied Science Publishers, London. pp: 85-112
- Horstad, , I., Larter, S.R. and Mills, N., 1992. A quantitative model of biological petroleum degradation within The Brent Group reservoir in the Gullfaks field, Norwegian North Sea. *Organic Geochemistry* 19, 107-117.
- Horstad, I., Larter, S.R., Dypvik, H., Aagaard, P., Bjornvik, A.M., Johansen, P.E. and Eriksen, S., 1990. Degradation and maturity controls on oil field petroleum column heterogeneity in the Gullfaks field, Norwegian North Sea. *Organic Geochemistry* 16, 497-510.
- Huang, Y., Lockheart, M.J., Logan, G.A. and Eglinton, G., 1996. Isotopic and molecular evidence for the diverse origin of carboxylic acids in leaf fossils and sediments from the Miocene Lake Clarkia deposit, Idaho, U.S.A. *Organic Geochemistry* 24, 289-299.
- Hug, H. and Fiechter, A., 1973. Assimilation of aliphatic hydrocarbons by *Candida tropicalis*. *Archives Microbiology* 88, 87-96.
- Hunt, J.M., 1979. *Petroleum geochemistry and geology*. Ferman and Co., 617 p.
- Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J., Sorensen, D.L., McLean, J.E. and Huling, S., 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation as a function of oxygen tension in contaminated soils. *Journal of Hazardous materials* 51, 193-208.
- Husain, D.R., Goutx, M., Bezac., C., Gilewicz, M. and Bertrand, J.C., 1997. Morphological adaptation of *Pseudomonas nautica* strain 617 to growth on eicosane and modes of eicosane uptake. *Letters in applied Microbiology* 24, 55-58.
- Hussein, A., Skultety, L. and Toman, R., 2001. Structural analyses of the lipopolysaccharide from *Chlamydophila psittaci* strain 6BC and *Chlamydophila pneumoniae* strain Kajaani 6. *Carbohydrate research* 336, 213-223.
- Huu, B., Denner, E.B.M., Ha, D.T.C., Wanner, G. and Stan-Lotter, H., 1999. *Marinobacetr aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 367-375.
- Huybregtse, R. and Van der Linden, A.C., 1964. the oxidation of α -olefins by a *Pseudomonas*. Reaction involving the double bond. *Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology Serology* 30, 185-196.

I

- Inamoto, Y., Hamanaka, S., Hamanaka, Y., Ariyama, S., Takemoto, T. and Okita, K., 1993. Unique fatty acids of *Helicobacter pylori* are methoxy fatty acids. *Proc. Japan.Acad.* 3, 65-69.

- Intriago, P. and Floodgate, G.D., 1991. fatty acid composition of estuarine *Flexibacter* sp. Strain Inp: effect of salinity, temperature and carbon source for growth. *Journal of General Microbiology* 137, 1503-1509.
- Ishige, T., Tani, A., Takabe, K., Kawasaki, K., Sakai, Y. and Kato, N., 2002. Wax ester production from *n*-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1192-1195.

J

- Jiang, Z.H., Budzynski, W.A., Skeels, L.N., Krantz, M.J. and Koganty, R.R., 2002. Novel lipid A mimetics derived from pentaerythritol: synthesis and their potent agonistic activity. *Tetrahedron* 58, 8833-8842.
- Johns, R.B., Brady, B.A., Butler, M.S., Dembitsky, V.M. and Smith, J.D., 1994. Organic geochemical and geochemical studies of Inner Great Barrier Reef sediments –IV. Identification of terrigenous and marine sourced inputs. *Organic Geochemistry* 21, 1027-1035.
- Jones, R.G. et Gilman, H., 1951. *Organic Reactions* 6, 352.

K

- Kaneda, T., 1991. *Iso* and *anteiso*-fatty acids in bacteria: Biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Micobiological Reviews* 55, 288-302.
- Kaplan, N., Zosim, Z. and Rosenberg, E., 1987. Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 Emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 440-446.
- Kates, M., 1986. Definition and classification of lipids. In: Kates, M. (Ed), *Techniques of lipodology, isolation, analysis, and identification of lipids* (2nd revised edition). Elsevier. Amsterdam., pp: 1-79.
- Kawamura, K. and Ishiwatari, R., 1982. Tightly bound β -hydroxy acids in recent sediments. *Nature* 297, 144-145.
- Kawamura, K., Ishiwatari, R. and Ogura, K., 1987. Early diagenesis of organic matter in water column and sediments: Microbial degradation and resynthesis of lipids in Lake Haruna. *Organic Geochemistry* 11, 251-264.
- Kawamura, K. and Ishiwatari, R., 1984. Tightly bound aliphatic acids in Lake Biwa sediments. Their origin and stability. *Organic Geochemistry* 7, 121-126.
- Keinänen, N.M., Korhonen, L.K., Martikainen, P.J., Vartiainen, T., Miettinen, I.T., Lehtola, M.J., Nenonen, K., Pajunen, H., Kontro, M.H., 2003. Gas chromatographic-mass spectrometric detection of 2- and 3-hydroxy fatty acids as methyl esters from soil, sediment and biofilm. *Journal of Chromatography B* 783, 443-451.
- Kennish, M.J., 2001. *Practical handbook of marine science*, Third Edition. CRC Press. Boca Raton, London New York Washington, D.C.
- King, D.H. and Perry, J.J., 1975. The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism *Mycobacterium vaccae*. *Canadian Journal of Microbiology* 21, 85-89.
- Kissin, Y.V., 1990. Catagenesis of light cycloalkanes in petroleum. *Organic Geochemistry*, 15, 575-594.
- Klok, J., Baas, M., Cox, H.C., De Leeuw, J.W., Rijpstra, W.I.C. and Schenck, P.A., 1988. The mode of occurrence of lipids in Namibian Shelf diatomaceous ooze with emphasis on the β -hydroxy fatty acids. *Organic Geochemistry* 12, 75-80.
- Klug, M.J. and Markovetz, A.J., 1967. Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida*. II. Oxidation of alkanes and alkenes by *Candida lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 93, 1847-1852.
- Klug, M.J. and Markovetz, A.J., 1971. Utilization of aliphatic hydrocarbons by Microorganisms. *Advances in Microbiology Physiology* 5, 1-43.
- Klug, M.J. and Perry, J.J., 1967. Degradation of hydrocarbons by a members of the genus *candida*. II. Oxidation of *n*-alkanes and *n*-alkenes by *Candida lipolytica*. *Journal of Bacteriology* 93, 1847-1852.
- Ko, S.H. and Lebeault, J.M., 1999. Effect of mixed culture on co-oxidation during the degradation of saturated hydrocarbon mixture. *Journal of Applied Microbiology* 87, 72-79.

- Kolattukudy, P.E., 1976. Chemistry and biochemistry of natural waxes. Edited by Kolattukudy, P.E. Elsevier.
- Komararat, P. and Kates, M., 1975. The lipid composition of a halotolerant species of *Staphylococcus epidermis*. *Biochimica et Biophysica Acta* 398, 464-484.
- Krasikova, I.N., Khotimchenko, S.V., Solov'eva, T.F. and Ovodov, 1995. Mutual influence of plasmid profile and growth temperature on the lipid composition of *Yersinia pseudotuberculosis* bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1257, 118-124.
- Kulshin, V.A., Zähringer, U., Lindner, B., Frasch, C., Tsai, C.M., 1992. Structural characterization of the lipid A component of pathogenic *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology* 174, 1793-1900.
- Kumar, G.S., Jagannadham, M.V. and Ray, M.K., 2002. Low temperature induced changes in composition and fluidity of lipopolysaccharides in the Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology* 184, 6746-6749.
- Kussak, A. and Weintraub, A., 2002. Quadrupole ion-trap mass spectrometry to locate fatty acids on lipid A from gram-negative bacteria. *Analytical Biochemistry* 307, 131-137.

L

- Lal, B. and Khanna, S., 1996. Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 355-362.
- Lang, S., 2002. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 7, 12-20.
- Langworthy, T.A., 1985. Lipids of Archaeobacteria. In: Woese, C.R. et Wolfe, R.S. (Eds.), Vol. 8, pp. 459-497. Academic Press, New York.
- Larson, R.A., Bott, T.L., Hunt, L.L. and Rogenmuser, K., 1979. Photooxidation products of a fuel oil and their antimicrobial activity. *Environmental Science and Technology* 13, 965-969.
- Larter, S., Wilkhelms, A., Head, I., Koopmans, M., Aplin, A., Di-Primio, R., Zwasch, C., Erdmann, M. and Telnaes, N., 2003. The control of the composition of biodegraded oils in the deep subsurface-part 1: Biodegradation rate in petroleum reservoirs. *Organic Geochemistry* 34, 601-613.
- Lattuati, A., Metzger, P., Acquaviva, M., Bertrand, J.C., Largeau, C., 2002. *n*-Alkane degradation by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain SP 17: long chain β -hydroxy acids as indicators of bacterial activity. *Organic Geochemistry* 33, 37-45.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- Lee, M. and Chandler, A.C., 1941. A study of the nature, growth and control of bacteria in cutting compounds. *Journal of Bacteriology* 41, 373-386.
- Lee, R.F., Nevenzel, J.C., Paffenhöffer, G.A., Bensen, A.A., Patton, S. et Kavanagh, T.E., 1970. A unique hexaene hydrocarbon from a diatom *Skeletonema costatum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 202, 386-388.
- Lehninger, A.L., 1975. *Biochemistry*, 2nd Edition. Worth Publishers Inc., New York, pp. 543-558.
- Linareas, F., Acquaviva, M., Bertrand, J.C. and Gauthier, M., 1996. Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by marine halotolerant bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Systematic Applied Microbiology* 19, 113-125.
- Lohner, K., 1991. Effects of small organic molecules on phospholipids phase transitions. *Chemistry and Physics of lipids* 57, 341-362.
- Loveley, D.R. and Lonergan, D.J., 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol and *p*-cerol by a dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1856-1864.
- Lugtenberg, B. and Peters, R., 1976. Distribution of lipids in cytoplasmic and outer membranes of *Escherichia coli* K12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Lipids and lipids metabolism* 441, 38-47.
- Lugtenberg, B. and van Alphen, L., 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 737, 51-115.

- Lugtenberg, B., 1981. Composition and function of the outer membrane of *Escherichia coli*. Trends in Biochemical Sciences 6, 262-266.
- Lundquist, E.J., Scow, K.M., Jackson, L.E., Uesugi, S.L. and Johnson, 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. Soil Biology and Biochemistry 31, 1661-1675.
- Lyngby, J., Olsen, L.H., Eidem, T., Lundanes, E. and Jantzen, E., 2002. Quantification of lipopolysaccharides in outer membrane vesicle vaccines against meningococcal disease. High performance liquid chromatographic determination of the constituent 3-hydroxy-lauric acid. Biologicals 30, 3-7.

M

- MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J. and White, D.C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied and Environmental Microbiology 65, 3566-3574.
- Madison, L.L. and Huismann, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63, 21-53.
- Magot, M. and Connan, J., 1993. Ancient bugs in exploration and production. New Scientist (Elf Suppl.) April 1993, 14-15.
- Maki, H., Sasaki, T.S. and Harayama, S., 2001. Photo-oxidation of biodegraded crude oil and toxicity of the photo-oxidized products. Chemosphere 44, 1145-1151.
- Makula, R. and Finnerty, W.R., 1968a. Microbial assimilation of hydrocarbons. I. Fatty acids derived from normal alkanes. Journal of Bacteriology 95, 2102-2107.
- Makula, R. and Finnerty, W.R., 1968b. Microbial assimilation of hydrocarbons. II Fatty acids derived from 1-alkenes. Journal of Bacteriology 95, 2108-2111.
- Makula, R.A., Lockwood, P.J. and Finnerty, W.R., 1975. Comparative analysis of the lipids of *Acinetobacter* species grown on hexadecane. Journal of bacteriology 121, 250-258.
- Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S. and Laborda, F., 1996. Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. International Biodeterioration and Biodegradation 27, 69-75.
- Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S., Ortiz, M.L. and Laborda, 1995. Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. International Biodeterioration and Biodegradation 35, 269-284.
- Mark, B.Y., McDonalds, R.W., Veltkamp, D.J. and Gretney, W.J., 1995. Terrestrial and marine biomarkers in seasonally ice covered arctic estuary-integration of multivariate and biomarker approaches. Marine Chemistry 49, 1-50.
- Markovetz, A.J., Klug, M.J. and Forney, F.W., 1967. Oxidation of 1-tetradecene by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology 93, 1289-1293.
- Martin, S., Marquez, M.C., Sanchez-Porro, C., Mellado, E., Arahall, D.R. and Ventosa, A., 2003. *Marinobacter lipolyticus* sp. Nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 53, 1383-1387.
- Matsumoto, G., Torii, T. and Hanya, T., 1981. High abundances of long-chain normal alkanic acids in Antractic soils. Nature 290, 688-690.
- Matsumoto, G.I. and Nagashima, H., 1984. Occurrence of 3-hydroxy acids in microalgae and cyanobacteria and their geochemical significance. Geochimica et Cosmochemica Acta 48, 1680-1687.
- Matsumoto, G.I., Shioya, M. and Nagashima, H., 1984. Occurrence of 2-hydroxy acids in microalgae. Phytochemistry 23, 1421-1423.
- Matsumoto, G.I., Watanuku, K., Torii, T., 1988. Hydroxy acids in Antarctic lake sediments and their geochemical significance. Organic Geochemistry, 13: 785-790.
- May, S.W. and Abbott, B., 1973. Enzymatic epoxidation. II. Comparison between the epoxidation and hydroxylation reactions catalysed by the ω -hydroxylation system of *Pseudomonas oleovorans*. The Journal of Biology Chemistry 10, 1725-1730.
- Mc Caffrey, M.A., Farrington, J.W. and Repeta, D.J., 1989. Geochemical implication of the lipid composition of *Thioploca* spp. From the Peru upwelling region-15 S. Organic Geochemistry 14, 61-68.

- McGarrity, J.T. and Armstrong, J.B., 1975. The effect of salt on phospholipids fatty acid composition in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 398, 258-254.
- McKenna, E.J. and Kallio, R.E., 1971. Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, 1552-1554.
- McKenna, E.J., 1972. Microbial metabolism of normal and branched chain alkanes. In : Degradation of synthetic organic molecules in the biosphere. National Academy of Sciences. Washington, D.C., pp. 73-97.
- Mejia, R., Gomez-Eichelmann, M.C. and Fernandez, M.S., 1999. *Escherichia coli* membrane fluidity as detected by diprenylpropane : sensitivity to the bacterial fatty acid profile. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 368, 156-160.
- Mendoza, Y.A., Gülaçar, F.O. and Buchs., A., 1987a. Comparison of extraction techniques for bound carboxylic acids in recent sediments. 1. Unsubstituted monocarboxylic acids. *Chemical Geology* 62, 307-319.
- Mendoza, Y.A., Gülaçar, F.O. and Buchs., A., 1987b. Comparison of extraction techniques for bound carboxylic acids in recent sediments. 2. β -hydroxyacids. *Chemical Geology* 62, 321-330.
- Meulenberg, R., Rijnaarts, H.H.M., Doddema, H.J. and Field, J.A., 1997. Partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons show an increased bioavailability and biodegradability. *FEMS Microbiology Letters* 152, 45-49.
- Meyers, H. and Holz, G.C., 1966. Biosynthesis of lipids by flagellates. *Journal of Biological Chemistry* 241, 5000-5007.
- Meyers, P.A. and Eadie, B.J., 1993. Sources, degradation and recycling of organic matter associated with sinking particles in Lake Michigan. *Organic Geochemistry* 20, 47-56.
- Meyers, P.A., 1997. Organic geochemical proxies of palaeoceanographic, paleolimnologic and paleoclimatic processes. *Organic Geochemistry* 27, 213-250.
- Miller, K.J., 1985. Effects of temperature and sodium chloride concentration on the phospholipids and fatty acid compositions of a halotolerant *Planococcus* sp. *Journal of Bacteriology* 162, 263-270.
- Miura, Y. and Fluco, A.J., 1975. ω -1, ω -2 and ω -3 Hydroxylation of long chain fatty acids, amide and alcohols by a soluble enzyme system from *Bacillus megatherium*. *Biochimica et Biophysica Acta* 388, 305-317.
- Mohn, W.W. and Stewart, G.R., 2000. Limiting factors for hydrocarbons at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1161-1172.
- Molinaro, A., Lanzetta, R., Evidente, A., Parrilli, M and Holst, O., 1999. Isolation and characterization of the lipopolysaccharide from *Xanthomonas hortorum* pv. Vitians. *FEMS Microbiology Letters* 181, 49-53.
- Monteolivia-Sanchez, M. and Ramos-Cormenzana, A., 1986. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Flavobacterium halmephilum* CCM 2831. *FEMS Microbiology Letters* 33, 51-54.
- Monteolivia-Sanchez, M; Ferrer, M.R., Ramos-Cormenzana, A., Quesada, E. and Monteolivia, M., 1988. Cellular fatty acid composition of *Delia halophila*: effect of growth temperature and salt concentration. *Journal of General Microbiology* 134, 199-203.
- Moran, A.P., Lindner, B. and Walsh, E.J., 1997. Structural characterization of the lipid A component of *Helicobacter pylori* rough- and smooth- from lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 179, 6453-6463.
- Morris, R.J. and Culkin, F., 1976. Marine lipids: analytical techniques and fatty acid ester analyses. *Marine Biology Annual Review* 14, 391-433.
- Murphy, R.C., 1993. Handbook of lipid research 7, mass spectrometry of lipids. Plenum Press New York.

N

- National Research Council (U.S.), 2002. Oil in the sea: inputs, fates and effects. National Academy of Science, Washington DC.
- Neff, J.M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : source, fate and biological effect. Applied Science, Essex, England, pp. 262.
- Newman, M.S., 1960. Organic Syntheses. Volume 40.

- Nichols, D.S., Olley, J., Garda, H., Brenner, R.R. and McMeekin, T., 2000. Effect of temperature and salinity stress on growth and lipid composition of *Shewanella gelidimarina*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2422-2429.
- Nichols, P.D. and Johns, R.B., 1985. Lipids of the tropical seagrass *Thalassia hemprichii*. *Phytochemistry* 24, 81-84.
- Nichols, P.D., Klumpp, D.W. and Johns, R.B., 1982. A study of food chains in seagrasses *Posidonia australis* and *Heterozostera tasmanica* as indicators of carbon source. *Phytochemistry* 21, 1613-1621.
- Nichols, P.D., Palmisano, A.C., Smith, G.A. and White, D.C., 1986. Lipids of the Antarctic sea ice diatom *Nitzschia cylindrus*. *Phytochemistry* 25, 1649-1653.
- Nichols, P.D., Smith, G.A., Antworth, L.P., Hanson, R.S. and White, D.C., 1985. Phospholipid and lipopolysaccharide normal and hydroxyl fatty acids as potential signatures for methane oxidizing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 31, 327-335.
- Nichols, P.D., Volkman, J.K., Palmisano, A.C., Smith, G.A. et White, D.C., 1988. Occurrence of an isoprenoid C25 diunsaturated alkene and a high neutral lipid content in Antarctic Sea-Ice diatom communities. *Journal of Phycology* 24, 90-96.
- Nieder, M. and Shapiro, J., 1975. Physiological function of *Pseudomonas putida* PpG6 (*Pseudomonas oleovorans*) alkane hydroxylase: Monoterminal oxidation of alkane and fatty acids. *Journal of Bacteriology* 122, 93-98.

O

- O'Leahy, W.M. and Wilkinson, S.G., 1988. Gram positive bacteria. In: Ratledge, C. and Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial lipids*, Vol. 1. Academic Press, London. pp. 117-201.
- Ogawa, T., Asai, Y., Sakai, Y., Oikawa, M., Fukase, K., Suda, Y., Kusumoto, S. and Tamura, T., 2003. Endotoxic and immunological activities of a chemically synthesized lipid A of *Helicobacter pylori* strain 206-1. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 36, 1-7.
- Ogura, K., Machihara, T. and Takada, H., 1990. Diagenesis of biomarkers in Biwa lake sediments over 1 million years. In: Durand, B. and Behar, F. (Eds.), *Advances in Organic Geochemistry*, 1989. *Organic Geochemistry* 16, 805-813. Pergamon Press, Oxford.
- Ohno, Y., Yano, I. and Masui, M., 1979. Effect of NaCl concentration and temperature on the phospholipids and fatty acid composition of a moderately halophilic bacterium *Pseudomonas halosaccharolytica*. *Journal of Biochemistry* 85, 413-421.
- Olivera, N.L., Esteves, J.L. and Commendatore, M.G., 1997. Alkane biodegradation by a microbial community from contaminated sediment in Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration Biodegradation* 40, 75-79.
- Orgambide, G.G., Reusch, R.N. and Dazzo, F.B., 1993. Methoxylated fatty acids reported in *Rhizobium* isolates arise from chemical alterations of common fatty acids upon acid-catalysed transesterification procedure. *Journal of Bacteriology* 175, 4922-4926.
- Oro, J., Tornabene, T.G., Nooner, D.W. et Gelpi, 1967. Aliphatic hydrocarbons and fatty acids of some marine and freshwater microorganisms. *Journal of Bacteriology* 93, 1811-1818.

P

- Pancost, R.D., Bouloubassi, I., Aloisi, G., Damsté, S.J.S. and the Medinaut Shipboard Scientific Party, 2001. Three series of non-isoprenoidal dialkyl glycerol diethers in cold-seep carbonate crusts. *Organic Geochemistry* 32, 695-707.
- Parker, P.L., van Baalen, C. and Maurer, L., 1967. Fatty acid in eleven species of blue-green algae: geochemical significance. *Science*, 155: 707-708.
- Parkes, R.J., Dowling, N.J.E., White, D.C., Herbet, R.A. and Gibson, G.R., 1993. Characterization of sulphate-reducing bacterial populations within marine and estuarine sediments with different rates of sulphate reduction. *FEMS Microbiology Ecology* 102, 235-250.
- Parrish, C.C., 1988. Dissolved and particulate marine lipid classes: a review. *Marine Chemistry* 23, 17-40.
- Payne, J.R. and Philipps, C.R., 1985. Photochemistry of petroleum in water: Photooxidation causes changes in oil and enhances dissolution of its oxidized products. *Environmental Science and Technology* 19, 569-579.

- Payne, J.R., Clayton, J.R., Phillips, Jr. C.R., Lambach, J.L. et Farmer, G.H., 1985. Marine of pollution index. *Oil Petrochem. Pollution* 2, 173-191.
- Pedrotta, V. and Witholt, B., 1999. Isolation and characterization of *cis-trans*-unsaturated fatty acids isomerase of *Pseudomonas oleovorans* GPo12. *Journal of bacteriology* 181, 3256-3261.
- Perry, G.J., Volkman, J.K. and Johns, R.B., 1979. Fatty acids of bacterial origin in contemporary marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 1715-1723.
- Perry, J.J., 1979. Microbial cooxidation involving hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 43, 59-72.
- Peters, K.E. and Moldowan, J.M., 1993. The biomarker guide: Interpreting molecular fossils in petroleum and ancient sediments. Eds., Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 363.
- Pettersson, M. and Baach, E., 2003. temperature dependant changes in the soil bacterial community in limited and unlimited soil. *FEMS Microbiology Ecology* 14, 13-21.
- Pines, O. and Gutnick, D., 1986. Role of emulsan in Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on crude oil. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 661-663.
- Pinkart, H.C. and White, D.C., 1997. Phospholipid biosynthesis and solvent tolerance in *Pseudomonas putida* strains. *Journal of Bacteriology* 179, 4219-4226.
- Pirnik, M.P., Atlas, R.M. and Bartha, R., 1974. Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: Normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology* 119, 868-878.

R

- Rabus, R. and Widdel, F., 1995. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by a new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* 163, 96-103.
- Rabus, R., Brüchert, V., Amann, J. and Könneke, M., 2002. Physiological response to temperature changes of the marine sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium autotrophicum*. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 409-417.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. and Widdel, F., 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulphate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 1444-1451.
- Raetz, C.R.H., 1978. Enzymology, genetics, and regulation of membrane phospholipids synthesis in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 42, 614-659.
- Ramos, J.L., Gallegos, M.T., Marques, S., Ramos-Gonzalez, M.I., Espinoza-Urgel, M. and Segura, A., 2001. Responses of gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Current Opinion in Microbiology* 4, 166-171.
- Ratledge, C. and Wilkinson, S.G., 1988. *Microbial lipids*. Volume 1. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers.
- Ratledge, C., 1978. Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J.(Ed.), *Development in biodegradation of hydrocarbons*. Applied Sciences Publishers. Vol. 1., pp 1-46. London.
- Ratledge, C., Wilkinson, S.G., 1988. Fatty acids, related and derived lipids. In: Ratledge, C., Wilkinson, S.G. (Eds), *Microbial lipids*, Vol. 1. Academic Press, London, pp.23-53.
- Rehm, H.J. and Reiff, I., 1981. Mechanism and occurrence of Microbial oxidation of long-chain alkanes. *Advances in Biochemical Engineering* 19, 173-215.
- Rike, A.G., Haugen, K.B., Borrensen, M., Engene, B. and Kolstad, P., 2003. In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. *Cold Region Science and technology* 907, 1-24.
- Rios-Hernandez, L.A., Gieg, L.M. and Suflita, J.M., 2003. Biodegradation of an alicyclic hydrocarbon by a sulphate-reducing enrichment from a gas condensate-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 434-443.
- Röling, W.F.M., Head, I.M. and Larter, S.R., 2003. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology* 154, 321-328.
- Rontani, J.F. and Bonin, P., 1992. Utilization of *n*-alkyl-substituted cyclohexanes by a marine *Alcaligènes*. *Chemosphere* 24, 1441-1446.
- Rontani, J.F. and Giusti, G., 1986. Study of the biodegradation of poly-branched alkanes by a marine bacterial community. *Marine Chemistry* 20, 197-205.
- Rontani, J.F. and Giusti, G., 1987. Photosensitized oxidation of pristine in sea water: effect of photochemical reactions on tertiary carbons. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*. 40, 107-120.

- Rontani, J.F., Bertrand, J.C., Blanc, F. and Giusti, G., 1986. Gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry applied to the determination of a new pathway of pristine degradation by a marine mixed population. *Marine Chemistry* 18, 9-16.
- Rontani, J.F., Bonin, P. And Giusti, G., 1987. Mechanism study of the interaction between photooxidation and biodegradation of *n*-nonylbenzene in seawater. *Marine Chemistry* 22, 1-12.
- Rontani, J.F., Bonin, P., 1992. Utilization of *n*-alkyl-substituted cyclohexanes. *Chemosphere* 24, 1441-1446.
- Rontani, J.F., Mouzdahir, A., Michotey, V., Caumette, P. and Bonin, P., 2003. Production of a polyunsaturated isoprenoid wax ester during aerobic metabolism of squalene by *Marinobacter squalenivorans* sp. Nov. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 4167-4176.
- Rontani, J.F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C. and Giusti, G., 1992. Favourable interaction between photooxidation and bacterial degradation of anthracène in sea water. *Chemosphere* 14, 1909-1912.
- Rontani, J.F., Bosser-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C., Giusti, G. and Faure, R., 1985. Analytical study of Ashtart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere* 14, 1413-1422.
- Russell, N. J., 1984. Mechanisms of thermal adaptation in bacteria: blueprints for survival. *Trend in Biochemical Sciences* 9, 108-112.
- Russell, N.J. and Fukunaga, N., 1990. A comparison of thermal adaptation of membrane lipids in psychrophilic and thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 75, 171-182.
- Russell, N.J. and Kogut, M., 1985. Haloadaptation : salt sensing and cell-envelope changes. *Microbiological Sciences* 2, 345-350.
- Russell, N.J., 1989. Adaptative modifications in membrane of halotolerant and halophilic microorganisms. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 21, 93-113.

S

- Sakai, Y., Maeng, J.H., Kubota, S., Tani, A. and Tani, Y., 1996. A non conventional dissimilation pathway for long chain *n*-alkanes in *Acinetobacter* sp; M-1 that starts with a dioxygenase reaction. *Journal of Ferment and Bioengineering*. 81, 286-291.
- Saliot, A., 1981. Natural hydrocarbons in sea water. In : Duursma, E.K. and Dawson, R. (Eds.), *Marine organic chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 327-374.
- Saliot, A., 1994. *Biochimie organique marine*. Oceanis 20, 197p.
- Saliot, A., Laureillard, J., Scribe, P. and Sicre, M.A., 1991. Evolutionary trends with lipid biomarker approach for investigating the biogeochemistry of organic matter in the marine environment. *Marine Chemistry* 36, 233-248.
- Saliot, A., Tissier, M.J. and Boussuge, C., 1980. Organic geochemistry of the deep ocean-sediment interface and interstitial water. In: Douglas, A.G. and Maxwell, J.R. (Eds.), *Advances in organic geochemistry, 1979. Physics and chemistry of the earth* 12, 333-341. Pergamon Press, Oxford.
- Saliot, A., Tronczinsky, J., Scribe, P. and Letolle, R., 1988. The application of isotopic and biogeochemical markers to the study of the biochemistry of organic matter in a macrotidal Eastuary, the Loire, France. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 27, 645-669.
- Sandvik, S., Lode, A. and Pederson, T.A., 1986. Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. *Applied Microbiology Biotechnology* 23, 297-301.
- Sariaslani, F.S., Happer, D.B. and Higgins, I.J., 1974. Microbial degradation of hydrocarbons. Catabolism of 1-phenylalkanes by *Nocardia salmonicolor*. *Biochemical Journal* 140, 31-45.
- Schaeffer, T.L., Cantwell, S.G., Brown, J.L., Watt, D.S. and Fall, R.R., 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 742-746.
- Schwartz, R.D. and McCoy, C.J., 1973. *Pseudomonas oleovorans* hydroxylation-epoxidation system: additional strain improvements. *Applied Microbiology* 26, 217-218.
- Schwartz, R.D., 1973. Octene epoxidation by a cold-stable alkane-oxidizing isolate of *Pseudomonas oleovorans*. *Applied Microbiology* 25, 574-577.
- Schwarz, J.R., Walker, J.D. and Colwell, R.R., 1974. Hydrocarbon degradation at ambient and *in situ* Pressure. *Applied Microbiology* 28, 982-986.

- Schwarz, J.R., Walker, J.D. and Colwell, R.R., 1975. Deep-sea bacteria: growth and utilization of *n*-hexadecane at in situ temperature and pressure. *Canadian Journal of Microbiology* 21, 682-687.
- Scribe, P., Fillaux, J., Laureillard, J., Denant, V. and Saliot, A., 1991. Fatty acids as biomarkers of planktonic input in the stratified estuary of the Krka River, Adriatic Sea: relationship with pigments. *Marine Chemistry* 32, 299-312.
- Scribe, P., Pepe, C., Barouxis, A., Fuche, C., Dagant, J. and Saliot, A., 1990. Détermination de la position de l'insaturation des mono-ènes par chromatographie en phase gazeuse capillaire-spectrométrie de masse (CGS/SM) des dérivés diméthyl-disulfures: application à l'analyse d'un mélange complexe d'alcènes. *Analisis* 18, 284-288.
- Senez, J.C. and Azoulay, E., 1961. Déshydrogénation d'hydrocarbures paraffiniques par les suspensions nonproliférantes et les extraits de *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 47, 307-316.
- Seydel, U., Lindner, B., Wollenweber, H.W. and Rietschel, E.T., 1984. Structural studies of the lipid A components of enterobacterial lipopolysaccharides by laser desorption mass spectrometry. Location of acyl groups at the lipid A backbone. *European Journal of Biochemistry* 145, 505-509.
- Shaw, P.M. and Johns, R.B., 1985. Organic geochemical studies of a recent Inner Great Barrier Reef sediment-I. Assessment of input sources. *Organic Geochemistry* 8, 147-156.
- Shaw, P.M. and Johns, R.B., 1986. Organic geochemical studies of a recent Inner Great Barrier Reef sediment –II. Factor analysis of sedimentary organic materials in input source determinations. *Organic Geochemistry* 9, 237-244.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and Poolman, B., 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Bacteriology* 269, 8022-8028.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and Poolman, B., 1995. Metabolism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59, 201-222.
- Sikkema, J., Poolman, B., Koning, W.N. and de Bont, J.A.M., 1992. Effect of the membrane on tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *Journal of Bacteriology* 174, 2986-2992.
- Simoneit, B.R.T., 1986. Characterization of organic constituents in aerosols in relation to their origin and their transport. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 23, 207-237.
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous adaptation – A homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Echerichia coli*. *Proc. Nat.Acad.Sci.* 71, 522-525.
- Skerratt, J.H., Nichols, P.D., Bowman, J.P. and Sly, L.I., 1992. Occurrence and significance of long-chain (ω -1)-hydroxy fatty acids in methane-utilizing bacteria. *Organic Geochemistry* 18, 189-194.
- Small, F.J. and Ensign, S.A., 1997. Alkene monooxygenase from *Xanthobacter* strain Py2. Purification and characterization of a four-component system central to the bacterium metabolism of aliphatic alkenes. *Journal of Biological Chemistry* 272, 24913-24920.
- So, C.M. and Young, L.Y., 1999. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulphate reducer, strain 1K-01. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5532-5540.
- Song, H.G., Wang, X. And Bartha, R., 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 652-656.
- Spormann, A.F. and Widdel, F., 2000. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* 11, 85-105.
- Stewart, J.E., Finnerty, W.R., Kallio, R.E. and Stevenson, D.P., 1960. Esters from bacterial oxidation of olefins. *Science N.Y.* 132, 1254-155.
- Suda, Y., Ogawa, T., Kashihara, W., Oikawa, M., Shimoyama, T., Hayashi, T., Tamura, T. and Kusumoto, S., 1997. Chemical structure of lipid A from *Helicobacter pylori* Strain 206-1 lipopolysaccharide. *Journal of Biochemistry* 121, 1129-1133.
- Sun, M.Y. and Wakeham, S.G., 1994. Molecular evidence for degradation and preservation of organic matter in the anoxic Black Sea basin. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58, 3395-3406.
- Süsskind, M., Lindner, B., Weimar, T., Brade, H. and Holst, O., 1998. Note: The structure of the lipopolysaccharide from *Klebsiella oxytoca* rough mutant R29 (O1/K29). *Carbohydrate Research* 312, 91-95.

- Sutton, G.C., Russell, N.J. and Quinn, P.J., 1991. The effect of salinity on the phase behaviour of total lipid extracts and binary mixtures of the major phospholipids isolated from a moderately halophilic eubacterium. *Biochemica et Biophysica Acta* 1061, 235-246.
- Suutari, M. etv Laakso, S., 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Critical Reviews in Microbiology* 20, 289-328.

T

- Tagger, S., Deveze, L. and LePetit, J., 1976. The conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons at sea. *Marine Pollution Bulletin* 7, 172-174.
- Taylor, J. and Parkes, R.J., 1983. The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. And *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General Microbiology* 129, 3303-3309.
- Taylor, J., Young, C., Parkes, R.J., Eglinton, T. and Douglas, A.G., 1984. Structural relationship on protokerogens and other geopolymers from oxic and anoxic sediments. In: Schenk, P.A., de Leeuw, J.W. and Lijmbach, G.W.M. (Eds.), *Advances in organic geochemistry, 1983. Organic Geochemistry* 6, 279-286.
- Therisod, H., Karibian, D., Perry, M.B. and Caroff, M., 2002. Structural analysis of *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 29833 lipid A. *International Journal of Mass Spectrometry* 219, 549-557.
- Therisod, H., Monteiro, M.A., Perry, M.B. and Caroff, M., 2001. *Helicobacter mustelae* lipid A structure differs from that of *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters* 449, 1-5.
- Thijsse, G.J.E. and Van Der Linden, A.C., 1961. *Iso*-alcane oxidation by *Pseudomonas*. I. Metabolism of 2-methylhexane. *Antoine van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 27, 171-179.
- Thijsse, G.J.E. and Van Der Linden, A.C., 1963. Pathways of hydrocarbons dissimilation by *Pseudomonas* as revealed by chloramphenicol. *Antoine van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* 29, 89-100.
- Tissot, B.P. and Welte, D.H., 1978. *Petroleum formation an occurrence. A new approach to oil and gas exploration.* Springer-Verlag, Berlin, 699 p.
- Tissot, B.P. and Welte, D.H., 1984. *Petroleum formation and occurrence.* Springer, Berlin.
- Tronczynski, J., Marty, J.C., Scribe, P., Lorre, A. and Saliot, A., 1985. Marqueurs chimiques indicateurs des activités microbiologiques: cas des acides gras dans l'estuaire de la loire. *Oceanis* 11, 399-408.
- Trudgill, P.W., 1978. Microbial degradation of alicyclic hydrocarbons, In: Watkinson, R.J. (Ed.), *Development in biodegradation of hydrocarbons-1.* Applied Science publishers LTD London. Chapitre 2, pp: 47-84.
- Trudgill, P.W., 1984. Microbial degradation of the alicyclic ring: structural relationship and metabolic pathway, p. 131-180. In: Gibson, D.T. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds.* Marcel Dekker, New York, NY.

U

- U.S. Congress, Office of Technology Assesment, 1991. *Bioremediation of Oil Spills – Background Paper, OTA-BP-70* (Washington, DC: U.S. Government Printing Office).
- Ueda, T., Lode, E.T. and Coon, M.J., 1972. Enzymatic ω -oxidation. VI. Isolation of homogeneous reduced diphosphopyridine nucleotide-rubrodoxin. *The Journal of Biological Chemistry* 247, 2109-2116.
- Urakami, T. and Komagata, K., 1987. Cellular fatty acid composition with special reference to the existence of hydroxyl fatty acids in gram-negative methanol-, methane- and methylamine-utilizing bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* 33, 135-165.
- Uribe, S., Ramirez, J. and Pena, A., 1985. Effect of β -pinene on yeast membrane functions. *Journal of Bacteriology* 161, 1195-1200.
- Uribe, S., Rangel, P., Espinola, G. and aguirre, G., 1990. Effects of cyclohexane, an industrial solvent, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and on isolated yeast *Mitochondria*. *Applied Environmental Microbiology* 56, 2114-2119.

V

- Valderrama, M.J., Monteolivia-Sanchez, Quesada, E. and Ramos-Cormenzana, A., 1998. Influence of salt concentration on the cellular fatty acid composition of the moderately halophilic bacterium *Halomonas salina*. *Res. Microbiol.* 149, 675-679.
- Van Beilen, J.B., Wubbolts, M.G. and Witholt, B., 1994. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation* 5, 161-174.
- Van der Linden, A.C., 1963. Epoxidation of α -olefins by heptane-grown *Pseudomonas* cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 77, 157-159.
- Van Der Meer, J.R. et al., 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews* 56, 677-694.
- Van Dongen, B.E., Rijpstr, W.I.C., Philippart, C.J.M., de Leeuw, J.W. and Sinninghe Damste, J.S., 2000. Biomarkers in upper Holocene Eastern North Sea and Wadden Sea sediments. *Organic Geochemistry* 31, 1533-1543.
- Vaz, A.D.N., McGinnity, D.F. and Coon, M.J., 1998. Epoxidation of olefins by cytochrome P450: Evidence from site-specific Mutagenesis for hydroperoxo-ion as an electrophilic oxidant. *Biochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95, 3555-3560.
- Venkatesan, M.I., 1988. Organic Geochemistry of marine sediments in Antarctic region : Marine lipids in McMurdo sound. *Organic Geochemistry* 12, 13-27.
- Venkatesan, M.I., Ruth, E., Steinberg, S. and Kalpan, I.R., 1987. Organic geochemistry of sediments from the continental margin of southern New England USA –Part II. Lipids. *Marine Chemistry* 21, 267-299.
- Visot, A.C. and Marty, J.C., 1993. Fatty acids from 28 marine microalgae. *Phytochemistry* 34, 1521-1533.
- Volkman, J.K., Barrett, S.M., Blackburn, S.I., Mansour, M.P., Sikes, E.L. and Gelin, F., 1998. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments.. *Organic Geochemistry* 29, 1163-1179.
- Volkman, J.K., Burton, H.R., Everitt, D.A. and Allen, D.I., 1988b. Pigment and lipid compositions of algal and bacterial communities in Ace Lake, Vestfold Hills, Antarctica. *Hydrobiologica* 165, 41-57.
- Volkman, J.K., Farrington, J.W., Gagosian, R.P. and Wakeham, S.G., 1981. Microbial composition of coastal marine sediments from the Peru upwelling region. *Advances in Organic Geochemistry*, 228-240.
- Volkman, J.K., Holdworth, D.G., Neill, G.P. et Bavor, Jr H.J., 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Sci. Total. Environ.* 112, 203-219.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Nichols, P.D., Rogers, G.I. and Garland, C.D., 1988a. Fatty acids and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128, 219-240.
- Volkman, J.K., Johns, R.B., Gillan, F.T., Perry, G.J. and Bavor, H.J.Jr., 1980. Microbial lipids of an intertidal sediment-I. Fatty acids and hydrocarbons. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 1133-1143.
- Volkman, J.K., Jeffrey, S.W., Rogers, G.I., Nichols, P.D. and Garland, C.D., 1989. Fatty acids and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 128, 219-240.

W

- Wakeham, S.G. and Canuel, E.A., 1990. Fatty acids and sterols of particulate matter in a brackish and seasonally anoxic coastal salt pond. *Organic Geochemistry* 16, 703-713.
- Wakeham, S.G., 1990. Algal and bacterial hydrocarbons in particulate matter and interfacial sediment of Cariaco Trench. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 54, 1325-1336.
- Wakeham, S.G., 1999. Monocarboxylic, dicarboxylic and hydroxy acids released by sequential treatments of suspended particles and sediments of the Black Sea. *Organic Geochemistry* 30, 1059-1074.
- Wakeham, S.G., Pease, T.K. and Benner, R., 2003. Hydroxy fatty acids in marine dissolved organic matter as indicators of bacterial membrane material. *Organic Geochemistry* 34, 857-868.

- Walker, J.D., Cowell, R.R. and Petrakis, K., 1975. Degradation of petroleum by an alga, *Prototheca zopfii*. *Applied Microbiology* 30, 79-81.
- Walworth, J., Braddock, J. and Woolard., 2001. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil. *Cold Region Science and Technology* 32, 85-91.
- Walworth, J.L., Woolard, C.R and Harris, K.C., 2003. Nutrient amendments for contaminated periglacial soils: use of code bone meal as a controlled release nutrient source. *Cold Region Science and Technology* 430, 1-8.
- Ward, D.M. and Brock, T.D., 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 353-359.
- Whyte, L.G., Geer, C.W. and Innis, W.E., 1995. Assessment of biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. Abstract of General Meeting of the American Society for Microbiology 95, p 468.
- Widdel, F. and Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 259-276.
- Wilhelms, A., Larter, S.R., Head, I., Farrimond, P., di-Primio, R. and Zwach, C., 2001. Biodegradation of crude oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilisation. *Nature* 411, 1034-1037.
- Wilkes, H., Boreham, C., Harms, G., Zengler, K. and Rabus, R., 2000. Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil sulphate-reducing bacteria. *Organic Geochemistry* 31, 101-115.
- Wilkes, H., Rabus, R., Fischer, Th., Armstroff, A., Behrends, A. and Widdel, F., 2001. Anaerobic degradation of *n*-hexane in denitrifying bacterium: further degradation of the initial intermediate (1-methylpentyl) succinate *via* C-skeleton rearrangement. *Archives of Microbiology* 177, 235-243.
- Wilkinson, S.G., 1988. Gram-negative bacteria. In: Ratledge, C. and Wilkinson, S.G. (Eds.), *Microbial lipids*. Volume 1. Academic Press, London. pp: 299-488.
- Williams, M.A.J., Bishop, P.M., Dakin, F.M. and Gillespie, R., 1977. The geochemical significance of positional isomers of unsaturated acids from an intertidal zone sediment. *Nature* 267, 693-694.
- Williams, W.C., 1993. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Williams, W.C. (Eds.), *Advances in lipid methodology – Two*. The Oily Press Scotland, 69-111.
- Williamsons, J.M., Anderson, M.S. and Raetz, R.H., 1991. Acyl-Acyl carrier protein specificity of UPD-GlcNAc acyltransferase from gram-negative bacteria: relationship to lipid A structure. *Journal of Bacteriology* 173, 3591-3596.
- Winters J.C. and Williams, J.A., 1969. Microbiological alteration of crude oil. I The reservoir. Preprints. ACS Division of fuel chemistry, Paper PETR 86; 22-31.
- Wollenweber, H.W., Seydel, U., Lindner, B., Luderitz, O. and Rietschel, T., 1984. Nature and location of amide-bound (R)-3-acyloxyacyl groups in lipid A of lipopolysaccharides from various gram-negative bacteria. *European Journal of Biochemistry* 145, 265-272.

X

- Xu, M., Fasile, F. and Voorkees, K.J., 2000. Differentiation and classification of user-specified bacterail groups by in situ thermal hydrolysis and methylation of whole bacterial cells with tert-butyl bromide chemical ionisation in trap mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 418, 119-128.

Y

- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y. and Tani, Y., 2002. Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicellium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology* 30, 828-831.
- Yanagibayashi, M., Nogi, Y., Li, L. and Kato, C., 1999. Changes in the microbial community in Japan Trench sediment from a depth of 6292 m during cultivation without decompression. *FEMS Microbiological Letters* 170, 271-279.

- Youngblood, W.W., Blumer, M., Guillard, R.L. and Fiore, F., 1971. Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. *Marine Biology* 8, 190-201.
- Yuste, L., Canosa, I. and Rojo, F., 1998. Carbon-source dependent expression of the PalkB promoter from the *Pseudomonas oleovorans* alkane degradation pathway. *Journal of Bacteriology* 180, 5218-5226.

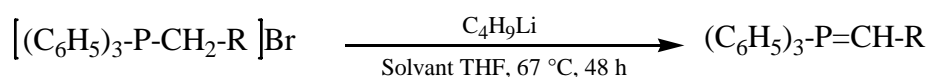
Z

- Zarilla, K.L. and Perry, J.J., 1984. *Thermoleophilum album* gen. nov. and sp. nov., a bacterium obligate for thermophily and *n*-alkane substrates. *Archives of Microbiology* 137, 286-290.
- Zegouagh, Y., 1998. Etude de la matière organique dans les sédiments récents de différents environnements marins. Thèse de Doctorat de l'Université Paris VI. 180p.
- Zegouagh, Y., Derenne, S., Largeau, C. and Saliot, A., 1996. Origin matter sources and early diagenetic alterations in arctic surface sediments (Lina River delta and Laptev Sea, Eastern Siberia) –I. Analysis of the carboxylic acids released via sequential treatments. *Organic Geochemistry* 24, 841-857.
- Zegouagh, Y., Derenne, S., Largeau, C., Bardoux, G. and Mariotti, A., 1998. Organic matter sources and early diagenetic alterations in arctic surface sediments (Lina River delta and Laptev Sea, Eastern Siberia) –II. Molecular study of hydrocarbons. *Organic Geochemistry* 28, 571-583.
- Zelles, L., 1997. Phospholipid fatty acid profiles in selected members of soil microbial communities. *Chemosphere* 35, 275-294.
- Zelles, L., 1999. Identification of single cultured micro-organisms based on their hole-community fatty acid profiles, using an extended extraction procedure. *Chemosphere* 39, 665-682.
- Zengler, K., Richnow, H.R., Rossello-Moro, R., Michaelis, W. and Widdel, F., 1999. Methane formation from long chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* 401, 266-269.
- Zhang, Y. and Miller, R.M., 1992. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3276-3282.
- Zobell, C.E., 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10, 1-49.
- ZoBell, C.E., 1969. Microbial modification of crude oil in the sea. In: Proceedings of joint conferences on prevention and control of oil spills. American. Petroleum. Institute. Washington, D.C., pp. 317-326.

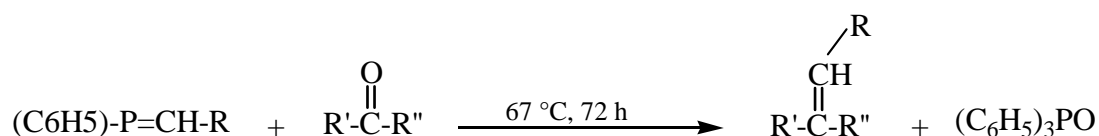
Annexes

ANNEXE 1: SYNTHÈSE DES ALCANES RAMIFIÉS

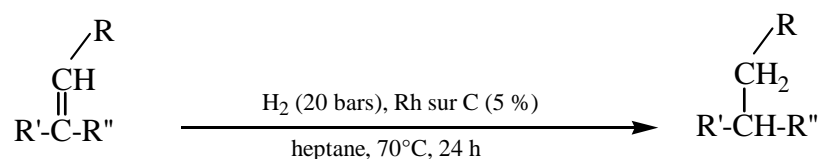
La synthèse des alcanes ramifiés (*iso*, *antéiso* et ramifiés en milieu de chaîne) a été effectuée en trois étapes. La première consiste à préparer le réactif nécessaire à la réaction de Wittig, à savoir l'alkylidènetriphénylphosphorane. Celui-ci est obtenu par action du butyllithium sur le bromure d'alkyltri-phénylphosphonium correspondant, comme le montre la figure suivante:



La deuxième étape est celle de la synthèse de l'oléfine obtenue par la réaction entre l'alkylidènetriphénylphosphorane et une cétone. Le bilan de cette réaction est le suivant :



Après extraction de l'oléfine du milieu réactionnel, une réduction catalytique est nécessaire pour obtenir l'alcane désiré:



Les figures 1 et 2, montrent les spectres de masse du 10-méthylène-nonadécane (obtenu par réaction entre le méthylidène triphénylphosphorane et la nonadecan-10-one) et du 10-méthyl-nonadécane obtenu par réduction catalytique de ce dernier.

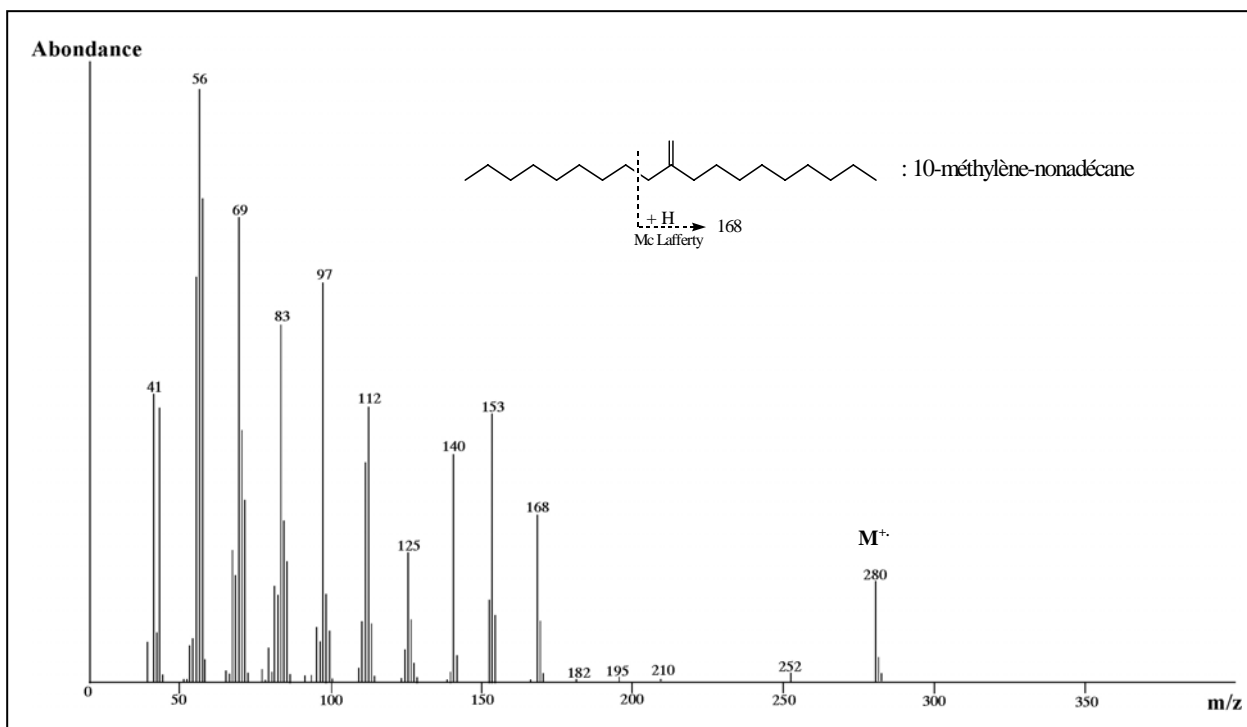


Figure A.1. Spectre de masse du 10-méthylène-nonadécane.

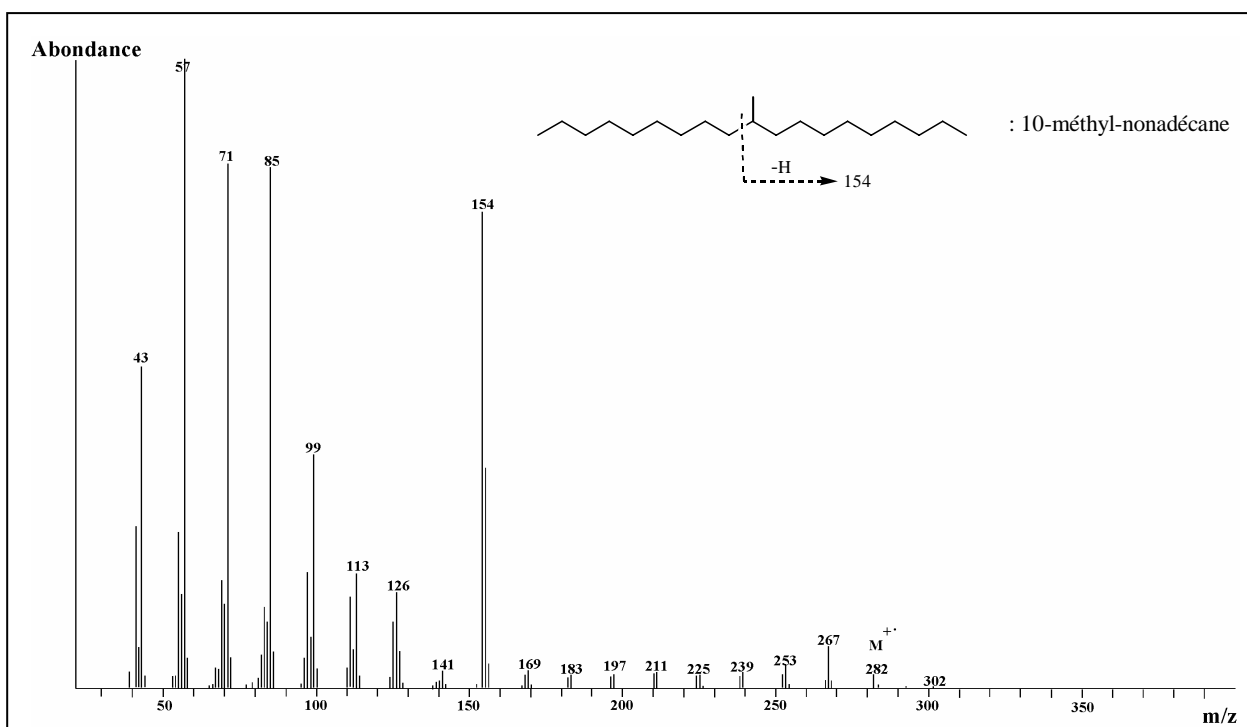


Figure A.2. Spectre de masse du 10-méthyl-nonadécane.

ANNEXE 2: SPECTRES DE MASSE DES HYDROCARBURES SYNTHETISES

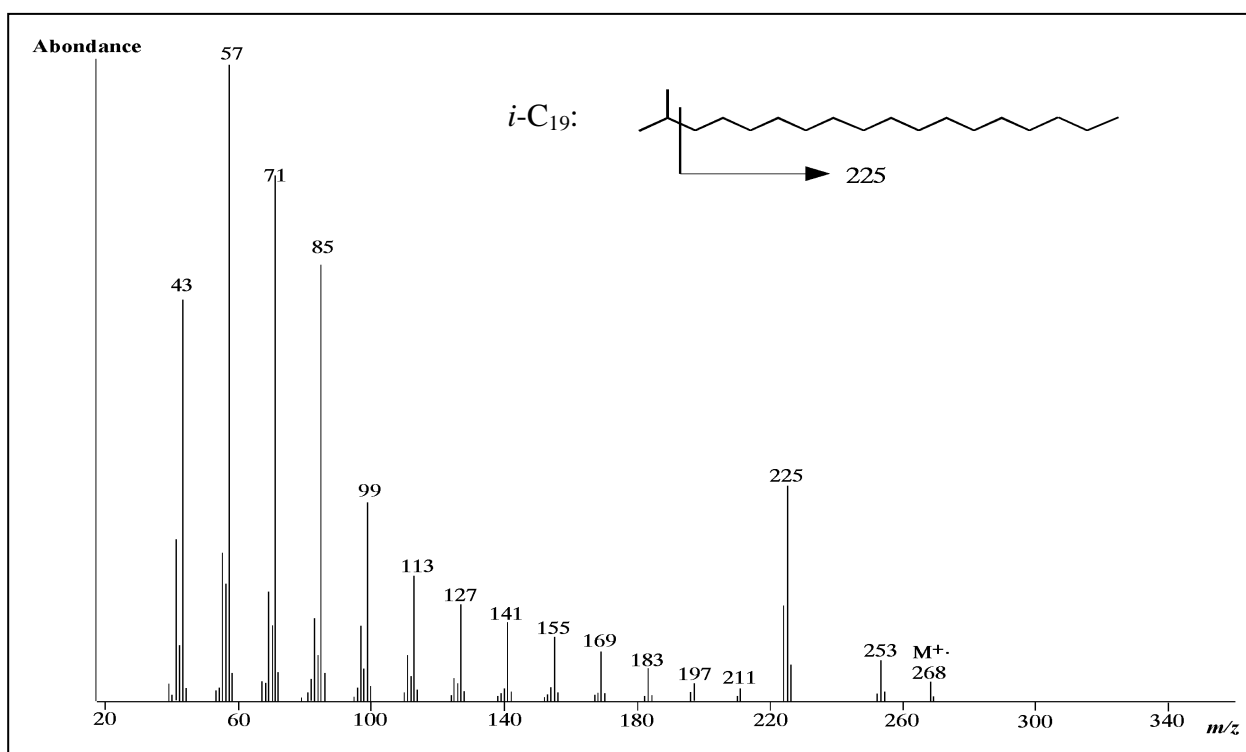


Figure A.3. Spectre de masse du 2-méthyl-octadécane (*i*-C₁₉).

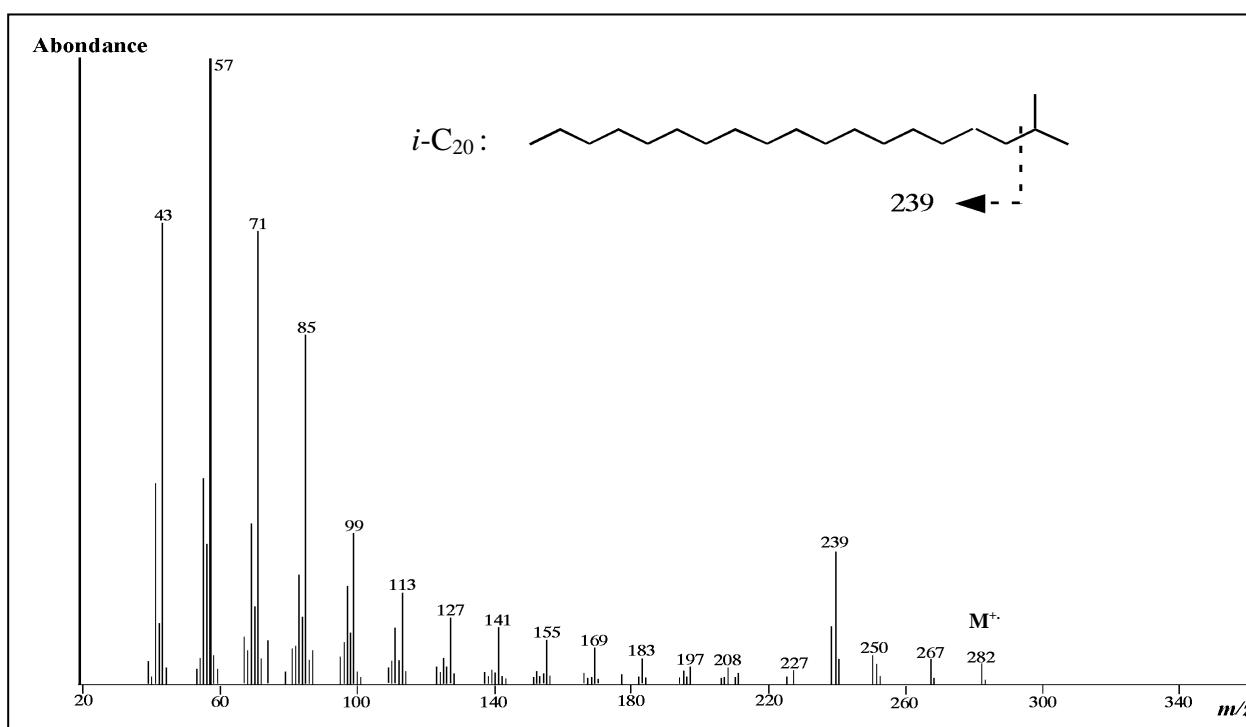


Figure A.4. Spectre de masse du 2-méthyl-nonadécane (*i*-C₂₀).

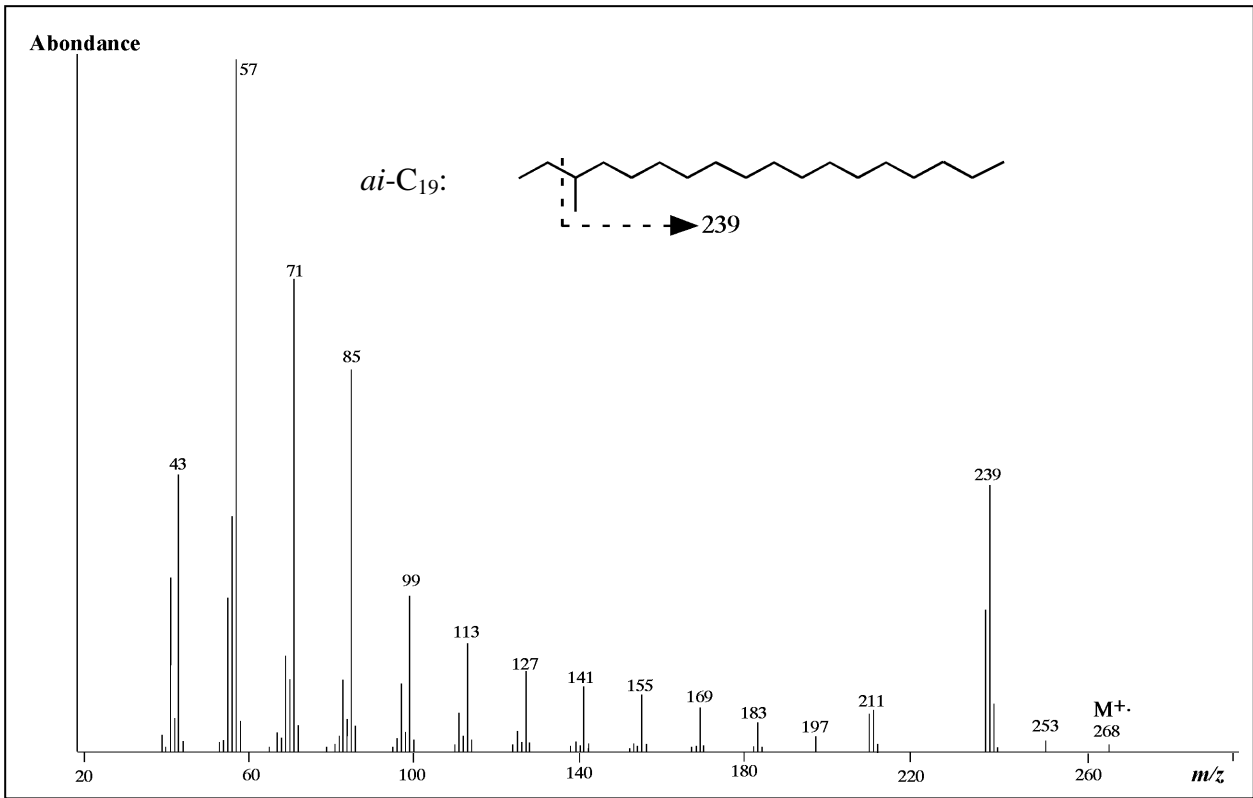


Figure A.5. Spectre de masse du 3-méthyl-octadécane (*ai-C₁₉*).

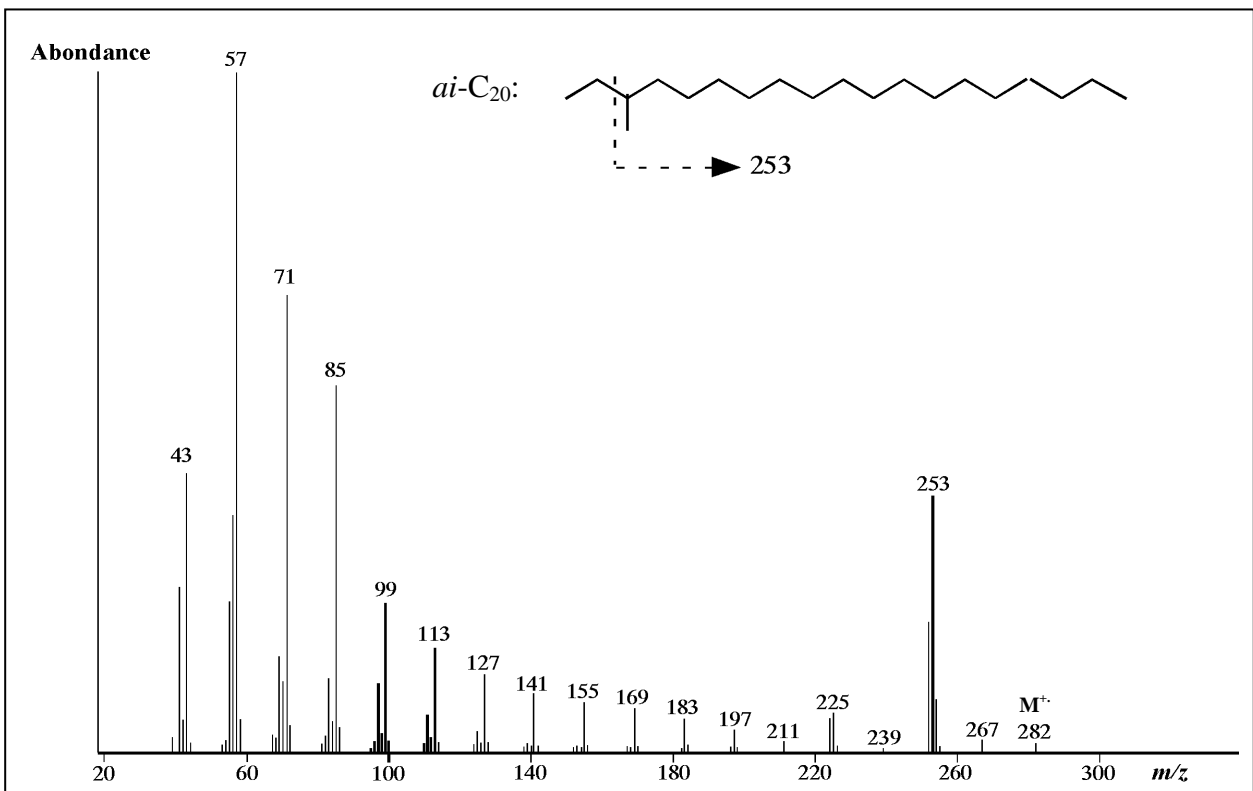


Figure A.6. Spectre de masse du 3-méthyl-nonadécane (*ai-C₂₀*).

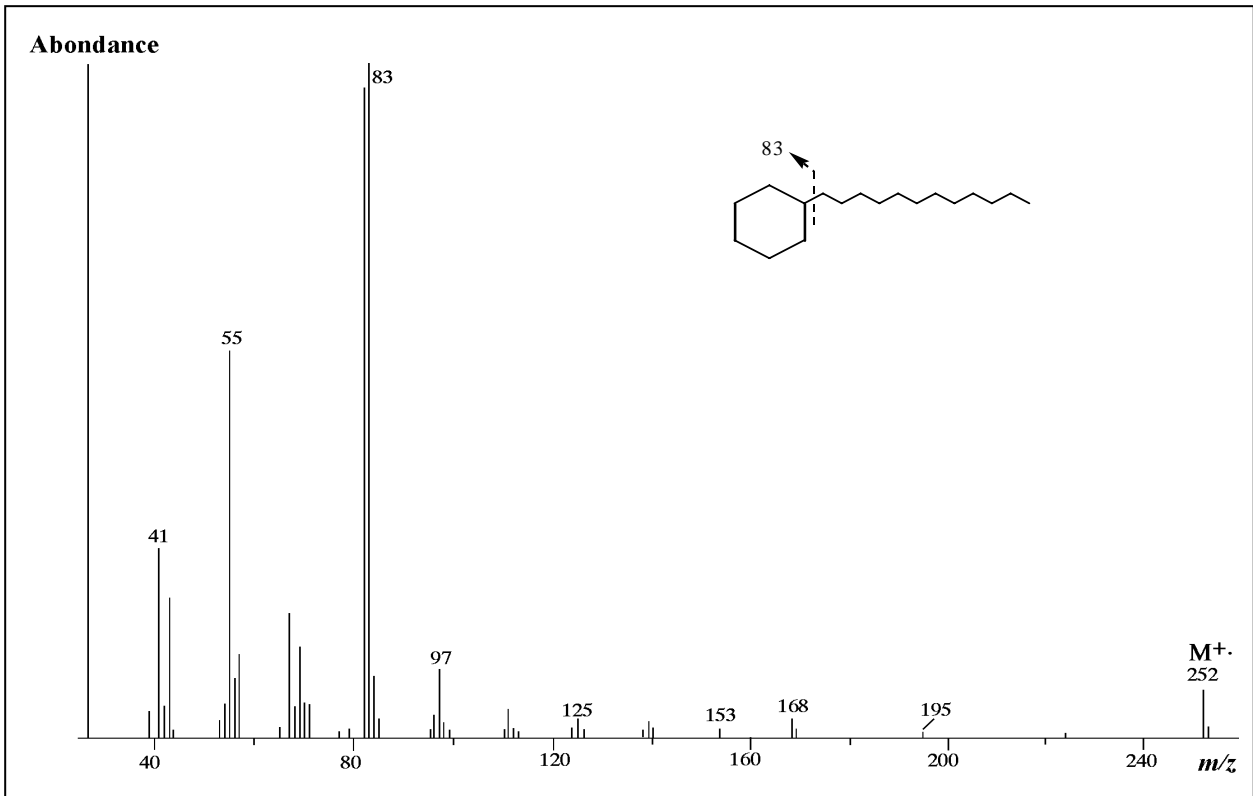


Figure A.7. Spectre de masse du cyclohexyldodecane.

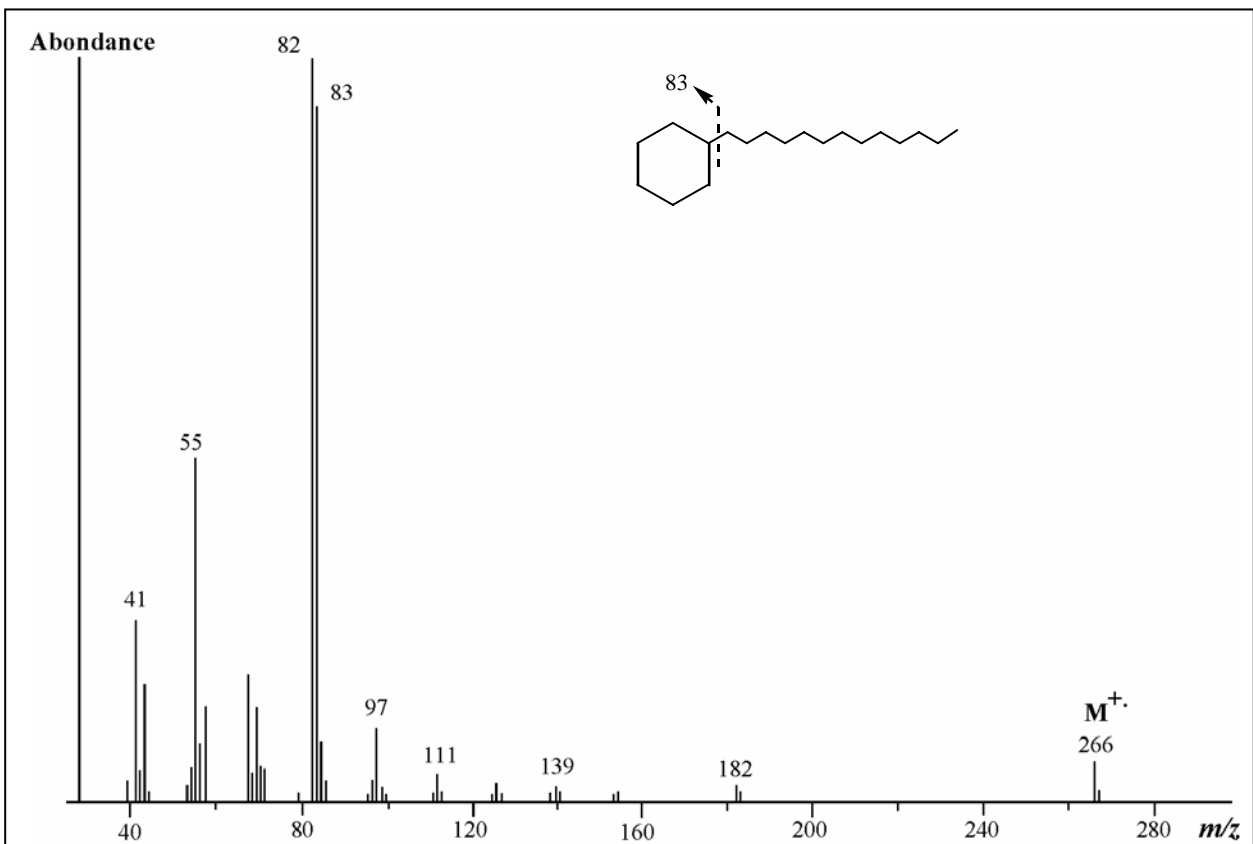


Figure A.8. Spectre de masse du cyclohexyltridécane.

Résumé

Les principaux objectifs de ce travail de recherche étaient (i) l'étude de la composition lipidique de quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* et *Pseudomonas oleovorans* en fonction de la source de carbone, (ii) la détermination des différents voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures comportant une chaîne alkyle et (iii) mieux connaître la composition en β -hydroxy acides lipopolysaccharidiques de leurs membranes extérieures. La première partie de ce travail présente une description qualitative et quantitative des lipides "non liés", labiles en milieu basique et labiles en milieu acide de *M. hydrocarbonoclasticus* en fonction de l'hydrocarbure (alcanes normaux et ramifiés, phényl et cyclohexyl-alcanes, et 1-alcène) utilisé comme source unique de carbone et d'énergie. Ces résultats ont montré que la structure chimique des lipides identifiés suit celle de l'hydrocarbure fourni: apparition de proportions significatives et dans certains cas très importantes d'acides gras issus de la dégradation de ces composés. Les β -hydroxy acides des LPS sont moins sensibles au changement de la structure de l'hydrocarbure. Le n - β -12:0 est toujours dominant alors que les β -hydroxy acides provenant de la dégradation des hydrocarbures peuvent être incorporés aux LPS mais ne constituent que des composés mineurs. La présence d'intermédiaires métaboliques de chaque hydrocarbure dans les lipides "non liés" a permis la détermination des différents voies métaboliques de dégradation.

La deuxième partie de ce travail porte sur la composition lipidique des bactéries *M. aquaeolei*, *A. calcoaceticus* et *P. oleovorans* en fonction de la source de carbone (acétate ou alcane). Cette partie a montré le degrés de variabilité des acides gras chez les bactéries Gram-négatives *M. aquaeolei* et *A. calcoaceticus*: substitution des acides gras normaux pairs par des acides gras de même parité et même squelette que l'alcane utilisé. Chez *P. oleovorans* l'utilisation d'alcanes courts se manifeste aussi bien sur la distribution des acides gras membranaire que sur la composition en β -hydroxy acides des LPS. Enfin, les β -hydroxy acides issus des quatre bactéries étudiées sont essentiellement normaux pairs de C₁₀ à C₁₄ dont le composé prédominant est dépendant de l'espèce bactérienne.

Abstract

The major aims of this study was to derive information on the effect of the carbon source on the lipid composition of the hydrocarbonoclastic Gram-negative bacteria *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Marinobacter aquaeolei*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Pseudomonas oleovorans*, establish the metabolic pathways of hydrocarbon degradation and to have to a better knowledge on the lipopolysaccharide β -hydroxy acids of their external membrane. The first part of the work presents a qualitative and quantitative description of unbound, OH⁻ labile and H⁺ labile lipids of *M. hydrocarbonoclasticus* as a function of the hydrocarbon structure used for growth (normal and branched alkanes, phenyl- and cyclohexyl-alkanes and a terminal olefin). The obtained results showed that the chemical structures of the lipids strongly correlated those of the fed hydrocarbons: appearance of significant and in some cases very important proportions of fatty acids derived from the degradation of these compounds. β -hydroxy acids of the LPS are less sensitive to the change of the hydrocarbon structure. β - n -12:0 is always dominant, the β -hydroxy acids derived from the hydrocarbons can be incorporation to the LPS but constituted minor compounds.