

xxx
6139
EGIO - GHO - H

DUPRAY

UNIVERSITE DE RENNES I

U.F.R. de PHARMACIE

Année 1990

N°

THESE

en vue du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ
DE RENNES I

Mention

SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE

conformément aux dispositions de l'arrêté du 23 novembre 1988

HALOTOLERANCE
de *Escherichia coli*
Effet des osmoprotecteurs naturels

par

Mostefa GHOUL

Né le 24 mai 1952 à OUED ATHMENIA (Algérie)

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 1990

Président :

Monsieur M. CORMIER

Professeur
Université de Rennes I

Membres du Jury :

Monsieur P. BOURLIOUX

Professeur
Université de Paris XI

Monsieur B. BALEUX

Directeur de recherche C.N.R.S.
Université de Montpellier II

Monsieur A. LE TREUT

Professeur
Université de Rennes I

Madame A. SAULEAU

Professeur
Université de Rennes I

Monsieur T. BERNARD

Maître de conférences
Université de Rennes I

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10091

Membre invité :

Madame M. POMMEPUY

Ingénieur
IFREMER

UNIVERSITE DE RENNES I
U.F.R. de PHARMACIE

Année 1990

N°

THESE

en vue du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE
DE RENNES I

Mention

SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE

conformément aux dispositions de l'arrêté du 23 novembre 1988

HALOTOLERANCE
de *Escherichia coli*
Effet des osmoprotecteurs naturels

par

Mostefa GHOUL

Né le 24 mai 1952 à OUED ATHMENIA (Algérie)

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 1990

Président : Monsieur M. CORMIER Professeur
Université de Rennes I

Membres du Jury : Monsieur P. BOURLIOUX Professeur
Université de Paris XI

Monsieur B. BALEUX Directeur de recherche C.N.R.S.
Université de Montpellier II

Monsieur A. LE TREUT Professeur
Université de Rennes I

Madame A. SAULEAU Professeur
Université de Rennes I

Monsieur T. BERNARD Maître de conférences
Université de Rennes I

Membre invité : Madame M. POMMEPUY Ingénieur
IFREMER

UNIVERSITE DE RENNES I
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES & BIOLOGIQUES

PROFESSEURS

Monsieur le Professeur ANGER Jean-Pierre	Toxicologie
Monsieur le Professeur BOUGET Hervé	Physique Pharmaceutique
Monsieur le Professeur BURGOT Jean-Louis	Chimie Analytique
Madame le Professeur CHEMTOB Chantal	Pharmacie Galénique
Madame le Professeur CILLARD Josiane	Botanique et Biologie Cellulaire
Monsieur le Professeur CILLARD Pierre	Botanique et Biologie Cellulaire
Monsieur le Professeur CORMIER Michel	Microbiologie Pharmaceutique
Monsieur le Professeur DEUNFF Jean	Parasitologie Pharmaceutique
Monsieur le Professeur FAUCONNIER Bernard	Bactériologie, Virologie
Monsieur le Professeur GIRRE René-Loïc	Pharmacognosie et Mycologie
Monsieur le Professeur HUET Jean	Chimie Pharmaceutique
Monsieur le Professeur JOUAN Pierre	Biochimie des Hormones
Monsieur le Professeur LEBORGNE Jean-Yves	Chimie Pharmaceutique
Monsieur le Professeur LEVERGE Roger	Pharmacie Galénique et Biopharmacie
Monsieur le Professeur RAULT Bernard	Physiologie Pharmaceutique
Monsieur le Professeur SADO Pierre	Pharmacie Galénique
Madame le Professeur SAULEAU Armelle	Chimie Pharmaceutique
Monsieur le Professeur SEGUI Alain	Physique Pharmaceutique
Monsieur le Professeur TAIEB Guy	Physique Pharmaceutique
Monsieur le Professeur TREBAUL Louis	Pharmacodynamie

Professeur Emérite

Monsieur le Professeur CHAUVEL Yves	Chimie Analytique
-------------------------------------	-------------------

MAITRES DE CONFERENCES ET MAITRES ASSISTANTS

Madame AMOROS Maryvonne M.C.	Pharmacognosie et Mycologie
Madame AZNAR Christine M.C. (en disponibilité)	Parasitologie
Madame BEAUCOURNU Françoise M.A.	Parasitologie
Monsieur BOUDEVILLE Philippe M.C.	Chimie Analytique
Madame BURGOT Gwénola M.C.	Chimie Analytique
Madame DAVID Michèle M.C.	Chimie Pharmaceutique
Madame DELAGE Elisabeth M.C.	Botanique et Biologie Cellulaire
Monsieur GIBASSIER Denis M.C.	Pharmacie Galénique et Biopharmacie
Monsieur GUESNIER Louis-Robert M.C.	Pharmacodynamie
Monsieur HANNOUCHE Nabil M.A.	Biochimie des Hormones
Monsieur HOUEIX Alain M.C.	Physique Pharmaceutique
Madame LE FLOC'H Marie M.C.	Physique Pharmaceutique
Madame PELLISSIER Catherine M.C.	Toxicologie
Madame PLANTARD Claude M.C.	Chimie Analytique
Monsieur SAIAG Bernard M.A.	Physiologie Pharmaceutique
Monsieur SAULEAU Jean M.C.	Chimie Pharmaceutique
Madame SAUVAGER Françoise M.A.	Microbiologie Pharmaceutique
Monsieur URIAC Philippe M.C.	Chimie Pharmaceutique

ASSISTANTS

Madame ANGER Françoise	Toxicologie
Monsieur AZIZ Bruno (en disponibilité)	Physiologie Pharmaceutique
Monsieur CORBEL Jean-Charles	Chimie Pharmaceutique
Madame GIRRE Annie	Physiologie Pharmaceutique
Monsieur GUERIN Jacques	Physique Pharmaceutique
Monsieur KOSKAS Jean-Pierre (en disponibilité)	Botanique et Biologie Cellulaire
Monsieur JAVAUDIN Loïc	Pharmacodynamie
Madame LE ROY Brigitte	Biochimie des Hormones
Madame MAHE Maryvonne (en disponibilité)	Pharmacognosie et Mycologie
Monsieur MEILLARD Didier	Chimie Pharmaceutique
Madame OLLIVIER Christine	Chimie Pharmaceutique
Monsieur SHACOORI Valliollah (Attaché Temporaire)	Physiologie Pharmaceutique
Monsieur SEIGNOUX Daniel	Biochimie des Hormones

Madame BATT Agnès, Attachée de Recherche (INSERM)	Microbiologie Pharmaceutique
Madame SAMPEREZ Suzanne, Chargée de Recherche (CNRS)	Biochimie des Hormones

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique sous la direction de Monsieur Le Professeur M.CORMIER à qui j'exprime ma profonde gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour tous les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail.

Monsieur T.BERNARD m'a facilité l'accès au laboratoire de Génétique et Physiologie Microbiennes. Sans son aide, certains aspects de mon travail n'auraient pu être réalisés. Sa compétence et sa connaissance des phénomènes de l'halotolérance m'ont été très utiles. En outre, il a accepté de juger ce travail et d'en être le rapporteur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma profonde considération.

Je remercie Monsieur Le Professeur B.BALEUX, directeur de recherche-CNRS de l'université de Montpellier, d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail.

Je remercie Monsieur Le Professeur P.BOURLIOUX, de l'université de Paris XI, de m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.

Toute ma reconnaissance à Monsieur Le Professeur A.LE TREUT pour l'aide qu'il m'a apportée et pour avoir accepté de juger ce travail.

Toute ma gratitude va à Mr et Mme SAULEAU pour leur diligence et leur gentillesse. Leur aide m'a été précieuse. En outre Madame Le Professeur SAULEAU m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Je suis reconnaissant à Monsieur Le Professeur LE GALL pour m'avoir facilité l'accès au laboratoire de Biochimie et à Mme VAN DEN STRAATEN pour toute son aide.

Je tiens à remercier Mme POMMEPUY et à travers elle l'IFREMER.

Monsieur J. MINET m'a été d'une grande aide. Je le remercie pour sa disponibilité.

Mes remerciements les plus sincères vont à Mme B.BARDOT pour la réalisation technique de ce document.

Mr S.SINBANDHIT, du Centre Régional des Mesures Physiques de l'Ouest, m'a été d'une grande aide.

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	3
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES.....	11
INTRODUCTION	12
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	16
A - Action auto-épurative du milieu marin.....	17
B - Survie des bactéries en milieu marin	20
C - Etude de l'osmorégulation	23
D - Les sources d'énergie.....	43
MATERIEL ET METHODES.....	48
I - Etude de la physiologie de l'halotolérance.....	49
1 - Site de prélèvement.....	49
2 - Souches bactériennes.....	49
3 - Mise en évidence de l'halotolérance.....	51
II - Détermination du potassium intracellulaire	53
III - Détermination des acides aminés endogènes.....	54
1 - Culture en milieu minimum.....	54
2 - Culture en milieu riche.....	54
IV - Détermination du tréhalose intracellulaire	55
V - Effet du carbonyl <i>m</i> -chlorophénylhydrazone (CCCP) sur l'halotolérance de <i>E.coli</i>	56
1 - Détermination de la CMI	56
2 - CCCP et osmoprotecteurs.....	57
3 - Etude de la croissance de <i>E.coli</i>	57
VI - Méthodes d'extraction, de séparation et d'identification des composés osmoprotecteurs.....	58

1 - Extraction	58
2 - Séparation et mise en évidence	59
2-1 - Electrophorèse en haute tension	59
2-2 - Chromatographie sur papier	61
3 - Identification	62
3-1 - Chromatographie sur couche mince	62
3-2 - Spectrométrie de masse et spectroscopie de RMN- ¹ H	63
VII - Etude de l'accumulation intracellulaire d 'osmoprotecteurs exogènes	63
VIII - Sédiments marins et halotolérance de <u>E.coli</u>	64
1 - Echantillonnage	64
2 - Croissance bactérienne sur sédiments	64
3 - Extraction de la bétaine intracellulaire	65
4 - Détermination quantitative d'osmoprotecteurs	65
5 - Rôle osmoprotecteur de la substance purifiée	66
IX - Algues marines et halotolérance de <u>E.coli</u>	66
1 - Présentation	66
2 - Etude de l'osmoprotection bactérienne	67
3 - Etude de la croissance bactérienne	68
4 - Algues marines et composés Dragendorff-positifs	68
5 - Détermination de composés osmoprotecteurs	69
6 - Les apports nutritifs	70
RESULTATS ET DISCUSSION	71
I - Appréciation de l'halotolérance bactérienne	73
1 - <u>E.coli</u>	73
2 - Osmoprotection de <u>E.coli</u> par le DMSP	76
3 - <u>Klebsiella</u> spp	76
4 - <u>Salmonella</u> spp	76

5 - <u>Pseudomonas</u> spp	78
6 - <u>Acinetobacter</u> spp	78
7 - <u>Vibrio</u> spp.....	78
8 - Influence de la température et de la durée d'incubation	78
9 - Discussion.....	80
II - Le potassium intracellulaire	83
1 - Résultats.....	83
2 - Discussion.....	83
III - Les acides aminés libres	84
1 - En milieu minimum.....	86
2 - En milieu riche	88
3 - Discussion.....	89
IV - Le trehalose intracellulaire	91
1 - Résultats.....	91
2 - Discussion.....	92
V - Effet du CCCP sur l'halotolérance de <u>E.coli</u>	94
1 - CMI du CCCP.....	94
2 - Action du CCCP sur des populations bactériennes.....	96
3 - Croissance de <u>E.coli</u>	96
4 - Discussion.....	99
VI - Accumulation d'osmoprotecteurs à partir de milieux de culture	102
1 - A partir du M63 enrichi en G.B,choline,ou DMSP.....	102
2 - A partir du bouillon trypticase-soja	102
3 - Discussion.....	104
VII - Sédiments marins et osmoprotection de <u>E.coli</u>	106
1 - Croissance de <u>E.coli</u>	106
2 - Effet osmoprotecteur de la substance purifiée.....	106

3 - Identification de l'osmoprotecteur accumulé par	
<u>E.coli</u> à partir de sédiments	106
3-1 - Par électrophorèse et CCM.....	106
3-2 - Par spectroscopie de RMN-¹H et	
spectrométrie de masse	110
4 - Dosage de bétaines dans les sédiments.....	110
5 - Discussion	110
VIII - Algues marines et osmoprotection bactérienne.....	112
1 - Osmotolérance bactérienne à partir d'algues	112
2 - Etude de la croissance bactérienne	114
3 - Composés-oniums, azote aminé et protéines.....	117
4 - Les substances osmoprotectrices algales.....	117
5 - Identification des composés osmoprotecteurs	120
5-1 - La CCM	120
5-2 - La spectrométrie de RMN-¹H.....	123
6 - Discussion	123
CONCLUSION	127
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	131
PUBLICATIONS.....	147
ANNEXES	149

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Fig A : Microbes regroupés selon leurs réponses au sel (d'aprèsLARSEN, H. 1986)	24
Fig B : Protocole de mise en évidence, séparation et identification des composés osmoprotecteurs.....	60
Fig 1a, b, c : Pourcentages de souches de populations de <u>E.coli</u> présentant une culture en 24h en fonction de la nature du milieu et de la salinité.....	72
Fig 2 : Osmoprotection par le DMSP.....	75
Fig 3a, b : Pourcentages de souches de populations bactériennes présentant une culture en 24h en fonction de la nature du milieu et de la salinité (<u>Klebsiella</u> spp, <u>Salmonella</u> spp)	75
Fig 4a, b, c : Pourcentages de souches de populations bactériennes présentant une culture en fonction de la nature du milieu et de la salinité (<u>Pseudomonas</u> spp, <u>Acinetobacter</u> spp, <u>Vibrio</u> spp)	77
Fig 5a, b, c, d : Pourcentages de souches présentant une culture en fonction de la nature du milieu, de la salinité, de la température et de la durée d'incubation	79
Fig 6 : Pourcentages de souches bactériennes présentant une culture en 24h, en fonction de la nature du milieu et en absence (a) ou en présence (b) de CCCP.....	97
Fig 7 : Effets de la glycine bétaine et/ou du CCCP sur la croissance de <u>E.coli</u>	98

Fig 8 : Electrophorégrammes montrant l'accumulation par <i>E.coli</i> de G.B ou de DMSP lorsqu'ils sont fournis dans le milieu de croissance.....	101
Fig 9 : Electrophorégramme et chromatogramme montrant l'accumulation de substances Dragendorff -positives par <i>E.coli</i>	103
Fig 10 : Survie de <i>E.coli</i> en présence de sédiments.....	105
Fig 11 : Survie de <i>E.coli</i> en eau de mer.....	105
Fig 12 : Croissance de <i>E.coli</i> en M63/NaCl 0,85M en présence de la substance Dragendorff-positive purifiée à partir de cultures sur sédiments marins	107
Fig 13 : Electrophorégramme des substances Dragendorff -positives accumulées par <i>E.coli</i> cultivé en présence de sédiments marins.....	108
Fig 14 : Chromatogrammes de la substance Dragendorff -positive isolée à partir de sédiments	109
Fig 15 : Spectre de RMN-¹H de la glycine bétaine.....	111
Fig 16 : Appréciation de l'osmoprotection de <i>E.coli</i> à partir d'extraits d'algues	113
Fig 17 : Croissance de <i>E.coli</i> à partir d'algues	115
Fig 18 : Electrophorégrammes des substances algales Dragendorff-positives.....	118
Fig 19 : Electrophorégrammes des substances algales Dragendorff-positives accumulées par <i>E.coli</i>	119
Fig 20 : Démonstration par la méthode du disque du rôle osmoprotecteur d'une substance algale accumulée par <i>E.coli</i>	121
Fig 21 : Chromatogrammes de substances osmoprotectrices accumulées par <i>E.coli</i> à partir d'algues.....	122
Fig 22 : Spectres de RMN-¹H du DMSP et de la γ-butyrobétaine	124
Tab 1 : Teneur intracellulaire en potassium	82
Tab 2 : Teneur en acides aminés libres en M63/Souche 1157D.....	85
Tab 3 : Teneur en acides aminés libres en M63/Souche 1412C.....	85

Tab 4 : Teneur en acides aminés libres en M63/Souche 54C	85
Tab 5 : Teneur en acides aminés libres en bouillon trypticase-soja	87
Tab 6 : Teneur intracellulaire en tréhalose	90
Tab 7 : CMI du CCCP en bouillon trypticase-soja	93
Tab 8 : CMI du CCCP sur gélose trypticase-soja	95
Tab 9 : Numérations bactériennes/sédiments	107
Tab 10 : Détermination des composés-oniums, azote aminé et protéines	116

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

- BTS** : Bouillon Trypticase-Soja
G.B : Glycine Bétaire
CCCP : Carbonyl Cyanide *m*-ChloroPhenylhydrazone
DMSP : DiMéthylSulfonioPropionate
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
UFC : Unités Formant Colonie
RMN-¹H : Résonance Magnétique Nucléaire-Proton

INTRODUCTION

Avec l'accroissement démographique, le volume des eaux résiduaires déversées quotidiennement dans l'environnement marin a atteint des niveaux considérables. Le littoral marin reçoit, en effet, les eaux usées provenant des émissaires des agglomérations littorales, les eaux fluviales et d'estuaires utilisées parfois pour les rejets domestiques, et les eaux de ruissellement terrestre pouvant entraîner détritus et déchets animaux.

D'une manière générale, ces eaux résiduaires renferment des matières organiques en grande quantité, des micropolluants (détecteurs, hydrocarbures) mais surtout des micro-organismes apportés le plus souvent par les matières fécales. En dépit de leur traitement au niveau des stations d'épuration, leur concentration en bactéries reste néanmoins élevée. Leur dissémination dans le milieu marin entraîne donc une contamination de tous ses compartiments et des organismes y vivant. Sur le plan strictement sanitaire, les conséquences de cette pollution microbienne sont d'une importance particulière car l'homme peut s'infecter au cours de baignades (atteintes cutanéo-muqueuses) et surtout par l'ingestion de produits marins (toxi-infections alimentaires). Si les risques de contamination par les eaux de baignade représentent rarement un danger sérieux pour la santé, il n'en est pas de même pour les aliments d'origine marine, essentiellement les coquillages, qui peuvent être à l'origine de manifestations pathologiques très graves car ils concentrent les bactéries dans leur organisme par filtration de quantités énormes d'eau.

Cette pollution microbienne est généralement mesurée par le dénombrement de "germe-tests" à savoir les coliformes totaux, les coliformes fécaux dont Escherichia coli, et les Streptocoques fécaux, témoins d'une contamination fécale, et donc la pollution possible par des germes pathogènes. Il a été montré, par exemple, que la fréquence des Salmonella augmente avec le taux de coliformes fécaux (VAN DONSEL et GELDREICH, 1971). Les micro-organismes pathogènes véhiculés par les matières fécales, et susceptibles d'être rencontrés dans le milieu marin, sont essentiellement des bactéries telles que E.coli entéropathogène, Salmonella spp, Shigella spp, Campylobacter jejuni, Vibrio spp, Clostridium spp, des mycobactéries, des entérovirus, des champignons et des parasites. En outre, parmi les risques épidémiologiques, certains peuvent être considérés comme intrinsèques du milieu. Les cas du Vibrio parahaemolyticus et de Clostridium botulinum type E en sont des exemples permanents. Si le contrôle bactériologique est nécessaire pour mesurer le degré de la gravité de la pollution microbienne, il est aussi intéressant d'étudier le comportement des bactéries et de suivre leur évolution dans le milieu marin pour une meilleure appréhension de cette pollution.

Les premiers travaux sur le sujet ont tenté de montrer le déclin et la mortalité des bactéries pathogènes d'origine tellurique ou allochtones, dans le milieu

marin. L'eau de mer est un milieu hostile à leur développement à cause essentiellement de sa forte salinité (35 g/l en moyenne) et de sa pauvreté en matières organiques. Le milieu marin aurait ainsi un pouvoir auto-épurateur. Cependant, grâce à l'utilisation relativement récente de méthodes bactériologiques nouvelles, des données suffisantes obtenues *in vitro* et *in situ* permettent de conclure que les bactéries entériques pathogènes survivent pendant de longues périodes en eau de mer (GRIMES et coll, 1986). En fait, elles entrent, probablement, dans un état de dormance, durant lequel elles restent viables et potentiellement virulentes. Elles ne sont pas cultivables lorsque les méthodes bactériologiques traditionnelles sont utilisées.

La salinité fut toujours considérée comme un élément de sélection favorisant la mortalité de *E.coli* en eau de mer par effet osmotique et déshydratation (CARLUCCI et PRAMER, 1960).

La vitesse de disparition est proportionnelle à la concentration en sel. La première remarque est qu'au niveau des estuaires, où l'eau de mer se trouve diluée par l'apport d'eau douce, la survie des bactéries serait meilleure. En outre, ANDERSON et coll (1979) ont détecté un stress sublétal chez *E.coli* et ont démontré qu'il était fonction de la salinité. Enfin, une étude effectuée en rade de Brest (IFREMER, 1981) montre que le nombre des coliformes reste élevé même à distance de tout rejet, ce qui laisse supposer que ces germes se sont adaptés au sel et ont donc acquis une haloadaptation ou une halotolérance au milieu marin. La découverte relativement récente du rôle de certaines molécules (Bétaines et Proline) dans la restauration de la croissance de *E.coli* et d'autres entérobactéries (LE RUDULIER et BOUILLARD 1983) en milieu minéral salé a permis d'autre part une nouvelle approche du phénomène de l'halotolérance en milieu marin.

La carence alimentaire est un autre facteur considéré comme prépondérant dans la disparition des bactéries en milieu marin. Ceci n'est cependant pas valable pour certaines zones du littoral et les estuaires recevant de considérables volumes d'eaux usées riches en matières organiques de diverses origines (fèces, débris végétaux...) dont une grande partie sédimente. GERBA et Mc LEOD (1976) ont observé une meilleure survie de *E.coli* en présence de sédiments et l'attribuent à la matière organique se trouvant sous forme liée aux sédiments. De fortes concentrations de coliformes et de bactéries entériques pathogènes existent dans les sédiments plutôt que dans la couche d'eau qui les recouvre. Lorsqu'elles sont soumises à des flux verticaux, ces bactéries sont suspendues dans la colonne d'eau et peuvent infecter un hôte potentiel.

Quoi qu'il en soit, dans des conditions naturelles, seulement une croissance limitée est observée en présence de sédiments provenant de sites fortement pollués. Il reste néanmoins que la persistance de *E.coli* est beaucoup plus longue en présence de sédiments. Peu d'informations existent concernant la qualité de la matière organique des sédiments et sa composition précise. En plus des déchets telluriques comprenant des

détritus, des déchets animaux, des fèces et aussi de nombreux inhibiteurs, ceux-ci sont constitués par des débris d'origine marine tels les cadavres d'animaux et les débris végétaux dont les algues essentiellement.

Depuis plus d'un siècle, l'homme a pris conscience du danger que peut représenter pour lui la pollution microbienne de l'environnement marin. Les premiers travaux concernant le suivi et le devenir de ces bactéries au sein du milieu marin ont été optimistes. Les résultats obtenus par les différents auteurs montraient essentiellement le déclin des bactéries pathogènes allochtones dans l'environnement marin (DE GIAXA, 1889 ; ZOBELL, 1936 ; KETCHUM et COLL, 1952 ; GREENBERG, 1956 ; CARLUCCI et PRAMER, 1959 ; CARLUCCI et PRAMER, 1960 ; MITCHELL, 1968).

A) ACTION AUTO-EPURATIVE DU MILIEU MARIN

Divers phénomènes vont intervenir sur ces micro-organismes d'origine tellurique au cours de leur dérive en milieu marin. Parmi eux, il faut constater 3 types de facteurs : physiques - chimiques - biologiques.

1 - Les facteurs physiques

a - Dispersion et sédimentation

Les germes provenant des effluents sont adsorbés sur des particules organiques ou inorganiques qui suivant leur taille, seront soit entraînées au loin par les courants de surface, soit sédimenteront. Les études faites sur cette question mettent en évidence que les grosses particules, d'un poids spécifique élevé, ont tendance à sédimer, alors que les particules de faible dimension ($<20\text{ }\mu\text{ de diamètre}$) sont entraînées dans les couches océaniques superficielles (AUBERT, 1972). WOOD (1963) a montré que la majeure partie de la charge bactérienne se fixe sur les particules de faible dimension. L'extension de la charge bactérienne sera relativement faible sur le fond adjacent et plus importante en surface où s'effectue la dérive des eaux contaminées et où interviennent les mécanismes de diffusion et de dilution. La dispersion entraîne une dilution non seulement des germes mais aussi des nutriments nécessaires à leur survie. Chaque zone côtière constitue un cas particulier car il faut tenir compte du caractère irrégulier des courants; les vents, les tempêtes et les précipitations pluviales ont aussi une influence sur la dynamique de ces masses d'eau de mer. La construction d'émissaires en mer tient compte essentiellement de la dispersion bactérienne (AUBERT et DESIROTE, 1968). Les bactéries adsorbées sur les grosses particules vont s'accumuler sur les sédiments et disparaissent donc des eaux de surface. La sédimentation, en fait, ne joue pas un rôle véritable dans l'activité auto-épuratrice de l'eau de mer, car les cellules sédimentées peuvent être remises en suspension sous l'action de forces naturelles (vagues, marées...) ou artificielles (dragage, navigation...). De plus, GERBA et Mc LEOD (1976) ont montré que les coliformes sont capables

d'utiliser comme nutriment la matière organique des sédiments et ainsi de survivre beaucoup plus longtemps que dans l'eau de mer.

Les bactéries libres, non adsorbées sur des matériaux particulaires, se déplacent dans la masse d'eau selon les conditions hydrologiques locales.

b - La lumière

On a toujours pensé que seules les radiations U.V. ($\leq 280\text{nm}$) qui agissent au niveau des acides nucléiques étaient létales pour les micro-organismes. Cependant, il a été observé que la lumière visible ou proche U.V. peuvent causer des dommages chez *E.coli*. (JAGGER, 1975 ; KRINSKY, 1976 ; KAPUSCINSKI et MITCHELL, 1981) ont montré que les rayons solaires avaient un effet bactéricide chez *E.coli* en eau de mer littorale. L'inhibition de *E.coli*, par les rayonnements solaires, est due à la photooxydation et à la formation de peroxydes toxiques pour les cellules. La catalase, qui normalement a une action de protection en transformant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , serait donc la cible des rayonnements solaires (KAPUSCINSKI et MITCHELL, 1981). De plus, la catalase appartient aux porphyrines dont la photosensibilité en solutions oxygénées a été démontrée (KRINSKY, 1976). L'effet bactéricide de la lumière en eau de mer est important : FUJOIOKA et COLL (1981) ont montré que 90% des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux disparaissaient en 30 à 90 minutes et en 60 à 180 minutes respectivement.

c - La température

VACCARO et COLL (1950) ont montré que la survie de *E.coli* en mer varie avec les saisons. Les numérations de *E.coli* chutent plus rapidement durant l'été. Cette constatation est à rapprocher avec les variations de la température. En effet, une élévation de la température augmente le taux de déclin de *E.coli* (MITCHELL, 1968 ; FAUST et COLL, 1975). A 10°C , 10^3 cellules de coliformes subsistent après 15 jours d'incubation et seulement 5 jours à 30°C en eau de mer additionnée de 3% de féces (MATSUMOTO et OMURA, 1980).

2 - Les facteurs chimiques

Parmi ces facteurs, les plus cités par la littérature sont la carence alimentaire de l'eau de mer, la présence de métaux lourds et la salinité. Le pH de l'eau de mer, légèrement alcalin (voisin de 8), n'est pas considéré comme un facteur défavorable à la survie des coliformes et des entérocoques (MATSUMOTO et OMURA, 1980). Plusieurs bactéries sont, en fait, capables de se multiplier à des valeurs de pH légèrement alcalines.

a - La carence alimentaire

La pauvreté de l'eau de mer en matière organique est considérée comme un facteur défavorable à la survie des bactéries coliformes (CARLUCCI et PRAMER, 1959 ; CARLUCCI et PRAMER, 1960 ; MATSUMOTO et OMURA, 1980). Certaines bactéries dites oligotrophes peuvent cependant se développer en eau de mer contrairement aux bactéries eutrophes dont les besoins nutritionnels sont plus importants. Nous verrons plus loin que *E.coli* peut survivre dans les sédiments et dans les zones de rejet des eaux usées riches en substances organiques et azotées.

b - Les substances chimiques

Ce sont essentiellement les métaux lourds et les détergents. CHAI (1983) a montré que l'inhibition de *E.coli* par des sels de métaux lourds (CuSO_4 , HgCl_2 , $\text{Pb}(\text{Ac})_2$, AgNO_3 , CoCl_2) est plus importante en eau de mer filtrée qu'en milieu riche. Il en est de même pour les détergents. Cette augmentation de la sensibilité serait due à une modification de la composition en porines de la membrane externe. JONAS et COLL (1984) travaillant directement sur l'eau de mer ont observé de très faibles valeurs de CMI de métaux lourds vis-à-vis de la communauté bactérienne présente dans celle-ci : 5mg/l pour l'étain, 5 $\mu\text{g}/\text{l}$ pour le tributylétain et 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ pour le mercure. D'autres contaminants chimiques (colorants, composés organométalliques) sont mis en cause. Ils sont véhiculés par les eaux usées domestiques et industrielles, l'atmosphère, l'érosion ou peuvent être liés à l'application directe d'algicides ou d'agents antifoliques.

c - La salinité

La salinité de l'eau de mer est l'une de ses principales caractéristiques et il a été suggéré qu'elle constitue l'un des plus importants facteurs de disparition des coliformes. D'après HANES et FRAGALA (1967) : "Si les entérocoques et *E.coli* sont utilisés comme bactéries indicatrices en eau de mer et en eau douce, la connaissance de leur survie est nécessaire. Par exemple, dans les études menées sur le littoral (plages, zones de culture...), un facteur très important doit être pris en considération, c'est l'effet de la concentration de l'eau de mer sur la survie de ces bactéries. Si ceci n'est pas connu, il serait impossible d'apprécier quantitativement la contamination fécale présente dans plusieurs estuaires où la concentration de l'eau de mer varie". Utilisant de l'eau de mer diluée (33% et 67%) ou non, les auteurs ont montré que le taux de mortalité de *E.coli* est proportionnel à la concentration de l'eau de mer en sel. CARLUCCI et PRAMER (1960) en menant l'expérience parallèlement sur l'eau de mer et sur de l'eau salée (NaCl) concluèrent que des teneurs croissantes en sel diminuent la survie de *E.coli* et qu'il n'existe pas, à même concentration saline, de différences notables entre eau de mer et eau salée. La salinité contribue donc d'une façon significative à la mortalité de *E.coli* en eau de mer, l'effet paraît être osmotique. D'autres travaux menés *in vitro* (MATSUMOTO et OMURA, 1980) et *in situ* (FAUST et COLL, 1975 ;

VASCONCELOS et SWARTZ, 1976) aboutirent aux mêmes conclusions. Enfin, ANDERSON et COLL (1979) en constatant le même effet inhibiteur du sel ont mis en évidence un stress sublétal chez E.coli, celui-ci étant une fonction de la salinité.

3 - Les facteurs biologiques

a - Rôle des prédateurs

Ce sont les antagonistes naturels des bactéries telluriques. Il faut distinguer les microprédateurs des macroprédateurs. Les premiers sont constitués par les bactériophages et Bdellovibrio bacteriovirus dont l'action de lyse des bactéries entériques dans l'eau d'égout a été démontrée par GUELIN et LAMBLIN (1966) et par STOLP et STARR (1963). Selon AUBERT (1968), leur action s'effectuerait au niveau de la zone d'estuaire, proche de l'arrivée des eaux d'égout très riches en germes. En outre, elle est étroitement liée à la richesse en nutriments de l'eau de mer puisqu'elle nécessite la multiplication de la bactérie-hôte (HICKS et ROWBURY, 1987). Les organismes macroprédateurs tels les métazoaires et les protozoaires se nourrissent directement de bactéries rejetées et abaissent de ce fait le taux bactérien (ENZINGER et COOPER, 1976). Les mollusques filtrent de 20 à 100 litres d'eau par jour et par individu. Ils se chargent de bactéries et les concentrent. Leur consommation devient ainsi dangereuse pour l'homme.

b - L'antibiose

L'existence de substances antibiotiques dans l'eau de mer a été reportée par KETCHUM et COLL (1952), GREENBERG (1956) et MITCHELL (1968). Elles sont produites par certaines bactéries marines (KRASSILNIKOVA 1962, GAUTHIER 1969). La flore bactérienne autochtone serait ainsi responsable de la destruction des bactéries allochtones. Certaines espèces phytoplanctoniques libèrent dans l'eau de mer des substances antibactériennes de diverses natures chimiques (AUBERT, 1964). Il en est de même pour certaines algues supérieures productrices de toxines. Cependant, comme le précise MITCHELL (1968), aucune preuve directe n'a été apportée dans la production de substances antibactériennes *in situ*.

B) SURVIE DES BACTERIES EN MILIEU MARIN

Il va sans dire que les causes de mortalité énumérées ci-dessus jouent un rôle essentiel dans la disparition des bactéries fécales en eau de mer. Cependant les méthodes bactériologiques traditionnelles ont exagéré le rôle épurateur du milieu marin. Durant cette dernière décennie cette notion de mortalité a connu une profonde évolution, à cause d'une part de l'apparition de nouvelles méthodes de culture et de

dénombrément bactériens et d'autre part suite à l'apport de plus en plus important de matière organique permettant une meilleure survie des bactéries en milieu marin. En même temps est apparue la notion de stress des bactéries : celles-ci évoluant plus ou moins rapidement vers un état viable mais non cultivable.

1 - Bactéries viables mais non cultivables

Les entérobactéries subissent un stress important consécutif à leur passage dans un milieu hostile (eaux usées d'abord, eau de mer ensuite). En milieu marin littoral, ce sont les différents facteurs du pouvoir épurateur de l'eau de mer qui sont impliqués. Selon BISSONNETTE et COLL (1975), les cellules stressées sont celles capables de croître sur milieu non-sélectif mais non sur milieu sélectif. Les coliformes introduits dans un environnement aquatique ont les trois comportements suivants : la mort, la survie avec énumération possible par les méthodes standard, ou le stress subletal rendant la croissance impossible.

Bien que cet état de stress ait été déjà appréhendé par certains auteurs (KLEIN et WU, 1974 ; BISSONNETTE et COLL, 1975; OLSON, 1978), c'est essentiellement l'évolution des techniques de visualisation et de dénombrement des bactéries dites "techniques modernes" qui a permis de confirmer la notion de survie. Depuis, l'idée de mortalité des bactéries est remise en question, et on parle plutôt de survie dans le milieu marin.

Ces techniques permettent des numérations directes et sont basées sur le marquage des bactéries. L'épifluorescence utilise l'acridine orange comme fluorochrome et permet le dénombrement des cellules, mortes ou vivantes, par microscopie sous U.V. (DALEY et HOBBIE, 1975 ; HOBBIE et COLL, 1977). L'immunofluorescence est basée sur l'utilisation d'anticorps fluorescents, le dénombrement des bactéries s'effectue sous lumière ultra-violette (XU et COLL, 1982 ; CAMPBELL et COLL, 1983). Enfin, une technique de comptage direct des cellules viables dite DVC (Direct Viable Count, pour les Anglo-Saxons) utilise l'extrait de levure pour favoriser la croissance et l'acide nalidixique comme inhibiteur de l'ADN gyrase (KOGURE et COLL, 1979). Sous de telles conditions, les cellules s'allongent et sont reconnaissables par la technique à l'acridine orange ou par immunofluorescence. Des méthodes autoradiographiques ont montré que de telles cellules sont métaboliquement actives (ROSZAK et COLWELL, 1987). En outre, elles sont potentiellement virulentes (COLWELL et COLL, 1985).

De la conjugaison des méthodes traditionnelles de culture et des techniques modernes est donc née la notion de bactéries viables mais non cultivables. Ces bactéries sont considérées en état de dormance ou en état de carence alimentaire et peuvent survivre pendant de longues périodes en eau de mer. Ces observations ont été essentiellement faites à partir d'études *in vitro* chez E.coli (XU et COLL, 1982 ;

PALMER et COLL, 1984), Salmonella enteritidis (ROSZAK et COLL 1984) et Vibrio cholerae (XU et COLL 1982, COLWELL et COLL, 1985). Enfin, il a été montré qu'aussi bien les bactéries allochtones qu'autochtones sont capables d'entrer dans un état viable mais non cultivable (GRIMES et COLL, 1986).

2 - Survie et matière organique

D'une manière générale, l'eau de mer est très pauvre en nutriments organiques (quelques dizaines de mg/litre). Par contre, la zone d'estuaire, lieu de rejet de la rivière ou de l'égout, et la zone benthique comprenant la couche sédimentaire et la couche d'eau immédiate qui la recouvre, sont riches en matières organiques. VAN DONSEL et GELDREICH (1971) et GERBA et COLL (1977) ont montré que les coliformes, les coliformes fécaux et les Salmonella tendent à se concentrer dans les sédiments et sont presque totalement localisés dans la couche supérieure (environ 5cm) (VAN DONSEL et GELDREICH, 1971). ORLOB (1956) et WON et ROSS (1973) ont observé une croissance de E.coli, in vitro, quand de la peptone, du trypticase, du lactose, des eaux d'égout ou des féces sont ajoutés à l'eau de mer. L'effet des sédiments sur la survie de E.coli a été étudié par GERBA et McLEOD (1976). E.coli survit pendant de longues périodes dans de l'eau de mer naturelle non-stérile en présence de sédiments, que dans de l'eau de mer seule. E.coli est capable de croître en utilisant les nutriments adsorbés aux sédiments autoclavés en présence d'eau de mer autoclavée à 34g /kg de salinité. De même qu'il est capable de croître en eau de mer polluée et autoclavée. Toutefois, la croissance en présence de sédiments est toujours plus importante (GERBA et McLEOD, 1976 ; HOOD et NESS, 1982) car plus riches en matière organique. De plus, celle-ci est meilleure en présence de sédiments autoclavés puisque, d'une part, le relargage des nutriments est favorisé par la chaleur et, d'autre part, la compétition avec la microflore naturelle est absente. Des résultats comparables ont été obtenus pour Vibrio cholerae (HOOD et NESS, 1982 ; GUTHRIE et SCOVILL, 1984) et les entérovirus (LA BELLE et COLL, 1980).

Les eaux usées contiennent, en plus, des substances chimiques toxiques. Si les bactéries sensibles à ces toxiques sont éliminées directement, il en résulte toutefois une sélection de populations bactériennes résistantes ou de populations capables de leur dégradation. De tels résultats ont été obtenus concernant la sélection de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques (GOOSSENS et COLL, 1985). De plus, la transmission *in situ* de plasmides codant pour la résistance aux antibiotiques a été démontrée (MORRISSON et COLL, 1978 ; MACH et GRIMES, 1982). Ainsi, la sélection de souches bactériennes résistantes et potentiellement virulentes constitue un autre problème de santé publique.

Un autre élément fondamental nécessaire à la compréhension du

comportement des bactéries allochtones dans le milieu marin est la stratégie qu'elles mettent en oeuvre pour faire face au stress osmotique qu'entraîne la forte salinité du milieu due en grande partie à la présence d'une importante teneur en chlorure de sodium (NaCl). Ces bactéries d'origine entérique, contrairement aux bactéries dites halophiles, ne nécessitent pas de NaCl, ou plus exactement d'ions sodium (Na^+), pour leur croissance. Déversées dans le littoral marin, elles subissent alors un déséquilibre osmotique de part et d'autre de la membrane cytoplasmique qui tend à provoquer, chez elles, la déshydratation. Cependant, nous avons vu que, dans une certaine mesure, *E.coli* arrive à survivre dans le milieu marin. Pour équilibrer sa pression osmotique interne *E.coli* fait appel dans un premier temps à des mécanismes endogènes à savoir l'accumulation ou l'excrétion d'osmolytes internes. Lorsque le stress osmotique devient plus important, elles accumulent des substances dites osmoprotectrices à partir du milieu extérieur.

L'ensemble de ces mécanismes confère à la cellule une halotolérance ou une haloadaptation lui permettant de résister au stress salin et de se développer en présence de fortes osmolarités du milieu. En plus des aspects physiologiques et biochimiques de cette adaptation, la cellule bactérienne met en oeuvre des processus de régulation génétique.

C - ETUDE DE L'OSMOREGULATION

Définition : Selon BROWNetCOLL (1986) c'est le maintien de la pression de turgescence et/ou du volume cellulaire nécessaires à la croissance et à la multiplication d'un organisme.

1 - Halophilie et Halotolérance : définitions

A l'heure actuelle, la classification des bactéries selon leur réponse au sel n'est pas clairement définie. Cependant, les différents auteurs s'accordent à différencier les bactéries halophiles pour lesquelles le sel, en l'occurrence le chlorure de sodium (NaCl), est indispensable à leur survie et à leur croissance des bactéries halotolérantes pour lesquelles le sel n'est pas exigé spécifiquement mais pouvant tolérer une certaine concentration de sel.

La première classification fut proposée par LARSEN (1962) et complétée par KUSHNER (1978) qui classifia les micro-organismes selon la meilleure croissance obtenue en présence de concentrations connues en sel.

- Les non-halophiles : croissance optimale à moins de 0,2M NaCl. La plupart des Eubactéries et les micro-organismes d'eau douce.

- Les halophiles faibles : croissance optimale entre 0,2 et 0,5 M NaCl. Plusieurs

micro-organismes marins.

- Les halophiles modérés : croissance optimale entre 0,5 et 2,5M NaCl. Bactéries et quelques algues.

- Les halophiles extrêmes : croissance optimale entre 2,5 et 5,2M NaCl. Les halobactéries et les halococci.

- Les halotolérants : ce sont les non-halophiles qui peuvent tolérer le sel.

IMHOFF (1986) classifia les bactéries halophiles selon la concentration optimale en sel nécessaire à leur croissance et les halotolérantes selon leurs "limites supérieures de croissance" c'est-à-dire la concentration maximale en sel pouvant être supportée par la bactérie. Ainsi, les bactéries non halophiles ont une croissance optimale à 0,2 M NaCl, les halophiles faibles entre 1,0 et 1,2M NaCl, les halophiles modérées entre 2,0 et 2,5M, et les halophiles extrêmes pour des valeurs supérieures à 2,5M. Les mêmes limites pourraient être utilisées pour définir les tolérances au sel.

Actuellement, cependant, la classification établie par LARSEN (1986) semble la plus adoptée. La distinction est faite entre "tolérance au sel" et "exigence en sel".

Afin d'éviter toute confusion, il serait bon de préciser que les bactéries non-halophiles sont souvent stimulées dans leur croissance par une faible quantité en sel (environ 1%) et que l'effet stimulateur de la croissance est obtenu avec différents sels. L'addition de sel dans les milieux de culture n'était pas préconisée jusqu'à présent, (LARSEN, 1986).

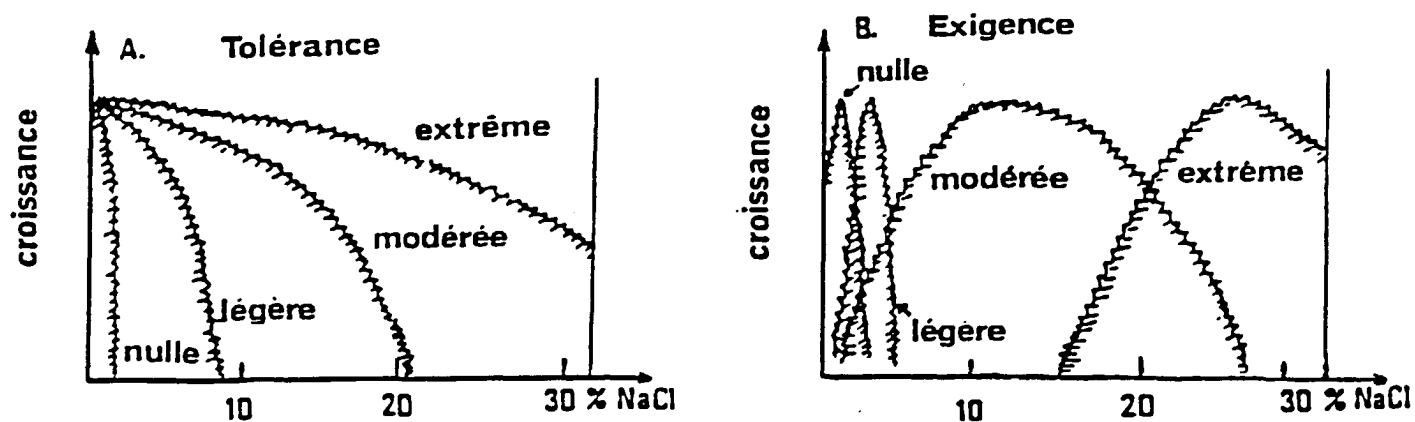


Fig.A : Microbes regroupés selon leurs réponses au sel

Source: LARSEN, H., FEMS. Microbiol. Rev. 39 (1986) 3-7.

2 - Solutés compatibles

Les cellules bactériennes possèdent des mécanismes qui leur permettent de maintenir une pression osmotique interne plus grande que celle du milieu environnant. Chez *E.coli*, cette différence de pression positive ou Pression de turgescence est approximativement égale à 300mOsm en milieu minimum. Son maintien est

indispensable à la croissance et la division cellulaires.

Puisque la membrane cytoplasmique bactérienne est perméable à l'eau mais non à la plupart des métabolites, un choc hyper ou hypoosmotique provoque un efflux ou un influx d'eau accompagné, respectivement, par une diminution ou une augmentation concomitante du volume cytoplasmique. Vu la rigidité de la paroi bactérienne, le choc hypoosmotique n'entraîne généralement qu'une légère augmentation du volume cytoplasmique. Par contre, le choc hyperosmotique a pour conséquence de considérables contractions du volume cytoplasmique. L'importance de cette plasmolyse dépend de l'osmolarité du milieu mais non de la nature du soluté.

L'exposition des bactéries à des conditions d'hyperosmolarités a comme résultat une diminution de l'activité de l'eau cytoplasmique. Les protéines et d'autres macromolécules biologiques ont une activité optimale entre certaines limites de valeurs de l'activité de l'eau, en dehors desquelles celle-ci est perturbée. La plasmolyse entraîne la dénaturation des enzymes (YANCEY et COLL, 1982) et donc l'inhibition de processus physiologiques tels l'accumulation de nutriments (ROTH et COLL, 1985) ou la réplication de l'ADN (MEURY, 1988). OHWADA et SAGISAKA (1988) ont reporté qu'il y a augmentation du taux de l'ATP intracellulaire probablement due à l'inhibition de la biosynthèse des macromolécules.

En général, les organismes répondent au stress osmotique en augmentant les concentrations d'un nombre limité de solutés qui n'ont aucun effet inhibiteur sur les processus cellulaires. Pour cette raison, ils sont appelés Solutés Compatibles (BROWN et SIMPSON, 1972). Les plus rencontrés chez les bactéries sont les ions K^+ , les acides aminés tels le glutamate, la glutamine, la proline, le γ -aminobutyrate et lalanine, les sucres tels le saccharose et le tréhalose, le glucosylglycérol et les dérivés méthylés d'acides aminés tels la glycine bétaine (BROWN, 1976 ; YANCEY et COLL, 1982). CSONKA (1989) constate deux caractéristiques communes aux solutés compatibles. Ils ne peuvent traverser rapidement les membranes cellulaires sans l'aide de systèmes de transport et, pour la plupart, ne portent pas de charge électrique nette aux valeurs neutres de pH. Cependant, les ions K^+ et le glutamate constituent une exception à cette généralisation, et ces deux solutés n'apportent aucune osmoprotection contre le stress hyperosmotique comme certains des métabolites non chargés.

Les solutés compatibles sont accumulés par les bactéries soit par synthèse endogène soit par transport à partir du milieu de culture. Il faut distinguer 2 classes de solutés compatibles.

. Les uns n'ont aucun effet de stimulation sur la croissance des cellules en milieu à forte osmolarité.

. Les autres, par contre, ont un important effet de stimulation sur le taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu de culture. Ce sont des osmoprotecteurs (STRØM et COLL., 1983).

Les raisons de cette différence entre les 2 types de solutés ne sont pas comprises. Il se peut que les substances osmoprotectrices soient accumulées à des concentrations plus élevées par transport ou soient moins toxiques dans ces conditions que les autres solutés compatibles, ou encore parce qu'elles ont des interactions spéciales avec les macromolécules cellulaires en augmentant leur stabilité dans des milieux à osmolarité élevée (YANCEY et COLL., 1982 ; SCHOBERT et TSCHESCHE, 1978 ; STRØM et COLL., 1983 ; ARAKAWA et TIMASHEFF, 1985 ; PALEG et COLL., 1985).

Parmi plus d'une centaine de composés testés, seul un nombre restreint d'ammoniums quaternaires dérivés d'acides aminés tels la glycine bétaine, la choline, la bétaine aldéhyde, la triméthyl- γ -aminobutyrate, la proline bétaine, et un acide aminé, la proline ont montré une osmoprotection chez les entérobactéries (LE RUDULIER et VALENTINE, 1982 ; LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983 ; STRØM et COLL., 1983) et chez d'autres espèces bactériennes (CSONKA, 1989). Plus récemment, il a été montré que la diméthylthétine, un composé sulfonium, est un osmoprotecteur aussi efficace que la glycine bétaine (CHAMBERS et COLL., 1987).

3 - Rôle primaire du Potassium

Les bactéries maintiennent une osmolarité interne plus élevée que celle de l'environnement externe. Cette différence positive entre l'osmolarité interne et externe, appelée pression de turgescence, est nécessaire à la croissance et la division bactériennes. Chez *E.coli*, elle est maintenue à environ 3 atm par l'accumulation d'ions potassium (K^+) et d'une variété d'anions produits métaboliquement (EPSTEIN et SCHULTZ, 1968). Les ions K^+ servent aussi à l'activation de plusieurs enzymes cellulaires et participeraient à la régulation du pH cytoplasmique (BOOTH, 1985).

Les ions K^+ sont l'osmolyte primaire chez plusieurs espèces bactériennes, leur accumulation constitue le principal moyen de compenser l'osmolarité externe et de maintenir une turgescence normale de la cellule bactérienne (CHRISTIAN et WALTHO, 1961 ; WALDERHAUG et COLL, 1989). La concentration intracellulaire en ions K^+ augmente à peu près proportionnellement à l'osmolarité externe du milieu de croissance (CHRISTIAN, 1955a ; CHRISTIAN, 1955b ; CHRISTIAN et WALTHO, 1961 ; EPSTEIN et SCHULTZ, 1965 ; TEMPEST et COLL, 1970 ; REED et STEWART, 1985).

EPSTEIN et SCHULTZ (1968) rapportent que l'osmolalité du milieu est un déterminant majeur de la teneur en K^+ de *E.coli*, et que des changements brutaux de cette osmolalité entraînent des changements rapides de la teneur intracellulaire en K^+ . Cette teneur varie de 150mM à près de 600mM quand l'osmolalité du milieu varie de 80 à 1200 mOsm. Cette accumulation du potassium dépend de la seule osmolarité du

milieu et non de la nature du soluté (ionique ou non) à condition que celui-ci ne diffuse pas librement à travers la membrane cellulaire (tel le glycérol). Ces résultats suggèrent que l'accumulation des ions K^+ n'est pas liée directement à la diminution de l'activité de l'eau, per se, mais plutôt à la perte de la pression de turgescence (LAIMINS et COLL, 1981 ; MEURY et COLL, 1985) ou à la réduction du volume cytoplasmique (CSONKA, 1989). La concentration intracellulaire du potassium est déterminée à la fois par son taux d'entrée (influx) et son taux de sortie (efflux). MEURY et COLL (1985) ont démontré que le taux de l'influx dépend du niveau de l'osmolarité interne et non de l'accroissement de l'osmolarité du milieu. Le taux de l'efflux, par contre, est directement proportionnel à la diminution de l'osmolarité du milieu et est indépendant de l'osmolarité interne.

Ces processus d'échange des ions K^+ sont très rapides. Enfin, la rétention des ions K^+ nécessite l'accumulation du glutathion (MEURY et KEPES, 1982). Les teneurs en ce métabolite augmentent avec le stress osmotique (MUNRO et COLL, 1972).

Deux systèmes de l'incorporation des ions K^+ fonctionnent chez E.coli :

Trk : un système constitutif à faible affinité, $K_m = 1,5\text{mM}$ (EPSTEIN, 1985)

Kdp : un système à haute affinité, $K_m = 2 \mu\text{M}$ osmotiquement induit (EPSTEIN, 1985, 1986).

Le système Trk a un taux élevé de transport (RHOADS et COLL, 1976). Son activité augmente en réponse à un choc hyperosmotique, elle est diminuée par mutations sur les gènes trk A, trk E, trk G et trk H dispersés sur le chromosome. Ceci suggère que Trk serait ainsi composé de différents polypeptides. À part le gène trk A qui code pour une protéine membranaire impliquée dans le transport du potassium par le système Trk (HAMANN et COLL, 1987), le rôle des autres gènes et leurs possibles interactions avec K^+ ne sont pas connus. Deux autres gènes, trk B et trk C sont impliqués dans l'excrétion des K^+ à partir de la cellule (BAKKER et COLL, 1987). Le système Kdp est codé par un ensemble de 5 gènes organisés en 2 unités de transcription ou opérons (EPSTEIN, 1985).

- kdp ABC : codant pour des protéines structurales de transport

- kdp DE : codant pour 2 protéines de régulation qui régulent l'expression du premier opéron en réponse au stress osmotique

Le produit du gène kdp A est responsable de la liaison avec K^+ durant son transport (EPSTEIN, 1985 ; SIEBERS et COLL, 1987), celui du gène kdp B est le site de phosphorylation (EPSTEIN, 1985).

Dans la plupart des conditions de croissance, le système Trk est seul présent. Quand son activité est réduite par l'utilisation d'un milieu carencé en K^+ ou par mutations, le système Kdp, répressible, est exprimé. Les 2 systèmes répondent de la même façon à une soudaine augmentation de l'osmolarité du milieu, par une stimulation

de l'influx sans aucun changement de l'efflux (RHOADS et EPSTEIN, 1978).

Kdp est exprimé seulement quand la pression de turgescence est basse ; il entre en jeu quand l'activité du Trk ne peut la maintenir (LAIMINS et COLL, 1981). L'opéron kdp ABC est induit directement en réponse aux changements de la pression de turgescence et est indépendant de la valeur absolue de l'osmolarité externe et la concentration intra ou extracellulaire en K^+ (LAIMINS et COLL, 1981). De plus il est réprimé par de fortes teneurs en K^+ du milieu extérieur même en présence de fortes osmolarités du milieu (LAIMINS et COLL, 1981 ; GOWRISHANKAR, 1985 ; SUTHERLAND et COLL, 1986). L'activité de Kdp et Trk est aussi modulée par la turgescence cellulaire afin d'éviter une "super-accumulation" de K^+ qui serait inhibitrice pour la cellule (régulation par feed-back) (EPSTEIN, 1985, 1986).

Bien que l'idée que la turgescence cellulaire est le seul signal de régulation de l'expression de l'opéron kdp ABC soit séduisante puisqu'elle propose un contrôle "homéostatique" de la pression de turgescence, elle reste néanmoins controversée à l'heure actuelle. Certains résultats expérimentaux obtenus par GOWRISHANKAR (1985) et SUTHERLAND et COLL (1986) sont incompatibles avec cette idée. Les auteurs ont remarqué que différents types de solutés n'ont pas les mêmes effets sur l'expression de l'opéron kdp.

En effet des solutés non polaires, tels le glucose, entraînent une brève induction de l'opéron alors que des solutés ioniques tels NaCl ou $(NH_4)_2SO_4$ provoquent une induction permanente de kdp même en milieu à forte concentration en K^+ . Selon SUTHERLAND et COLL (1986), cette constatation n'est pas en contradiction avec le modèle du contrôle par la turgescence, et proposent que le NaCl pourrait inhiber le système Trk ou stimulerait l'excrétion de K^+ qui par conséquent diminue la turgescence cellulaire. Cependant, d'après GOWRISHANKAR (1987) l'observation faite par SUTHERLAND et COLL (1986), selon laquelle l'expression de kdp chez des cellules croissant en milieu à faible osmolarité ou en présence de saccharose 0,44M est identique à celle constatée en présence de chlorure de choline 0,3M est incompatible avec l'idée que la turgescence soit le seul signal de régulation de l'expression de kdp.

Ainsi, ces observations soulèvent des questions concernant l'hypothèse selon laquelle la turgescence est le seul régulateur de l'expression de kdp et suggèrent que cet opéron soit au moins en partie régulé par un quelconque facteur lié directement ou indirectement à la disponibilité en K^+ .

Du point de vue énergétique, le système Kdp est associé à une ATPase stimulée par K^+ . A partir d'observations faites *in vivo*, il est supposé que son activité est dépendante de l'ATP et indépendante de la Force Motrice Protonique (FMP). Le système Trk, par contre, requiert de l'ATP et la FMP pour l'accumulation de K^+ (RHOADS et EPSTEIN, 1977 ; EPSTEIN et LAIMINS, 1980), Trk serait couplé à la

FMP mais régulé par l'ATP. STEWART et COLL (1985) suggèrent que l'ATP agirait comme activateur.

4 - Les acides aminés

L'augmentation de la teneur intracellulaire en acides aminés en fonction du stress osmotique a été constatée chez plusieurs espèces bactériennes (BRITTEN et McCLURE, 1962 ; BROWN et STANLEY, 1972 ; TEMPEST et COLL., 1970 ; MAKEMSON et HASTINGS, 1979 ; HUA et COLL., 1982). Bien que les teneurs initiales en acides aminés soient plus élevées chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif, une osmolarité élevée du milieu de croissance entraîne une meilleure et rapide augmentation relative des teneurs en acides aminés chez les bactéries à Gram négatif (TEMPEST et COLL., 1970 ; BROWN et STANLEY, 1972 ; MEASURES, 1975). Ces changements sont dûs à la seule pression osmotique du milieu puisqu'ils peuvent être provoqués par le chlorure de sodium ou le saccharose.

Parmi les acides aminés accumulés, le glutamate, à lui seul, peut constituer plus de 50% du pool total (TEMPEST et COLL., 1970). Les concentrations atteintes sont directement proportionnelles à l'osmolarité du milieu (RICHEY et COLL., 1987). La glutamine est aussi accumulée, mais ne servirait que comme précurseur de la synthèse du glutamate.

L'accumulation de ces 2 acides aminés est observée chez plusieurs espèces bactériennes croissant en milieux dépourvus en acides aminés. Dans ces conditions, leur accumulation est donc due à une augmentation de leur synthèse intracellulaire. L'augmentation rapide du taux de glutamate chez des cellules stressées par l'addition de NaCl au milieu de croissance peut être produite par un changement d'activité de la glutamate déshydrogénase qui catalyse la synthèse du glutamate à partir de NH₃ et d'α-cétoglutarate (TEMPEST et COLL., 1970 ; BROWN et STANLEY, 1972). L'activité de l'enzyme est étroitement liée au pH (activité optimale à pH 8,0, presque inactivée à pH 7,0) : l'addition d'ions Na⁺ au milieu de croissance provoque un rapide efflux de protons et par conséquent, une augmentation du pH intracellulaire. Cette alcalinisation momentanée (CASTLE et COLL., 1986) du cytoplasme active la glutamate déshydrogénase qui à son tour provoque la synthèse du glutamate.

En outre, il a été montré chez *E.coli* que les ions potassium K⁺ (500mM) activent de plus de 10 fois la glutamate déshydrogénase (MEASURES, 1975). Dans des conditions de stress osmotique, l'accumulation des ions K⁺ constitue donc le signal de régulation de la synthèse du glutamate.

Les bactéries peuvent aussi accumuler les acides aminés à partir d'un milieu complexe. Dans ces conditions, la proline, le glutamate et l'acide γ-aminobutyrique sont prépondérants (MEASURES, 1975 ; BROWN et STANLEY, 1972). Si la proline est

connue pour son rôle osmoprotecteur, le glutamate et l'acide γ -aminobutyrique, par contre, n'augmentent pas l'halotolérance de E.coli (STRØM et COLL., 1983).

Le rôle essentiel du glutamate est de contre-balancer les charges positives des ions K^+ inhibiteurs des enzymes (TEMPEST et COLL., 1970). Le glutamate possède, en effet, une charge négative nette à des valeurs neutres de pH. Il est l'anion le plus abondant chez les bactéries. Toutefois, sa concentration chez E.coli constitue seulement la moitié de celle des ions K^+ dans des milieux à forte osmolarité (EPSTEIN et SCHULTZ, 1965 ; RICHEY et COLL., 1987 ; LARSEN et COLL., 1987 ; DINNBIER et COLL., 1988). Par conséquent, d'autres processus osmorégulés sont nécessaires pour éviter la dénaturation des enzymes par les ions K^+ . Parmi ceux-ci, l'extrusion des ions H^+ libérés probablement suite à une ionisation d'ampholytes cytoplasmiques (RICHEY et COLL., 1987) et celle de la putrescine, sous forme de cation divalent (MUNRO et COLL., 1972) constituent deux processus supplémentaires consistant à diminuer la charge positive globale de la cellule bactérienne.

5 - Le Tréhalose

C'est un disaccharide non réducteur, formé de 2 molécules de glucose. Il est trouvé chez certains animaux qui peuvent résister à la dessication où il semble être spécialement efficace dans la protection des membranes biologiques (CROWE et COLL., 1984). Il est l'osmolyte organique dominant chez certaines cyanobactéries (MACKAY et COLL., 1984). Chez E.coli, la teneur en tréhalose augmente avec la concentration en sel du milieu de croissance ; elle est de 0,5 μ mole/mg de protéine en milieu minimum à 0,45 M NaCl (STRØM et COLL., 1986 ; LARSEN et COLL., 1987). Le tréhalose n'est pas accumulé en absence de stress osmotique ou quand les cellules se développent sous stress en présence de glycine bétaine (LARSEN et COLL., 1987), par contre la proline n'affecte pas son taux d'accumulation (ROD et COLL., 1988).

La synthèse du tréhalose se fait à partir de glucose-6-phosphate (G6P) et d'uridine diphosphate glucose (UDPG) en présence de K^+ (STRØM et COLL., 1986 ; GIAVER et COLL., 1988). La réaction catalysée par la tréhalose phosphate synthétase aboutit à la formation de tréhalose-6-phosphate qui sous l'action d'une phosphatase donne du tréhalose.



La tréhalose phosphate synthétase est induite par la pression osmotique du milieu et est fortement stimulée par les ions K^+ et d'autres cations monovalents. L'activité de l'enzyme est due aux gènes ots A et ots B (GIAVER et COLL., 1988). Cependant, il n'est pas encore établi si ces 2 gènes osmotiquement régulés sont des gènes de structure ou de régulation et s'ils forment un opéron.

E.coli peut utiliser le tréhalose comme seule source de carbone sous l'action

d'une tréhalase localisée dans l'espace périplasmique et dont le gène de structure est tre A. Il est intéressant de noter que le stress osmotique augmente par 10 fois l'induction de la tréhalase (BOOS et COLL., 1987). L'accumulation du glucose par E.coli dans des conditions de stress osmotique rapportée par ROLLER et ANAGNOSTOPOULOS (1982) serait en fait due à l'hydrolyse du tréhalose (ROD et COLL., 1988). L'induction de la tréhalose synthétase et de la tréhalase par le stress osmotique semble contradictoire mais peut être qu'il y aurait un fin équilibrage du taux intracellulaire de tréhalose par l'intervention simultanée de l'anabolisme et du catabolisme (CSONKA, 1989).

E.coli en état de stress salin n'accumule pas de tréhalose exogène. Son transport à partir du milieu extérieur est effectué par un système phosphotransférasique dépendant du phosphoénolpyruvate (MARECHAL, 1984).

Enfin, l'accumulation de tréhalose est constatée chez des mutants de E.coli super-producteurs de tyrosine (OGINO et COLL., 1982), ce qui signifie que celle-ci peut répondre à d'autres signaux autres que la pression osmotique du milieu.

6 - Putrescine

La putrescine est une polyamine polycationique présente en quantités importantes chez E.coli croissant en milieu minimum à pH neutre. Elle interviendrait dans la synthèse de l'ADN, de l'ARN et des protéines (TABOR et TABOR, 1985). Son rôle dans l'osmorégulation a été décrit par MUNRO et COLL. (1972). La teneur intracellulaire en putrescine est particulièrement élevée ($0,15 \mu\text{mole/mg}$) chez des cellules de E.coli croissant en milieu à faible osmolarité. Dans ce cas, elle équilibrerait les charges sur les acides nucléiques et maintiendrait l'électroneutralité du cytoplasme en compensant la chute de la concentration en ions K^+ (HIGGINS et COLL., 1987a). En présence de fortes concentrations de NaCl , KCl , MgCl_2 ou de saccharose, E.coli réduit sa teneur intracellulaire en putrescine. Il y a une rapide excrétion de putrescine dans le milieu extérieur. Son excrétion sous forme de putrescine 2^+ constituerait pour la cellule un moyen d'équilibrer sa charge positive interne suite à l'accumulation des ions K^+ .

MUNRO et COLL. (1972) suggèrent que l'excration de la putrescine soit K^+ -dépendante. De plus, elle serait couplée à l'accumulation des ions K^+ c'est-à-dire qu'elle s'effectuerait via un antiport $\text{K}^+/\text{Putrescine}$. Enfin, l'excration de la putrescine est bloquée par l'addition d'azide de sodium ou d'arsénate de sodium.

Le mécanisme par lequel la pression osmotique du milieu contrôle la concentration intracellulaire de la putrescine n'est pas compris, cependant la rapidité du processus fait penser à une modulation de l'expression du gène (INGRAHAM, 1987).

Ainsi, l'accumulation des ions K^+ et de leur contre-ion, le glutamate, d'une

part, et la rapide excrétion de la putrescine²⁺ et de protons d'autre part, concourraient à réduire les changements de la charge positive intracellulaire et donc de la force ionique cytoplasmique.

7 - Les oligosaccharides périplasmiques

Ils représentent une classe de polysaccharides hautement anioniques et sont localisés dans l'espace périplasmique (KENNEDY, 1982 ; KENNEDY, 1987). Chez *E.coli*, ils sont constitués de 6 à 12 unités glucosyl reliées par des liaisons β (1-2) et β (1-6) substituées par des résidus *sn*-1-phosphoglycérol, phosphoéthanolamine, et Ω -succinyl ester. Ils ne peuvent diffuser à travers la membrane externe. De ce fait, leur accumulation dans le périplasme réduit la pression de turgescence à laquelle est soumise la membrane cytoplasmique. De plus, ces molécules à fortes charges négatives augmentent le potentiel électrique à travers la membrane externe (Potentiel de Donnan décrit par STOCK et COLL., 1977) qui crée une pression hydrostatique dans l'espace périplasmique en favorisant une plus forte accumulation de cations dans le périplasme plutôt que dans le milieu de croissance.

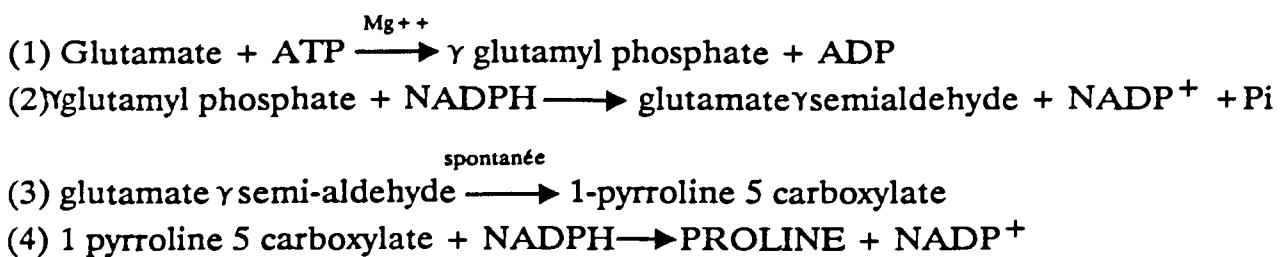
La régulation osmotique des oligosaccharides périplasmiques des bactéries à Gram négatif a été décrit par KENNEDY (1982). Quand *E.coli* croit en milieu à faible osmolarité (30mOsm) il y a synthèse nette d'oligosaccharides. Ceux-ci peuvent représenter jusqu'à 7% du poids sec bactérien et une fraction considérable des anions du périplasme. En milieu à forte osmolarité (600mOsm), leur synthèse est presque complètement abolie. Les enzymes (de 10 à 15) impliquées dans la formation des oligosaccharides périplasmiques sont constitutives et seraient seulement activées aux faibles osmolarités. Leur activité serait régulée par des effecteurs cellulaires dépendants de l'osmolarité du milieu de croissance (KENNEDY, 1987). Des mutations sur les gènes *mdoA* ou *mdoB* bloquent leur synthèse (KENNEDY, 1987 ; FIEDLER et ROTTERING, 1988). Cependant, la croissance des cellules déficientes en ces gènes en milieux à faibles ou fortes osmolarités n'est pas perturbée (KENNEDY, 1987).

Le rôle physiologique des oligosaccharides périplasmiques n'est pas établi expérimentalement. Selon KENNEDY (1982), les cellules de *E.coli* croissant dans un milieu à faible osmolarité augmentent la pression osmotique de leur périplasme, en synthétisant les oligosaccharides, afin de prévenir l'intégrité de la membrane cytoplasmique contre le gonflement. Selon HIGGINS (1987a), en présence d'un milieu à faible osmolarité, les cellules réduisent leur osmolarité en expulsant les ions K^+ afin de maintenir une turgescence optimale. Cependant, même quand la teneur intracellulaire est réduite à un minimum, d'autres constituants cytoplasmiques empêchent l'osmolarité de chuter au-dessous de 300mOsm. Ainsi afin de maintenir un gradient osmotique de part et d'autre de la membrane, les cellules augmentent l'osmolarité de leur périplasme.

8 - La Proline

Le rôle de la proline dans l'osmorégulation des bactéries a été décrit initialement par CHRISTIAN (1955a et b). En présence de faibles activités de l'eau dues à une addition de NaCl au milieu de croissance, la proline exogène restaure la croissance de Salmonella oranienburg. CHRISTIAN et WALTHO (1966) ont montré, en outre, que la proline stimule la respiration de cet organisme soumis à de faibles activités de l'eau. Les mêmes constatations ont été reportées chez E.coli (BRITTEN et Mc CLURE, 1962) et chez des bactéries marines (BROWN et STANLEY, 1972). Enfin, en présence de stress osmotique, divers genres bactériens accumulent d'importantes quantités de proline (MEASURES, 1975). Chez Salmonella typhimurium et d'autres Enterobacteriaceae, la synthèse intracellulaire de proline n'est pas stimulée par le stress osmotique (CSONKA, 1981). Son accumulation s'effectue à partir du milieu extérieur par augmentation de l'activité de transport. Chez E.coli, la teneur intracellulaire de proline est proportionnelle à la force osmotique du milieu (BRITTEN et Mc CLURE, 1962).

La synthèse intracellulaire de proline a été obtenue chez de rares mutants de Salmonella typhimurium (CSONKA, 1981) et Serratia marcescens (SUGIURA et KISUMI, 1985). La synthèse se fait alors à partir de glutamate en 4 étapes (BAICH, 1969 ; GAMPER et MOSES, 1974 ; HAYZER et LEISINGER, 1980, 1981 ; LEISINGER, 1987).



Les étapes (1) (2) et (4) sont catalysées respectivement par la γ -glutamyl kinase, la glutamate γ -semialdehyde deshydrogénase et la pyrroline -5-carboxylate réductase. Les gènes codant pour ces enzymes sont dans l'ordre : proB, proA et proC ; les gènes proB et proA forment un opéron. Chez Salmonella typhimurium et E.coli, de type sauvage, l'activité de la γ -glutamyl kinase est fortement régulée par la proline (inhibition par feed-back). CSONKA (1988) a remarqué que chez S.typhimurium soumis à un stress osmotique (NaCl 0,8M) le taux de proline reste invariable, alors que celui du glutamate augmente de 6,5 fois. Ce qui indique que la γ glutamylkinase est inhibée par la

proline dans des milieux à osmolarité normale ou élevée. Les mutations permettant d'obtenir une production accrue en proline, et donc une augmentation de l'osmotolérance, sont localisées sur proB. La γ -glutamyl kinase devient beaucoup moins sensible à l'inhibition par feed-back (SMITH, 1985).

Le transport de la proline à partir du milieu extérieur est assuré par 3 systèmes (Proline Permeases ou Proline Porteurs : PP) (DUNLAP et CSONKA, 1985a ; JOCELYN et COLL., 1987).

- Le système PPI, produit du gène putP, n'est pas impliqué dans le contrôle osmotique de l'accumulation de la Proline (DUNLAP et CSONKA, 1985b). Il est requis dans le catabolisme de la proline comme source de carbone et d'azote. Cette perméase catalyse le transport actif de la proline par l'intermédiaire d'un symport sodium-proline (CAIRNEY et COLL., 1984). Elle a une haute affinité et spécificité pour la proline ($K_m = 2\mu M$) (WOOD et ZADWORNY, 1979). Elle est induite par la proline et est sujette à la répression catabolique (RATZKIN et COLL., 1978).

- Le système PPII, produit du gène proP (MENZEL et ROTH, 1980) est une perméase dont l'activité augmente pendant le stress osmotique (CSONKA, 1982 ; CAIRNEY et COLL., 1985a ; GROTHE et COLL., 1986 ; GOWRISHANKAR, 1986a ; MILNER et COLL., 1987 ; MILNER et COLL., 1988). Cette perméase est exprimée d'une façon constitutive (CAIRNEY et COLL., 1985a). La transcription du gène est augmentée de 3 à 4 fois par de fortes osmolarités du milieu (CAIRNEY et COLL., 1985a). Elle a cependant une faible affinité pour la proline ($K_m = 300\mu M$) (ANDERSON et COLL., 1980). Très récemment MILNER et WOOD (1989) ont mis en évidence la présence du locus proQ qui pourrait coder pour un élément de régulation positive de proP.

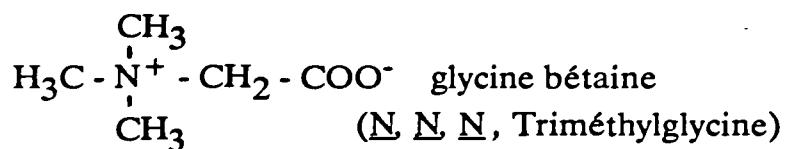
- Le système PPIII, produit du gène proU, ne fonctionne qu'en milieux à fortes osmolarités (CSONKA, 1982). Son activité est augmentée par plus de 100 fois par le stress osmotique, suite à un accroissement de la transcription (CAIRNEY et COLL., 1985b ; DUNLAP et CSONKA, 1985a et b ; GOWRISHANKAR, 1985). Cette perméase possède une faible affinité pour la proline, son rôle dans le transport de la proline est considéré comme négligeable (CAIRNEY et COLL., 1985b).

9 - Les Bétaines

Ce sont des ammoniums quaternaires méthylés dérivés d'acides aminés. Elles ont été isolées à partir de plantes de zones arides où elles se concentrent parfois en grandes quantités. La glycine bétaine, par exemple, est considérée comme le composé cytoplasmique majeur chez certaines familles de plantes adaptées au stress osmotique dû au sel (STOREY et WYN JONES, 1977 ; WYN JONES et COLL., 1981). Les bétaines sont aussi isolées chez les algues marines (HORI et COLL., 1979 ; BLUNDEN

et COLL., 1981), chez des poissons et des invertébrés marins, et dans les urines humaines (CHAMBERS et KUNIN, 1985). A chaque fois leur présence est liée à une meilleure adaptation au sel. Chez les bactéries, SAKAGUCHI (1960) fut le premier à constater le rôle de la glycine bétaine dans la levée de l'inhibition de la croissance de Pediococcus soyae par de fortes osmolarités du milieu. RAFAELI-ESHKOL et AVIDOR (1968) ont remarqué que la glycine bétaine restaurait la respiration de Pseudomonas Ba-1, bactérie modérément halophile, contre le stress osmotique. Elle s'accumule chez Ectothiorhodospira halochloris, bactérie phototrophe extrêmement halophile (GALINSKI et TRÜPER, 1982) et chez les cyanobactéries (MACKAY et COLL., 1984) où elle est impliquée dans les mécanismes osmorégulatoires. L'effet osmoprotecteur de la glycine bétaine chez les Enterobacteriaceae a été relativement le plus étudié. Un apport exogène de glycine bétaine, à une concentration aussi basse que 1mM, stimule le taux de croissance chez E.coli, Salmonella typhimurium et Klebsiella pneumoniae, en milieu à force osmotique inhibitrice (LE RUDULIER et VALENTINE, 1982 ; LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983). La glycine bétaine est aussi effective chez Rhizobium meliloti (BERNARD et COLL., 1986) et chez d'autres bactéries (CSONKA, 1989). Bien que son efficacité comme substance osmoprotectrice ait été observée chez bon nombre de bactéries, essentiellement chez les entérobactéries, la glycine bétaine reste néanmoins sans effet chez certaines autres (CSONKA, 1989).

- Structure de la glycine bétaine (G.B) :

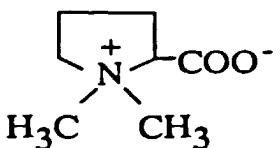


Elle est la plus simple des bétaines. C'est une substance très soluble dans l'eau et hygroscopique. Il est donc possible qu'elle joue un rôle dans l'attraction et la rétention de l'eau dans les cellules (LE RUDULIER et COLL., 1984). Sa nature dipolaire évite l'accumulation d'autres charges pour le maintien de l'électroneutralité de la cellule. D'autre part, le degré de méthylation de l'atome d'azote, la présence du groupement carboxyl, et la distance entre N^+ et COO^- sont déterminants pour l'efficacité osmoprotective des différentes bétaines (LE RUDULIER et COLL., 1984, PERROUD et LE RUDULIER, 1985) dont les plus performantes sont, en général, la glycine bétaine, la proline bétaine, et la γ -butyrobétaine.

- structure d'autres bétaines :



$(CH_3)_3 N^+ - CH_2 - CH_2 - CH_2 - COO^-$ γ butyrobétaine
(triméthylaminobutyrate)



Proline bétaine
(stachydrine ou
N-N-diméthylproline)

Rôle et devenir de la G.B

La G.B est un osmoprotecteur à des concentrations aussi basses que 1m Molaire, elle restaure la pression de turgescence et la croissance cellulaires en s'accumulant en grandes quantités. Dans des conditions de forte osmolarité (NaCl 0,8M), la concentration intracellulaire en G.B peut atteindre 600mM (LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983). Par sa rétention de l'eau intracellulaire et son accumulation massive, elle rétablit l'équilibre osmotique entre la cellule et le milieu extérieur et par conséquent, évite à la cellule la plasmolyse et la déshydratation. La G.B est aussi un soluté compatible, elle s'accumule sans perturber le métabolisme normal et les fonctions enzymatiques de la cellule. De plus, elle stabilise la structure et la fonction des protéines et les protège contre l'effet dénaturant de la force ionique (BROWN, 1976 ; YANCEY et COLL., 1982 ; ARAKAWA et TIMASHEFF, 1985). Ainsi plutôt que de modifier toutes ses protéines, et donc les séquences d'ADN, *E.coli* et d'autres organismes, en accumulant les solutés compatibles, modifient seulement quelques protéines (les enzymes responsables de leur accumulation) qui sont en fait régulées par de minimes changements de salinité (YANCEY et COLL., 1982).

La G.B intracellulaire s'oppose aux effets inhibiteurs de la croissance d'une forte osmolarité du milieu. RAFAELI-ESHKOL et AVI-DOR (1968) ont montré qu'elle stimule la respiration chez *Pseudomonas* Ba-1. LE RUDULIER et COLL. (1984) ont remarqué que la G.B augmente l'activité de la nitrogénase chez *Klebsiella pneumoniae*. En présence de GB, la capacité de *E.coli* à former des colonies en milieu solide salé (NaCl 0,8M) est restaurée (ROTH et COLL., 1988) ; la G.B stimule, non seulement, la production d'ATP via une accélération du transport de glucose, mais aussi, accélère le processus de consommation d'ATP nécessaire à la capacité de former des colonies. En outre, elle peut aussi lever l'inhibition de plusieurs systèmes de transport des glucides (ROTH et COLL., 1985). Enfin, récemment, HIGGINS et COLL. (1988) ont constaté que l'addition de G.B, chez *Salmonella typhimurium* et *E.coli*, restaure le superenroulement de l'ADN.

La G.B intracellulaire ne sert que comme substance osmoprotectrice. Elle est accumulée par les cellules mais n'est pas métabolisée, elle n'est pas utilisée comme source de carbone ou d'azote (PERROUD et LE RUDULIER, 1985 ; LARSEN et

COLL, 1987). Elle ne sert pas à des synthèses cellulaires (LANDFALD et STRØM, 1986). Enfin, il n'y a pas synthèse intracellulaire de G.B, sauf à partir de choline ou de bétainal (LANDFALD et STRØM, 1986). La G.B peut ressortir de la cellule (LE RUDULIER, 1988, communication personnelle). En absence de stress osmotique, le taux de croissance de E.coli n'est pas modifié par un apport exogène de GB. Son transport et son accumulation ne sont déclenchés que par la seule élévation de la pression osmotique du milieu qui peut être due soit à des électrolytes tels NaCl, KCl, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, K₂SO₄ soit à des composés non-électrolytes tels le saccharose, le raffinose ou l'inositol (LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983 ; PERROUD et LE RUDULIER, 1985). Le glycérol qui n'a aucun effet sur la pression osmotique du milieu ne stimule pas le transport de la G.B.

Transport de la G.B

Chez S.thyphimurium et E.coli, le transport de la GB à partir du milieu extérieur vers la cellule bactérienne est assuré par 2 systèmes distincts ProP et ProU qui, malgré leurs noms essentiellement historiques, ont la G.B plutôt que la proline comme substrats (CAIRNEY et COLL., 1985a et b ; MAY et COLL., 1986). Toutefois, LE RUDULIER et BOUILLARD (1983) et DUNLAP et CSONKA (1985b) ont observé une augmentation de l'osmotolérance par la G.B chez des mutants de S.typhimurium ayant perdu les 2 systèmes ProP et ProU. Ces observations suggèrent qu'il existerait une autre perméase impliquée dans le transport de S.typhimurium.

- ProP (codé par le gène proP) (92mn) : il a une affinité relativement faible pour la G.B ($K_m = 44\mu M$) et pouvant aussi transporter la proline ($K_m = 300\mu M$). Quand la cellule se trouve dans un milieu d'osmolarité élevée, la spécificité de ce système de transport est modifiée de telle façon qu'il y a une nette accumulation de la G.B aux dépens de la proline (CAIRNEY et COLL., 1985a). ProP est constitutif (CAIRNEY et COLL., 1985b). Le transport de la G.B via ProP est régulé par la pression osmotique du milieu à 2 niveaux différents : la transcription du gène proP augmente en fonction de l'osmolarité, de plus, l'activité même du transport dépend de la pression osmotique du milieu. Cependant, même complètement induit, ProP est seulement capable de transporter la G.B à une certaine limite (CAIRNEY et COLL., 1985a).

L'induction du gène proP est très rapide et s'effectue en 3 phases (JOVANOVICH et COLL. 1988).

- ProU (codé par le gène proU) (58mn) : il possède une haute affinité pour le transport de la G.B ($K_m = 1,3\mu M$), alors que le transport de la proline via ce système est négligeable (CAIRNEY et COLL., 1985b). Le gène proU est seulement exprimé chez des cellules placées en milieu de forte osmolarité. Dans ces conditions, la

transcription du gène proU est stimulée plus de 100 fois (BARRON et COLL., 1986 ; CAIRNEY et COLL., 1985b). L'induction du gène demeure permanente tant que les cellules sont soumises à de fortes osmolarités (DUNLAP et CSONKA, 1985a ; GOWRISHANKAR, 1985 ; SUTHERLAND et COLL., 1986). Par contre, aux faibles osmolarités, proU n'est pas exprimé. Le transport de la G.B via ProU est régulé au niveau de l'expression du gène et au niveau de l'activité du transport (CAIRNEY et COLL., 1985b). La cinétique de l'induction de proU montre 3 phases dans le processus (JOVANOVICH et COLL., 1988) : une phase de latence, suivie d'une rapide stimulation de la transcription de proU, puis normalisation.

L'induction de proU n'est pas directement contrôlée par les changements de la pression de turgescence. Le niveau final d'expression de proU est principalement déterminé par l'accumulation intracellulaire du potassium. Les ions K⁺ sont donc le signal de l'expression de proU (EPSTEIN, 1986 ; SUTHERLAND et COLL., 1986). ProU ne peut être induit si K⁺ est limitant. Aux faibles osmolarités du milieu, le potassium s'accumule afin de restaurer la pression de turgescence. Quand l'osmolarité externe devient plus importante, l'augmentation parallèle en K⁺ devient potentiellement dénaturante pour les enzymes, ainsi, si la GB est présente dans le milieu, elle est préférée au potassium. De plus, SUTHERLAND et COLL. (1986) ont observé une diminution (de 25%) du taux intracellulaire du potassium en présence de GB ou de proline.

Enfin, des évidences récentes (HIGGINS et COLL., 1988) indiquent que l'augmentation du superenroulement de l'ADN, conséquence de l'accumulation de K⁺, joue un rôle clé dans l'induction de la transcription de proU. L'addition de G.B restaure le superenroulement de l'ADN.

- Structure de ProU

ProU est organisé en opéron. Il était considéré, jusqu'à très récemment, comme contenant les gènes codant pour la synthèse de 4 protéines :

. Une protéine périplasmique de 32 ou 31 kDa impliquée dans la liaison avec la GB a été mise en évidence chez E.coli et Salmonella typhimurium (GBBP : Glycine betaine Binding Protein) (BARRON et COLL., 1986 ; MAY et COLL., 1986 ; HIGGINS et COLL., 1987). FAATZ et COLL. (1988) ont proposé que le gène proV décrit par GOWRISHANKAR (1986b) serait le gène structural de cette protéine.

. Deux protéines de 42 et 33 kDa respectivement qui seraient des composés de la membrane interne (CSONKA, 1989).

. Un polypeptide très faiblement exprimé (FAATZ et COLL., 1988). Cependant, récemment DATTANANDA et GOWRISHANKAR (1989) ont obtenu des données indiquant que proU est un opéron comportant 3 gènes, proV, proW et proX,

codant pour la synthèse de 3 protéines de 44, 35, et 33 kDa respectivement. L'ensemble de ces 3 gènes est nécessaire et suffisant à l'efficacité de proU dans le transport et l'accumulation de la G.B et de la proline. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse de la séquence nucléotidique de proU (GOWRISHANKAR, 1989).

. ProV est une protéine de la membrane interne impliquée dans la liaison avec un nucléotide triphosphate.

. ProW est une protéine membranaire.

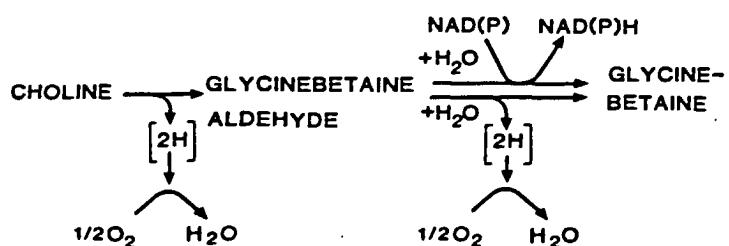
. ProX est la protéine périplasmique impliquée dans la liaison avec la G.B (GBBP).

- Energétique du transport :

Le transport de la G.B et de la proline est un processus actif nécessitant de l'énergie. Dans un premier temps, il a été suggéré que ce transport s'effectue grâce au gradient électrochimique protonique ou force motrice protonique lors de la respiration cellulaire (PERROUD et LE RUDULIER, 1985 ; DUNLAP et CSONKA, 1985). Au contraire, HIGGINS et COLL. (1987b) estiment que c'est l'hydrolyse de l'ATP intracellulaire, et non la FMP, qui est responsable de l'activité de cette protéine périplasmique. BERGER (1973), en étudiant plusieurs systèmes périplasmiques, a démontré que l'ATP intracellulaire est requis pour l'activité de transport. D'autres systèmes périplasmiques ont été étudiés et il est suggéré que probablement tous les systèmes de transport impliquant une protéine périplasmique (Binding-Protein) exigent de l'ATP (ROSEN, 1987). Toutefois, l'énergétique du transport de la G.B reste à moduler et à approfondir (LE RUDULIER, communication personnelle, 1988).

10 - La Choline

Bien que les entérobactéries soient incapables de synthétiser la glycine bétaine à partir de glucose ou d'autres sources de carbone, E.coli K-12 peut convertir la choline en G.B dans des conditions de stress osmotique. La choline est donc une substance osmoprotectrice (STRØM et COLL., 1983 ; LANDFALD et STRØM, 1986 ; STRØM et COLL., 1986 ; STYRVOLD et COLL., 1986). La voie de conversion se fait en 2 étapes et nécessite l'intervention de 2 enzymes (LANDFALD et STRØM, 1986)



- la choline déshydrogénase (enzyme membranaire, O₂-dépendante) qui

catalyse les 2 étapes ($K_m = 1,5\text{mM}$ pour la choline, $K_m = 1,6\text{mM}$ pour la glycine bétaine aldéhyde ou bétinal). Elle est codée par le gène bet A (STYRVOLD et COLL., 1986).

- la glycine bétaine aldéhyde déshydrogénase qui catalyse aussi la seconde étape. Elle est NAD (P) dépendante et possède un K_m de $0,13\text{mM}$ pour la glycine bétaine aldéhyde. Elle est codée par le gène bet B (ESHOO, 1988).

L'accumulation de la choline s'effectue par l'intermédiaire de 2 systèmes de transport : le premier possède un K_m de $8 \mu\text{M}$ et est codé par le gène bet T, le second a un K_m de $1,5\text{mM}$. Le gène de structure du second n'a pas été encore défini. En outre, ESHOO (1988) a décrit l'existence d'un quatrième gène, bet C.

La voie de conversion de la choline en glycine bétaine est osmotiquement régulée. Le stress osmotique augmente de 7 à 10 fois la transcription des gènes bet A, bet B et bet T. L'addition de la choline à des milieux de forte osmolarité augmente encore 3 fois plus l'expression de ces gènes. La transcription maximale est obtenue en présence d'oxygène (ESHOO, 1988).

Seule la choline est capable d'induire les gènes bet. Leur expression n'est pas induite par le bétinal, la proline ou la glycine bétaine. En outre, l'induction par la choline est spécifiquement réprimée par la glycine bétaine, alors que le bétinal et la proline n'ont aucun effet.

L'expression des gènes betA betB et betT est réduite de 7 à 10 fois en anaérobiose. Celle des gènes betB et betT est réduite chez E.coli croissant en milieu à forte osmolarité à 16°C . Ainsi l'expression des gènes bet paraît être sous le contrôle de plusieurs stimuli extérieurs (ESHOO, 1988).

Les 3 composés de la voie de conversion de la choline ajoutés séparément au milieu de croissance à forte osmolarité sont osmoprotecteurs. En anaérobiose, la choline n'a aucun effet alors que le bétinal et la glycine bétaine restent efficaces. E.coli n'utilise aucun métabolite de cette voie comme substrat pour la synthèse d'autres composés (LANDFALD et STRØM, 1986). Il n'y a pas d'accumulation de la choline chez E.coli, elle est automatiquement convertie en glycine bétaine.

Il est intéressant de noter que les gènes bet sont localisés près de l'opéron lac et, par conséquent, certaines souches de E.coli de laboratoire en sont dépourvues (HIGGINS et COLL., 1987a). Ils sont absents chez Salmonella (STRØM et COLL., 1986).

Aspects de la bactéries

11 - Les porines

Les porines sont une catégorie de protéines de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles constituent des canaux hydrophiles ou pores à travers la membrane qui permettent aux substances de faible poids moléculaire de pénétrer par

diffusion passive dans la cellule (NAKAE, 1976 ; HANCOCK, 1987 ; NIKAIDO et VAARA, 1987). Chez *E.coli* et *Salmonella typhimurium*, on distingue deux porines essentielles OmpF et OmpC dont la production est régulée par l'osmolarité et la composition du milieu, la température de croissance (LUGTENBERG et COLL., 1976 ; VAN ALPHEN et LUGTENBERG, 1977) et le pH (HEYDE et PORTALIER, 1987).

Les quantités des protéines OmpF et OmpC sont généralement constantes, mais leurs proportions relatives varient selon les conditions de croissance. Un milieu à osmolarité élevée ou riche en source de carbone et une température élevée entraînent une réduction de OmpF et une augmentation concomitante de OmpC (LUGTENBERG et COLL., 1976). Quand le milieu externe contient du saccharose 0,5M, OmpC est 15 fois plus abondante que OmpF (KAWAJI et COLL., 1979).

La synthèse des porines OmpC et OmpF est régulée au niveau de la transcription par l'intermédiaire des gènes *ompR* et *envZ* qui forment l'opéron *ompB*. OmpR est l'activateur de la transcription des 2 gènes de structure des porines (*ompF* et *ompC*), alors que EnvZ, situé au niveau de la membrane cytoplasmique, serait le signal qui modifie l'activité de OmpR, activant *ompF* à faible osmolarité ou *ompC* à osmolarité élevée (HALL et SILHavy, 1979 ; HALL et SILHavy, 1981).

Les canaux formés par OmpF (1,2nm de diamètre) sont plus larges que ceux formés par OmpC (1,1nm) (HANCOCK, 1987 ; NIKAIDO et VAARA, 1985). NIKAIDO et VAARA (1987) pensent que OmpC est synthétisée lorsque les bactéries entériques sont présentes dans le tractus intestinal de leurs hôtes où les nutriments existent à fortes concentrations. OmpF est synthétisée lorsque celles-ci se trouvent dans l'environnement extérieur où la température et la salinité sont faibles et où les nutriments sont plus dilués. Ainsi, les larges canaux créés par OmpF constituent un avantage physiologique certain pour les bactéries entériques vivants dans l'environnement. La diffusion des substrats est meilleure. Par contre, au niveau du tractus intestinal les pores de faible dimension créés par OmpC permettent aux bactéries d'exclure les composés inhibiteurs rencontrés dans les intestins.

12 - Autres mécanismes impliqués dans l'osmorégulation

D'autres gènes dont l'expression est sous contrôle osmotique ont été décrits. La synthèse de la phosphatase alcaline, normalement induite en milieu carencé en phosphate, est aussi affectée par des changements de l'osmolarité du milieu. En effet, l'expression du gène structural *phoA* augmente avec l'osmolarité externe (VILLAJERO et COLL., 1983 ; VILLAJERO et CASE, 1984). De même, l'expression du régulon *mal*, responsable du transport et du métabolisme du maltose et des maltodextrines, est réduite par une osmolarité élevée du milieu en absence d'un inducteur exogène (GOWRISHANKAR, 1985 ; BUKAU et COLL., 1986).

Quoi qu'il en soit, seul un nombre restreint de gènes est requis pour l'adaptation osmotique (HIGGINS et COLL., 1987a). Leurs activités sont intensément régulées soit au niveau de la transcription soit par modulation de l'activité des protéines pour lesquelles ils codent. Le résultat est la mise en place d'une réponse intégrée permettant aux cellules de croître dans des limites assez larges d'osmolarités du milieu extérieur. Cette réponse s'obtient, chez E.coli et S.typhimurium, par l'accumulation d'osmolytes, chez qui, apparemment, existe une hiérarchie (GIAVER et COLL., 1988). Le potassium et l'acide glutamique (son contre-ion) ne peuvent apporter une protection que contre de faibles niveaux de stress osmotique. Le tréhalose permet ensuite de résister à des osmolarités moyennes. Enfin, un apport exogène de glycine bétaine ou de ses précurseurs ou d'autres osmoprotecteurs tels la proline, la proline bétaine et la γ -butyrobétaine, est nécessaire à des niveaux élevés de stress.

Selon HIGGINS et COLL. (1987a), les 2 gènes considérés comme étant vraiment osmorégulés au niveau de la transcription sont les gènes kdp et proU. Leur transcription est réprimée en absence de stress osmotique et est induite par des osmolarités croissantes du milieu extérieur avec un taux d'induction au moins égal à 100.

En outre, il semble évident qu'il n'existe pas de protéine de régulation assurant la réponse osmotique puisque les gènes kdp et proU sont régulés par deux signaux différents.

La plupart des réponses au stress osmotique sont secondaires et sont la conséquence de l'accumulation des ions K^+ laquelle est provoquée par une diminution de la pression de turgescence de la cellule. D'autre part, il est évident que l'effet de régulation des ions K^+ intracellulaires est dû à l'augmentation de la force ionique qu'ils créent plutôt qu'aux ions eux-mêmes (EPSTEIN, 1986). Puisqu'ils accroissent la force ionique cytoplasmique, ils deviennent dénaturants pour les protéines et ne peuvent s'accumuler au-delà de certaines limites. Ensuite la glycine bétaine, si elle est présente dans le milieu, est accumulée justement pour protéger les protéines contre la dénaturation ionique. Ainsi, selon HIGGINS et COLL. (1987a) la force ionique peut être considérée comme un signal intracellulaire global agissant comme un "second messager" et qui régulerait l'expression génétique.

Il a été montré (HIGGINS et COLL., 1988) qu'une augmentation de la teneur des ions K^+ intracellulaires influencent directement les interactions entre l'ARN-polymérase et le promoteur de proU et que des changements du super-enroulement de l'ADN induits osmotiquement jouent un rôle important dans la transcription de proU.

CONCLUSION

L'adaptation des organismes aux fluctuations de l'osmolarité de leur environnement est fondamentale pour leur survie. L'étude de la capacité de résister au stress osmotique n'est pas seulement d'un intérêt biologique général mais d'une importance considérable tant sur le plan économique que sur celui de la santé publique. Les industries de fermentation, la préservation des aliments et le développement de cultures agricoles dans les zones semi-arides sont autant d'exemples où l'intérêt économique est certain. Sur le plan sanitaire et médical, des modifications de sensibilité des bactéries aux antibiotiques ou la prolifération de bactéries halotolérantes pathogènes en un lieu donné constituent un danger certain pour l'hygiène publique.

Le milieu marin, dominé par sa caractéristique essentielle à savoir la salinité, est un milieu vivant où les organismes rencontrés sont adaptés au stress osmotique et il est généralement exempt de bactéries fécales pathogènes. Néanmoins le littoral marin est de plus en plus pollué par le déversement d'eaux usées véhiculant des déchets de toute nature. Ces eaux contiennent, entre autres polluants, des bactéries d'origine fécale et pathogènes pour l'homme. Divers travaux ont montré la survie de telles bactéries dans le littoral marin essentiellement dans ses parties riches en matière organique. Cette haloadaptation implique de la part des bactéries la mise en oeuvre de mécanismes physiologiques, biochimiques et génétiques.

Le milieu marin est généralement utilisé à des fins de consommation nutritive (poissons et coquillages) ou à des fins récréatives ou sportives ou encore à des fins thérapeutiques. La présence de bactéries pathogènes présente donc une double incidence, sanitaire et économique .

D - LES SOURCES D'ENERGIE

INTRODUCTION

La voie par laquelle l'énergie est captée pour une utilisation biologique fonctionne selon un processus connu sous le nom de **Chimiosmose**. Elle démarre avec des électrons à haute énergie extraits d'aliments riches en énergie, les électrons circulent le long d'une chaîne de protéines, la chaîne de transport d'électrons ou chaîne respiratoire, localisée dans la membrane cytoplasmique bactérienne. L'énergie libérée par les électrons dans leur descente de la chaîne est utilisée pour pomper les protons d'un côté de la membrane vers l'autre. Il en résulte un gradient électrochimique de protons à travers la membrane et l'énergie mise en réserve dans ce gradient peut alors être captée par d'autres protéines de la membrane. Cette énergie est utilisée pour la conversion chimique de l'ADP et Pi en ATP.

Dans les bactéries, le gradient électrochimique est une réserve d'énergie directement utilisable aussi importante que l'ATP qu'il génère. Par exemple, ce gradient

assure non seulement de nombreux mécanismes de transport, mais permet également à une bactérie de se mouvoir. Ce gradient peut être dissipé par des agents découplants empêchant le transport de nombreuses substances et donc l'inhibition de la bactérie.

I - LA FORCE MOTRICE PROTONIQUE

Selon l'hypothèse chimiosmotique (MITCHELL, 1961), il y a une association entre les processus chimiques et les processus de transport. Alors que les électrons à haute énergie, issus des ions hydrogène du NADH et FADH₂, sont transférés le long de la chaîne respiratoire, l'énergie libérée au cours de leur passage d'un transporteur au suivant est utilisée pour pomper les protons de la surface interne à la surface externe de la membrane cytoplasmique. Ceci crée un gradient électrochimique de protons à travers la membrane et le reflux des protons est utilisé pour activer une enzyme membranaire, l'ATP synthétase (FoF1 ATPase ou encore ATPase de translocation d'H⁺) qui catalyse la conversion ADP + Pi en ATP et complète le processus de phosphorylation oxydative.

Le mouvement des protons a 2 conséquences :

. Il crée un gradient de pH (ΔpH) à travers la membrane cytoplasmique avec une concentration d'H⁺ plus faible dans celle-ci que dans le reste de la cellule.

. Il crée un gradient de potentiel électrique ou potentiel de membrane ($\Delta\psi$) à travers la membrane cytoplasmique : la surface intérieure devient négative et la surface extérieure positive.

La résultante de ces 2 forces constitue un gradient électrochimique de protons. Celui-ci exerce une force motrice protonique (FMP)

$$\text{FMP} = \Delta\psi - 60 (\Delta\text{pH}) \quad (\text{MITCHELL, 1976})$$

L'ATP synthétase est un gros complexe protéique à travers lequel les protons refluent vers la surface interne de la membrane cytoplasmique et qui permet la synthèse de l'ATP. Elle convertit donc un flux de protons en énergie de liaison phosphate. Chez *E.coli*, l'ATP synthétase est réversible et peut fonctionner dans le sens inverse pour hydrolyser l'ATP fourni par la glycolyse et expulser les protons dans des conditions anaérobies (MITCHELL, 1970). Le fait que toutes les bactéries, y compris celles à fermentation stricte, maintiennent une FMP à travers leur membrane cytoplasmique, reflète le rôle essentiel du gradient électrochimique de protons dans le transport de substances à travers cette membrane contre leurs gradients de concentration (ALBERTS et COLL., 1986).

La FMP constitue donc le couplage entre le transport d'électrons et la formation d'ATP. Elle est non seulement utilisée pour la production d'ATP mais aussi

dans les phénomènes de transport de substances.

II - TRANSPORT DES SUBSTANCES

Hormis quelques molécules qui diffusent librement à travers la membrane cytoplasmique, l'entrée de la plupart des molécules dans la cellule bactérienne nécessite l'intervention de protéines membranaires ou perméases. Certaines protéines assurent simplement la diffusion d'un substrat à travers la membrane. Ce processus appelé diffusion facilitée est rare chez les procaryotes. Chez E.coli et S.typhimurium, le seul exemple connu de diffusion facilitée est représenté par le passage du glycérol dans la cellule. Celui-ci s'accumule selon son gradient de concentration, et sa diffusion ne dépend pas de l'énergie (HELLER et COLL., 1980).

La plupart des molécules, cependant, pénètrent dans la cellule par l'intermédiaire de systèmes de transport nécessitant de l'énergie. Trois mécanismes de transport actif existent chez E.coli et S.typhimurium (CRONAN et COLL., 1987).

1) Le gradient électrochimique

Le transport de plusieurs substances telles certains acides aminés (glycine, lysine), acides organiques (lactate, pyruvate), glucides (lactose, galactose) est effectué par des protéines membranaires simples (ROSEN, 1987) grâce à ce gradient (MALONEY, 1987 ; CRONAN et COLL., 1987). Le mouvement des substrats est dépendant du couplage avec les ions H^+ principalement ou avec les ions Na^+ . Si le mouvement d'un substrat donné et l'ion de couplage s'effectue dans la même direction, le transport est un symport. Dans le cas contraire, on parle d'uniport. Chez les procaryotes, le symport couplé aux ions H^+ prédomine, et ceux-ci semblent avoir un rôle central dans les phénomènes de transport (MALONEY, 1987). Les ions Na^+ jouent aussi un rôle important dans le transport des substances (DIMROTH, 1987). En outre, la FMP peut être convertie en force motrice sodique par une réaction catalysée par un antiport Na^+ / H^+ . Le gradient Na^+ peut alors être couplé à un quelconque système de transport (WEST et MITCHELL, 1974 ; ROSEN, 1987 ; MALONEY, 1987).

Selon CRONAN et COLL. (1987), 40% des substrats transportés par E.coli pénètrent dans la cellule par couplage aux ions H^+ (ou Na^+). L'énergie nécessaire est fournie par la FMP.

2) Les Protéines périplasmiques de liaison (Desmoprotéines) (Binding Proteins)

Ce sont des protéines à structure complexe. Elles possèdent des liaisons

spécifiques pour le soluté transporté et permettent son accumulation dans le cytoplasme. Il a été montré que plusieurs transports périplasmiques dépendent directement de l'ATP (ou d'autres nucléotides phosphate), et non de la FMP (BERGER, 1973 ; HIGGINS et COLL., 1985 ; HIGGINS et COLL., 1987b ; ROSEN, 1987). Ceci serait vrai pour tous les systèmes périplasmiques de transport (ROSEN, 1987). Plusieurs substances (maltose, ribose, leucine, glycine bétaine) sont accumulées grâce à ces protéines. Ces systèmes de transport sont complexes comparés à ceux liés à la FMP (ROSEN, 1987). Ils assurent, chez *E.coli*, le transport de 40% des substrats (CRONAN et COLL., 1987).

3) La translocation de groupe

Contrairement aux deux précédents systèmes où le transport n'affecte en rien la structure du substrat, dans la translocation de groupe il y a modification chimique du substrat. Ceci est observé lors du transport de certains sucres tels le glucose ou le fructose par l'adjonction d'un phosphate ou de certains acides gras par l'adjonction du coenzyme A (CRONAN et COLL., 1987). Les substrats modifiés sont ainsi piégés et ne peuvent s'échapper par le même canal. Le système le mieux étudié est celui de la phosphotransférase dépendant du phospho-énol-pyruvate (PEP) impliqué dans le transport des sucres. Les translocases sont des systèmes à plusieurs protéines membranaires.

III - LES AGENTS DECOUPLANTS

Ce sont des acides faibles lipophiles, à faible poids moléculaire. Leur addition au milieu de croissance arrête la synthèse de l'ATP produit par l'ATPsynthétase sans bloquer la consommation d'oxygène (celle-ci est même stimulée) (LEHNINGER, 1972 ; ALBERTS et COLL., 1986). En effet, en présence d'un agent découplant, le flux des électrons continue mais aucun gradient d' H^+ n'est formé. Ces agents agissent comme des transporteurs d' H^+ ou protonophores (ionophores) et fournissent une voie qui se substitue à l'ATP synthétase pour le flux des ions H^+ à travers la membrane cytoplasmique. Le résultat de ce "court-circuit" est que la force motrice protonique est complètement annulée et que l'ATP ne peut plus être synthétisé (MITCHELL, 1976 ; HANSTEIN, 1976).

Divers inhibiteurs ayant pour cible l'ATPase, la chaîne respiratoire ou la cytochrome oxydase (ex : le dicyclohexylcarbodiimide, le KCN ou l'azide de sodium) et certains ionophores (ex : la valinomycine qui se lie aux ions K^+) sont généralement utilisés pour la connaissance des modes énergétiques impliqués dans tel ou tel mécanisme de transport. Les découplants de la phosphorylation oxydative tels le

dinitrophénol (DNP), le carbonyl cyanide-p-trifluorométhoxy-phénylhydrazone (FCCP) ou le carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP) sont utilisés dans la dissipation de la FMP. L'abolition du transport d'un composé donné par le CCCP, par exemple, suppose donc son couplage à la FMP. Vu l'importance de celle-ci dans le transport des substances, sa dissipation entraîne par conséquent l'inhibition de la croissance de la bactérie exposée.

L'effet inhibiteur du CCCP a été testé sur plusieurs espèces bactériennes. Les études ont été menées sur des bactéries halophiles telles Vibrio alginolyticus (TOKUDA et UNEMOTO, 1982 ; TOKUDA et UNEMOTO, 1983), V.parahaemolyticus (TSUCHIYA et SHINODA, 1985), modérément halophiles telles V.costicola (HAMAIDE et COLL., 1983), sur des bactéries halotolérantes telles E.coli (ITO et COLL., 1983 ; KINOSHITA et COLL., 1984) et Klebsiella sp (DIMROTH, 1987), d'autres bactéries telles Streptococcus faecalis (HEEFNER et HAROLD, 1982 ; KINOSHITA et COLL., 1984) et Bacillus subtilis (GUZZANTI et COLL., 1987) et enfin sur des bactéries anaérobies du rumen (DAWSON et BOLING, 1987).

Le comportement vis-à-vis du CCCP est assez diversifié, chaque type de bactéries répond différemment à des concentrations de CCCP et ce, en rapport avec le pH du milieu de croissance et la nature du milieu, minimum ou complexe (TOKUDA et UNEMOTO, 1983 ; KINOSHITA et COLL., 1984 ; HAMAIDE et COLL., 1985).

Le sodium n'est pas exigé par les bactéries halotolérantes qui peuvent cependant croître à une certaine concentration de sel entre 30 et 40g/l en milieu minimum, par contre, le sodium est essentiel pour la croissance des bactéries marines et halophiles qui vivent dans des environnements riches en Na^+ . Le mouvement des ions Na^+ à travers la membrane de ces bactéries est indispensable aux différentes fonctions physiologiques de la cellule.

Nous avons donc étudié l'effet inhibiteur du CCCP afin de discerner entre bactéries halotolérantes et halophiles. Cette étude a été menée sur des populations bactériennes, en milieu minimum, additionné ou non d'osmoprotecteurs, et en milieu riche en présence de concentrations salines variant de 0 à 70g/l NaCl (0 à 1,2M).

I - ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DE L'HALOTOLERANCE

1 - Site de prélèvement

Les souches de Escherichia coli faisant l'objet de cette étude ont été isolées d'eau de mer prélevée en rade de Brest. La zone de prélèvement reçoit essentiellement les eaux de 4 rejets dont les débits sont jugés importants (IFREMER : Etude de l'acceptabilité du milieu. Rade de Brest. 1981).

- La station d'épuration de la zone industrielle et portuaire, de type "boues activées", est responsable de l'apport le plus considérable mesuré dans la rade (70 à 96% des pollutions bactériennes).

- L'Elorn : c'est une rivière qui joue un rôle significatif dans la qualité des eaux de la rade de Brest car elle draîne une région où les activités urbaines, agricoles et agro-alimentaires sont prépondérantes. Les flores bactériennes de cette rivière sont d'origine humaine et animale.

- L'émissaire des eaux usées urbaines pluviales et de la zone industrielle. Son flux de pollution n'est pas négligeable.

- Les ruisseaux du Vallon et du Costour, aux débits irréguliers et auxquels viennent s'ajouter les eaux brutes issues du poste de relevage de la station d'épuration.

La salinité moyenne de l'eau est de 33‰. Elle est déterminée à l'aide d'un salinomètre Beckman type RS7C par les soins de l'IFREMER. L'eau est prélevée en différents points dans des flacons stériles et transportée maintenue à 4°C. Les opérations de filtration sur membrane Millipore (diamètre des pores : 0,22µm), et d'isolement sur milieux spécifiques sont réalisées aussitôt (6 heures). Les souches isolées sont identifiées et conservées par lyophilisation.

2 - Souches bactériennes :

Les souches sélectionnées à partir d'eau de mer appartiennent à 3 familles bactériennes. Ce sont des Enterobacteriaceae dont les intérêts sanitaires sont certains, des Vibrionaceae parmi lesquelles nous avons choisi des espèces halophiles, et des Pseudomonadaceae, germes du milieu naturel (sol, eau, air) au pouvoir d'adaptation étendu. De plus, des souches de Acinetobacter spp (famille des Neisseriaceae), bactéries du milieu extérieur, ont complété l'étude de l'halotolérance de bactéries isolées de l'environnement marin. Parallèlement, d'autres Enterobacteriaceae furent retenues puisque provenant d'autres origines : souches de E.coli isolées de la rivière de l'Elorn et de produits pathologiques hospitaliers, souches de Salmonella spp isolées de la rivière de Morlaix. Elles permettront l'étude de la relation pouvant exister entre l'habitat naturel d'une bactérie et son pouvoir d'adaptation au sel.

Le nombre de souches soumises à l'étude est à chaque fois le plus large possible.

2-1 - Escherichia coli:

. Souches d'origine marine (nombre : 50)

Leur isolement est obtenu par culture directe sur gélose lactosée de Drigalski (Institut Pasteur Production) incubée à 37°C pendant 24h (souches "D" pour milieu doux) et à 42°C pendant 24h (souches "C" pour milieu chaud) ou sur gélose de Drigalski préparée à l'eau de mer filtrée, incubée à 25°C pendant 24h (souches "S" pour milieu salé). L'identification est confirmée par la coloration de Gram, l'absence d'oxydase et par l'utilisation du système API 20E (API system-Montalieu Vercieu - France) d'identification biochimique.

. Souches d'origine hospitalière (nombre : 50)

Elles sont isolées à partir de produits pathologiques de malades hospitalisés au CHR de Rennes. Elles sont considérées comme n'ayant vraisemblablement pas été au contact de l'eau de mer. Elles sont indiquées par leur numéro de prélèvement.

. Souches de l'Elorn (nombre : 29)

Elles proviennent de prélèvements d'eaux saumâtres (salinité = 20-25°/∞) effectués en plusieurs points de l'estuaire de l'Elorn.

2-2 - Klebsiella spp (nombre : 46 dont K.oxytoca : 25, K.pneumoniae : 21)

Prélevées en rade de Brest, les souches ont été isolées et identifiées selon le protocole décrit pour E.coli.

2-3 - Salmonella spp (nombre : 20)

Elles proviennent de prélèvements d'eaux saumâtres (salinité = 20-25°/∞) effectués en plusieurs points de l'estuaire de Morlaix. Après filtration et pré-enrichissement en eau peptonée (AES-Combourg-France) et enrichissement en bouillon de Rappaport (AES) à 43°C, les bactéries sont repiquées sur gélose Hektoen (AES). Les bactéries lactose-négatives sont vérifiées pour leur absence d'oxydase et d'uréase. Elles sont finalement identifiées par galerie API 20E.

2-4 - Pseudomonas spp (nombre : 36 dont P.aeruginosa : 16, P.putida : 20)

Les bactéries lactose-négatives sont isolées sur gélose de Drigalski. Après vérification du mode respiratoire (aérobies-strictes) en gélose Viande-Foie 6°/∞ (AES) et la présence d'oxydase, elles sont finalement identifiées sur milieu de King A et B (bioMérieux) et galerie API 20NE.

2-5 - Acinetobacter spp (nombre : 23)

Après culture sur gélose de Drigalski, on vérifie le mode respiratoire (aérobies-strictes), l'absence d'oxydase et la non-réduction des nitrates. Les souches sont finalement identifiées sur galerie API 20E.

2-6 - Vibrio spp (nombre : 24 dont V.alginolyticus : 16, V.parahaemolyticus : 8)

Hormis 3 souches de collection de V.parahaemolyticus (R16, 7330 et 51-79), les autres souches sont d'origine marine et ont déjà fait l'objet d'une étude spécifique (DUPRAY E., Thèse de doctorat, Université de Rennes I, 1986).

3 - Mise en évidence de l'halotolérance

3-1 - Les milieux de culture

La croissance de E.coli et les autres espèces bactériennes précédemment décrites, en présence de chlorure de sodium* (sel), est étudiée en utilisant trois milieux de culture:

- Le milieu minéral minimum : M63 (Cohen et Rickenberg, 1956)

. KH ₂ PO ₄	100mM	13,6g
. KOH	75mM	4,2g
. (NH ₄) ₂ SO ₄	15mM	1,982g
. MgSO ₄ .7H ₂ O	1mM	0,246g
. FeSO ₄	3,9 μ M	1,08mg
. Eau distillée qsp 1000ml.		

Il est additionné de glucose (10mM), source de carbone et d'énergie. Le pH est ajusté à 7,2 à l'aide de KOH et stérilisé à 110°C pendant 30min.

- Le milieu M63 additionné de glycine bétaine (G.B) 1mM (M63+G.B) molécule connue pour son rôle dans la restauration de la croissance bactérienne en milieux d'osmolarités élevées. Pour ceci, une solution mère de G.B (100mM) (Sigma Chemical Co) est stérilisée par passage sur membrane Millipore (porosité = 0,22 μ m) et ajoutée au milieu M63 à une concentration finale de 1mM.

- Le Bouillon Trypticase-Soja (AES, Combourg, France). Milieu complexe et hautement nutritif, il permet une croissance abondante de la plupart des bactéries hétérotrophes aérobies ou anaérobies. Il est stérilisé à 120°C pendant 20min.

(*) : Les concentrations suivantes en chlorure de sodium (NaCl/Normapur, Prolabo) sont fixées pour chaque milieu (0,5-0,68-0,85-1,02 et 1,20M) . Un témoin sans sel est évidemment réalisé (Remarque : le Bouillon Trypticase-Soja (BTS) contient initialement du NaCl 0,085M dont on tient compte). Les milieux M63, M63 + G.B1mM et BTS constitueront pour nous les milieux conventionnels lorsqu'il s'agira d'évaluer en aérobiose l'halotolérance d'une bactérie.

3-2 - Les cultures bactériennes

Cinq ml d'un bouillon trypticase-soja sont ensemencés à partir d'une culture bactérienne fraîche et incubés à 37°C ou à 30°C (Pseudomonas putida et Acinetobacter spp), en aérobiose, pendant 18h (fin de phase exponentielle de croissance). La suspension bactérienne est alors centrifugée à 3000 x g et le culot est lavé à 3 reprises par 5ml d'eau physiologique (NaCl : 9g/l) puis repris finalement par 10ml (si la croissance constatée est faible, le volume utilisé est de 5ml).

La suspension bactérienne lavée servira à inoculer les milieux de culture répartis en plaques de microtitration.

3-3 - Etude de la croissance bactérienne en présence de sel

Les milieux de culture (M63 , M63+G.B1mM , BTS) de différentes teneurs en sel sont répartis dans les puits à fond rond des plaques de microtitration stériles (ou microplaques) en polystyrène, sous un volume de 200 μ l.

Les milieux sont ensuite inoculés par 5 μ l de la suspension bactérienne homogénéisée et incubés à 37°C ou à 30°C (Pseudomonas putida et Acinetobacter spp) pendant 24h. La croissance bactérienne dans les différents puits est déterminée par appréciation visuelle du trouble. La concentration saline maximale ayant permis la croissance bactérienne est notée à chaque fois dans les différents milieux.

3-4 - Osmoprotection par le diméthylsulfoniopropionate

Il existe parallèlement aux ammoniums quaternaires d'autres molécules connues pour leur rôle dans l'osmoprotection : les sulfonioms tertiaires. Parmi ces molécules, le diméthylsulfoniopropionate (DMSP) est le plus fréquemment rencontré dans la nature. Aussi, nous avons testé son efficacité dans l'halotolérance de souches de E.coli isolées du milieu marin. Le DMSP a été synthétisé au laboratoire de chimie organique (Professeur A. Sauleau) selon la technique décrite par CHAMBERS et COLL (1987) (Annexe n°18).

Seize souches de E.coli sont incubées en présence de M63, M63+G.B1mM, BTS, et M63+DMSP(1mM),à différentes concentrations de sel. Le DMSP est rajouté au M63 à partir d'une solution-mère (100mM) stérilisée par passage sur membrane Millipore (porosité : 0,22 μ m).

3-5 - Effets de la température et de la durée d'incubation

Ce sont des paramètres qui seraient impliqués dans la survie des bactéries allochtones dans le milieu marin. Pour répondre à la question, il a été procédé à la comparaison de la croissance de 24 souches de E.coli en milieux salés (M63, M63+G.B1mM, BTS) en faisant varier la température et la durée d'incubation.

- à 37°C (température optimale de croissance de E.coli pendant 24 et 48h)
- à 15°C (température annuelle moyenne de l'eau de mer littorale) pendant 5 et 15 jours. Dans ces cas, les microplaques sont mises à incuber dans des bacs étanches afin d'éviter l'évaporation.

II - DETERMINATION DU POTASSIUM INTRACELLULAIRE

L'accumulation des ions potassium (K^+) dans le cytoplasme constitue la première réaction de E.coli au stress osmotique pour le rétablissement de sa pression de turgescence. Il était donc utile de mesurer la teneur intracellulaire en K^+ et de connaître les fluctuations de celle-ci en fonction de la salinité et de la présence de la G.B. et/ou du carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP).

1 - Les cultures bactériennes

Les souches de E.coli (6S, 54C, 82C, 1157D, 1412C, 1422C) sont cultivées dans du M63 (50ml ou 100ml selon la densité de la culture obtenue) en absence ou en présence de stress osmotique (NaCl 0,5 et 0,68M). La G.B et/ou le CCCP sont ajoutés à chaque fois à des concentrations finales respectives de 1mM et 20 μ M. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h. Elles sont ensuite soit immédiatement traitées soit gardées à 4°C.

2 - Dosage

La méthode utilisée est celle décrite par MEURY et COLL (1985). Les cellules sont récupérées par filtration sur membrane Nuclepore de porosité 0,4 μ m - un aliquote de la culture sera réservé pour la détermination du poids sec bactérien. Elles sont ensuite lavées par des solutions salines (NaCl-Normapur Prolabo, impuretés en K^+ = 50ppm) d'osmolarités supérieures de 200mOsm à celles du milieu de croissance afin d'éviter la fuite des K^+ intracellulaires. Les membranes sont placées dans des tubes à essais en verre, très propres, et contenant 5ml d'acide nitrique 0,1M. Après 5 minutes, le potassium est dosé par photométrie à flamme (Appareil type 543 - Instrumentation Laboratory), auparavant étalonné à l'aide de solutions standard. Un témoin est constitué d'acide nitrique dans lequel est placée une membrane.

III - DETERMINATION DES ACIDES AMINES ENDOGENES

Les acides aminés jouent un rôle fondamental dans les phénomènes d'osmotolérance. En outre, la proline augmente la résistance au sel de *E.coli* lorsqu'elle est fournie dans le milieu de croissance.

Quelle est l'évolution générale de ces acides aminés intracellulaires en rapport avec un stress osmotique grandissant, en absence ou en présence d'osmoprotecteur ? Quels sont les plus impliqués dans cette évolution et donc dans les processus de l'halotolérance ? Afin de mieux comprendre cet aspect de la stratégie mise en oeuvre par la bactérie face au stress osmotique, nous avons utilisé un milieu minéral dont la composition est rigoureusement connue et un milieu complexe, source d'acides aminés et riche en substances nutritives.

1 - Culture en milieu minimum

Nous avons étudié 3 souches de *E.coli* (54C, 1157D, 1412C) choisies en fonction de leur capacité d'halotolérance. Les souches sont cultivées dans 300ml de M63 contenant soit :

- . NaCl : 0 (témoin)
- . NaCl : 0,5M
- . NaCl : 0,5M + G.B1mM
- . NaCl : 0,68M
- . NaCl : 0,68M + G.B1mM

puis incubées à 37°C pendant 24h. Les cultures sont aliquotées (300/2) et immédiatement centrifugées à 3000xg, à 4°C. Les culots bactériens obtenus serviront d'une part à l'extraction hydro-alcoolique, d'autre part à la détermination du poids sec (Annexe 21).

L'extrait sec est dissous dans une solution tampon de citrate de lithium, pH2,2 (solution Beckman contenant de l'acide citrique, de l'hydroxyde de lithium, du thiodiglycol et de l'acide octanoïque). L'analyse qualitative et quantitative des acides aminés est réalisée par passage et séparation sur colonne de résine de polystyrène sulfonique de l'analyseur automatique Beckman CL119. Les acides aminés sont révélés à la ninhydrine avec détection colorimétrique à 440 et 570nm.

2 - Culture en milieu riche

Le bouillon trypticase-soja est un milieu riche en substances diverses dont la qualité et les teneurs ne sont pas définies et précisées. Très nutritif, il contient des oligoéléments, des facteurs de croissance, des glucides et des acides aminés. La présence de substances osmoprotectrices dont la proline est également soupçonnée.

Les souches de E.coli (54C, 1157C) sont cultivées dans 200ml de BTS salé (NaCl : 0,68M) ou non, puis incubées à 37°C pendant 24h. Après centrifugation à froid, le culot est lavé 2 fois par 50ml d'eau salée (NaCl : 0,68 ou 0,17M) puis extrait à l'alcool 70%. L'extrait est repris dans du tampon au citrate de lithium et soumis finalement à l'analyse.

IV - DETERMINATION DU TREHALOSE INTRACELLULAIRE

Le tréhalose est un soluté compatible synthétisé par E.coli afin de faire face à des osmolarités moyennes du milieu de croissance. Le but de son dosage est de déterminer la relation entre son accumulation intracellulaire et la salinité du milieu de croissance, et l'effet de la G.B et/ou du CCCP sur celle-ci.

a - Cultures bactériennes

Les souches de E.coli sont cultivées dans du M63 (50 ou 100ml selon la densité de croissance obtenue) en absence ou en présence de stress osmotique (NaCl 0,5 et 0,68M). La G.B et/ou le CCCP sont ajoutés à des concentrations finales respectives de 1mM et 20µM. Après incubation à 37°C pendant 24h, les cellules sont immédiatement récupérées par filtration sur membrane Nuclepore de porosité 0,4µm. Un aliquote de la culture est réservé à la détermination du poids sec bactérien.

b - Extraction du tréhalose

La méthode utilisée est celle décrite par LARSEN et COLL (1987). Les membranes sont plongées dans 4ml d'acide perchlorique (HClO₄) 0,6M et l'extraction des cellules est favorisée par agitation au vortex pendant quelques secondes. L'extrait acide est centrifugé à 8000xg pendant 10min à 4°C. Le culot est extrait une seconde fois. Les surnageants acides sont ensuite neutralisés par de la potasse (KOH) 0,6M. Le précipité obtenu (KClO₄) est récupéré et lavé une fois par KOH et centrifugé.

L'extrait est ensuite bouilli pendant 15min en présence d'acide chlorhydrique (HCl) 0,2M pour l'hydrolyse des sucres phosphate et puis 15min en présence de soude (NaOH) 0,2M pour l'élimination des sucres réducteurs.

c - Dosage colorimétrique

Le tréhalose est déterminé par la méthode à l'anthrone (DEYMIÉ et COLL, 1981). Pour ceci, 2ml de l'extrait sont introduits dans des tubes à essais très propres et refroidis dans de l'eau glacée pendant 15min. On rajoute 4ml du réactif à l'anthrone (annexe 22). Les tubes sont agités au vortex, bouchés avec des billes de verre et placés au bain-marie à 92°C (± 1°C) pendant 8min. Les tubes sont ensuite rapidement refroidis dans un bain de glace. Les absorbances sont mesurées à 585nm après un repos de 30min à l'obscurité. Une gamme étalon (de 100 à 2,5µg/ml de tréhalose) est réalisée

à chaque expérimentation et les résultats sont exprimés en μg de tréhalose par mg de poids sec bactérien.

V - L'EFFET DU CARBONYL CYANIDE *m*-CHLORO - PHENYLHYDRAZONE SUR L'HALOTOLERANCE DE *E.COLI*

L'effet du carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) est testé sur des souches halotolérantes (Enterobacteriaceae) et sur des souches halophiles (Vibrio spp). A chaque fois la tolérance au sel de ces organismes et la CMI du CCCP sont déterminées. Le rôle d'osmoprotecteurs est aussi étudié dans ces conditions.

1 - Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

1-1 - En milieux liquides :

Les souches bactériennes : E.coli, Vibrio parahaemolyticus et V.alginolyticus, Pseudomonas aeruginosa et P.putida, sont isolées du milieu marin. Streptococcus faecalis, Staphylococcus aureus et S.epidermidis, Micrococcus spp et Bacillus sp, bactéries à Gram positif modérément halotolérantes, sont d'origine hospitalière.

Les bactéries sont incubées en aérobiose dans 5ml de BTS à 37°C (P.putida : 30°C) pendant 18h. Les cultures sont ensuite lavées 3 fois par 10ml d'eau physiologique. 5 μl des différentes suspensions lavées serviront à inoculer les puits des microplaques contenant les milieux sous un volume de 200 μl . Ce système permettra de déterminer soit la concentration maximale en sel tolérée par la bactérie soit la CMI en milieu liquide.

Le BTS, aux concentrations salines suivantes (NaCl : 0,085 - 0,5 - 0,68 - 0,85 - 1,02 et 1,20M), est utilisé pour les différentes espèces bactériennes. Le pH, avant stérilisation, est fixé à 7,2. Le CCCP (solutions-mères de 100 ou 1000 μM) dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) est additionné au BTS stérile aux concentrations finales suivantes : 0 - 0,312 - 0,625 - 1,25 - 2,5 - 5 - 10 - 20 - 40 - 50 - 60 - 80 et 100 μM . Des témoins constitués de la culture bactérienne en présence de DMSO et de chaque concentration saline sont inclus à chaque occasion.

Les cultures sont incubées à 37°C (P.putida : 30°C) pendant 24h. La croissance bactérienne est évaluée par appréciation visuelle du trouble. Les tests de détermination de la CMI sont réalisés en duplicita.

La CMI du CCCP est d'autre part déterminée en milieu M63. Pour ce faire, des suspensions lavées de E.coli (souche 82C/ZB400), de Vibrio parahaemolyticus (souche 5179) et V.alginolyticus (souche 35) sont mises à incuber à 37°C pendant 24h en présence de CCCP (0 à 100 μM) dans du M63/NaCl 0,5M.

1-2 - Sur milieu solide

La comparaison simultanée d'un grand nombre de souches est rendue possible par l'emploi de la gélose trypticase-soja. Pour ceci, une goutte d'une culture bactérienne incubée en aérobiose dans du BTS à 37°C (*P.putida* : 30°C) pendant 18h est transférée à l'aide d'un inoculateur sur la gélose en présence de sel et de CCCP, selon les concentrations suivantes :

- . NaCl : 0,5 - 0,68 - 0,85M
- . CCCP : 2,5 - 5 - 10 - 15 - 20 - 30 - 40 - 50 - 60 - 80 et 100 μ M (il est rajouté à la gélose après stérilisation et refroidissement de celle-ci).

Après incubation à 37°C (*P.putida* à 30°C) pendant 24h, la croissance bactérienne est notée aux points de dépôt. Des témoins sont évidemment réalisés sur gélose exempte de CCCP et sans addition de sel.

Les souches étudiées sont : *E.coli* du milieu marin (27 souches), *Klebsiella oxytoca* et *K.pneumoniae* (18), *Salmonella* spp (20), *V.alginolyticus* et *V.parahaemolyticus* (24), *Staphylococcus aureus* et *S.epidermidis* (12), *Streptococcus faecalis* (5), *Micrococcus* spp (3) et *Bacillus* sp (1).

2 - CCCP et osmoprotecteurs

L'effet du CCCP est testé sur des populations bactériennes de *E.coli* (16 souches d'origine marine choisies parmi les moins halotolérantes et 16 souches d'origine hospitalière) et de *Vibrio* spp (16 souches). Le CCCP est ajouté aux milieux de culture (M63, M63 + G.B1mM, BTS) à des concentrations sub-inhibitrices (20 μ M pour *E.coli* et 1,25 μ M pour *Vibrio* spp). Les teneurs en NaCl varient de 0 à 1,20M. Les autres conditions expérimentales sont décrites au paragraphe concernant la physiologie de l'halotolérance.

D'autre part concernant *E.coli*, le M63 additionné de proline (1mM) stérilisée sur membrane Millipore (0,22 μ m) est utilisé simultanément.

3 - Etude de la croissance de *E.coli*

Le but est le suivi de la croissance de souches de *E.coli* en milieu salé et la détermination de l'effet de la G.B et/ou du CCCP sur celle-ci. Six souches de *E.coli* du milieu marin ont été retenues selon les critères suivants :

- souche 1168C : croissance maximale tolérée en M63 dépourvu de sel.
- souche 1165D : croissance maximale tolérée en M63/NaCl 0,68M
- souche 200C : souche relativement sensible au CCCP:inhibition constatée sur gélose trypticase-soja salée.
- souche 1415C : souche relativement résistante au CCCP:croissance constatée sur gélose trypticase-soja salée.

- souche 1157D : accumulation importante d'acides aminés en M63/NaCl 0,68M.

- souche 54C : accumulation faible d'acides aminés en M63/NaCl 0,68M.

Les bactéries sont incubées 24h à 37°C respectivement dans du M63 sans NaCl (souche 1168C), M63/NaCl 0,5M (souche 1415C) et M63/NaCl 0,68M (souches 1165D, 200C, 54C et 1157D). Les concentrations en sel indiquées sont les concentrations maximales permettant la croissance de ces souches. L'incubation dans de telles conditions évitera une importante mortalité bactérienne suite au choc osmotique lors de l'inoculation.

Les inocula relativement élevés (5.10^6 bactéries/ml) sont effectués à partir des suspensions bactériennes non lavées. A chaque fois, 5 tubes de milieu M63 (9,9ml) sont inoculés par une souche donnée et contenant respectivement :

- M63/sans NaCl (Témoin)
- M63/NaCl 0,68M
- M63/NaCl 0,68M + G.B (1mM)
- M63/NaCl 0,68M + G.B (1mM) + CCCP (20 μ M)
- M63/NaCl 0,68M + CCCP (20 μ M)

Les tubes sont incubés à 37°C sous agitation.

La G.B et le CCCP sont rajoutés stérilement au milieu après une heure d'incubation. Le suivi de la croissance est réalisé pendant 24h, par dilutions successives et numérations sur gélose trypticase-soja.

VI - METHODES D'EXTRACTION, DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION DES COMPOSES OSMOPROTECTEURS

La recherche de substances osmoprotectrices éventuellement accumulées par les cellules bactériennes, en particulier à partir d'algues et de sédiments du littoral marin a nécessité l'application et la mise au point de méthodes aboutissant à une identification précise de telles substances (Fig. B).

Les techniques décrites ci-dessous restent cependant générales, les spécificités quand elles existent seront mentionnées dans les paragraphes correspondants.

1 - Extraction

Plusieurs méthodes d'extraction de composés bactériens endogènes sont proposées par la littérature dont, l'ébullition (SUGIURA et KISUMI, 1985) et l'utilisation de l'acide perchlorique (TEMPEST et COLL, 1970). Nous avons opté pour l'extraction hydro-alcoolique décrite par LE RUDULIER et BOUILLARD (1983).

Les culots bactériens sont lavés par du M63 à osmolarité appropriée pour éviter la fuite des constituants intracellulaires (osmolarité égale ou supérieure de

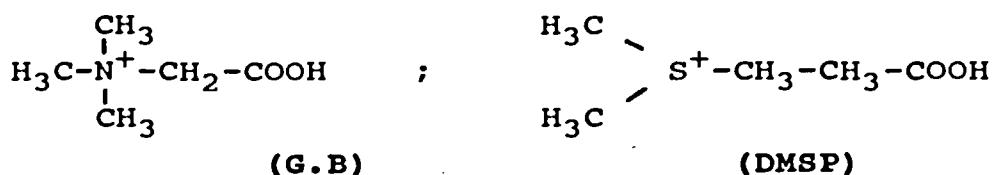
200mOsm à celle du milieu de croissance - Annexe n°2O). Ils sont ensuite extraits par 10ml d'éthanol à 70% (vol/vol), à température ambiante, avec une légère agitation occasionnelle pendant 20min. Le surnageant hydro-alcoolique obtenu après 3 extractions successives est évaporé à sec, sous vide, à 40°C. L'extrait sec est récupéré dans un maximum d'eau distillée (10ml par exemple) pour permettre sa complète dissolution, puis lyophilisé. Le lyophilisat est dissous dans 500µl d'eau distillée peu de temps avant de passer aux autres étapes de l'analyse.

2 - Séparation et mise en évidence

L'extrait hydro-alcoolique consiste en un mélange de diverses substances solubilisées présentant une charge électrique ou non. Les bétaines sont des molécules chargées et peuvent donc être séparées dans un champ électrique, par électrophorèse.

2-1 - Electrophorèse en haute tension

Les composés-oniums (ammoniums quaternaires et sulfoniums tertiaires) sont purifiés par électrophorèse en haute tension (40V/cm) sur papier Whatman 3MM imprégné d'une solution d'acide formique 0,75N (pH 2,0). A ce pH, les bétaines et le DMSP portent des charges positives nettes et migrent vers la cathode.

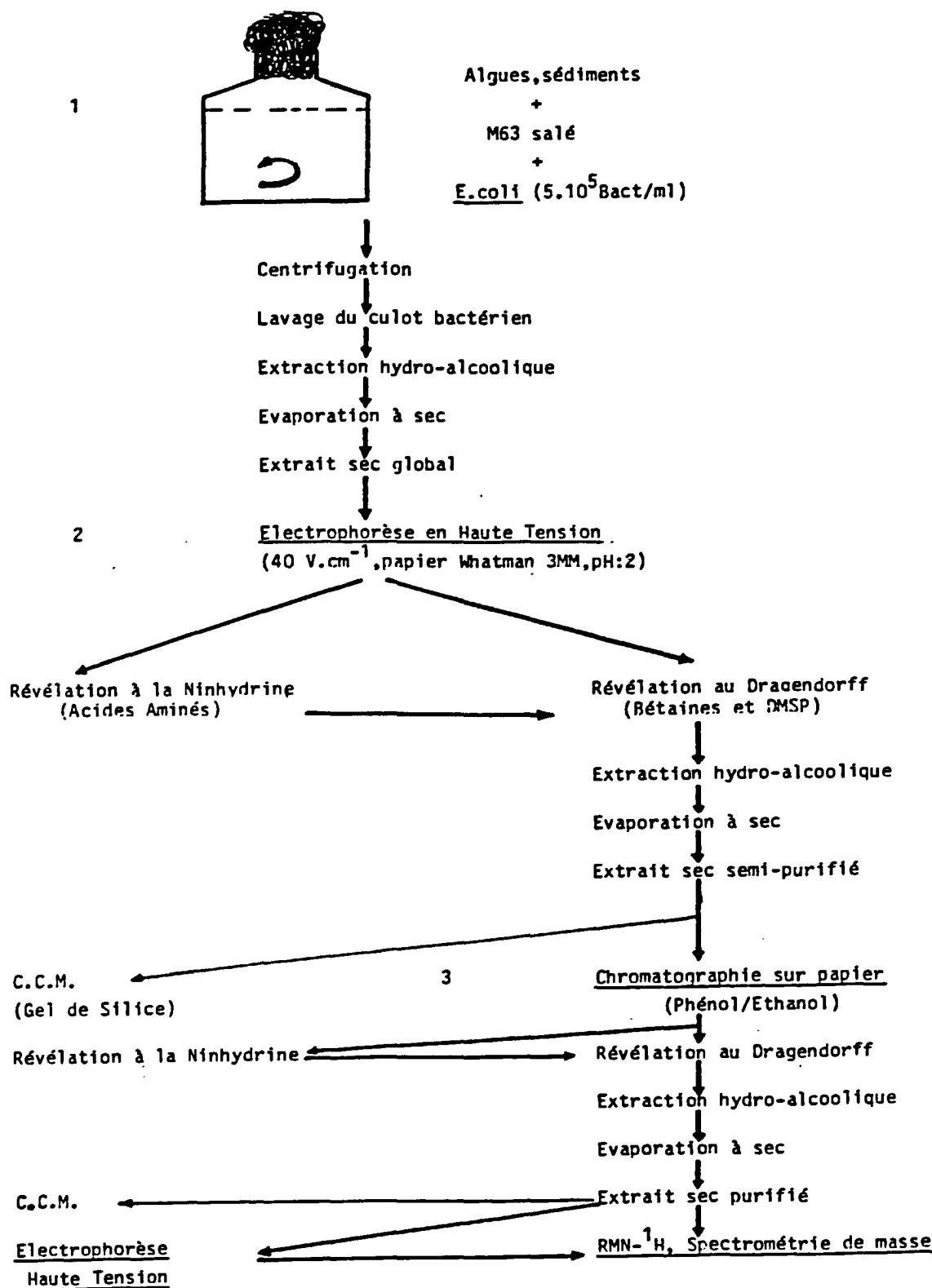


Des solutions standards de choline (25mg/ml) et de G.B (100mg/ml) (Sigma Co), ou accessoirement d' autres molécules osmoprotectrices, serviront comme témoins de migration. Le volume du dépôt est de 5 μ l pour les témoins, ceux des échantillons sont de 50 μ l. La migration est réalisée à froid (température 4°C) pendant 75 min.

Après séchage à l'étuve à circulation d'air (40°C), les électrophorégrammes sont révélés par pulvérisation du réactif de Dragendorff (annexe n°23). L'apparition des colorations dues aux témoins-choline (rose-rouge caractéristique) et G.B (jaune-orangé) est instantanée, celle des échantillons peut être immédiate ou exiger plusieurs jours, voire un mois. Au fait la durée d'apparition des taches est très intéressante, elle permet une estimation de la quantité relative de la substance migrante. Une apparition instantanée signifie bien sûr une quantité relativement plus importante. De plus, les dimensions des spots constituent un autre paramètre à prendre en considération. Enfin, les R_c = (distance de migration de la substance)/(distance de migration de la choline) sont calculés pour chaque substance. Toutefois, la comparaison des R_c des substances n'est pas toujours significative surtout si le même échantillon consiste en plusieurs

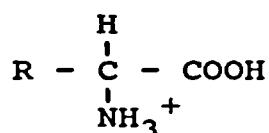
Fig.B

Protocole de Mise en évidence, Séparation et Identification
des Composés Osmoprotecteurs.



composés présents en quantités non négligeables. Dans ces conditions, les effets d'encombrement ralentissent la mobilité et la vitesse de migration des molécules. De même, que pour une même substance, la quantité présente influe sur la longueur de migration. Par contre, les R_c ont un intérêt certain dans l'identification d'une substance préalablement purifiée et utilisée pour une électrophorèse secondaire.

Les acides aminés jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes de l'halotolérance bactérienne. Ils sont omniprésents dans tout matériel biologique et sont extraits par l'éthanol 70%. En outre, ils sont chargés positivement à pH 2,0 et sont donc séparés par électrophorèse.



De ce fait, les acides aminés interfèrent avec les bétaines et le DMSP. Il faudrait évidemment en tenir compte quand on s'intéresse à la purification des bétaines.

La proline est un acide aminé particulier car elle possède des propriétés osmoprotectrices. De plus, en électrophorèse, elle migre au même niveau que la G.B. Elle est donc doublement intéressante.

Pour ceci, les électrophorégrammes sont séchés à l'étuve à circulation d'air à 80°C, révélés avec une solution de ninhydrine (Annexe n°24) puis remis à sécher. Les acides aminés donnent généralement une coloration violette, sauf la proline, une coloration jaune caractéristique. La révélation des acides aminés peut être effectuée isolément ou précéder celle des bétaines sur le même électrophorégramme car les colorations d'acides aminés disparaissent relativement rapidement.

Lorsque l'on désire poursuivre la purification de substances osmoprotectrices, la révélation au réactif de Dragendorff se fera uniquement de part et d'autre de la partie centrale. Une bande centrale est alors découpée au niveau de migration de la substance et plongée dans de l'alcool 70% pour élution. L'extrait hydroalcoolique est évaporé, repris dans de l'eau distillée puis lyophilisé. Le lyophilisat est repris dans 500µl d'eau distillée qui serviront pour la chromatographie.

2-2 - Chromatographie sur papier

Elle complète l'électrophorèse et constitue une étape nécessaire dans la purification des substances osmoprotectrices. Les divers acides aminés interférant avec les bétaines sont en effet éliminés par migration dans un mélange de solvants : phénol 80%- éthanol 95° (1:1). Les bétaines et le DMSP migrant sur une plus grande distance que les acides aminés sont ainsi séparés et isolés.

La chromatographie descendante est pratiquée sur papier Whatman 3MM.

Les dépôts (50 μ l) sont effectués à partir du lyophilisat récupéré après électrophorèse (des dépôts-témoins de choline et de G.B sont réalisés). Après migration et révélation, les R_f sont calculés. Une bande centrale de papier, exempte de réactif, est découpée au niveau de la substance Dragendorff-positive puis éluée dans de l'alcool 70%. Après évaporation à sec, l'extrait est dissous dans de l'eau dont une partie servira à la chromatographie sur couche mince et/ou à une électrophorèse d'appoint, l'autre partie sera lyophilisée. La substance lyophilisée sera identifiée par spectroscopie de RMN-¹H et/ou par spectrométrie de masse.

3 - Identification

Elle constitue la dernière étape dans l'étude des composés osmoprotecteurs accumulés par les cellules bactériennes. Elle n'est rendue nécessaire que si le rôle de tels composés dans l'halotolérance a été auparavant mis en évidence soit par l'étude de la croissance bactérienne soit par la méthode des disques. L'identification est cependant limitée aux seuls osmoprotecteurs préférentiellement accumulés par la bactérie.

3-1 - La chromatographie sur couche mince

Plusieurs auteurs (HORI et COLL, 1979 ; MULLER et COLL, 1981 ; BLUNDEN et COLL, 1981 ; HUTKINS et COLL, 1987) ont utilisé la chromatographie sur couche mince comme outil complémentaire dans l'identification des bétaines. Nous avons employé le gel de silice (Merck), épaisseur 0,2mm comme phase fixe et 2 systèmes de solvants : méthanol-NH₄OH (3:1) et isopropanol-eau (3:1) comme phases mobiles. Des solutions standards de G.B, trigonelline, carnitine, sarcosine (Sigma Co) γ -butyrobétaine (Aldrich Chemical Co) et DMSP (100mM) sont déposés sous un volume de 5 μ l, tandis que des dépôts de 10 à 20 μ l sont nécessaires pour les substances inconnues. La migration est interrompue lorsque le front arrive à 1cm du bord de la plaque. Après séchage, le gel est ensuite révélé,

- soit par pulvérisation du réactif de Dragendorff suivie de celle d'une solution saturée de NaHSO₄ pour l'intensification des spots (BLUNDEN ET COLL, 1981)

- soit par pulvérisation du réactif de Dragendorff puis séchage doux à 50cm de la plaque (sèche-cheveux sur position 1)

- soit aux vapeurs d'iode

L'identification d'une substance est presque acquise si pour les 2 systèmes de solvants employés, son R_f correspond à celui d'une solution standard donnée.

3-2 - Spectrométrie de masse et spectroscopie de résonance magnétique nucléaire ^1H

L'étape ultime dans l'identification des molécules osmoprotectrices accumulées par E.coli à partir d'algues et de sédiments marins consiste en l'établissement de leur formule chimique et donc de leur identité propre par spectrométrie de masse et/ou par spectroscopie de RMN- ^1H . La réalisation de ce travail a été confiée au Centre Régional des Mesures Physiques de l'Ouest (Université Rennes I).

* Spectrométrie de masse à haute résolution :

- Appareillage : spectromètre Varian Mat 311 couplé à la chromatographie en phase gazeuse.
 - Constantes physiques fixées pour la détermination de la G.B :
 - . Energie des électrons : 70eV
 - . Tension d'accélération : 3000V
 - . Température d'introduction directe : 180°C
 - . Spectre réalisé en impact électronique

* Spectroscopie de RMN- ^1H :

- Appareillage : spectromètre Bruker AM 300WB opérant à 300, 134 MHz
- Conditions expérimentales :
 - . Echantillons dissous dans D_2O
 - . D_2O fournit le signal interne
 - . Référence interne : Sodium 3-(triméthylsilyl)propane sulfonate (DSS)

VII - ETUDE DE L'ACCUMULATION INTRACELLULAIRE D'OSMOPROTECTEURS EXOGENES

Un osmoprotecteur quelconque, présent dans un milieu de culture à forte osmolarité, est accumulé par les cellules bactériennes afin de restaurer leur croissance. Nous avons tenté de mettre en évidence cette accumulation intracellulaire d'osmoprotecteurs chez E.coli essentiellement par extraction hydro-alcoolique suivie de leur caractérisation par électrophorèse en haute tension.

1 - A partir de milieu minimum enrichi d'osmoprotecteurs

Cinq souches de E.coli (6S, 82C, 54C, 1157D et 1412C) sont cultivées dans 150ml de milieu minimal M63/NaCl 0,68M additionnés de G.B à la concentration finale de 1mM. Les cultures sont incubées à 37°C pendant 24h puis centrifugées à 3000 x g, à 4°C. Les culots bactériens sont lavés à 3 reprises par du M63/NaCl 0,68M puis

soumis à l'extraction hydro-alcoolique. Après évaporation à sec, l'extrait est dissous dans de l'eau distillée puis lyophilisé. Le lyophilisat, repris dans un faible volume d'eau distillée (200µl), est soumis à l'électrophorèse pour la détection éventuelle de G.B. Une souche de *E.coli* cultivée en absence de G.B est traitée dans les mêmes conditions pour constituer la souche-témoin.

D'autre part, des cultures des souches 82C et 1412C obtenues respectivement à partir de M63/NaCl 0,68M additionné de DMSP ou de choline (concentration finale 1mM, et stérilisés sur membrane Millipore 0,22µm) sont soumises aux mêmes opérations expérimentales. Des témoins sont réalisés à partir de milieu exempt de DMSP ou de choline.

2 - A partir d'un milieu complexe

DULANEY et COLL (1968) ont mis en évidence de la G.B dans l'extrait de levure, composant de nombreux milieux de culture utilisés en bactériologie. Le BTS est un milieu de culture particulièrement riche en substances azotées du fait de sa composition en hydrolysat trypsique de caséine et en peptone de soja. Aussi, l'idée d'étudier l'éventualité de la présence de composés osmoprotecteurs dans ce milieu est-elle intéressante.

Pour ce faire, 6 souches de *E.coli* (6S, 82C, 54C, 1157D, 1412C et 1422C) sont cultivées dans 150ml de BTS /NaCl 0,68M et incubées à 37°C pendant 18h. Les cultures sont ensuite traitées comme indiqué ci-dessus. Une culture-témoin en BTS/NaCl 0,085M est réalisée.

VIII - SEDIMENTS MARINS ET HALOTOLERANCE DE E.COLI

1 - Echantillonnage

Les échantillons de sédiments proviennent de l'estuaire de Morlaix .Il reçoit principalement les effluents de la station d'épuration et les rejets des ruisseaux draînant des régions agricoles . Les sédiments (ou vase) consistent en une boue fluide et visqueuse, contenant approximativement 10% de sable, et de couleur gris-noir.

Les échantillons d'eau de mer sont collectés dans des flacons en verre stériles. Leur salinité déterminée (par les soins de l'IFREMER-Brest) à l'aide d'un salinomètre Beckman type RS7C, varie de 34 à 35°/‰. Les échantillons sont gardés au froid dans une glacière pendant leur transport jusqu'au laboratoire où ils sont maintenus à 4°C. Leur utilisation doit intervenir au plus tard dans les 24 heures.

2 - Croissance bactérienne sur sédiments

Les souches de *E.coli* 82C (ZB400), 1157D (ZB402) et 1412C (ZB403) sont cultivées dans 5ml de BTS et incubées à 37°C pendant 18h. Après 3 lavages

successifs à l'eau physiologique, 1ml de la suspension (10^9 bactéries/ml) servira à inoculer 1 litre de milieu.

Les sédiments 10% (poids/volume) sont additionnés de

- M63/NaCl 0,6M
- M63/NaCl 0,6M + glucose (10mM)
- Eau de mer

pour un volume final de 1 litre

De l'eau de mer additionnée de KCl (100mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1mM), FeSO_4 (3,9 μM) et de glucose (10mM) est utilisée comme contrôle. Ces composés sont choisis puisque constituants du M63 sauf le KCl qui a été préféré au KH_2PO_4 pour éviter la précipitation saline en eau de mer, l'apport de potassium demeure inchangé.

Tous les milieux sont stérilisés à 110°C pendant 30min. puis inoculés. Ils sont ensuite incubés à 37°C pendant 24h sous agitation magnétique. Le suivi de la croissance est réalisé par dilutions successives et numérations sur gélose trypticase-soja.

3 - Extraction de la bétaine intracellulaire

Après incubation, les cultures sont décantées pendant une nuit à 4°C afin d'éliminer les particules solides. Environ 750ml de la partie surnageante contenant les cellules bactériennes sont centrifugés à 3000 x g, à 4°C. Les culots sont lavés 2 fois avec du M63/NaCl 0,68M (il faut veiller cependant à ne récupérer que la partie supérieure des culots et éviter la partie profonde car pouvant contenir encore quelques particules sédimentaires). Les cellules lavées sont ensuite extraites à l'alcool 70%. Après évaporation, l'extrait sec est dissous dans 5ml d'eau distillée et lyophilisé avant d'être soumis à l'analyse pour la mise en évidence et l'identification d'éventuels osmoprotecteurs.

4 - Détermination quantitative d'osmoprotecteurs

Les sédiments du littoral marin peuvent être une source d'osmoprotecteurs. Il était donc nécessaire de pouvoir estimer leurs teneurs dans ceux-ci. Pour ce faire, les sédiments bruts (10g) sont extraits par agitation en présence de :

(*) - 100ml d'alcool 70% et centrifugés. Le surnageant est évaporé à sec et dissous dans 5ml d'eau distillée,

(**) - 100ml de M63/NaCl 0,6M + glucose (10mM) et stérilisés à 110°C pendant 30min.,

(***) - 100ml d'eau distillée, à température ambiante.

En tous les cas, 125 μl de l'échantillon sont soumis à la détermination quantitative des composés-oniums.

5 - Rôle osmoprotecteur de la substance purifiée

Après la détection de la substance Dragendorff-positive à partir d'extraits bactériens par électrophorèse et chromatographie sur papier, il était indispensable de mettre en évidence son rôle dans la restauration de la croissance de E.coli en milieux d'osmolarités élevées. Dans le cas positif, on pourra poursuivre les étapes en vue de son identification finale.

Une partie de la substance lyophilisée est dissoute dans un volume minimum d'eau distillée. Son efficacité dans l'osmoprotection est alors testée : 10 ; 50 et 65 μ l de la solution sont ajoutés à 5ml de M63/NaCl 0,85M + glucose.

L'inoculum consistera en 5 μ l d'une suspension lavée de E.coli (souche 82C/ZB400). Les cultures sont incubées à 37°C pendant 48h sous agitation. Le suivi de la croissance est effectué par dilutions successives et numérations sur gélose trypticase-soja.

IX - ALGUES MARINES ET HALOTOLERANCE DE E.COLI

1 - Présentation

Les algues marines, objet de notre étude, sont des algues dites macrobenthiques car macroscopiques et fixées à un support inerte ou vivant. Elles proviennent du site de Trégastel (Côtes d'Armor) et ont été choisies parmi les algues marines considérées comme les plus communes des côtes bretonnes. Dans ce but, 2 algues brunes (classe des Phéophycées), 2 algues vertes (classe des Chlorophycées) et une algue rouge (classe des Rhodophycées) ont été retenues. Ce sont des espèces diversement euryhalines, c'est-à-dire ayant une aptitude à supporter des variations de salinité plus ou moins importantes, qui se rencontrent dans l'étage médiolittoral, tant dans les cuvettes que sur le substrat exondé.

1-1 - Les algues brunes

1-1-1 - Ascophyllum nodosum : (ordre des Fucales). Il est connu sous le nom de "goemon noir". Il forme parfois des populations très importantes sur le rocher, au niveau moyen de la marée, dans les stations calmes.

1-1-2 - Fucus serratus : (ordre des Fucales). Il est aussi appelé "varech dentriculé" ou "varech plat". Il forme une ceinture dans l'horizon inférieur de l'étage médiolittoral dans toutes les localités où le substrat est rocheux.

1-2 - Les algues vertes

1-2-1 - *Ulva lactuca* (ou *U. latissima*) : (ordre des Ulvales). Elle est connue aussi sous le nom de "laitue de mer". Elle est commune sur les rochers dans la zone de balancement des marées, elle peut être rencontrée à différents niveaux sur le substrat rocheux exondé ou dans les cuvettes. Elle est très photophile et capable de supporter d'amples variations de salinité. Certaines conditions favorisent la croissance et la production des Ulves. L'arrivée en mer de rivières chargées de sels nutritifs provenant du lessivage de sols enrichis en engrais peut être la cause d'une production d'une telle importance qu'elle peut prendre le caractère de nuisance pour des points du littoral où les épaves, venant s'accumuler, se décomposent pendant la période chaude.

1-2-2 - *Enteromorpha ramulosa* : (ordre des Ulvales)

Cette espèce forme des touffes composées d'axes ramifiés pouvant atteindre une trentaine de centimètres de longueur. Elle se rencontre à peu près toute l'année dans les flaques de l'étage médiolittoral : elle est toutefois plus abondante au printemps et en été.

1-3 - L'algue rouge

Rhodymenia (ou *Palmaria*) *palmata* : (ordre des Palmariales) est une algue commune qui vit sur les rochers depuis les basses mers jusque dans l'étage infralittoral.

2 - Etude de l'osmoprotection bactérienne

2-1 - A partir d'extraits aqueux à chaud :

Les algues sont découpées en fins morceaux ($\sim 1\text{cm}^2$) de façon à faciliter un meilleur relargage ultérieur des substances intracellulaires. 2,5g (poids humide) sont plongés dans des flacons contenant 50ml de milieu M63 salé (NaCl : 0,5 - 0,68 - 0,85 - 1,02 - 1,20M) ou non. Les flacons sont ensuite autoclavés à 110°C pendant 30min. Après décantation, 10ml du surnageant sont répartis dans des tubes stériles qui serviront au remplissage ultérieur des microplaques pour l'étude de l'halotolérance bactérienne.

2-2 - A partir d'extraits hydro-alcooliques :

Les algues (50g en poids humide) sont découpées en fins morceaux et triturées au mixer électrique en présence de 150ml d'alcool 70% pendant quelques minutes. La trituration est complétée par un broyage manuel au mortier. La bouillie obtenue est alors filtrée sur gaze puis sur préfiltre Millipore pour l'élimination des résidus solides. L'extrait hydro-alcoolique susceptible de contenir les composés-oniums est ensuite évaporé à sec, sous vide, à 40°C. L'extrait sec est récupéré dans 10ml d'eau distillée. Des dilutions au 1/100ème et au 1/200ème dans du M63 salé (NaCl : 0,5 - 0,68

- 0,85 - 1,02 et 1,20M) ou non sont effectuées à partir de l'extrait. Les solutions obtenues sont finalement stérilisées à 110°C pendant 30min., elles serviront au remplissage des microplaques.

2-3 - Etude de l'halotolérance de *E.coli* en présence d'extraits d'algues :

Les souches de *E.coli* (nombre : 16) sont cultivées dans 5ml de BTS pendant 18h à 37°C. Les cultures sont alors centrifugées à 3000 x g, le culot lavé 3 fois par 5ml d'eau physiologique est finalement repris dans 10ml : 5µl de cette suspension lavée serviront à l'inoculation des puits des microplaques contenant les milieux.

Les milieux précédemment obtenus à partir d'algues (extraits aqueux et hydro-alcooliques) sont répartis à raison de 200µl/puits. Après ensemencement, les microplaques sont incubées à 37°C pendant 24h. La croissance bactérienne est déterminée par appréciation visuelle du trouble. La concentration saline maximale permettant la croissance est notée . Des témoins constitués de milieu minimum M63 salé (NaCl : 0,5 - 0,68 - 0,85 - 1,02 et 1,20M) ou non, additionné ou non de G.B1mM, sont réalisés parallèlement.

3 - Etude de la croissance bactérienne

La croissance bactérienne d'une souche de *E.coli* (82C/ZB400) est étudiée sur algues entières (M63/NaCl 0,68 et 0,85M) et extraits hydro-alcooliques d'algues dilués au 1/100ème dans du M63/NaCl 0,85M.

Pour ceci, la souche est d'abord cultivée dans 5ml de BTS et incubée à 37°C pendant 18h. La culture est centrifugée à 3000 x g et le culot est lavé 3 fois par 5ml d'eau physiologique. La suspension lavée servira à l'inoculation de 50ml de M63/NaCl 0,68 et 0,85M contenant 2,5g des 5 espèces d'algues ou de 5 x 5 ml de M63/NaCl 0,85M contenant l'un des 5 extraits d'algues à la dilution finale au 1/100ème. Des témoins sans apport algal sont réalisés. En tous les cas, l'inoculum de départ doit consister en approximativement 5.10^5 bactéries/ml. Les cultures sont agitées au bain-marie à 37°C. Le suivi de la croissance est réalisé par dilutions successives et numération des unités formant colonies (UFC) sur gélose trypticase-soja pendant 48h.

4 - Algues marines et composés Dragendorff-positifs

La présence de composés dits "Dragendorff-positifs" chez les algues marines a été décrite essentiellement par HORI et COLL (1979) et BLUNDEN et COLL (1981, 1982b, 1985). Les composés extraits et identifiés par ces auteurs à partir de différentes espèces d'algues sont surtout des bétaines et le DMSP. Nous avons voulu rechercher la présence de tels composés chez des algues marines communes des côtes bretonnes. Pour ceci, nous avons réalisé l'électrophorèse en haute tension des 5 extraits hydro-alcooliques d'algues obtenus précédemment (dépôts=50ul).

5 - Détermination de composés osmoprotecteurs accumulés par *E.coli* à partir d'algues marines

Après la mise en évidence de composés Dragendorff-positifs dans les extraits hydro-alcooliques d'algues, il était logique de savoir dans un premier temps si de telles substances étaient accumulées par des cellules de *E.coli* soumises à de fortes osmolarités du milieu de croissance et d'essayer ensuite d'identifier la substance jugée comme étant accumulée principalement et en quantités importantes par les cellules bactériennes à partir d'une algue donnée. Les autres substances éventuellement détectées dans les mêmes conditions seront uniquement testées pour leur probable rôle osmoprotecteur par la méthode des disques.

5-1 - Cultures bactériennes :

La souche de *E.coli* (82C/ZB400) est cultivée dans 5ml de BTS et incubée à 37°C pendant 18h. Après centrifugation de la culture, le culot est lavé 3 fois par de l'eau physiologique. 1ml de la suspension lavée servira à l'inoculation de 1 litre de milieu M63/NaCl 0,85M contenant 50g d'algue (concernant *Ascophyllum nodosum* et *Fucus serratus*, les extraits ,20ml dans 1 litre de M63/NaCl 0,85M, ont été préférés aux algues entières pour une meilleure production de biomasse).

Après incubation à 37°C pendant 36h sous agitation magnétique, des numérations bactériennes sont réalisées à partir des différentes cultures. Celles-ci sont ensuite décantées pendant 2-3 heures à froid, quelques 800ml (pour éviter les résidus solides) sont centrifugés à 3000 x g, à 4°C, pendant 10min. Le culot obtenu est lavé 2 fois par 100ml de M63/NaCl 1,02M afin d'éliminer toute trace de matière algale.

Le culot bactérien lavé est extrait par de l'alcool 70% et soumis à l'électrophorèse. Dans le cas où plusieurs substances sont détectées au réactif de Dragendorff à partir de l'un des 5 extraits bactériens, seule celle jugée comme prépondérante suivra le chemin complet de purification avant son identification finale par RMN-¹H. Les autres substances seront testées pour leur rôle dans l'osmoprotection de *E.coli*. En outre, la révélation des acides aminés est effectuée.

5-2 - Méthode des disques

Le réactif de Dragendorff est pulvérisé sur les seules parties latérales de l'électrophorégramme correspondant à la migration de la choline et de la G.B (témoins) et des éventuels composés de l'échantillon égal. La pulvérisation du réactif évitera la partie centrale qui consiste en la migration des composés de l'échantillon (environ une dizaine de dépôts de 50µl chacun). Des disques de 7mm de diamètre sont ensuite découpés dans la bande horizontale centrale joignant de part et d'autre les niveaux de migration de la substance. Il faut remarquer cependant, que concernant les substances

migrant au niveau de la G.B, une révélation parallèle à la ninhydrine est indispensable. En effet, la proline connue pour son rôle osmoprotecteur migre dans la même zone. Son absence permettra ainsi d'attribuer sans conteste l'éventuel effet osmoprotecteur à la substance Dragendorff-positive.

Les disques de papier stérilisés à 110°C pendant 30min. sont déposés sur gélose M63 salée (NaCl : 0,5 - 0,68 et 0,85M) préparée à partir de M63 et d'agar noble (Merck) (15g/l) et préalablement ensemencée en nappe par une culture de E.coli. Après incubation à 37°C, on notera la présence de colonies bactériennes autour du disque. Ainsi, la substance peut être considérée comme osmoprotectrice, son efficacité sera estimée par rapport à différentes concentrations salines. Des témoins constitués uniquement de papier Whatman 3MM sont réalisés.

6 - Les apports nutritifs d'algues

Les algues macrobenthiques sont des organismes végétaux vivants. Du fait de leur constitution spécifique en diverses molécules biochimiques, elles sont utilisées, depuis longtemps, à des fins agricoles, industrielles, alimentaires et autres. En ce qui concerne l'halotolérance bactérienne, nous nous sommes intéressés aux molécules impliquées directement ou indirectement dans l'osmoprotection. Nous avons donc tenté de déterminer quantitativement l'apport d'azote aminé (méthode de YEMM et COCKING .1955-Annexe n°15) de composés-oniums (méthode de WALL et COLL. 1960, modifiée par STOREY et WYN JONES .1977- Annexe n°16) et de protéines (méthode de LOWRY et COLL .1951- Annexe n°17) à partir des 5 extraits hydro-alcooliques d'algues.

RESULTATS ET DISCUSSION

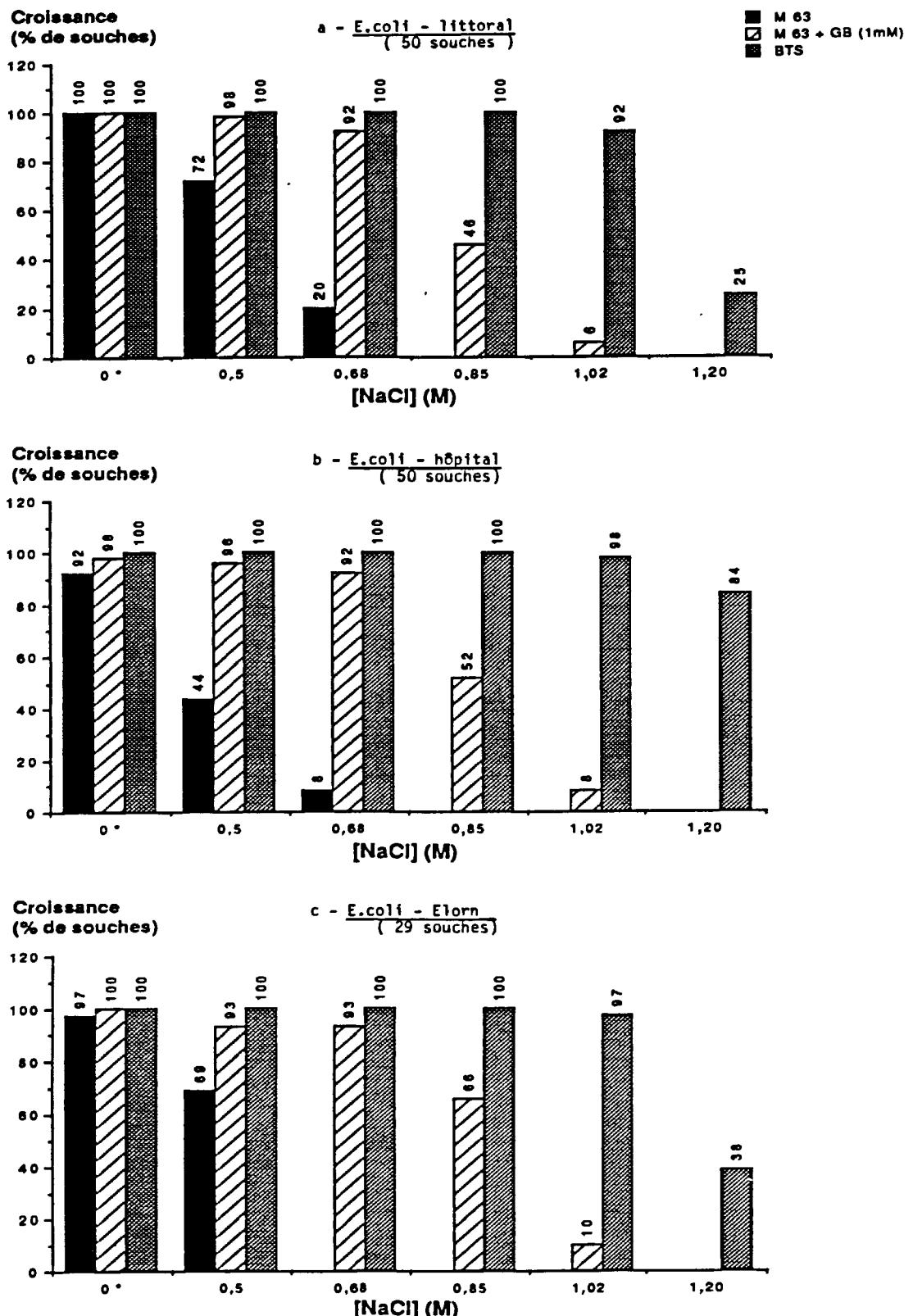


Fig.1: Pourcentages de souches de populations de *E. coli* présentant une culture en 24 h en fonction de la nature du milieu et de la salinité .

(*): Le bouillon trypticase-soja (BTS) contient du NaCl 0,085 M.

I - APPRECIATION DE L'HALOTOLERANCE BACTERIENNE

Si les microplaques se sont avérées un outil indispensable dans l'étude simultanée de plusieurs souches bactériennes, leur utilisation lors de la phase de lecture demeure, dans certains cas, délicate. En effet, l'appréciation visuelle du trouble dans un puits peut varier d'un observateur à un autre. Toutefois ces cas restent rares et limités à quelques concentrations salines maximales tolérées par la bactérie.

L'appréciation du trouble a été retenue comme unique critère de la croissance bactérienne ; la seule présence d'un culot, qui est plus le résultat d'un agrégat cellulaire que d'une véritable culture, n'a pas été considérée. Sa densité peut cependant être faible, moyenne ou forte, cette différence n'est pas mentionnée dans nos résultats. D'autre part, il faut rappeler que les résultats sont obtenus à partir de faibles volumes de milieux (200 μ l) et en absence d'agitation. L'une et l'autre condition pourraient influencer l'apparition et la densité du trouble.

1 - E.coli

1-1 - Souches du littoral : (Fig 1a, Annexe 1)

Concernant les souches de E.coli isolées du milieu marin et constituant l'objet essentiel de notre étude, les expérimentations ont été réalisées en triplicata.

. en M63 : Près des 3/4 des souches croissent en présence de NaCl 0,5M. Elles sont donc considérées comme halotolérantes. Seulement 20% tolèrent encore 0,68M.

. en M63 + G.B : Une nette différence avec le milieu minimum apparaît : 92% des souches se développent à des teneurs de NaCl 0,68M. 46% et 6% tolèrent respectivement 0,85 et 1,02M. La G.B se révèle être un composé osmoprotecteur important pour ces souches.

. en BTS : 100% des souches tolèrent 0,85M, 25% croissent encore à 1,20M. Le BTS, milieu complexe, permet la meilleure haloadaptation de E.coli.

1-2 - Souches d'origine hospitalière (Fig 1b, Annexe 2)

. en M63, le nombre de souches halotolérantes intrinsèques est plus faible que celui des souches du milieu marin : en effet, à une concentration en sel égale à 0,5M seulement 44% des souches croissent contre 72%. De plus, 4 souches sont auxotropes.

. en M63 + G.B : l'apport de G.B est bénéfique, et si l'on retrouve sensiblement les mêmes valeurs que celles concernant E.coli du littoral, la réponse à la G.B est bien meilleure.

. en BTS : les souches hospitalières cultivent mieux : 84% des souches croissent à 1,20M.

1-3 - Souches de l'Elorn (Fig 1c, Annexe 3)

. en M63 : le pourcentage de souches croissant à une salinité de 0,5M est comparable à celui de E.coli du littoral. Il y a absence de croissance en M63/NaCl 0,68M. Une souche est auxotrophe.

. en M63 + G.B : les souches sont osmoprotégées par la G.B. A une salinité de 0,85M, 66% des souches croissent.

. en BTS : il y a une large osmoprotection en milieu riche : 38% des souches croissent à une salinité de 1,20M.

Le nombre de souches étudiées (29) ne permet cependant qu'une comparaison approchée avec les souches de E.coli du littoral et d'origine hospitalière.

1-4 - La réponse de E.coli au stress osmotique est variable. L'appréciation qualitative des résultats permet de distinguer 3 groupes de souches :

a) Souches du littoral :

* 1er groupe : Souches pour lesquelles la G.B augmente de façon importante l'halotolérance (écart supérieur ou égal à 0,34M).

24 souches (48%) appartiennent à ce groupe.

ex : 2D, 6S, 62D, 1222D.

* 2ème groupe : Souches pour lesquelles l'augmentation de l'halotolérance par la G.B est plus discrète (écart = 0,17M)

19 souches (38%) appartiennent à ce groupe.

ex : 54C, 82C, 1422C.

* 3ème groupe : Souches pour lesquelles la G.B présente uniquement un faible pouvoir osmoprotecteur. Il y a augmentation de la densité de la culture pour une même teneur maximale en sel tolérée.

7 souches (14%) appartiennent à ce groupe.

ex : 117D, 1090D, 1412C.

Aucune relation ne semble se dégager entre halotolérance et les conditions d'isolement du départ sur gélose lactosée de Drigalski (souches D et S : c'est-à-dire isolées sur milieu "Doux", salinité 0,085M et sur milieu "Salé", salinité de l'eau de mer).

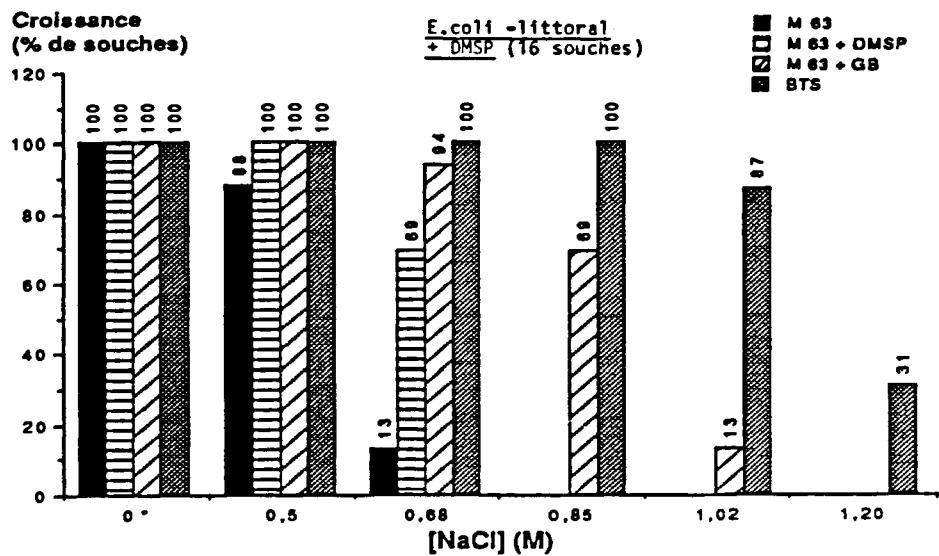
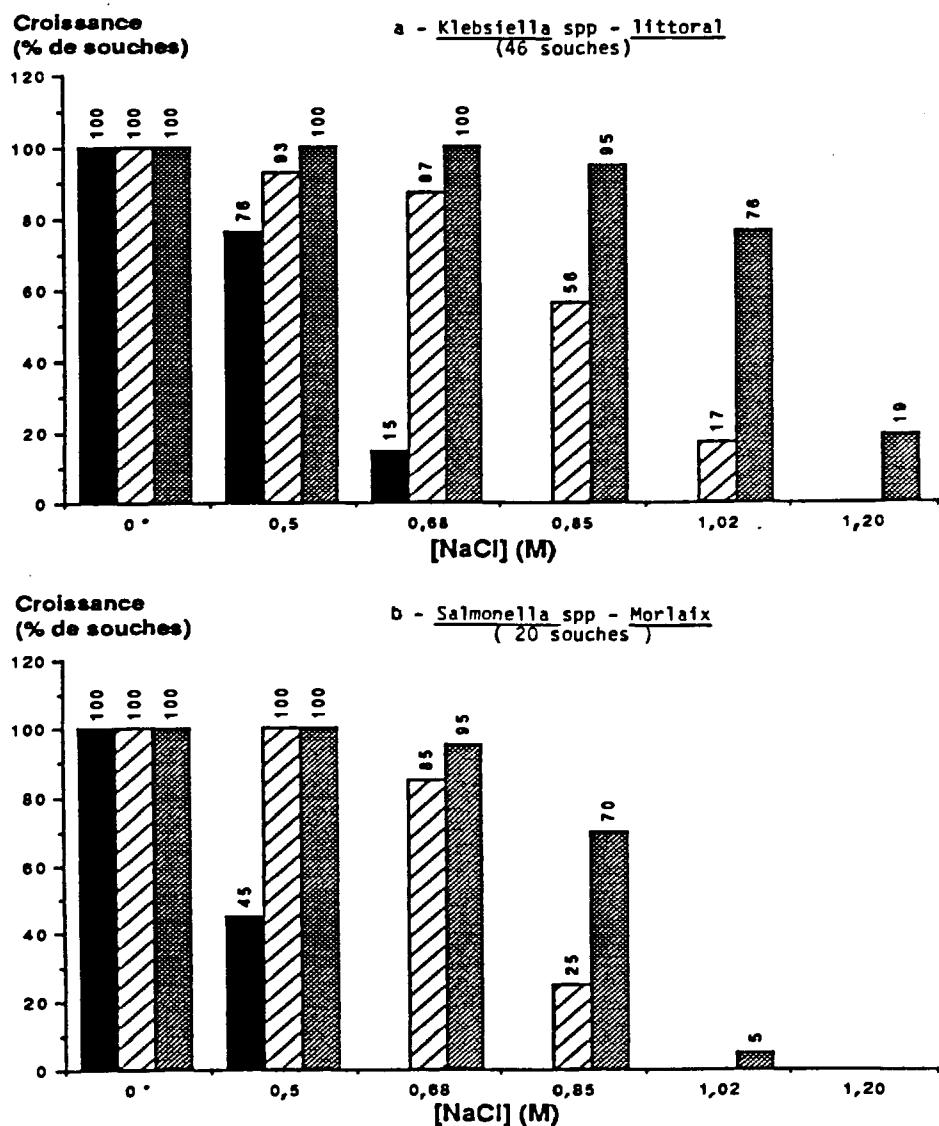


Fig. 2: Osmoprotection par le DMSP.



Pourcentages de souches de populations bactériennes présentant une culture en 24 h en fonction de la nature du milieu et de la salinité .

(*) : Le bouillon trypticase-soja (BTS) contient du NaCl 0,085 M.

b) Souches hospitalières :

* 1er groupe : L'osmoprotection par la G.B est importante. 42 souches (84%) appartiennent à ce groupe. Le résultat est bien meilleur que celui obtenu avec les souches du littoral.

* 2ème groupe : L'osmoprotection par la G.B est légère (écart = 0,17M) pour 5 souches (10%).

* 3ème groupe : Souches pour lesquelles, la G.B a un faible pouvoir osmoprotecteur. Seulement 2 souches (4%) sont concernées. Une souche n'est pas protégée par la G.B.

c) Souches de l'Elorn :

* 1er groupe : La réponse à la G.B est forte (écart $\geq 0,34M$) pour 24 souches (83%) ; elle est meilleure que celle obtenue avec les souches du littoral.

* 2ème groupe : 4 souches (14%) sont modérément protégées par la G.B.

* 3ème groupe : Une souche est concernée.

2 - Osmoprotection de E.coli par le DMSP(Fig 2,Annexe4)

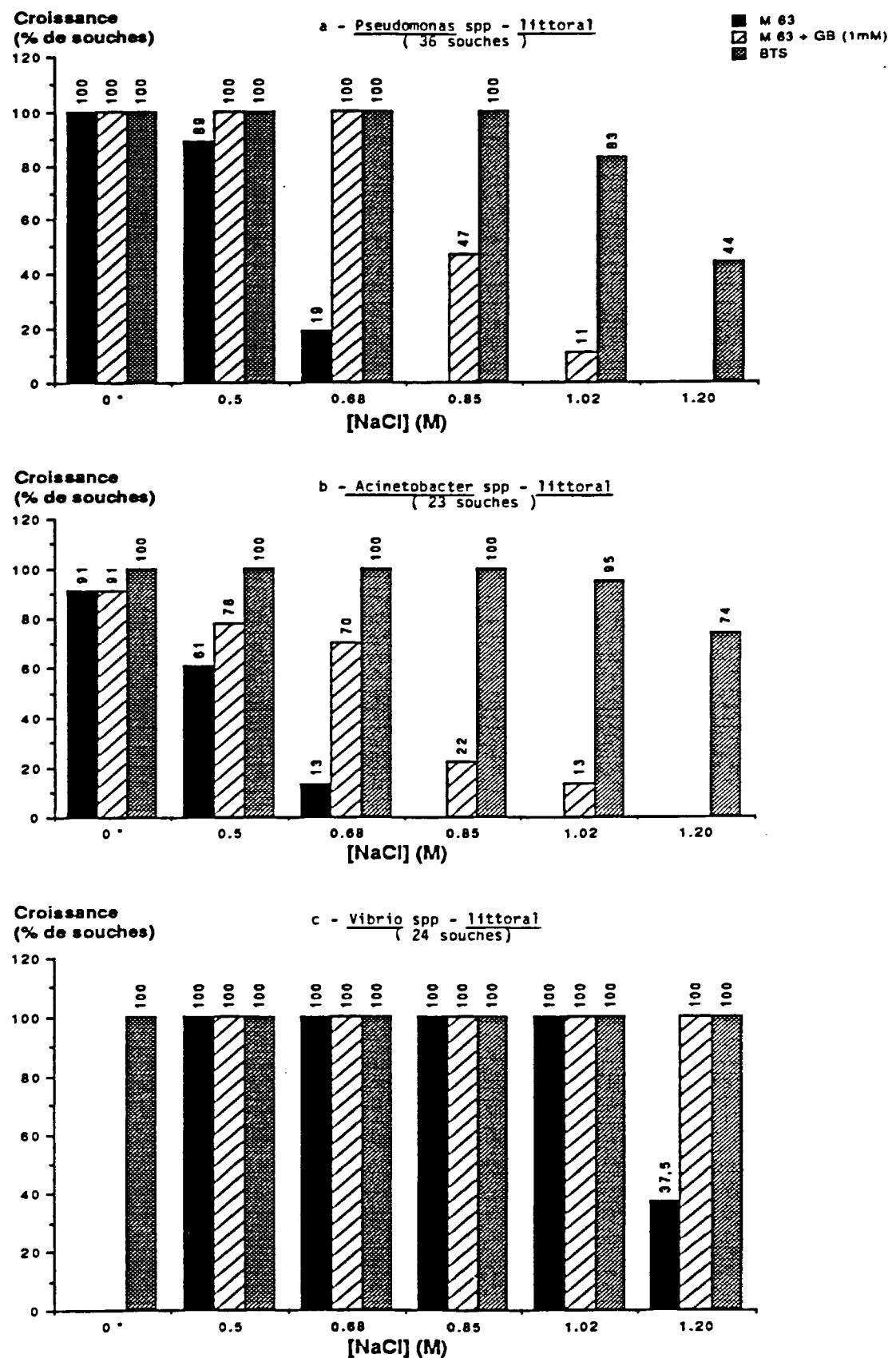
Le DMSP s'avère une molécule osmoprotectrice pour les souches de E.coli du littoral testées. Cependant, son activité osmoprotectrice est plus faible que celle de la G.B (à une salinité de 0,68M, 69% de souches croissent en présence de DMSP contre 94% en présence de G.B). De plus, le DMSP ne permet pas une osmoprotection au-delà d'une salinité de 0,68M.

3 - Klebsiella spp : (Fig 3a, Annexe 5)

Les pourcentages de croissance présentent des profils en tous points comparables à ceux de E.coli du milieu marin. La G.B augmente de façon importante l'halotolérance (écart $\geq 0,34M$ pour 33 souches - 66%-). D'autre part, les souches des 2 espèces étudiées - oxytoca et pneumoniae - ont sensiblement le même comportement haloadaptatif.

4 - Salmonella spp : (Fig 3b, Annexe 6)

Parmi les Enterobacteriaceae étudiées, les souches de Salmonella spp se montrent les moins halotolérantes : seulement 45% se développent à 0,5M de salinité, et aucune croissance n'est constatée à 0,68M. Seulement 70% des souches cultivent en BTS/NaCl 0,85M. Toutefois l'augmentation de l'halotolérance par la G.B est totale,



Pourcentages de souches de populations bactériennes présentant une culture en 24 h en fonction de la nature du milieu et de la salinité .
 Fig.4: (*) Le bouillon trypticase-soja (BTS) contient du NaCl 0,085 M.

écart $\geq 0,34M$ pour 80%.

5 - Pseudomonas spp (Fig 4a, Annexe 7)

Les pourcentages en souches tolérant le sel laissent apparaître sensiblement les mêmes résultats que ceux obtenus avec les souches de E.coli du littoral. Pseudomonas se montre cependant plus résistant en M63/NaCl 0,5M (89% contre 72%). La G.B exerce un effet osmoprotecteur sur l'ensemble des souches dont l'halotolérance est augmentée : écart $\geq 0,34M$ pour 44% des souches, écart = 0,17M (56%). Celle-ci est encore améliorée par culture dans du BTS. Enfin, P.putida dont 30% des souches croissent à une salinité de 0,68M semble plus résistant au sel que P.aeruginosa (seulement 6%).

6 - Acinetobacter spp : (Fig 4b, Annexe 8)

Bactéries du milieu extérieur, les Acinetobacter sont néanmoins moins halotolérants que les Pseudomonas, 61% des souches croissent en M63/NaCl 0,5M. D'autre part, la réponse à la G.B est mitigée : écart de salinité $\geq 0,34M$ pour 35% des souches. Il est à noter toutefois les faibles pourcentages de croissance obtenus en présence de G.B.

7 - Vibrio spp : (Fig 4c, Annexe 9)

Les 2 espèces choisies sont halophiles et les résultats obtenus sont caractéristiques. La croissance est nulle en absence de sel, le BTS qui contient du sel 0,085M permet la croissance. A partir de 0,5M les cultures sont optimales et les valeurs obtenues sont maximales (100%) en M63 + GB et en BTS à une teneur en sel 1,20M. Seul V.alginolyticus (56% des souches) se développe en milieu minimal/NaCl 1,20M.

8 - Influence de la température et de la durée d'incubation (Fig 5, Annexe 10)

- En M63 et M63 + G.B, une plus longue durée d'incubation améliore l'halotolérance aux 2 températures utilisées : à 37°C, le nombre de souches croissant dans les créneaux de salinité maximale tolérée est multiplié par 2. A 15°C, la différence d'écart est plus nette.

- En BTS, cette augmentation est négligeable. Lorsque l'on considère la température d'incubation, on remarque que :

- En M63, à 37°C et à 15°C, les pourcentages de croissance sont les mêmes (21 et 25%) respectivement en 24h et 15j. Lorsque les durées d'incubation augmentent, la croissance est meilleure à 15°C (71% de souches) qu'à 37°C (42% des souches).

- En M63 + G.B, à 15°C, les pourcentages de croissance sont meilleurs : en effet, à une salinité de 1,02M, 67% des souches croissent à 15°C (5j) contre 13% à 37°C

E.coli - littoral (24 souches)

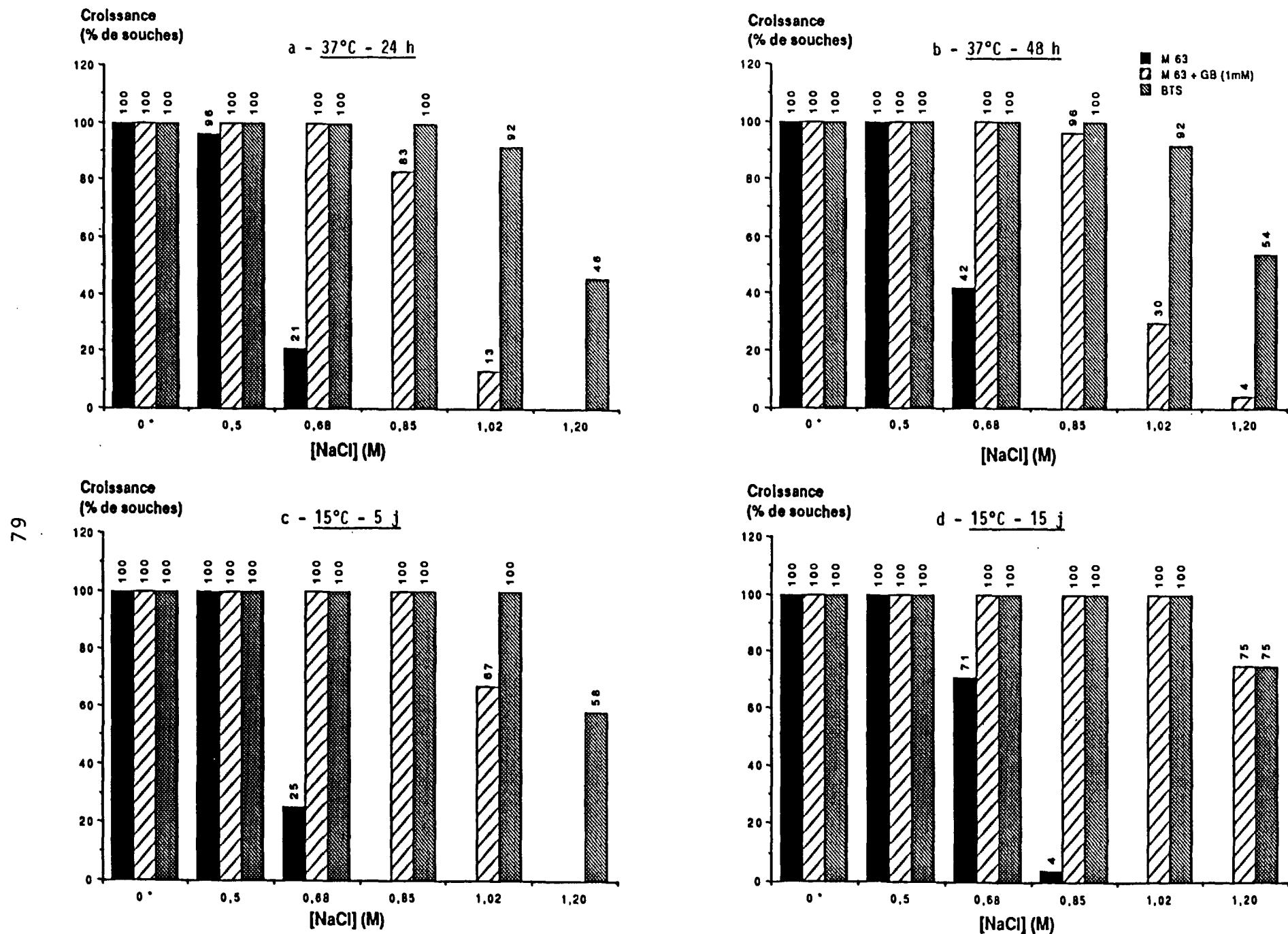


Fig.5 :

Pourcentages de souches présentant une culture en fonction de la nature du milieu, de la salinité, de la température et de la durée d'incubation.

(24h). Cette différence est accentuée avec l'augmentation de la durée d'incubation : à une salinité de 1,02M, 100% des souches croissent à 15°C contre 30% à 37°C.

- En BTS, aucune différence notable n'existe.

8-3 - Discussion

Les espèces bactériennes testées présentent une **halotolérance intrinsèque** (en M63), elles possèdent les capacités endogènes d'équilibrer leur pression de turgescence et de résister au stress osmotique en dehors de toute osmoprotection externe. Elles portent donc l'information génétique et l'équipement enzymatique nécessaires à l'osmotolérance. Cette halotolérance intrinsèque ne permet cependant qu'une adaptation limitée au stress osmotique. Le nombre de bactéries croissant en milieu M63/NaCl 0,68M ne dépasse guère 20% D'autre part, l'étude simultanée de populations de souches bactériennes a permis de dégager différentes catégories de souches selon la teneur en NaCl maximale tolérée. Les capacités d'osmotolérance ne sont pas similaires. L'intensité de la réponse au stress serait liée aux possibilités de synthèse de la cellule.

La comparaison des données obtenues en milieu minéral minimum fait ressortir une meilleure haloadaptation des souches de E.coli isolé du milieu marin par rapport à celles d'origine hospitalière ou provenant d'eaux saumâtres (Fig 1). Ceci suppose donc l'existence d'une pression de sélection exercée par le milieu naturel. Cette constatation peut être élargie aux autres espèces bactériennes (d'une part Klebsiella, Pseudomonas et Acinetobacter isolées du milieu marin et d'autre part Salmonella isolées d'eaux saumâtres) (Fig 3 et 4). Les souches de Vibrio alginolyticus et V.parahaemolyticus sont halophiles et ne croissent pas en absence de sel : les ions sodium (Na^+) sont indispensables à leur croissance pour au moins 4 raisons, car ils interviennent dans : (DIMROTH, 1987)

- les systèmes de cotransport Na^+ /soluté,
- la conservation et la transduction d'énergie,
- les mécanismes de l'équilibre du pH,
- l'activation d'enzymes spéciales.

L'osmoprotection apportée par la G.B (1mM) est générale: les différentes espèces bactériennes (même les espèces halophiles) réagissent positivement à cette molécule . La pression de sélection devient négligeable. En effet, la restauration et l'amélioration de la croissance par la G.B sont significatives. Ces bactéries possèdent les capacités de son transport et de son accumulation (systèmes ProP et ProU). Cependant, ce phénomène n'est pas ubiquitaire, la G.B est sans effet chez certaines espèces (LE RUDULIER et BERNARD, 1986 ; CSONKA, 1989). D'autre part, la levée de l'inhibition due au stress osmotique peut être faible, modérée ou forte. L'effet de la G.B

est subordonné à l'activité de son transport, à la transcription des gènes proP et proU, à l'existence de mutations (déficience en ProU et/ou en ProP) ou autre phénomène. La G.B peut encore rester inefficace chez certaines espèces de Salmonella ou de Acinetobacter. Enfin, elle augmente l'osmotolérance chez des mutants de S.typhimurium déficients en putP, proP et proU (LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983 ; DUNLAP et CSONKA, 1985b), ce qui suggère que l'accumulation de la G.B pourrait être assurée par un système de transport spécifique.

Le DMSP s'est avéré une molécule aux propriétés osmoprotectives modérées (Fig 2). C'est un composé retrouvé chez des plantes halophytes de l'environnement marin telles Spartina anglica (LARHER et COLL, 1977) et chez des algues marines telles Ulva lactuca (DICKSON et COLL, 1980) où il est impliqué dans les processus d'osmorégulation. Sa libération dans le milieu marin pourrait intensifier la pollution bactérienne. Le DMSP est accumulé par E.coli auquel il confère une osmoprotection suffisante pour sa survie en eau de mer. Cette accumulation est variable selon les souches mais ne va pas au-delà d'une salinité de 0,68M.

Le milieu riche apporte assurément l'osmoprotection la meilleure. Le bouillon trypticase-soja (BTS) contient en effet de la proline et des substances Dragendorff-positives dont probablement la G.B. Il existerait ainsi une synergie entre les différents osmoprotecteurs du BTS qui expliquerait les rendements élevés de croissance à de fortes osmolarités. De plus le BTS constitue une source énergétique appréciable. Toutes les espèces bactériennes résistent très efficacement au sel. Mais là aussi, on distingue divers degrés d'osmotolérance, mais au moins équivalents à une salinité de 0,85M. L'accumulation d'osmoprotecteurs est variable d'une souche à une autre. La différence de pression osmotique exercée par le BTS est inférieure de 100mOsm/kg à celle du M63 + G.B (ou M63) pour une même salinité (Annexe n°20). Cette minime différence ne saurait expliquer l'ampleur de l'osmotolérance bactérienne apportée par le BTS qui est bien le résultat de l'accumulation d'osmoprotecteurs.

Si les Salmonella présentent une capacité d'adaptation, celle-ci est plus faible que celle des autres Enterobacteriaceae (Fig.3b). Sa résistance intrinsèque et son pouvoir d'accumulation d'osmoprotecteurs sont limités. Ceci pourrait s'expliquer conjointement par leur provenance d'eaux saumâtres et par de faibles potentialités de synthèse endogène et de transport d'osmoprotecteurs.

Enfin, la température ne permet pas de constater une différence fondamentale, même si l'osmoprotection intrinsèque et celle apportée par la G.B semblent meilleures.

Milieux de culture	<u>E.coli</u>					
	6S	54C	82C	1157D	1412C	1422C
M63	1,08	0,62	1,45	0,57	0,97	1,05
M63 + GB ¹	0,85	0,31	1,52	0,50	1,12	1,02
M63 + GB ¹ + CCCP ²	0,35	1,04	2,03	0,44	0,98	1,20
M63 + CCCP ²	0,41	0,31	3,02	0,40	0,69	1,88
M63/0,5	2,33	0,87	7,39	0,77	2,50	1,67
M63/0,5 + GB	1,66	0,52	1,70	0,65	1,00	1,26
M63/0,5 + GB + CCCP	0,74	0,55	3,92	0,34	1,32	1,25
M63/0,5 + CCCP	2,64	0,28	9,33	0,44	2,81	2,70
M63/0,68	1,85	1,33	2,11	1,17	1,96	1,77
M63/0,68 + GB	1,50	1,06	2,48	0,71	1,10	1,15
M63/0,68+GB+CCCP	1,85	1,13	2,00	0,50	1,22	2,10
M63/0,68 + CCCP	1,50	0,50	0,47	0,67	1,87	2,40

TABLEAU 1 : Teneur intracellulaire en potassium (µmole/mg de poids sec) chez E.coli après 24h de culture, à différentes salinités (NaCl : 0,5 et 0,68M)
 (1) : (G. B) = 1mM (2): (CCCP) = 20µM

II - LE POTASSIUM INTRACELLULAIRE

1 - Résultats

Le dosage des teneurs du potassium intracellulaire extrait par de l'acide nitrique 0,1M et déterminé par photométrie à flamme a donné les résultats mentionnés au Tab 1.

L'étude de la concentration cytoplasmique en K^+ permet de constater une hétérogénéité des résultats obtenus. Ceux-ci diffèrent d'une souche à une autre pour une même osmolarité du milieu. Leur comportement n'est pas uniforme surtout en présence de CCCP. Toutefois certaines observations globales peuvent être dégagées :

- Pour l'ensemble des souches, il y a augmentation de la teneur en K^+ lors du stress osmotique. Les concentrations en K^+ sont plus importantes pour 0,5M de NaCl que pour 0,68M sauf pour les souches 54C et 1157D qui accumulent en fait peu de K^+ . L'afflux le plus important se produit chez la 82C lorsque la teneur en sel est de 0,5M. La G.B provoque une normalisation de la teneur en K^+ : son effet est plus marqué à 0,5M et faible à 0,68M. En absence de sel, la G.B ne modifie pas le taux de K^+ .

Les fluctuations des taux de K^+ en présence de CCCP varient selon les souches et l'osmolarité du milieu.

. en absence de stress, il y a une diminution de ce taux, sauf chez les souches 82C et 1422C où il augmente.

. en présence de sel et de G.B, le CCCP fait chuter le taux de K^+ par rapport aux témoins (M63/NaCl 0,5 ou 0,68M).

. lorsqu'il est rajouté au M63/ 0,5M le CCCP a une action variable sur la teneur en K^+ .

La réaction au stress osmotique et à la G.B est pratiquement équivalente pour toutes les souches, à savoir : une augmentation de la teneur en K^+ et sa normalisation en présence de G.B. Le comportement bactérien face au CCCP dépend largement de l'osmolarité du milieu et des souches. Il faut signaler que les résultats sont obtenus après 24h de culture quand on sait que le phénomène d'accumulation des ions K^+ est très rapide. Ils sont exprimés par rapport à un poids sec bactérien, les incertitudes sur les pesées prennent de l'ampleur lorsqu'il s'agit de faibles poids bactériens. Enfin, la méthode employée (filtration et poids sec) nécessite des volumes de cultures minima (50 ou 100ml). La filtration est relativement lente et le risque d'évolution de la concentration cytoplasmique du potassium est grand.

2 - Discussion

L'accumulation intracellulaire des ions K^+ constitue chez E.coli la réponse

primaire au stress osmotique (EPSTEIN et SCHULTZ, 1965 ; EPSTEIN, 1986). C'est aussi un processus d'urgence, très rapide : sa teneur optimale est obtenue en 20-25min, le relargage intervient juste après et en 2h, le taux des K^+ est juste supérieur au témoin de 25% (DINNBIER et COLL, 1988 ; OHWADA et SAGISAKA, 1988). Ces 2 paramètres (rapidité et relargage) permettent donc d'expliquer les faibles teneurs et écarts constatés dans nos résultats. Toutefois les données obtenues permettent la comparaison quand il s'agit de l'importance des taux des K^+ accumulés (ex : souche 82C) et de la continuation du processus vers des osmolarités supérieures (ex : souches 54C et 1157D). La G.B en normalisant la pression de turgescence normalise la teneur des K^+ par leur relargage vers le milieu extérieur (BAKKER et COLL, 1987).

Le transport des ions K^+ s'effectue par l'intermédiaire d'un antiport K^+/H^+ . Il est assuré par 2 systèmes de transport : Kdp, à grande affinité ($K_m = 2\mu M$) et Trk, à faible affinité mais à grande activité de transport (RHOADS et COLL, 1976). L'activité du premier nécessite de l'ATP, celle du second la force motrice protonique (FMP) et l'ATP, comme régulateur (RHOADS et EPSTEIN, 1977). Dans des conditions normales de croissance, seul Trk est fonctionnel. Son activité est réduite par de faibles teneurs en K^+ du milieu de croissance ou par mutations (EPSTEIN, 1986). En ce qui nous concerne, nous pourrions supposer que l'abolition partielle de la FMP (CCCP, $20\mu M$ = concentration sub-inhibitrice) entraîne une diminution de l'activité de Trk d'où les chutes des valeurs de K^+ généralement constatées. Cependant, dans certains cas et selon les souches, la défection même partielle de Trk provoque une activité de Kdp d'où l'augmentation de K^+ constatée essentiellement chez les souches 82C et 1422C (Kdp utilise dans ces conditions l'ATP de la glycolyse). En tous les cas, l'action du CCCP semble s'exercer beaucoup plus sur le transport de K^+ que sur celui de la G.B. En effet le transport de la G.B ne semble pas être affecté dans ces conditions, d'où son action de normalisation sur le taux de K^+ . Toutefois ceci ne constitue qu'une tentative d'explication des phénomènes à la lumière de la littérature. Les processus de transport et d'énergie cellulaires sont complexes et le plus souvent restent à élucider.

III - LES ACIDES AMINES LIBRES

Les souches de E.coli (54C, 1157D, 1412C) retenues dans le cadre de cette étude ont été sélectionnées selon certains critères de croissance (Annexe 1) que nous rappelons ci-dessous (p.86).

Acides Aminés (nmoles/100mg poids sec)	NaCl (M)				
	0	0,5	0,5+GB	0,68	0,68+GB
Phosphosérine	49	140	86	76	89
Taurine	118	120	144	70	289
Aspartate	102	1730	502	554	498
Thréonine	TRACES	70	37	19	TRACES
Sérolle	23	370	156	70	50
Asparagine	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Glutamate	1980	7500	4534	6853	5315
Proline	TRACES	140	TRACES	TRACES	40
Glycine	187	730	160	223	129
Alanine	154	2950	304	949	305
Valine	154	1310	555	407	843
Cystéine	46	280	177	108	235
Méthionine	16	10	45	TRACES	33
Isoleucine	33	90	45	63	43
Leucine	49	130	66	70	56
Tyrosine	43	60	70	TRACES	20
Phénylalanine	33	70	78	TRACES	23
G.A.B.A.	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Ornithine	TRACES	60	29	19	8
Lysine	319	220	86	191	99
Histidine	33	TRACES	49	ABS	TRACES
Arginine	TRACES	ABS	ABS	ABS	13
TOTAUX	3339	15980	7123	9672	8088

TABLEAU 2 : Teneur en acides aminés libres en fonction de la concentration en NaCl et de la présence de glycine bétaine. Cultures en milieu minimum M63-souche 1157D d'après KORN E. (DEA Microbiologie, 1985)

Acides Aminés (nmoles/100mg poids sec)	NaCl (M)				
	0	0,5	0,5+GB	0,68	0,68+GB
Phosphosérolle	41	97	41	54	33
Taurine	112	121	107	94	39
Aspartate	109	998	440	654	258
Thréonine	11	ABS	ABS	ABS	ABS
Sérolle	32	19	13	13	21
Asparagine	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Glutamate	1197	2889	1584	3762	723
Proline	41	161	125	TRACES	67
Glycine	83	124	68	197	49
Alanine	82	772	181	910	186
Valine	88	262	582	329	613
Cystéine	56	413	201	224	197
Méthionine	9	12	25	8	15
Isoleucine	23	49	38	29	31
Leucine	22	41	28	19	20
Tyrosine	18	32	58	11	36
Phénylalanine	19	31	44	84	33
G.A.B.A.	26	17	40	ABS	28
Ornithine	6	8	TRACES	16	TRACES
Lysine	131	78	242	46	134
Histidine	6	7	38	ABS	20
Arginine	2	TRACES	49	TRACES	2
TOTAUX	2114	6131	3904	6450	2505

TABLEAU 3 : Teneur en acides aminés libres en fonction de la concentration en NaCl et de la présence de glycine bétaine. Cultures en milieu minimum M63-souche 1412C d'après KORN E. (DEA Microbiologie, 1985)

Acides Aminés (nmoles/100mg poids sec)	NaCl (M)				
	0	0,5	0,5+GB	0,68	0,68+GB
Phosphosérolle	79	91	94	40	85
Taurine	68	ABS	ABS	ABS	73
Aspartate	41	214	168	66	340
Thréonine	TRACES	TRACES	TRACES	TRACES	TRACES
Sérolle	14	41	37	14	110
Asparagine	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Glutamate	694	1816	1271	3606	2184
Proline	TRACES	24	TRACES	TRACES	TRACES
Glycine	70	265	87	80	155
Alanine	141	930	178	526	549
Valine	82	328	309	ABS	671
Cystéine	TRACES	82	150	66	209
Méthionine	15	10	18	TRACES	14
Isoleucine	23	51	59	42	62
Leucine	35	19	28	40	31
Tyrosine	12	22	28	TRACES	48
Phénylalanine	18	29	3	TRACES	23
G.A.B.A.	ABS	ABS	ABS	ABS	ABS
Ornithine	TRACES	5	3	TRACES	TRACES
Lysine	68	67	215	80	136
Histidine	TRACES	TRACES	21	TRACES	TRACES
Arginine	18	ABS	TRACES	ABS	TRACES
TOTAUX	1378	3994	2669	4560	4690

TABLEAU 4 : Teneur en acides aminés libres en fonction de la concentration en NaCl et de la présence de glycine bétaine. Cultures en milieu minimum M63-souche 54C d'après KORN E. (DEA Microbiologie, 1985)

Souches	NaCl (M)	Maximale	Tolérée
1157D	0,68	0,68	0,85
1412C	0,68	0,68	1,02
54C	0,68	0,85	1,02

1 - En milieu minimum (Tab 2,3,4)

L'étude quantitative et qualitative des acides aminés libres permet de dégager certaines règles générales concernant l'évolution de leur teneur intracellulaire selon le stress osmotique et l'apport ou non d'osmoprotection.

. Les cellules bactériennes accumulent une large quantité d'acides aminés face à un stress salin. Leur taux est normalisé en présence de G.B.

. Peu d'acides aminés sont impliqués dans l'osmorégulation :

- le glutamate et l'aspartate : acides aminés "acides", chargés négativement à pH 6,0 - 7,0.

- l'alanine, la valine, la glycine : acides aminés aliphatiques non polaires, pas de charge électrique nette à pH 6,0 - 7,0.

- la cystéine : acide aminé soufré.

- la lysine : acide aminé "basique", chargé positivement à pH 6,0 - 7,0.

Ils constituent à eux seuls, en moyenne, 80, 90 et 95% des acides aminés totaux à des salinités de 0 - 0,5 et 0,68M. Le glutamate est prépondérant. Sa teneur augmente avec le stress osmotique, elle peut atteindre 79% de la teneur totale en A.A, en M63/ 0,68M. Elle se normalise en présence de G.B.

Les autres acides aminés (ASP, ALA, VAL, GLY et CYS) ont d'une manière générale les mêmes profils que celui du GLU mais leurs fluctuations sont moins régulières. Le taux de lysine, par contre, semble suivre un chemin inverse c'est-à-dire diminuer avec l'accroissement de la salinité et revenir à des valeurs normales en présence de G.B. La teneur de ces acides aminés est maximale (43%) à une salinité de 0,5M, minimale à 0,68M (25%).

La proline et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) ne sont pas accumulés par les cellules bactériennes. Il n'y a pas de synthèse endogène.

Une étude comparative des 3 souches de E.coli étudiées permet de ressortir certaines différences dans leur synthèse d'acides aminés, et leur comportement face au stress osmotique.

. La souche 1157D : le pool d'acides aminés accumulés est d'une manière générale très élevé (maximal en M63/NaCl 0,5M). Sa croissance en présence de NaCl/ 0,68M est faible et n'est pas franchement améliorée par la G.B.

. La souche 1412C : la teneur d'acides aminés endogènes est moyenne et

Acides aminés (nmoles/100mg poids sec)	54C		1157D	
	NaCl:0,085M	NaCl:0,68M	NaCl:0,085M	NaCl:0,68M
Taurine	160	53,8	-	-
Aspartate	23,5	-	-	-
Thrénanine	1,56	30,30	-	-
Sérine	2,00	-	0,282	1,16
Asparagine	-	-	1,414	6,38
Glutamate	199,2	469	217,88	714,3
Glutamine	-	-	-	52,22
Proline	49,24	2735,46	54,33	1326,50
Glycine	31,64	34,10	7,07	21,47
Alanine	63,28	672,5	18,95	281,43
α -Butyrate	1,33	5,68	-	3,48
Valine	14,93	114	7,07	50,48
Cystéine	2,22	20,08	-	5,80
Méthionine	5,35	54,9	3,39	19,73
Isoleucine	7,8	32,6	3,39	3,86
Leucine	25,4	137,20	13,30	48,16
Tyrosine	4,68	11	4,52	5,80
Phénylalanine	5,57	11,36	3,68	4,06
Tryptophane	1,11	2,65	-	-
Ethanolanine	1,33	-	5,09	-
Ornithine	0,44	0,38	0,56	1,74
Lysine	4,01	18,18	9,05	6,38
Histidine	14,70	28,80	4,8	4,64
Arginine	14,48	27,28	4,5	6,96
G.A.B.A.	-	192,50	-	-
TOTAUX	633,77	4651,77	359,27	2564,55

TABLEAU 5 : Teneur en acides aminés libres en fonction de la concentration en NaCl.
Cultures en bouillon trypticase-soja.

augmente parallèlement à la force osmotique du milieu. Sa croissance en présence de NaCl/ 0,68M est modérée et est légèrement améliorée par l'apport de G.B.

. La souche 54C : elle est faiblement accumulatrice. Le taux d'acides aminés augmente fortement avec le stress salin. Sa croissance est largement favorisée par la G.B puisqu'elle résiste à une salinité de 0,85M.

2 - En milieu riche (Tab 5)

Seules les souches 1157D et 54C ont été testées puisque les quantités d'acides aminés accumulées en M63 présentent les plus grands écarts.

Nous pouvons constater que :

- La teneur intracellulaire d'acides aminés est faible. Elle augmente quand les cellules sont soumises à un stress osmotique (multipliée par un facteur 7).

- Seuls la proline, le glutamate et lalanine sont impliqués dans l'osmorégulation car accumulés massivement.

. La proline, absente chez *E.coli* croissant sur M63 salé, est prépondérante (51 et 58% des acides aminés totaux). C'est une molécule aux propriétés osmoprotectrices, elle est puisée massivement à partir du milieu de croissance afin d'assurer l'équilibre osmotique de la cellule (teneur x 54 et x 24 pour les souches 54C et 1157D).

. Le glutamate : sa teneur intracellulaire reste modeste par rapport à celles rencontrées en M63. Il est vrai que l'osmoprotection apportée par la proline normalise son taux.

. Lalanine : comme en milieu M63, elle est aussi accumulée en quantités relativement importantes.

(la valine, la leucine et le GABA sont accessoirement concernés chez la souche 54C).

Contrairement aux observations faites en milieu M63, la souche 54C accumule à partir du milieu extérieur plus d'acides aminés que la souche 1157D. Ceci étant particulièrement valable pour la proline. En outre, il existe une bonne corrélation entre le taux intracellulaire d'acides aminés et la croissance maximale en BTS salé. En effet, la souche 54C résiste à une plus forte concentration saline que la 1157D (1,02 contre 0,85M).

Toutefois, il faudrait tenir compte du fait qu'à concentrations salines égales, le BTS exerce une pression osmotique légèrement plus faible que celle due au M63 (Annexe n°20). La teneur en acides aminés libres est exprimée par rapport à un poids sec bactérien. Cette représentation reste discutable car elle ne permet pas de rendre compte de la teneur relative en protéines bactériennes.

En milieu M63, on trouve sur les chromatogrammes (au temps 1250 environ)

un pic assez important. Il présente des variations inverses à celles du glutamate c'est-à-dire une diminution en milieu salé et une normalisation en présence de G.B. Cet acide aminé (et non un dipeptide car résiste à l'hydrolyse acide) jouerait un rôle dans les phénomènes d'osmorégulation. Les différentes tentatives pour la détermination de sa structure chimique en spectrométrie de masse n'ont pas abouti. Certes une formule brute correspondant à la β -chloroalanine nous a été proposée mais sa comparaison avec la molécule commercialisée (Sigma Co) est négative.

En milieu BTS, ce pic n'existe pas. On note cependant l'apparition de 2 autres pics dont l'un n'existe qu'à une concentration saline de 0,68M. Il correspondrait à la substance Dragendorff-positive décelée chez E.coli croissant sur BTS salé.

3 - Discussion

En milieu minéral minimum, l'une des stratégies essentielles mises en œuvre par E.coli face au stress osmotique est la synthèse de novo d'acides aminés. Parmi ceux-ci, nous l'avons constaté, le glutamate est prépondérant. Ceci rejoint les observations faites par différents auteurs (TEMPEST et COLL, 1970 ; MEASURES, 1970 ; LARSEN et COLL, 1987). Le glutamate sert à contre-balance une partie (20%) des ions K^+ et donc à maintenir l'électroneutralité de la cellule (EPSTEIN, 1986 ; LARSEN et COLL, 1987). L'aspartate interviendrait aussi dans ce même but, alors que la synthèse de la lysine chargée positivement est freinée. L'autre partie du glutamate est utilisée probablement à la synthèse d'acides aminés et de multiples autres molécules biochimiques.

Lorsque l'on s'intéresse à la croissance des souches de E.coli (1157D, 1412C et 54C) en M63 et M63 + G.B et leur capacité de synthèse d'acides aminés, on remarque que :

- chez la 1157D, il y a forte synthèse de novo d'acides aminés mais faible accumulation de G.B.
- chez la 1412C, il y a synthèse d'acides aminés et accumulation de G.B, à des niveaux moyens.
- chez la 54C, il y a faible synthèse d'acides aminés mais forte accumulation de G.B.

En milieu complexe, la 54C montre encore des capacités élevées de "pompage" d'acides aminés à partir du milieu extérieur, la proline est particulièrement concernée. Les capacités d'accumulation exogène de la 1157D sont limitées. Il faut ajouter qu'en milieu BTS salé, E.coli accumule non seulement de la proline mais aussi d'autres substances osmoprotectrices (parmi elles, probablement la G.B) et dans ces conditions, il y a donc diminution du taux intracellulaire d'acides aminés.

Les souches de E.coli diffèrent donc par leurs capacités de croissance en présence de sel, et par celles de production endogène d'acides aminés et d'accumulation

Milieux de culture	Souches					
	6S	54C	82C	1157D	1412C	1422C
M63	1,40	1,55	1,37	1,41	1,59	1,12
M63 + GB ¹	2,25	1,52	1,87	1,25	1,07	1,48
M63 + GB ¹ + CCCP ²	0,90	1,93	1,03	1,80	2,20	1,77
M63 + CCCP ²	1,03	1,85	1,51	1,01	1,47	1,66
M63/0,5	11,76	6,25	15,20	16,67	9,40	9,78
M63/0,5 + GB	1,36	2,10	4,04	1,93	0,90	1,92
M63/0,5 + GB + CCCP	1,12	2,80	2,74	1,57	3,90	2,32
M63/0,5 + CCCP	5,20	5,30	9,67	9,16	16,30	11,57
M63/0,68	10,90	11,36	10,00	15,20	12,35	15,31
M63/0,68 + GB	6,50	3,84	3,48	5,50	3,78	4,70
M63/0,68+GB+CCCP	16,00	10,20	5,76	12,25	3,93	15,50
M63/0,68 + CCCP	8,60	11,67	ND	ND	5,73	ND

Tableau 6 : Teneur intracellulaire en tréhalose (ug/mg de poids sec) chez E.coli, après 24h de culture, à différentes salinités (NaCl : 0,5 et 0,68M).

(1) : (GB) = 1mM (2):(CCCP)=20 μ M (ND): Non Déterminé.

exogène d'acides aminés et de G.B. La forte synthèse de novo d'acides aminés ne permet pas à elle seule une meilleure résistance au stress (souche 1157D), une osmoprotection extérieure est nécessaire.

L'ensemble de ces phénomènes physiologiques est régi par des mécanismes osmorégulatoires. L'effet osmoprotecteur de la G.B et de la proline apparaît lié à la capacité des cellules de les accumuler dans leur cytoplasme. Ces deux substances sont concernées par les mêmes systèmes membranaires de transport ProP et ProU (CAIRNEY et COLL, 1985a, 1985b). La membrane cytoplasmique a un rôle fondamental dans les phénomènes osmorégulatoires. Elle constitue la barrière osmotique des cellules et exerce le contrôle de l'influx et de l'efflux des molécules. Elle est le site des mécanismes de transport actif et des systèmes perméasiques. De ce fait, elle pourrait expliquer les différences de comportement des souches de E.coli face au stress osmotique. Un manque d'intégrité de la membrane chez la souche 1157D expliquerait d'une part l'importante quantité d'acides aminés synthétisés pour assurer l'équilibre osmotique, d'autre part son incapacité de "pomper" la G.B et la proline. Par contre la souche 54C, chez laquelle la membrane cytoplasmique est plus fonctionnelle, synthétise relativement peu d'acides aminés et accumule beaucoup plus les substances osmoprotectrices. La souche 1412C représente un cas intermédiaire.

IV - LE TREHALOSE INTRACELLULAIRE

1 - Résultats: Le tréhalose endogène est déterminé par la méthode à l'anthrone. Les concentrations obtenues sont mentionnées au Tab 6.

A la comparaison des résultats, nous pouvons remarquer une relative homogénéité des valeurs de la teneur en tréhalose intracellulaire :

- En absence de stress, les taux de tréhalose sont à des niveaux bas (moyenne 1,40) et ni la G.B ni le CCCP ne semblent avoir un réel effet sur ceux-ci.

- A osmolarités élevées du milieu, les teneurs en tréhalose augmentent d'une façon considérable. Pour certaines souches (6S, 82C, 1157D) les maxima sont atteints à une salinité de 0,5M, pour les autres (54C, 1412C, 1422C) à 0,68M.

- La G.B réduit d'une façon importante les taux de tréhalose. Toutefois en M63/NaCl 0,68M, le phénomène est moins marqué.

- L'action du CCCP est diversifiée :

* En M63/ 0,5M et en présence de G.B, les teneurs en tréhalose sont faibles. Lorsque le CCCP est rajouté seul au milieu, la synthèse s'accentue et peut devenir très importante chez certaines souches de E.coli (1412C et 1422C).

* En M63/ 0,68M, la réaction des souches au CCCP est variable.

La synthèse endogène de tréhalose par *E.coli* constitue donc une réponse au stress osmotique. L'apport de G.B normalise cette synthèse, celui de CCCP a des effets variés. Les conditions de culture et de récupération des cellules, et l'expression des résultats par rapport à un poids sec sont celles employées pour le dosage du potassium. Aussi, les mêmes remarques inhérentes à cette démarche méthodologique restent valables.

2 - Discussion

Chez *E.coli*, le tréhalose et le glutamate sont les deux osmolytes organiques connus dont la synthèse *de novo* soit provoquée par le stress osmotique. Le tréhalose ne s'accumule pas en absence de stress ou en présence de G.B (LARSEN et COLL, 1987), ce que confirme nos résultats. L'étude de plusieurs souches nous a permis en plus de constater que si leur réaction au stress osmotique va toujours dans le même sens, il n'en est pas de même pour l'ampleur de la synthèse. En outre, pour certaines le taux maximal est atteint à une salinité de 0,5M, pour d'autres à 0,68M.

La synthèse du tréhalose intervient 30min après l'accumulation de potassium et de glutamate. En 2 heures, *E.coli* aura remplacé ses deux osmoprotecteurs initiaux par le tréhalose (DINNBIER et COLL, 1988). Le tréhalose constitue l'osmoprotecteur endogène qui permet à *E.coli* de faire face à long terme, à de faibles ou moyens stress osmotiques. Ceci explique les valeurs élevées obtenues après 24h de culture. Puisque le tréhalose est synthétisé dans le cytoplasme, l'action du CCCP se portera donc uniquement sur le transport actif de la G.B et en fonction de l'osmolarité du milieu. A 0,5M, la salinité est moyenne et le CCCP utilisé à une concentration sub-inhibitrice n'empêche pas le transport de la G.B d'où les valeurs normalisées de taux de tréhalose. Les teneurs de tréhalose reviennent vers des valeurs élevées en présence du seul CCCP. Par contre à une salinité égale à 0,68M le CCCP empêche efficacement la pénétration de G.B et le tréhalose retrouve des taux élevés.

La différence fondamentale entre le potassium et le tréhalose réside donc dans le transport actif du premier et la synthèse endogène du second. L'effet du CCCP n'est pas le même.

Le CCCP agit donc sur le processus d'accumulation du potassium et de la G.B où la FMP semble jouer un rôle non négligeable

Globalement, nous constatons qu'en milieux de fortes osmolarités, *E.coli* réagit en augmentant ses teneurs intracellulaires en K^+ , en acides aminés et en tréhalose. Lorsque la G.B est présente dans le milieu de croissance, celle-ci est pompée.

(NaCl) (M)	CMI du CCCP (μ M) pour			
	<u>E.coli</u> ZB400	<u>E.coli</u> ZB401	<u>Vibrio</u> <u>alginolyticus</u>	<u>Vibrio</u> <u>parahaemolyticus</u>
0,085	> 100	> 100	5	5
0,50	40	50	2,5	2,5
0,68	20	40	2,5	2,5
0,85	20	20	1,25	2,5
1,02	20	20	1,25	0,625
1,20	(-)	(-)	0,312	0,312

Tableau 7 : CMI du CCCP en Bouillon Trypticase-Soja.
(-): absence de croissance.

Son accumulation entraîne automatiquement la normalisation des taux des autres osmolytes. Cependant, l'ampleur de ces réactions diffère d'une souche de E.coli à une autre.

. Chez la souche 1157D, il y a forte synthèse endogène d'acides aminés et de tréhalose. Par contre, ses capacités d'accumulation de G.B et de proline sont limitées. Les teneurs maximales en sel tolérées ne sont pas maximales.

. Chez la souche 54C, l'accumulation de G.B et de proline est optimale. Les capacités de synthèse endogène sont minimes. Le résultat de l'accumulation d'osmoprotecteurs est une bonne tolérance au sel.

. Chez la souche 1412C, les 2 processus physiologiques sont équivalents et ont une moyenne intensité.

Les ions K^+ ne semblent pas intervenir dans cette différenciation. Leur accumulation est rapide et a plutôt un rôle inducteur des autres phénomènes d'osmoprotection. Ils n'interviennent pas dans l'osmoprotection à long terme de E.coli.

En bref, pour résister au stress osmotique et éviter la déshydratation, E.coli fait intervenir 3 processus physiologiques : synthèse de novo d'acides aminés et de tréhalose et accumulation d'osmoprotecteurs à partir du milieu extérieur. Ces processus peuvent cependant s'effectuer à différents degrés d'intensité. L'ensemble est induit par les ions K^+ qui constituent la réponse primaire au stress.

V - EFFET DU CCCP SUR L'HALOTOLERANCE DE E.COLI

1 - CMI du CCCP

- En milieu minimum M63, la CMI du CCCP pour E.coli 82C (ZB400) est égale à $10\mu M$ pour une teneur en sel de $0,5M$, alors que Vibrio alginolyticus et V.parahaemolyticus sont inhibés respectivement par $2,5$ et $0,650\mu M$.

- En bouillon trypticase-soja(BTS), à une concentration en NaCl égale à $0,085M$, la CMI du CCCP est supérieure à $100\mu M$ pour E.coli. Les souches de Vibrio sont sensibles au CCCP, la CMI est de $5\mu M$ (Tab.7).

Quand la teneur en sel augmente, les valeurs de CMI diminuent. Les écarts constatés sont grands chez E.coli. Chez Vibrio, ils sont minimes ou nuls surtout à des salinités comprises entre $0,5$ et $0,85M$.

- Sur gélose trypticase-soja (Tab 8) certaines constatations s'imposent :

* Les Enterobacteriaceae sont résistantes au CCCP. E.coli et Klebsiella spp le sont plus que Salmonella spp. A des teneurs en NaCl/ $0,5M$ et en CCCP/ $100\mu M$, 48,2% de souches de E.coli et 38,8% de souches de Klebsiella spp ont une croissance

NaCl (M)	cccp (uM)	%																							
		<i>V. alginolyticus</i> n=24			<i>V. parahaemolyticus</i> n=27			<i>E. coli</i> n=27			<i>E. oxytoca</i> n=18			<i>E. pneumonies</i> n=20			<i>Salmonella</i> sp n=20			<i>S. aureus</i>					
		c.n ^a	p.i ^b	c.nu ^c		c.n	p.i	c.nu		c.n	p.i	c.nu		c.n	p.i	c.nu		c.n	p.i	c.nu		c.n	p.i	c.nu	
0.5	2,5	100				100				100				100				100				100			
	5	66,7	8,3	23	100					100				100				100				100			
	10				100	100				100				100	66,7	31,2		100				100			
	15					100				100				100	6,23	31,2	62,3	100				100			
	20						100			100				100			6,3	93,7	100		100				
	30						100			100				100			100	100			100				
	40							100		100				100			100	100			66,3	33,3			
	50					96,2		3,7	94,4		3,3	100					100				66,6	33,3			
	60					70,3	22,2	7,4	72,2	11,1	16,6	45	30	23			100				66,6	33,3			
	80					66,6	11,1	22,2	55,5	5,55	38,8	20	35	45			100				58,3	41,6			
	100					48,2	27,6	24,1	38,8	11,1	30		20	80			100				23	50	23	100	
0.88	2,5	100				100				100				100			100				100				
	5	66,7		33,3	100					100				100			100				100				
	10				100	100				100				100	56,2	37,3	6,23	100				100			
	15					100				100				100	18,7	37,3	43,7	100				100			
	20						100		88,8	11,1		95	5			18,7	81,3	100				91,6	8,3	100	
	30					96,2		3,7	55,5	33,3	11,1	50	30	20			100	100			66,6	23	8,3	100	
	40					62,9	22,2	14,8	44,4	5,5	50	30	20	50			100	100			41,6	50	8,3	100	
	50					40,7	40,7	18,3	38,8		61,1		20	80				100				41,6	16,6	41,6	100
0.85	2,5	100				100				100				100			100				100				
	5	20,8	12,5	54,16	100					100				100			100				100				
	10					100	80	20		72,2	16,6	11,1	100			56,2	37,3	6,23	100			100			
	20					59,2	23,2	14,8	44,4	33,3	22,2	20	25	55			100	100			100				
	30					24,1	41,3	34,4	22,2		77,7		20	80			100	100			91,6	8,3	100		

Pourcentages de souches bactériennes résistantes au CCCP, sur

Tab.8 gélose Trypticase-Soja, à différentes concentrations salines, en 24H.

(a):c.n=croissance normale,(b):p.i=partiellement inhibée,(c):c.nu=croissance nulle.

normale. Dans les mêmes conditions, aucune croissance n'est constatée pour Salmonella spp. De plus, la résistance au CCCP des Enterobacteriaceae semble dépendre de la concentration en sel.

* Les souches de Vibrio alginolyticus et V.parahaemolyticus sont très sensibles au CCCP. Elles sont totalement inhibées par une concentration égale à $10\mu\text{M}$ quelle que soit la teneur en sel utilisée.

* Streptococcus faecalis est très résistant au CCCP. Une inhibition est seulement constatée vers des teneurs en sel de $0,68\text{M}$ et en CCCP de $50\mu\text{M}$. Néanmoins, cette résistance dépend de la salinité. Chez les autres bactéries à Gram-positif, l'action inhibitrice du CCCP est moyenne et ne semble pas liée à la teneur en sel du milieu. En effet, la croissance normale de S.aureus, S.epidermidis et Micrococcus spp d'une part, et celle de Bacillus sp d'autre part, sont inhibées respectivement par $20\mu\text{M}$ et $10\mu\text{M}$ CCCP.

* Pseudomonas aeruginosa et P.fluorescens ont le même comportement que celui des Enterobacteriaceae, par contre P.putida résiste au CCCP à la concentration de $30\mu\text{M}$ quelle que soit la salinité.

2 - Action du CCCP sur des populations bactériennes (Fig 6) (Annexes 11,12,13)

L'effet du CCCP sur une population de E.coli isolés du littoral (Annexe 11) montre qu'une concentration sub-inhibitrice ($20\mu\text{M}$) réduit le nombre de souches croissant en M63, M63 + G.B, M63 + Proline, contenant NaCl/ $0,5\text{M}$. L'inhibition de toutes les souches intervient alors à une salinité de $0,68\text{M}$. La résistance de E.coli est meilleure en milieu riche et modérée en présence de G.B ou de proline.

Les mêmes observations restent valables pour les souches de E.coli d'origine hospitalière sauf que la proline semble être un meilleur antagoniste que la G.B face au CCCP.

D'autre part, aucune croissance de Vibrio n'est observée en présence de CCCP/ $10\mu\text{M}$. Une concentration sub-inhibitrice ($1,25\mu\text{M}$) entraîne déjà une inhibition partielle en M63/NaCl $0,68\text{M}$ et en BTS/NaCl $0,85\text{M}$. L'inhibition en M63 + G.B est intermédiaire.

3 - Croissance de E.coli (Fig 7)

L'étude de la croissance de 6 souches de E.coli du littoral choisies selon certaines capacités de croissance, de résistance au CCCP ou de production d'acides aminés (cf : Matériel et Méthodes) donne les résultats suivants :

- * L'effet de la G.B est bénéfique pour toutes les souches.
- * La croissance en présence de sel ($0,68\text{M}$) peut être nulle (1168C et 1415C), faible (1157D), modérée (200C et 1165C) ou forte (54C). Ceci confirme d'ailleurs nos résultats présentés en annexe 1.

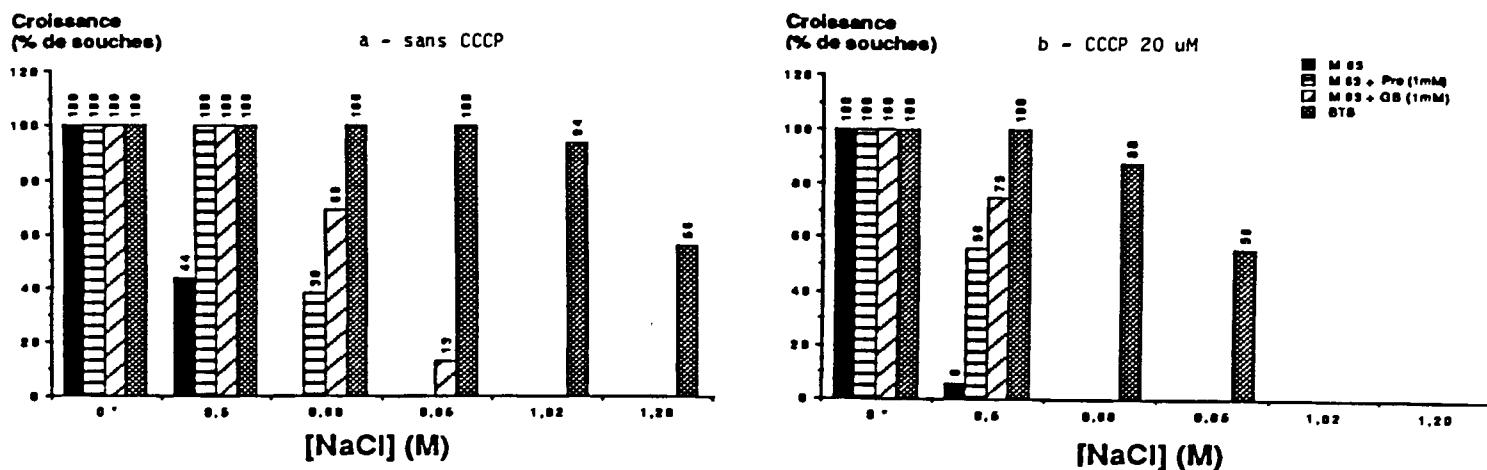
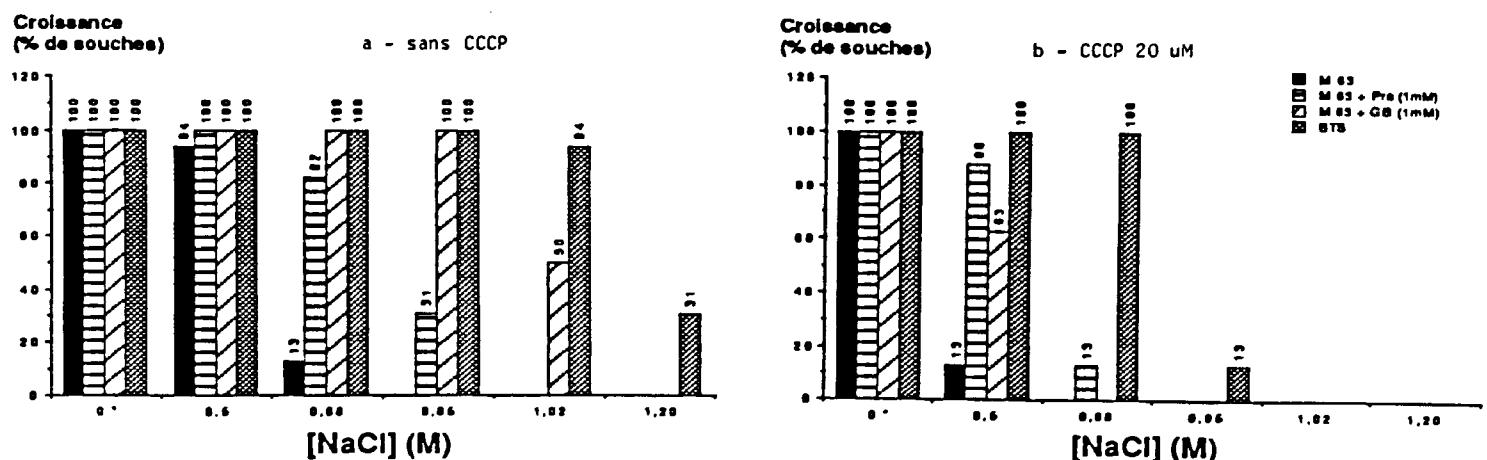
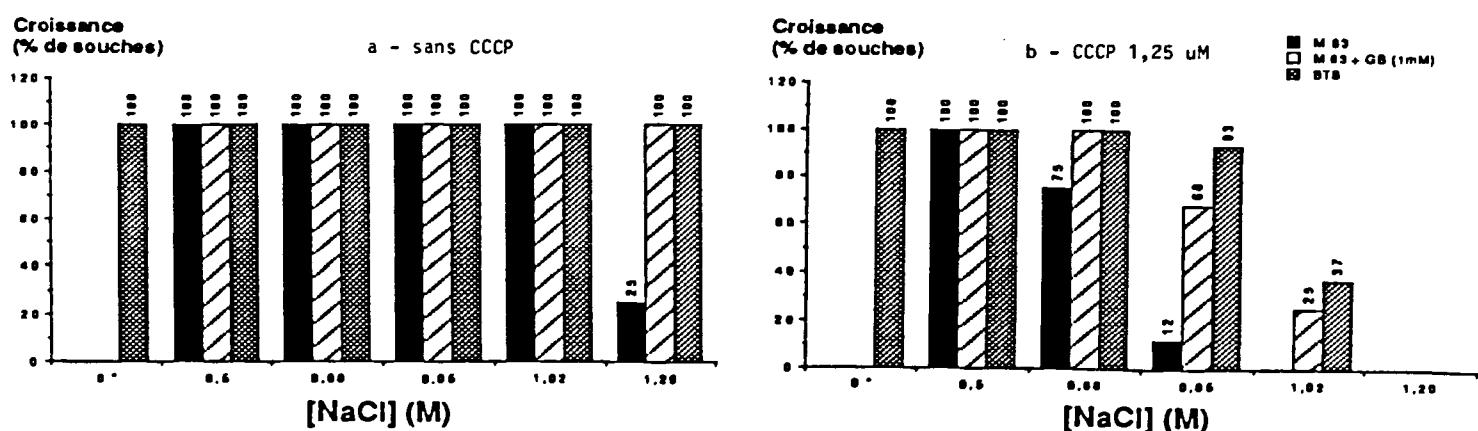
E.coli - littoral (16 souches)E.coli - hôpital (16 souches)Vibrio spp - littoral (16 souches)

Fig. 6: Pourcentages de souches bactériennes présentant une culture en 24h, en fonction de la nature du milieu et en absence (a) ou en présence (b) de CCCP.

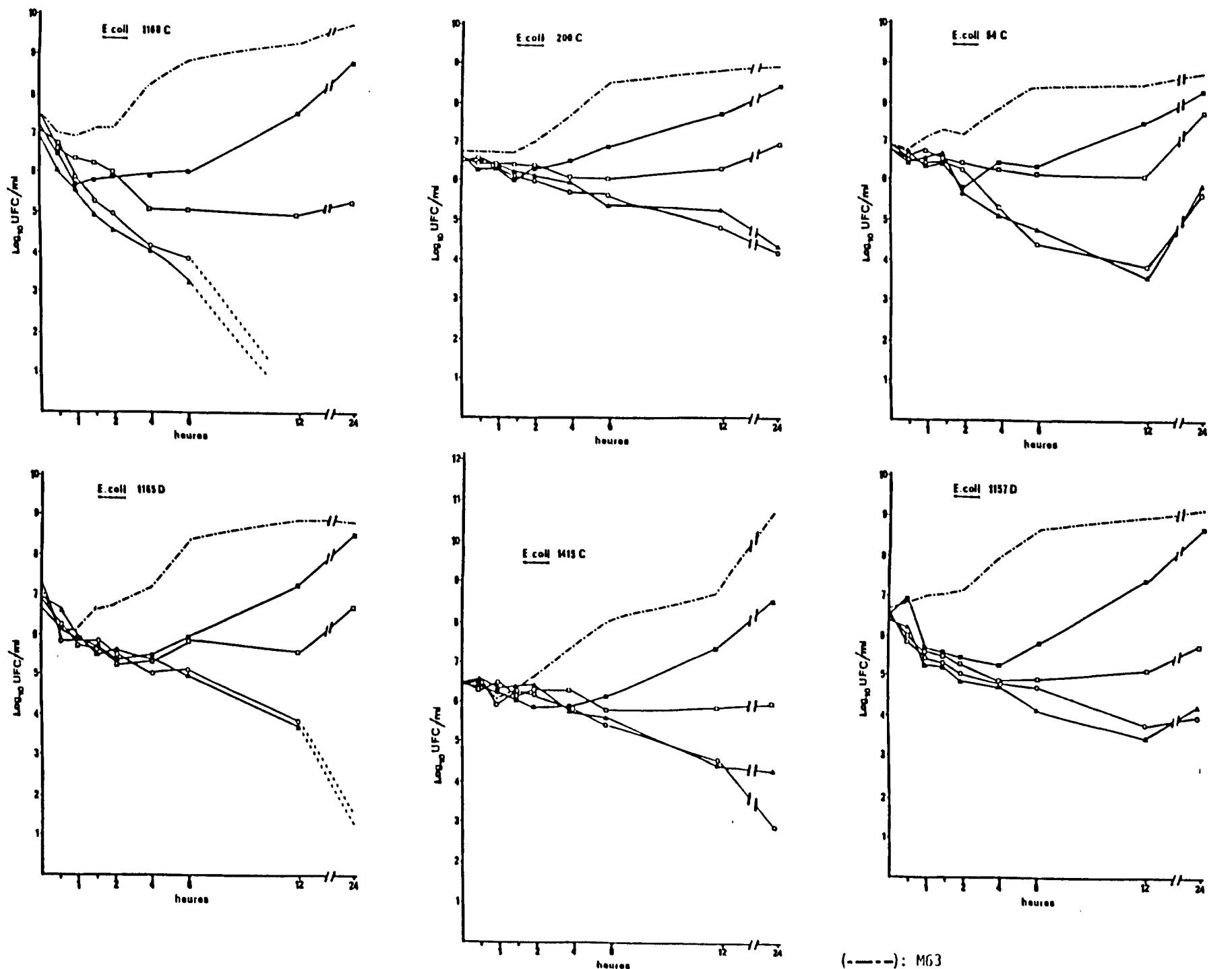


Fig. 7: Effets de la glycine bétaine (1mM) et/ou du CCCP (20μM) sur la croissance de *E.coli*.

(---) : M63
 (□) : M63/NaCl 0,68M
 (■) : M63/NaCl 0,68M + G.B(1mM)
 (▲) : M63/NaCl 0,68M + G.B(1mM) + CCCP(20μM).
 (○) : M63/NaCl 0,68M + CCCP(20μM).

* L'action du CCCP (20 μ M) peut aussi revêtir plusieurs aspects :

- Les souches 1168C et 1165C y sont très sensibles (numérations inférieures à 10³UFC/ml après 6 ou 12h d'incubation).

- Les souches 200C et 1415C montrent une résistance moyenne au CCCP (5.10⁴ UFC/ml en 24h). De plus chez la 1415C, la G.B semble s'opposer à l'action du CCCP.

- La meilleure résistance au CCCP est obtenue chez les souches 54C et 1157D (10⁶ et 10⁴ UFC/ml en 24h). L'adaptation est réalisée après 12h d'incubation.

4 - Discussion

La résistance de E.coli au CCCP dépend de la nature du milieu. Pour une teneur en NaCl égale à 0,085M, la CMI se situe aux environs de 50 μ M en M63 et est supérieure à 100 μ M en BTS. Ces résultats correspondent à ceux indiqués par KINOSHITA et COLL (1984). Elle dépend aussi de la salinité : les valeurs de la CMI diminuent fortement quand la teneur en NaCl augmente. La CMI est seulement de 20 μ M pour une salinité comprise entre 0,68 et 1,02M. Chez E.coli c'est l'antiport Na⁺/H⁺ qui fonctionne, et les cellules peuvent ainsi croître en absence de FMP quand le glucose constitue la source d'énergie (KINOSHITA et COLL, 1984). Nos résultats peuvent être interprétés comme une combinaison des effets du CCCP et du stress osmotique. L'inhibition intervient quand l'énergie fournie par la voie glycolytique devient insuffisante.

Au contraire, chez les souches de Vibrio, la nature du milieu de croissance, riche ou minimum, semble n'avoir aucune influence sur l'action inhibitrice du CCCP. Dans les 2 cas, les souches sont très sensibles. A pH 7,2 les CMI sont de l'ordre de 2,5 μ M. Des valeurs de même grandeur sont signalées par TOKUDA et UNEMOTO (1983). A ce pH, la sensibilité au CCCP est élevée puisque c'est la pompe H⁺ qui fonctionne. Par contre à pH alcalin (8,5), et selon les auteurs, ce serait la pompe Na⁺ (TOKUDA et UNEMOTO, 1983) ou l'antiport Na⁺/H⁺ (McLEOD et COLL, 1988) qui fonctionnerait, rendant Vibrio plus résistant au CCCP. De plus, il est intéressant de noter que cette inhibition est indépendante de la concentration en sel. Chez Vibrio, il y a absence de stress osmotique et l'inhibition constatée est due au seul CCCP.

. Chez les bactéries à Gram-positif, il faut noter la sensibilité au CCCP de Staphylococcus aureus, S.epidermidis, Micrococcus spp (20 μ M) et Bacillus sp (10 μ M). GUFFANTI et COLL (1987) indiquent des valeurs de même grandeur concernant Bacillus subtilis. En tous les cas, cette inhibition semble indépendante de la teneur en NaCl du milieu de croissance. La FMP doit avoir un rôle primordial dans l'énergétique de ces cellules. Au contraire Streptococcus faecalis montre une résistance au CCCP : une croissance normale est encore constatée en présence de 100 μ M CCCP à une teneur en sel égale à 0,5M. Cependant, cette résistance est réduite avec l'augmentation de la

concentration saline : le stress osmotique s'ajoute à l'action du CCCP. HEEFNER et HAROLD (1982) et KINOSHITA et COLL (1984) ont montré l'existence chez *S.faecalis* d'une ATPase - Na^+ distincte de l'ATPase - H^+ . Cette enzyme est affectée par la concentration en ions Na^+ dont elle assure la translocation et son activité s'accroît en absence de FMP.

Les souches de Pseudomonas (organismes halotolérants, aérobies-stricts) ont des comportements différents selon l'espèce considérée. P.aeruginosa et P.fluorescens sont plus sensibles au CCCP que P.putida qui montre une extrême résistance quelle que soit la teneur en sel utilisée. La FMP ne semble pas obligatoire à sa croissance.

L'effet du CCCP sur une population bactérienne montre que les souches de E.coli sont sensibles en milieu minimum. En présence d'osmoprotecteurs (G.B ou proline), leur résistance au CCCP s'accroît. Il est démontré que dans ces conditions de stress osmotique ces 2 molécules sont accumulées par la cellule et ne sont impliquées dans aucune voie métabolique (LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983 ; PERROUD et LE RUDULIER, 1985 ; DUNLAP et CSONKA, 1985a ; GROTHE et COLL, 1986). Cette résistance est particulièrement notable en milieu riche. Ainsi la présence d'osmoprotecteurs augmente la résistance de E.coli au CCCP. ROTH et COLL (1988) ont montré que chez des cellules subissant un choc osmotique, la G.B stimulait la production d'ATP via une accélération du transport de glucose. Toutefois cette résistance de E.coli dépend de la teneur en NaCl . L'inhibition en M63 est due à une dissipation partielle de la FMP (KINOSHITA et COLL, 1984). L'énergie produite par la glycolyse est insuffisante pour lutter contre le stress osmotique. En présence d'osmoprotecteurs ou en milieu riche, l'inhibition serait due à un ralentissement du transport actif des solutés compatibles. En effet, le transport de la proline est étroitement lié à la FMP (PELEG et COLL, 1980 ; DUNLAP et CSONKA, 1985a). Quant à la G.B, l'intervention de la FMP n'est pas élucidée. Selon PERROUD et LE RUDULIER (1985), la FMP est nécessaire au transport actif de la G.B. Au contraire, d'après HIGGINS et COLL (1985, 1987), puisque le transport de la G.B est assuré par une protéine de liaison périplasmique, ce serait donc l'hydrolyse directe de l'ATP et non la FMP qui fournirait l'énergie. En tous les cas chez E.coli, l'énergie produite devient insuffisante quand augmente le stress osmotique.

Chez les souches de Vibrio, à pH neutre, la FMP est cruciale. L'inhibition par le CCCP est très importante en M63. En milieu riche et en M63 + G.B, l'inhibition est modérée et est due à un ralentissement des solutés compatibles.

Lorsque l'on suit la croissance de souches de E.coli en présence de CCCP (Fig7) on remarque l'existence de 3 catégories de souches selon les profils : les unes y sont très sensibles, les autres modérément inhibées, les autres enfin résistantes. Ceci confirme les résultats obtenus sur gélose trypticase-soja (Tab 8). Mais la croissance en 24h, en M63/ NaCl 0,68M reste faible (le maximum atteint est d'environ 10^6 UFC/ml

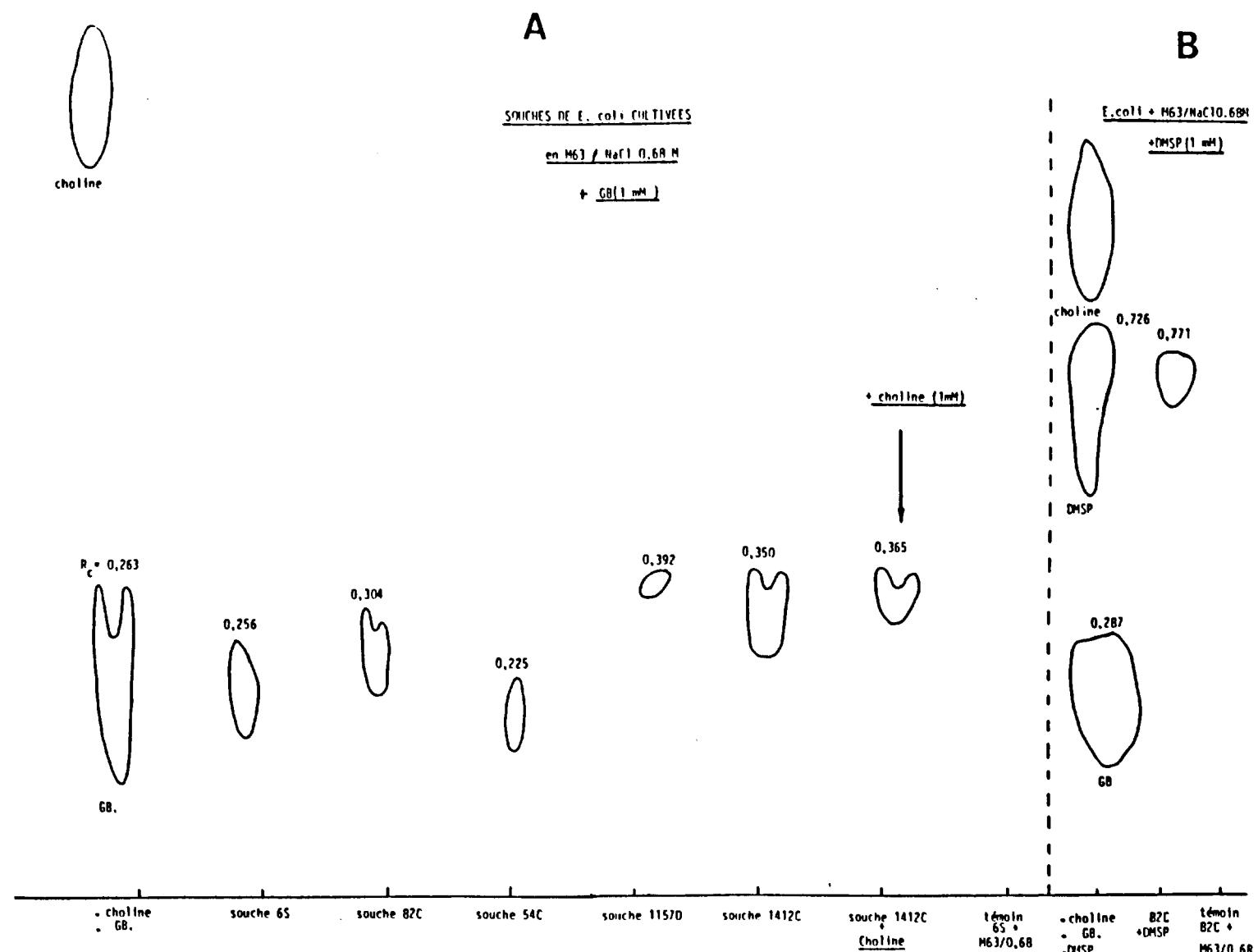


Fig.8: Electrophorégrammes montrant l'accumulation par *E.coli* de GB ou de DXSP lorsqu'ils sont fournis dans le milieu de croissance.

pour la souche 54C) et ne permet pas de cultures visibles, ce qui rejoint les données présentées en annexes 11, 12, 13. Enfin, il ne semble pas y avoir de relations entre les critères choisis initialement pour les souches (production d'acides aminés, teneur en sel tolérée et résistance au CCCP sur gélose trypticase-soja) et l'action du CCCP en milieu minimum. Cela viendrait du fait que la concentration en NaCl choisie (0,68M) est maximale et déjà limitante. Enfin nous remarquerons l'action de la G.B dans la restauration de la croissance de toutes les souches.

VI - ACCUMULATION D'OSMOPROTECTEURS A PARTIR DE MILIEUX DE CULTURE

1 - A partir du M63 enrichi en G.B, choline ou DMSP. (Fig 8)

L'électrophorèse en haute tension s'est révélée un outil très efficace dans la détection de substances osmoprotectrices accumulées par *E.coli*. L'électrophorégramme d'extraits hydro-alcooliques bactériens (Fig 8) montre la présence d'une substance Dragendorff-positive migrant au même niveau que la G.B. Leurs R_c diffèrent quelque peu mais ceci serait plutôt dû à la quantité relative accumulée (une faible quantité donne une plus longue distance de migration). Les 5 souches testées, sauf le témoin, en accumulent.

Il est bien établi que la G.B est accumulée par les cellules de *E.coli* soumises à un stress osmotique et qu'elle n'est pas métabolisée. En outre, il n'y a pas de synthèse endogène de G.B (PERROUD et LE RUDULIER, 1985 ; LANDFALD et STRØM, 1986 ; LARSEN et COLL, 1987). La substance Dragendorff-positive est donc de la G.B accumulée à partir du milieu de croissance.

Lorsque la choline remplace la G.B dans le milieu de culture (M63), aucun spot n'est détecté sur l'électrophorégramme au niveau de la choline. Par contre un spot est révélé au niveau de la G.B. LANDFALD et STRØM (1986) ont établi la voie de conversion de la choline en G.B chez des cellules stressées de *E.coli* K12. Celle-ci est transformée automatiquement en G.B. Ceci confirme donc nos résultats obtenus par électrophorèse (Fig 8A). Selon LARSEN et COLL (1987) : "Les bétaines sont accumulées dans les cellules (de *E.coli* K-10), et ne sont pas modifiées chimiquement". Qu'en est-il du DMSP, composé sulfonium tertiaire ? Lorsqu'il est fourni au milieu de croissance, l'on constate un spot de migration au niveau de la solution-standard de DMSP (Fig 8B). Au même titre que la G.B, le DMSP est donc accumulé par *E.coli* sans être métabolisé.

2 - A partir du bouillon trypticase-soja (Fig 9a, 9b)

Les électrophorégrammes (Fig 9a) d'extraits hydro-alcooliques bactériens montrent l'existence d'une substance Dragendorff-positive migrant au même niveau que la G.B (valeurs des R_c très proches). Elle est accumulée en quantités appréciables et n'est détectée qu'à partir de BTS salé : NaCl/ 0,68 et 0,85M. Dans ce deuxième cas, elle semble encore plus importante et on remarquera l'apparition de 3 autres substances

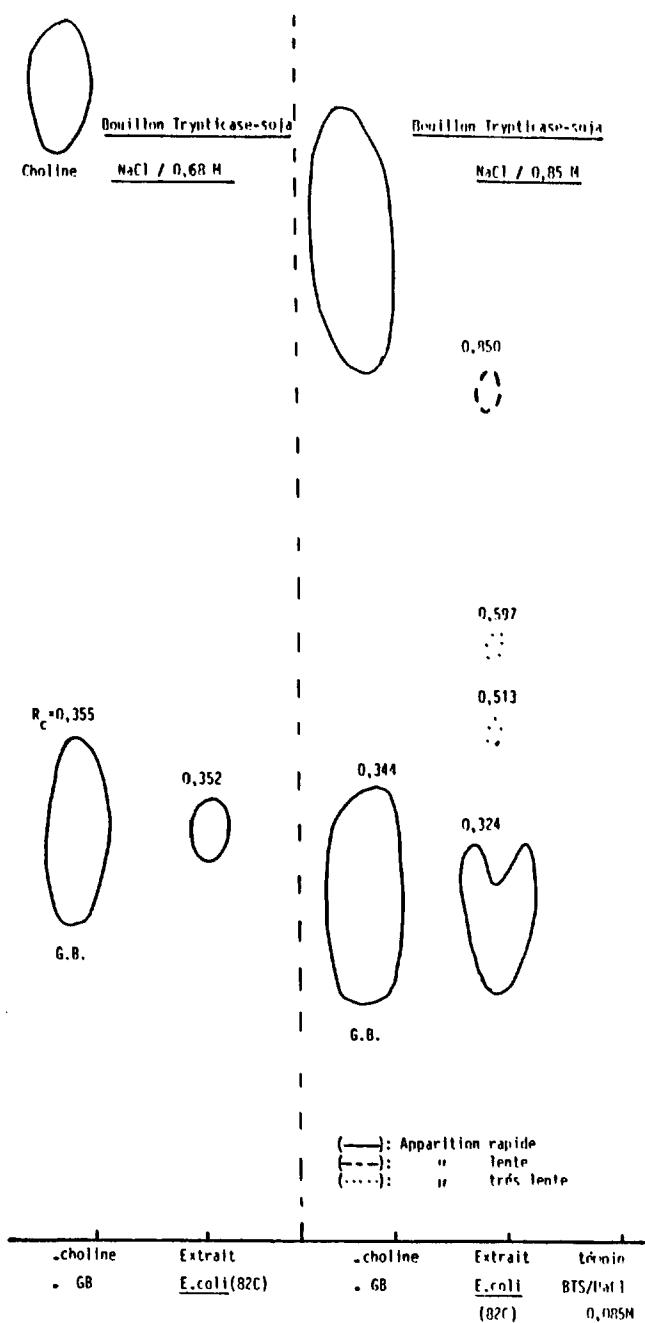
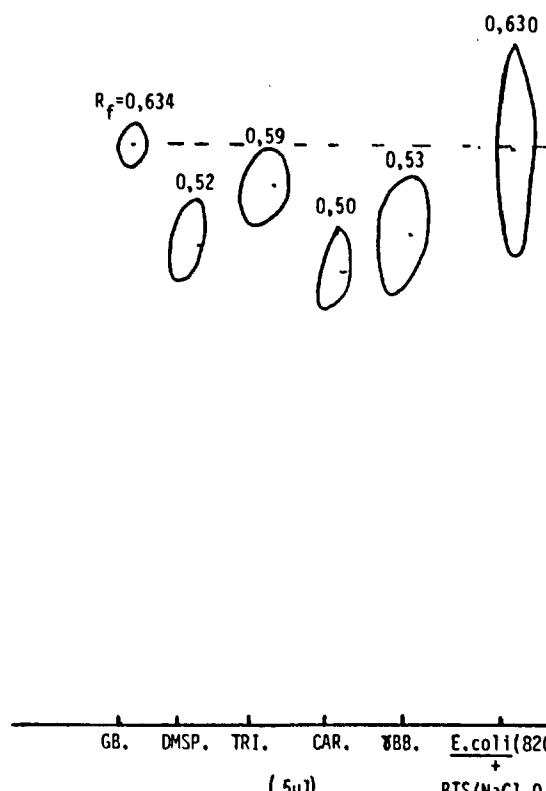


Fig.9: a) Electrophorégrammes montrant l'accumulation par E. coli de substances Dragendorff-positives à partir de BTS salé.

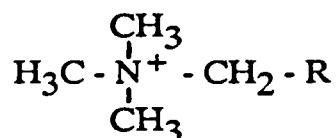
- Gel de silice
- Méthanol-NH₄OH (3:1).



b) Chromatogramme sur couche mince de solutions bétainiques-étalons et de la substance Dragendorff-positive isolée à partir de cultures bactériennes sur bouillon trypticase-soja/NaCl 0,85M.

dont l'une ($R_c = 0,85$) est en quantités non négligeables. Ainsi l'accumulation de composés Dragendorff-positifs semble proportionnelle à l'osmolarité du milieu de croissance. Les mêmes résultats sont constatés avec d'autres souches de *E.coli* (6S, 54C, 1157D, 1412C et 1422C). Aussi, lorsque les extraits sont réunis et soumis à la chromatographie sur papier, le même spot équivalent à celui de la G.B ($R_f = 0,80$) est obtenu. De même que la valeur du R_f (0,630) obtenue sur gel de silice en méthanol- NH_4OH correspond à celle de la G.B (0,634) (Fig 9b).

En spectrométrie de masse, seule l'existence de l'ammonium quaternaire a été confirmée .



Finalement, nos résultats suggèrent donc que des composés osmoprotecteurs dont (vraisemblablement) la G.B sont puisés par les souches de *E.coli* à partir de BTS d'osmolarités élevées. Parmi eux, la G.B est prépondérante.

3 - Discussion

Lorsqu'il est soumis à de fortes osmolarités du milieu, *E.coli* accumule la G.B à partir du milieu extérieur ou par transformation enzymatique de la choline. Les souches testées accumulent dans leur totalité la G.B mais peut-être à des taux différents. Ainsi le phénomène semble général chez *E.coli*. Dans les mêmes conditions, le DMSP est puisé à partir du milieu de croissance sans subir une quelconque métabolisation. Le transport actif de la G.B et de la proline est assuré par 2 systèmes ProU et ProP qui sont largement non spécifiques. Selon STRØM et COLL (1986) il serait surprenant que *E.coli* ait développé d'autres systèmes de transport pour de rares bétaines telles la proline bétaine et la γ -butyrobétaine. ProU et ProP assureraient le transport d'autres bétaines osmoprotectrices . Dans le même ordre d'idée, est-il permis de spéculer que les 2 systèmes réalisent aussi l'accumulation du DMSP ?

Les hautes valeurs d'osmolarités tolérées par les différentes espèces bactériennes testées en milieu BTS ne sauraient être expliquées par la seule présence de la proline, faible osmoprotecteur (LE RUDULIER et BOUILLARD, 1983 ; CAIRNEY et COLL, 1985a). La présence de substances Dragendorff-positives, dont (probablement) la G.B est démontrée chez des cellules stressées en milieu BTS. Ainsi, elle explique dans ces conditions les grandes capacités osmotolérantes de *E.coli* et des autres espèces bactériennes. En milieu BTS salé, il y a donc principalement accumulation de proline et de G.B par les cellules bactériennes. Une synergie entre les deux osmoprotecteurs semble exister vu les taux de croissance observés. La G.B serait

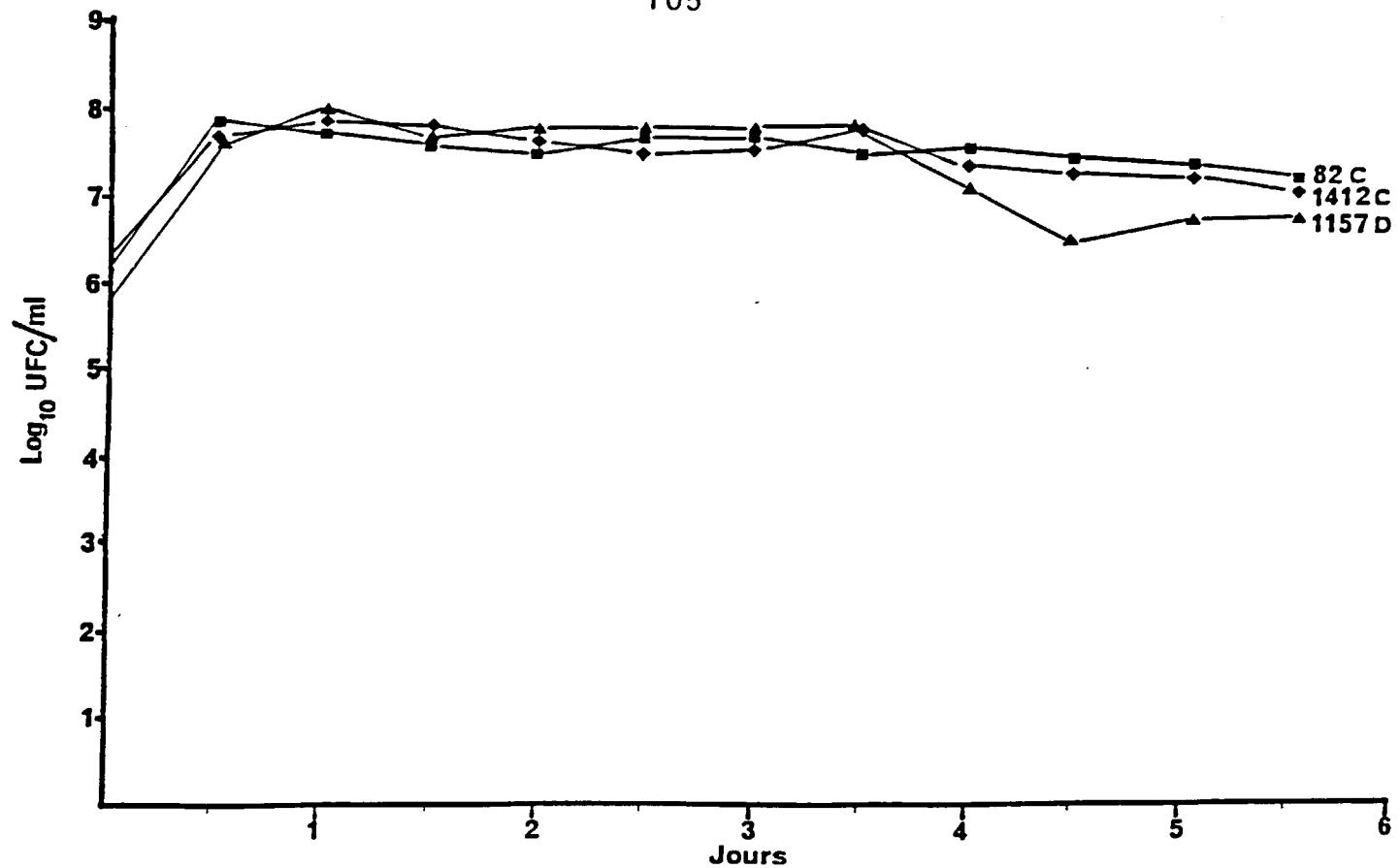


Fig.10 : Survie de E.coli en présence de sédiments (10% pds/vol) + eau de mer.

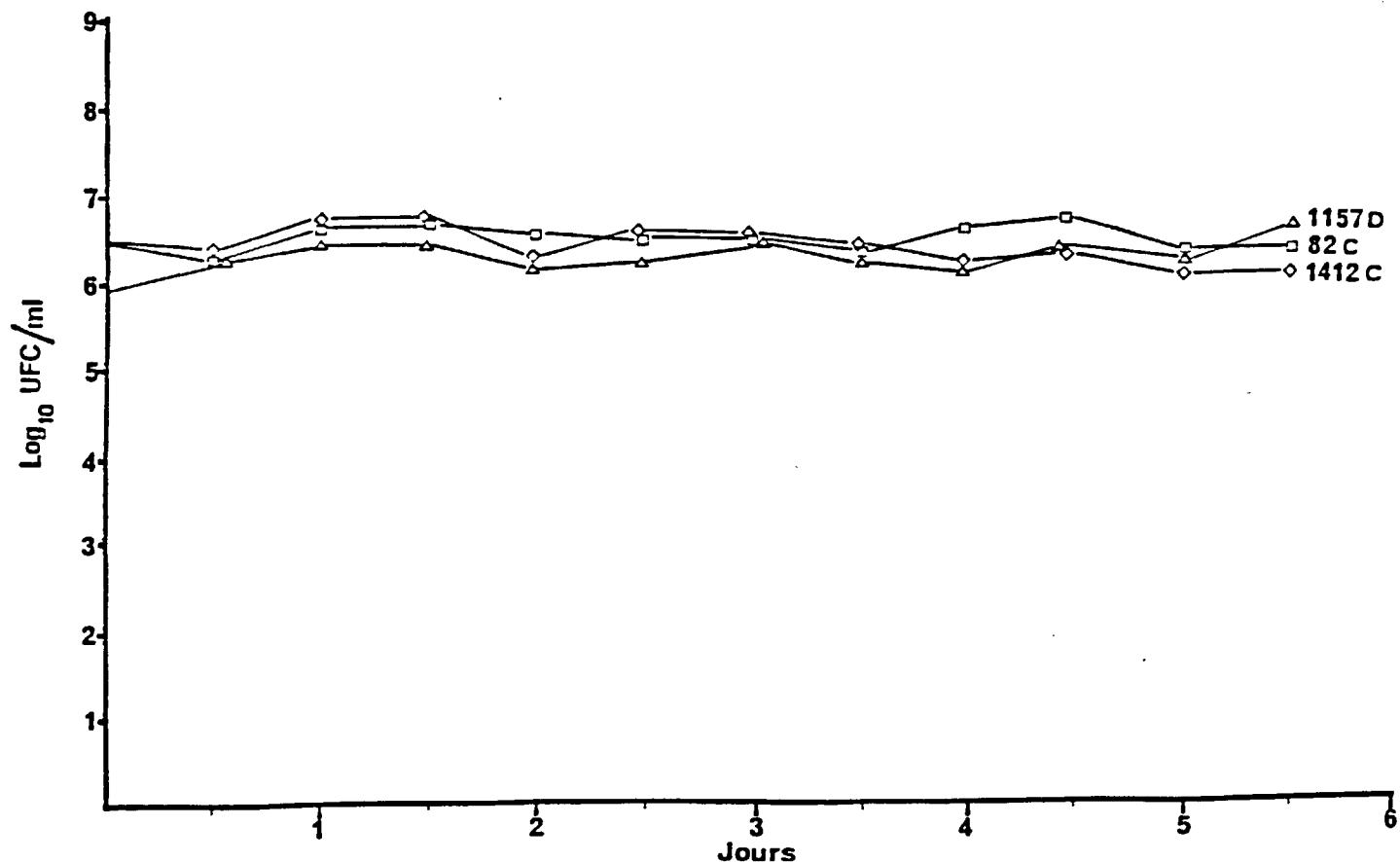


Fig.11 : Survie de E.coli en eau de mer additionnée de $KCl, 100mM$; $(NH_4)_2SO_4, 15mM$; $MgSO_4 \cdot 7H_2O, 1 mM$; $FeSO_4, 3.9uM$ et de Glucose, $10mM$.

plutôt véhiculée par la peptone de soja. Vu la richesse en osmoprotecteurs du BTS, il faudrait donc éviter ce milieu de culture quand il s'agit de mesurer l'halotolérance bactérienne.

VII - SEDIMENTS MARINS ET OSMOPROTECTION DE E.COLI

1 - Croissance de E.coli

En présence de sédiments, le taux de croissance des souches de E.coli 82C, 1157D et 1412C atteint un maximum en 24h puis se stabilise vers 9.10^7 UFC/ml (Fig 10). Le même profil de croissance est observé pour les 3 souches. Au contraire, aucune croissance n'existe en eau de mer : le nombre de cellules reste constant (3.10^6 UFC/ml) (Fig 11). Les souches de E.coli se maintiennent en survie tout au long de l'expérimentation.

Ainsi, les cultures bactériennes sur sédiments en vue de la purification de G.B sont obtenues après 24h d'incubation puisque la croissance y est alors maximale.

En eau de mer additionnée d'ingrédients du M63, aucune croissance n'est observée, la survie des bactéries est remarquable pendant la durée de l'expérience (10^6 UFC/ml). En eau de mer ou en M63/NaCl 0,6M additionnés de sédiments, la croissance est moyenne (10^7 UFC/ml en moyenne). Cependant l'apport de glucose, matière organique directement assimilable, permet une meilleure croissance de E.coli sur sédiments (10^9 UFC/ml) (Tab 9). La limitation de la croissance est due à la source d'énergie (carbone organique) et non pas à l'effet inhibiteur de NaCl

2 - Effet osmoprotecteur de la substance purifiée

La substance purifiée à partir d'extraits hydro-alcooliques de bactéries est testée pour son éventuel rôle osmoprotecteur. Les résultats (Fig 12) montrent que lorsque E.coli 82C est cultivée dans du M63/NaCl 0,85M, l'inhibition de la croissance est due à l'osmolarité élevée du milieu. Lorsque 10 μ l de l'extrait purifié sont ajoutés, la croissance est restaurée; elle est proportionnelle à la quantité apportée.

3 - Identification de l'osmoprotecteur accumulé par E.coli à partir de sédiments

3-1 - Par électrophorèse et CCM :

L'électrophorégramme obtenu à partir de cultures sur sédiments (Fig 13) montre la présence d'une substance Dragendorff-positive migrant au même niveau que la G.B. Sa détection est rapide. Elle est encore plus importante en présence de glucose ou de sédiments (20%). Elle est absente lorsque la culture est réalisée uniquement sur eau de mer. En électrophorèse, les Rc calculés à partir de plusieurs électrophorégrammes correspondent en général à celui de la G.B (Rc moyen = 0,31).

Souche de <i>E.coli</i>	Eau de mer + Ingrédients M63*	Eau de mer + Sédiments	Sédiments + M63/NaCl 0,6M	Sédiments + M63/NaCl 0,6M + Glucose
82C	$3,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$1,5 \times 10^9$
1157D	$3,3 \times 10^6$	$3,7 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$
1412C	$8,7 \times 10^6$	$4,9 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$

Tableau 9 : Numérations bactériennes (UFC/ml) après 24h de culture.

(*) L'eau de mer est additionnée de KCl (100mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (15mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1mM), FeSO_4 (3,9 μM) et de glucose (10mM).

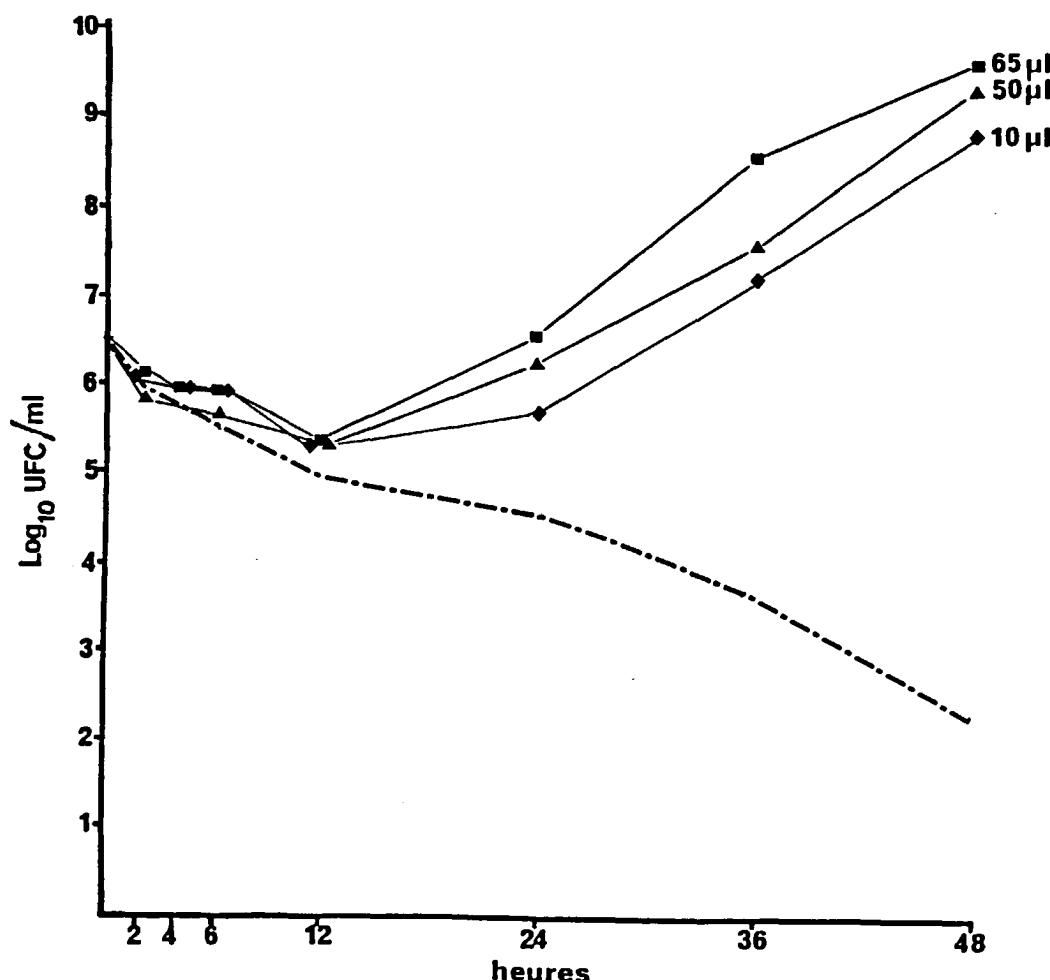


Fig.12 : Croissance de *E.coli* en M63/NaCl 0,85 M en présence de la substance Dragendorff-positive purifiée à partir de cultures sur sédiments marins.
 (----) : témoin : M63/NaCl 0,85 M.

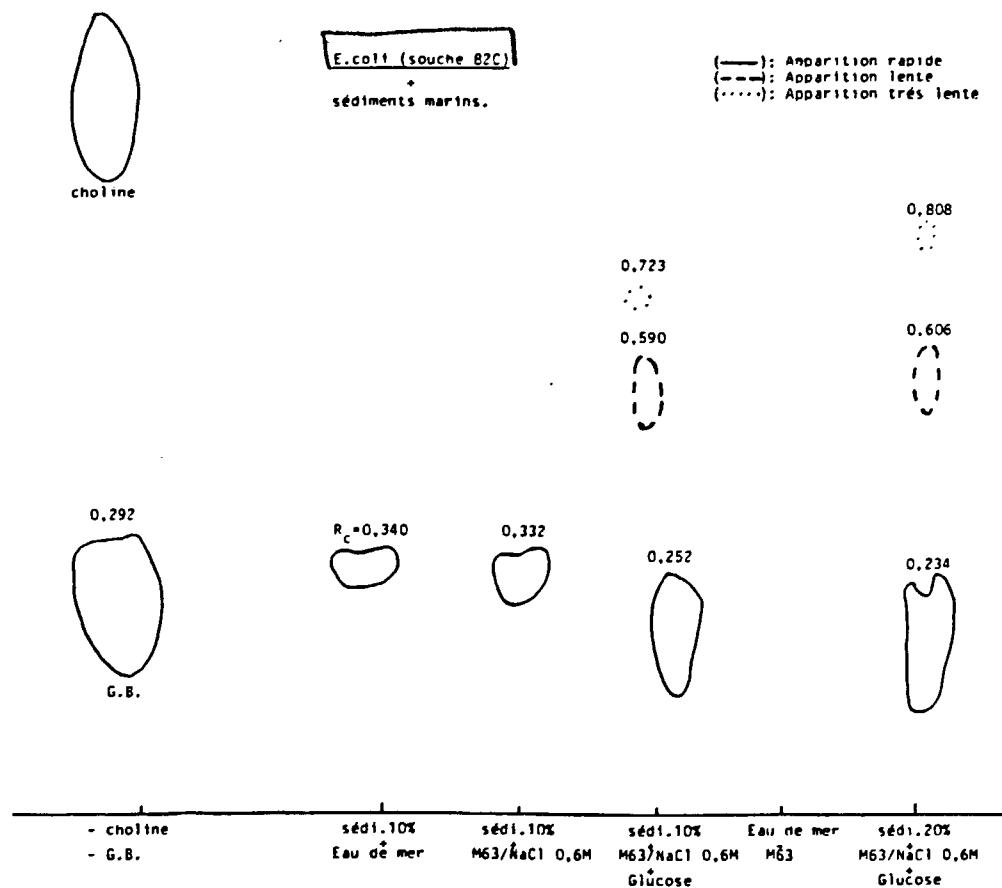
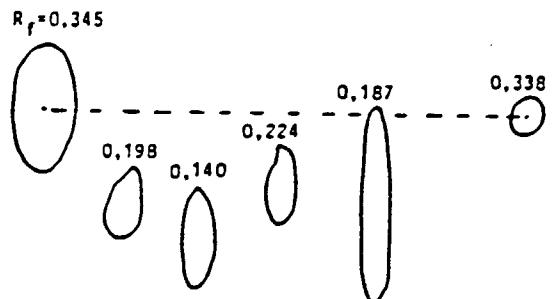
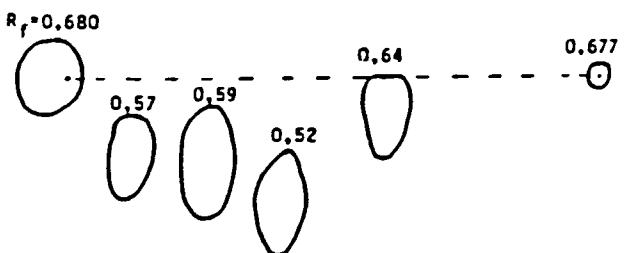


Fig.13: Electrophorégramme des substances Dragendorff-positives accumulées par E.coli cultivé en présence de sédiments marins.

- Gel de silice.
- Méthanol-NH₄OH (3:1).

-Gel de silice
-Isopropanol-Eau (3:1).



GB. DMSP. 888. CAR. SAR. E.coli(82C)
(5u1) + sédiments (10u1)

GB. DMSP. 888. CAR. SAR. E.coli(82C)
(5u1) + sédiments (10u1)

Fig. 14: Chromatogrammes sur couche mince de solutions bétainiques-étalons et de la substance Dragendorff-positive isolée à partir de cultures bactériennes sur sédiments marins.

C'est aussi le cas en chromatographie sur papier, les Rf moyens sont alors de 0,80. Enfin en chromatographie sur gel de silice (Fig 14) les Rf du composé bactérien correspondent à celui de la G.B dans les 2 systèmes de solvants employés : Rf = 0,34 en isopropanol-eau (3 : 1), Rf = 0,68 en méthanol-NH₄OH (3 : 1).

Il est à signaler qu'une seconde substance Dragendorff-positive est accumulée en quantités non négligeables par *E.coli* dans les mêmes conditions. Son R_c moyen est de 0,60. Un autre composé est encore détecté mais inconstamment et en quantités infimes (Fig 13). Après son obtention en quantités suffisantes, la G.B purifiée est soumise à l'identification finale par spectrométrie de masse et spectroscopie de RMN-¹H.

3-2 - Par spectroscopie de RMN-¹H et spectrométrie de masse :

La spectroscopie de RMN-¹H a été auparavant utilisée dans la détermination de la G.B chez *E.coli* (LANDFALD et STRØM, 1986). Le spectre de RMN-¹H (Fig 15) montre que les déplacements chimiques (δ) des 2 pics se situent à 3,27 et 4,03 ppm et correspondent exactement à ceux de la G.B pure (Sigma Co).

- Caractéristiques physiques à 300,134 M.Hz, δ (ppm), D₂O/DSS :
 $(CH_3)_3N^+ -$: 3,27 , singulet ; - CH₂- : 4,00 , singulet.

Le spectre de masse montre la base libre (CH₃)₂N-CH₂-COOH, mais l'ion moléculaire n'est pas observé. La masse théorique de C₄H₉NO₂ est égale à 103,0633 ; la masse trouvée est de 103,0634.

4 - Dosage de bétaines dans les sédiments

Dans les conditions d'expérimentation choisies, les composés-oniums ne sont pas détectés quand les sédiments sont dilués dans du M63/NaCl 0,6M additionné ou non de glucose, ou dans de l'eau distillée. Par contre les extraits hydro-alcooliques obtenus à partir de sédiments en contiennent 0,6mole/ml

5 - Discussion

La salinité est considérée comme la caractéristique essentielle de l'eau de mer. Elle est considérée comme inhibitrice des bactéries entériques en eau de mer (CARLUCCI et PRAMER, 1960 ; ANDERSON et COLL, 1979). Plusieurs chercheurs (XU et COLL, 1982 ; GUTHRIE et SCOVILL, 1984 ; GRIMES et COLL, 1986 ; GAUTHIER et COLL, 1987) ont démontré la survie des Enterobacteriaceae pathogènes dans l'environnement marin. De plus, cette survie est meilleure dans les sédiments (VAN DONSEL et GELDREICH, 1971 ; GERBA et McLEOD, 1976 ; HOOD et NESS, 1982 ; SHIARIS et COLL, 1987) où les bactéries se concentrent. La sédimentation est d'ailleurs considérée comme un facteur d'épuration des bactéries de l'eau de mer. Cependant, à notre connaissance, aucune information n'existe concernant

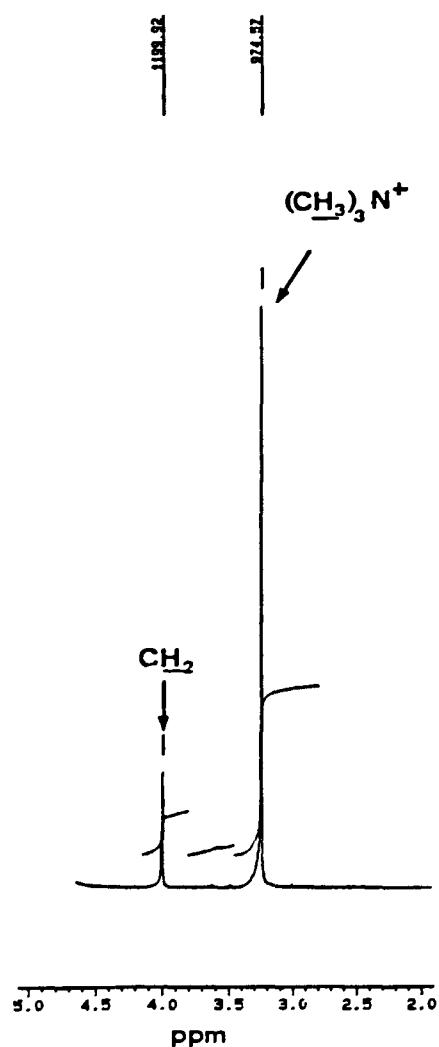
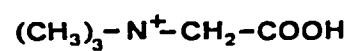


Fig.15: Spectre de RMN- ^1H de la glycine bétaine.

la capacité de E.coli de résister au stress osmotique dû à la salinité de l'eau de mer. Nos résultats démontrent que les cellules de E.coli résistent au stress salin en accumulant la G.B à partir de sédiments marins autoclavés.

Selon GERBA et McLEOD (1976) et LE GUYADER (1989), l'autoclavage facilite le relargage des nutriments liés aux sédiments. Il évite en outre la compétition avec la microflore naturelle. La matière organique contenue dans les sédiments constitue un facteur contribuant à la meilleure survie de E.coli. L'autoclavage facilite la dégradation des macromolécules et par conséquent leur meilleure assimilation nutritive. Ceci est confirmé lors de l'utilisation du glucose comme source de carbone supplémentaire : la croissance atteint dans ce cas 10^9 UFC/ml, alors qu'en absence de glucose, elle n'est que de 10^7 UFC/ml en 24h. L'eau de mer, même enrichie de glucose, ne favorise pas la croissance de E.coli. On constate un phénomène de survie dû probablement à la carence en nutriments. Ainsi, la quantité et la nature de la matière organique présente dans l'eau de mer s'avèrent des facteurs prédominants dans le maintien et la croissance des bactéries entériques pathogènes dans le milieu marin.

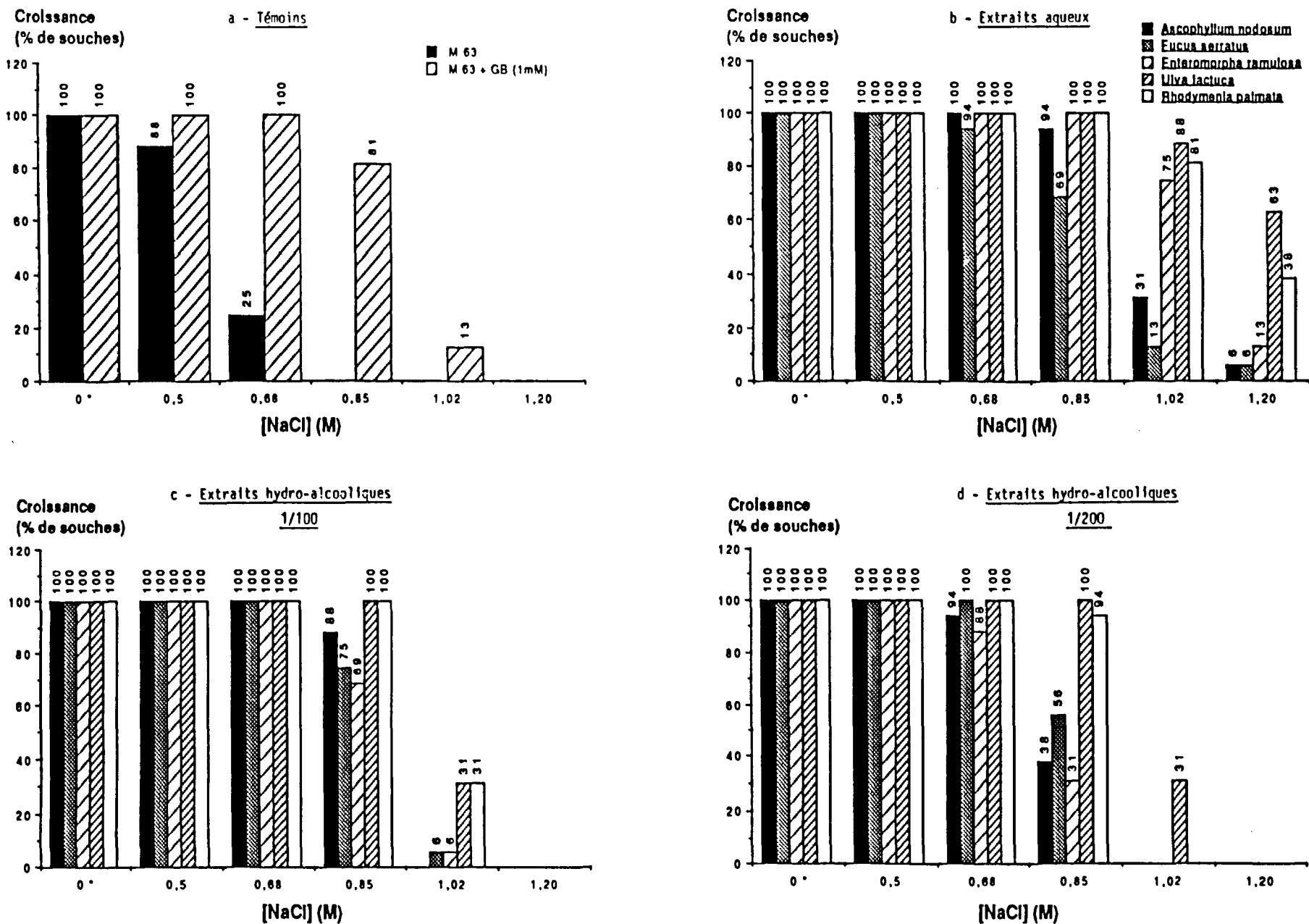
En outre, E.coli accumule de la G.B à partir de sédiments marins quelle que soit la nature du milieu salé. Aucune accumulation n'est observée en présence d'eau de mer seule. Ainsi, les sédiments constituent la seule source de G.B. La meilleure accumulation de G.B est obtenue quand E.coli croît en présence de glucose comme source supplémentaire de carbone. D'autre part, les quantités minimales de G.B détectées dans les sédiments prouvent que E.coli concentrent la G.B afin de résister au stress osmotique. Un autre composé Dragendorff-positif probablement une autre bétaine est fréquemment accumulé en faibles quantités par E.coli.

Le fait que la G.B, puissant osmoprotecteur, soit accumulée en quantités non négligeables à partir de sédiments marins démontre que l'osmoprotection joue un rôle essentiel dans le maintien de E.coli dans l'environnement marin. Elle semble d'autre part exister en plus grandes quantités que d'autres molécules osmoprotectrices car, en effet, elle est très répandue dans le monde végétal, chez les animaux marins et les algues (BEERS, 1967 ; WYN JONES, 1980 ; BLUNDEN et COLL, 1981, 1982b; YANCEY et COLL, 1982). Aussi, il n'est pas surprenant qu'elle soit retrouvée dans le milieu marin. Cependant, la G.B est diluée en eau de mer et relativement concentrée dans les sédiments marins.

VIII - ALGUES MARINES ET OSMOPROTECTION BACTERIENNE

1 - Osmotolérance bactérienne à partir d'algues (Fig 16) (Annexe 14)

La croissance de 16 souches de E.coli du littoral soumises à un stress salin est largement améliorée en présence d'algues. Les capacités osmoprotectrices des algues sont très importantes et dans certains cas peuvent dépasser celles de la G.B.

Fig.16: Appréciation de l'osmoprotection de *E.coli* à partir d'extraits d'algues.

* En présence d'extraits aqueux, la croissance de la majorité des souches de E.coli est observée en présence de fortes teneurs en sel (1,20M). A cette salinité, Ulva lactuca et Rhodymenia palmata favorisent respectivement la croissance de 63 et 38% des souches. Enteromorpha ramulosa, Ascophyllum nodosum et Fucus serratus semblent relativement moins performants.

* L'addition d'extraits hydro-alcooliques d'algues (dilution finale au 1/100ème) au milieu minimum favorise efficacement la croissance à une concentration saline de 1,02M. Les extraits provenant de Ulva lactuca et de Rhodymenia palmata apportent une osmoprotection pour un plus grand nombre de souches. Ceux provenant des 3 autres algues assurent une osmotolérance bactérienne modérée. Lorsque la concentration d'extraits est diminuée (dilution finale au 1/200ème), les effets osmoprotecteurs sont atténués, sauf pour Ulva lactuca.

2 - Etude de la croissance bactérienne (Fig 17)

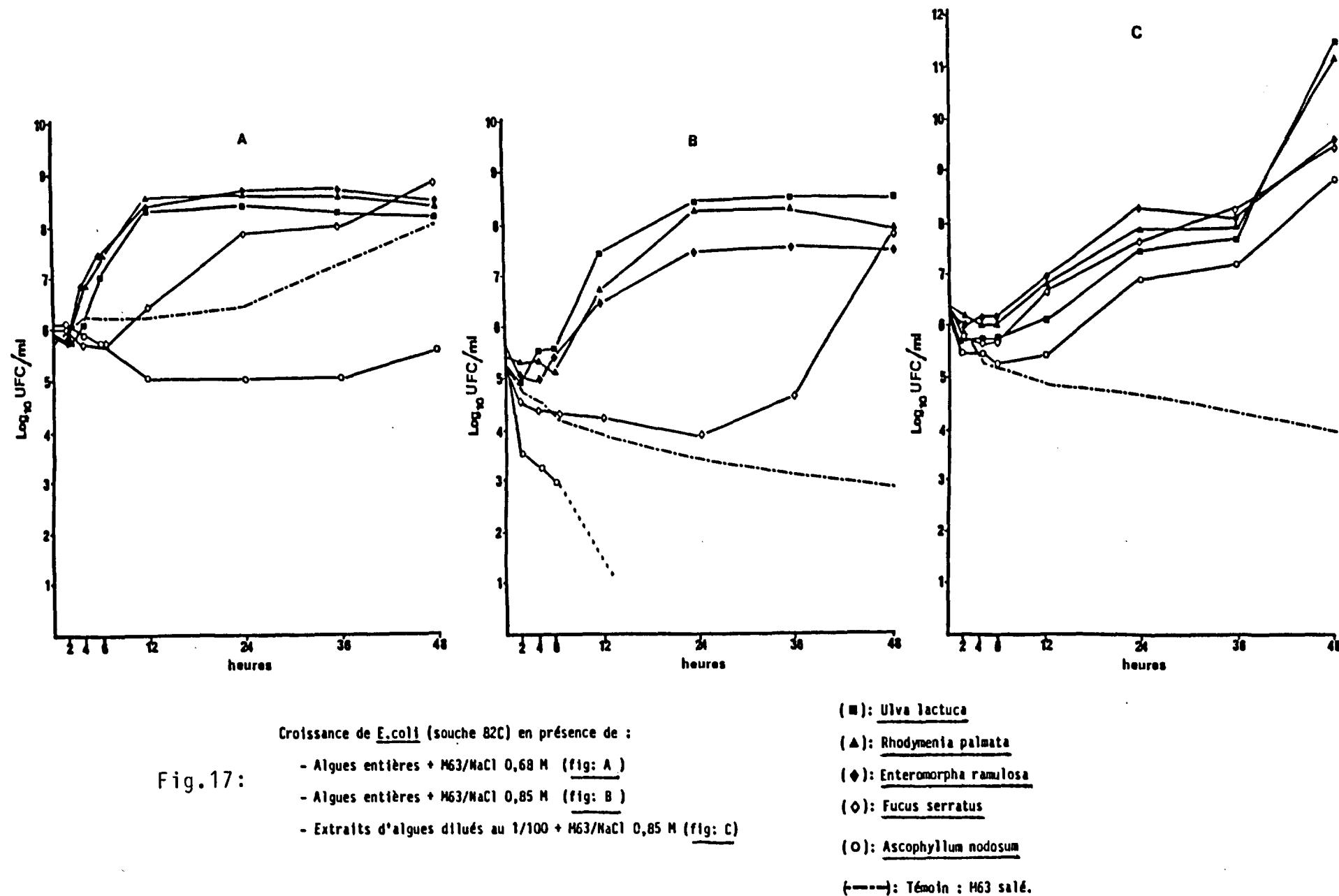
Le suivi de la croissance de E.coli révèle que l'addition d'algues ou d'extraits hydro-alcooliques dans le milieu M63/NaCl 0,68 et 0,85M accélère la multiplication bactérienne.

* Lorsque les cellules de E.coli sont incubées en contact direct avec les algues, les taux de croissance sont élevés en présence de Ulva lactuca, Rhodymenia palmata (5.10^8 UFC/ml) et Enteromorpha ramulosa (10^8 UFC/ml en moyenne). Quand l'osmolarité du milieu augmente, la croissance est relativement ralentie. Le cas des 2 algues brunes est spécifique. Fucus serratus est aussi performant que les 3 autres algues, mais l'adaptation de E.coli est difficile et exige plus de temps surtout à une teneur en NaCl de 0,85M. En présence de Ascophyllum nodosum, la croissance de E.coli est inhibée. Cette inhibition est accentuée par une augmentation de l'osmolarité du milieu M63.

* Lorsque des extraits hydro-alcooliques d'algues sont ajoutés au milieu, la restauration de la croissance est considérable. Les extraits provenant de Ulva lactuca et Rhodymenia palmata permettent une croissance optimale (10^{11} UFC/ml), ceux provenant de Enteromorpha ramulosa, Fucus serratus et Ascophyllum nodosum, une croissance moyenne (5.10^8 - 5.10^9 UFC/ml).

L'osmoprotection apportée par les extraits est nettement plus large, que celle apportée par des algues entières. Concernant Ascophyllum nodosum l'inhibition de E.coli due à l'algue entière n'est plus véhiculée par l'extrait. L'effet osmoprotecteur n'est plus masqué.

Les données obtenues ci-dessus nous ont permis d'obtenir une production satisfaisante de biomasse bactérienne en vue des étapes ultérieures d'extraction et de purification de composés osmoprotecteurs. Les résultats des numérations bactériennes obtenus à partir d'un litre de milieu de culture sont les suivants :



Extraits d'Algues	Composés - oniums (μ mole/ml)	azote aminé (μ mole/ml)	Protéines (mg/ml)
<u>Ascophyllum nodosum</u>	10,40	21,50	30,50
<u>Fucus serratus</u>	2,12	22,25	17,37
<u>Enteromorpha ramulosa</u>	3,22	3,56	3,31
<u>Ulva lactuca</u>	31,52	116,00	13,18
<u>Rhodymenia palmata</u>	7,32	49,00	6,43

Tableau 10 : Détermination quantitative des composés-oniums, de l'azote aminé et des protéines dans les extraits hydro-alcooliques d'algues.

Les valeurs indiquées sont les moyennes de 2 expérimentations.

- à partir d'algues entières : valeurs moyennes en 24h

Rhodymenia palmata : 2.10^{11} UFC/ml

Ulva lactuca : $3,25.10^{10}$ UFC/ml

Enteromorpha ramulosa : 5.10^{10} UFC/ml

- à partir d'extraits d'algues : valeurs moyennes en 24h

Ascophyllum nodosum : $2,7.10^9$ UFC/ml

Fucus serratus : $1,08.10^9$ UFC/ml

D'une manière générale, les algues apportent une osmoprotection efficace pour E.coli. Celle-ci peut être relativement forte (Ulva lactuca, Rhodymenia palmata), modérée (Enteromorpha ramulosa) ou faible (Fucus serratus, Ascophyllum nodosum). Cette différence semble être liée à la qualité et à la quantité des osmoprotecteurs libérés par les algues. Enfin, il est à souligner que lors de la croissance sur algues entières, les cellules de E.coli peuvent rester adsorbées sur les débris algaux et influencer ainsi les numérations bactériennes.

3 - Composés-oniums, azote aminé, et protéines

Les résultats du dosage de substances aminées (essentiellement acides aminés et protéines) et de composés-oniums contenus dans les extraits d'algues bruts permettent certaines constatations (Tab10):

* Chez les algues brunes, les teneurs en azote aminé et protéines sont élevées. Ascophyllum nodosum est plus riche en composés-oniums que Fucus serratus (10,40mole/ml contre 2,12)

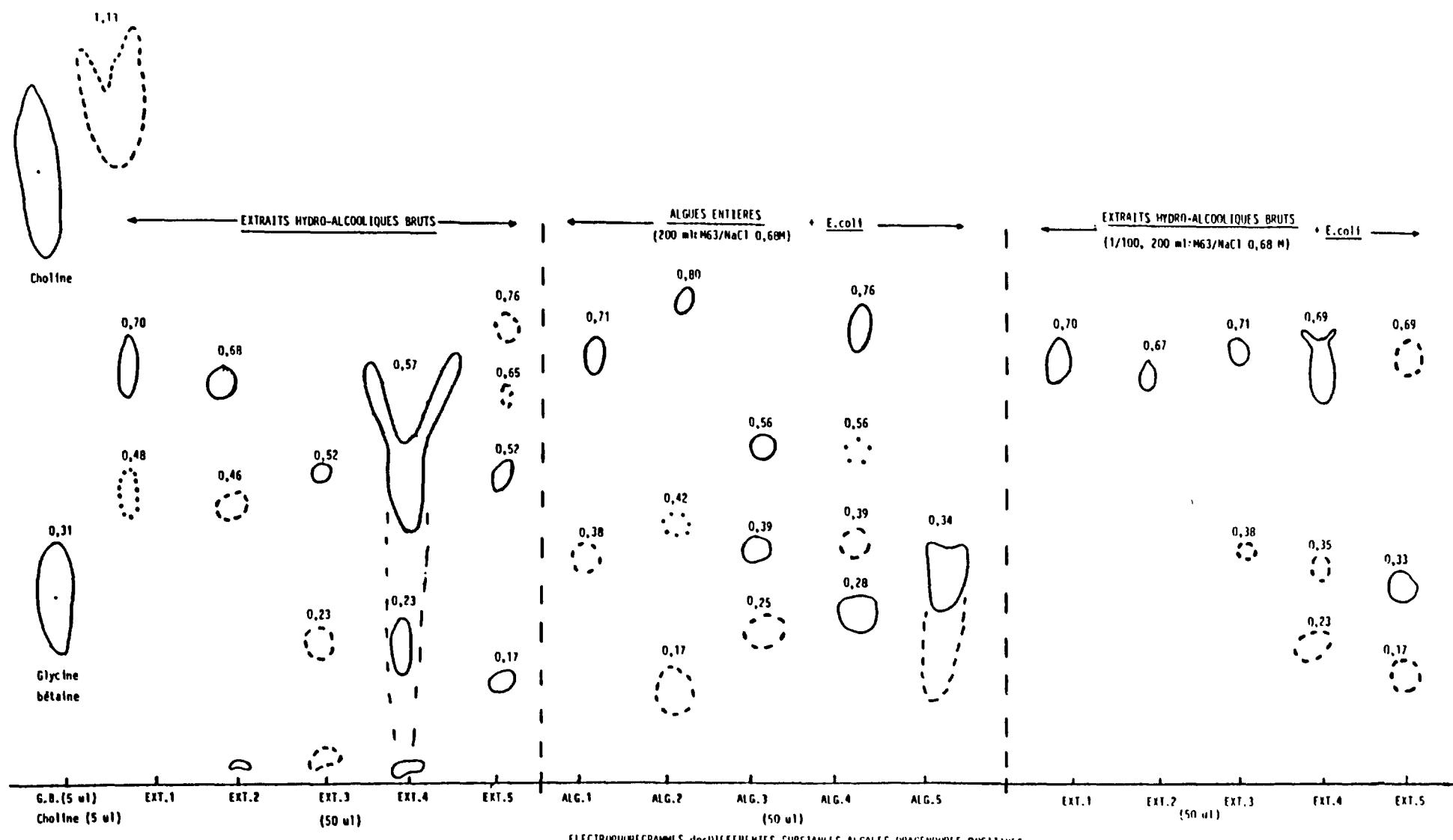
* Les extraits de Enteromorpha ramulosa sont pauvres en substances aminées et en composés-oniums.

* Les concentrations en composés-oniums et en azote aminé sont relativement considérables dans les extraits de Ulva lactuca. La teneur en protéines est moyenne.

* Chez Rhodymenia palmata, les teneurs en composés-oniums et en azote aminé sont importantes, alors que les protéines sont en proportions moindres.

4 - Les substances osmoprotectrices algales

L'électrophorèse en haute tension d'extraits d'algues bruts révèle leur extrême richesse en composés Dragendorff-positifs. Selon leur durée d'apparition sur l'électrophorégramme, ces composés existent à des teneurs différentes dans les extraits (Fig 18). L'électrophorèse montre d'autre part que E.coli, soumis à un stress osmotique, accumule ces mêmes substances à partir d'algues entières ou d'extraits hydro-alcooliques d'algues (Fig 18 et 19). Les teneurs accumulées sont variables et dépendent



- 1- Ascophyllum nodosum
 2- Fucus serratus (—): Apparition rapide.
 3- Enteromorpha ramulosa (---): Apparition lente.
 4- Ulva lactuca (....): Apparition très lente.
 5- Rhodymenia palmata

Fig.18



choline

E.coli - 1 à 2 litres M63/NaCl 0,85M

(—) : apparition rapide

(---) : apparition lente

(Electrophorégrammes à considérer séparément)

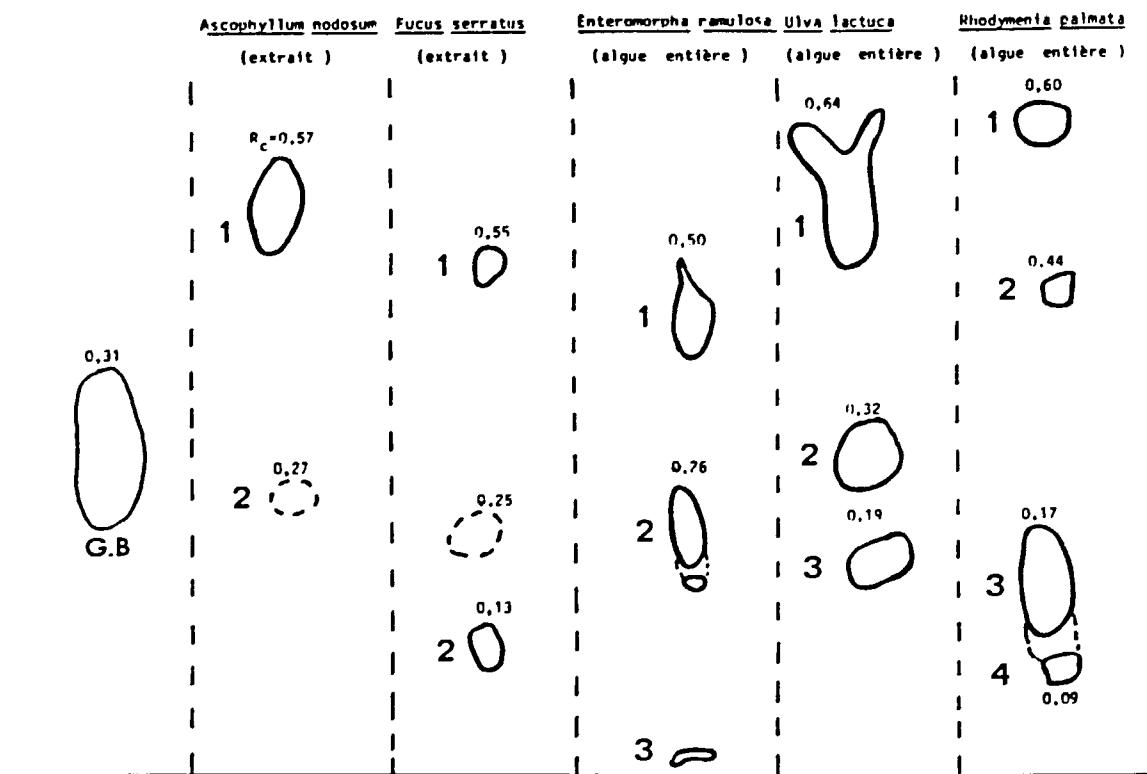


Fig. 19: Exemples d'électrophorégrammes de substances Dragendorff-positives accumulées par E.coli à partir de cultures sur algues entières ou extraits d'algues.
Les numéros: 1,2,3,4, font référence au texte. Les R_c sont donnés à titre indicatif.

du volume du milieu de croissance. Les figures 18 et 19 montrent que le Rc de telle ou telle substance évolue selon sa concentration propre et selon qu'elle coexiste ou non avec d'autres substances. Dans ces conditions, la valeur du Rc n'est donnée qu'à titre indicatif et de comparaison. Deux à quatre composés Dragendorff-positifs sont accumulés à chaque fois à partir d'une algue donnée (ou d'un extrait) par E.coli. Toutefois, il ressort clairement de l'observation des électrophorégrammes qu'en général un seul composé Dragendorff-positif est préférentiellement accumulé par E.coli. Ce sont les composés suivants (Fig 19) :

- N° 1 pour Ascophyllum nodosum, Fucus serratus et Ulva lactuca
- N° 3 pour Rhodymenia palmata
- N° 1 et 2 pour Enteromorpha ramulosa, cependant le n°2 a été préféré en vue de son identification finale.

La méthode des disques nous a permis de mettre en évidence les capacités osmoprotectrices vis-à-vis de E.coli de la totalité des substances illustrées à la Fig 19. Il est à préciser que E.coli accumule plusieurs composés osmoprotecteurs à partir d'une algue. Les résultats les plus satisfaisants sont obtenus sur milieu gélose M63/NaCl 0,68M. Dans ces cas, des colonies bactériennes sont uniquement observées dans les alentours immédiats du disque imbibés de la molécule osmoprotectrice (Fig 20).

Comme nous l'avons déjà signalé (cf : matériel et méthodes) la révélation des électrophorégrammes à la ninhydrine a précédé celle au réactif de Dragendorff, en vue de la détection éventuelle de proline. Celle-ci nous a permis de constater l'absence de proline et la pauvreté en acides aminés accumulés par E.coli croissant sur algues marines. Ceci reste bien évidemment lié aux possibilités de détection de la technique.

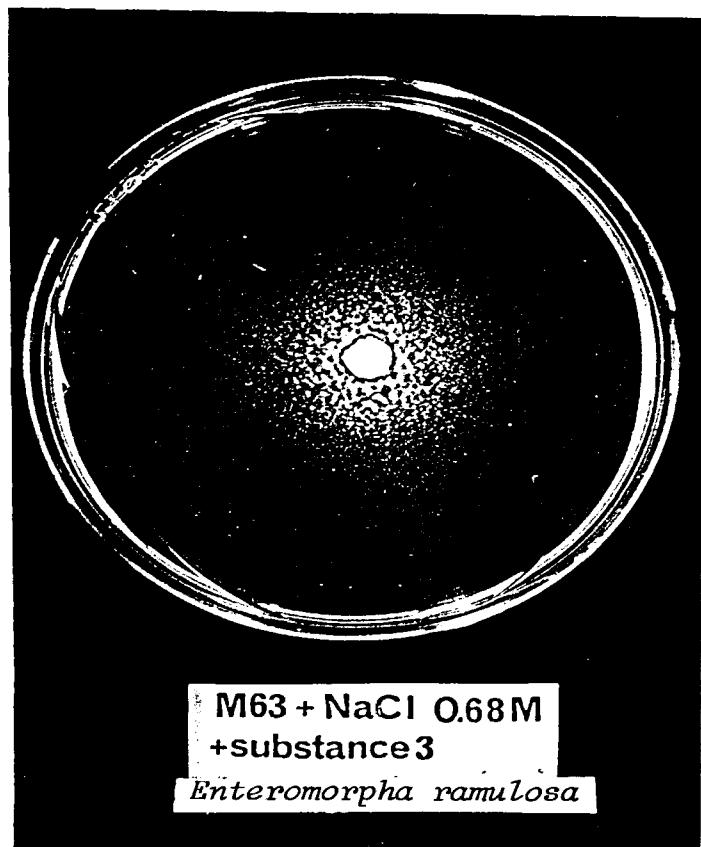
L'utilisation de la chromatographie sur papier s'est avérée d'un grand intérêt dans la purification des composés osmoprotecteurs. Elle donne cependant de faibles indications concernant leur identification. En effet, les composés-oniums migrent sur une plus grande distance dans le système de solvants phénol-éthanol et les valeurs des Rf sont élevées. A titre d'indication les Rf moyens de la G.B, de la choline et du DMSP sont de 0,81, celui de la γ -butyrobétaine est de 0,92.

5 - Identification des composés osmoprotecteurs

Nous rappelons que les processus d'identification ont concerné les seuls composés osmoprotecteurs principalement accumulés par E.coli.

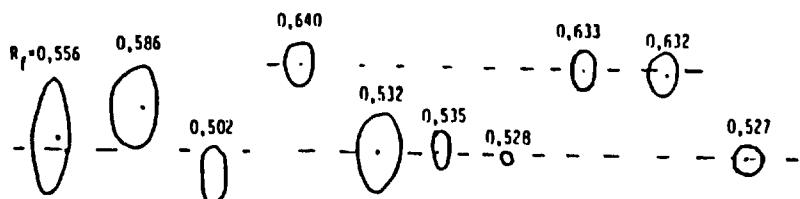
5-1 - La chromatographie sur couche mince (Fig 21) :

Elle s'est avérée d'une grande utilité. En effet, si le Rf de tel ou tel composé purifié correspond à celui d'une solution-standard dans les 2 systèmes de solvants, son identification est presque acquise. Il faut toutefois s'assurer de la pureté de la substance

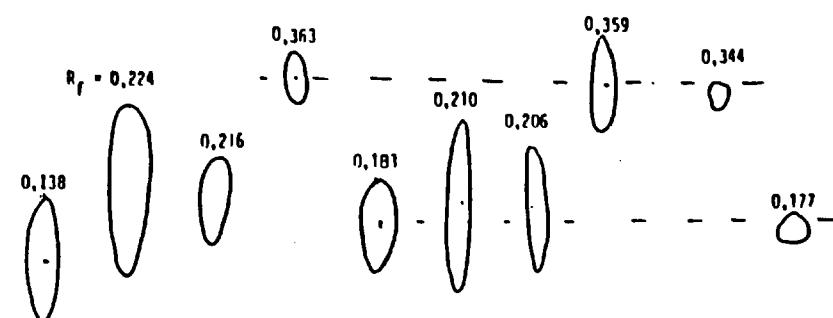


Démonstration par la méthode du disque du rôle
Fig.20: osmoprotecteur d'une substance algale accumulée
par E.coli

- Gel de silice
- Méthanol-H₂O (3:1).



- Gel de silice
- Isopropanol-eau (3:1).



YR8.	TRI.	CAR.	GR. (5u1)	DMSP.	ASCO. SUB.1	FLCUS. SUB.1	ENTE. SUB.2	RHHY. SUB.3	ULVA SUB.1
------	------	------	--------------	-------	----------------	-----------------	----------------	----------------	---------------

Y88.	TRI.	CAR.	GB.	DMSP.	ASCI.	FLUCS	ENTE.	RHODY.	UL. VA.
			(5ul)		SUB.1	SUB.1	SUB.2 (10ul)	SUB.3	SUB.1

Fig.21: Chromatogrammes sur couche mince de solutions bétainiques-étalons et de substances osmoprotectrices accumulées par *E.coli* à partir d'algues.

testée. Ainsi, les Rf des composés n°3 et 2 (Fig 21) accumulés par E.coli respectivement à partir de Rhodymenia palmata et de Enteromorpha ramulosa correspondent à chaque fois aux Rf de la G.B, ceux du composé n°1 de Ulva lactuca aux Rf du DMSP. Les Rf des composés accumulés à partir des 2 algues brunes ne correspondaient pas à ceux d'une solution-standard donnée, ceci étant dû aux impuretés (voir résultats de la RMN-¹H). Toutefois dans ce cas précis, la CCM nous aurait permis de confirmer qu'il s'agissait du même produit. L'électrophorèse en haute tension de composés osmoprotecteurs purifiés peut présenter un intérêt dans les processus d'identification. En effet, les Rc moyens des composés algaux accumulés par E.coli correspondent bien à ceux des solutions-standard (GB = 0,30 ; DMSP = 0,796 et la γ -butyrobétaine = 0,72).

5-2 - La spectrométrie de RMN-¹H (Fig 15 et 22) :

Elle marque l'aboutissement de l'identification des substances osmoprotectrices. Elle confirme l'accumulation par E.coli de G.B à partir de Rhodymenia palmata et de Enteromorpha ramulosa, de DMSP à partir de Ulva lactuca et de γ -butyrobétaine à partir de Ascophyllum nodosum et de Fucus serratus. Dans tous les cas, les spectres de RMN-¹H de ces composés osmoprotecteurs coïncident exactement avec ceux des composés commercialisés purs : G.B (Sigma Co), DMSP synthétisé comme indiqué en annexe n°18 et γ -butyrobétaine (Aldrich Chemical Co). Il est à préciser toutefois que les échantillons de composés accumulés par E.coli à partir d'algues brunes étaient accompagnés de quelques impuretés. La présence des 4 pics caractéristiques correspondants à ceux indiqués par la littérature (LARSEN et COLL, 1987) d'une part, et leur superposition précise avec les pics de la γ -butyrobétaine pure (Fig 22) d'autre part, nous ont assurés de l'identification finale de la molécule.

- caractéristiques physiques : constantes : RMN-¹H à 300,134MHz, δ (ppm), D₂O/DSS.

. DMSP :

- CH₂-COOH : 2,73 , triplet, J = 7Hz ; (CH₃)₂S⁺- : 2,89 , singulet ; S⁺-CH₂- : 3,43 , triplet, J = 7Hz.

. γ -butyrobétaine :

- C_βH₂- : 2,06 , multiplet, J = 8Hz ; - C_αH₂-COOH : 2,46 , triplet, J = 7Hz ; (CH₃)₃N⁺- : 3,12 , singulet ; - C_γH₂- : 3,35 , multiplet, J~8Hz.

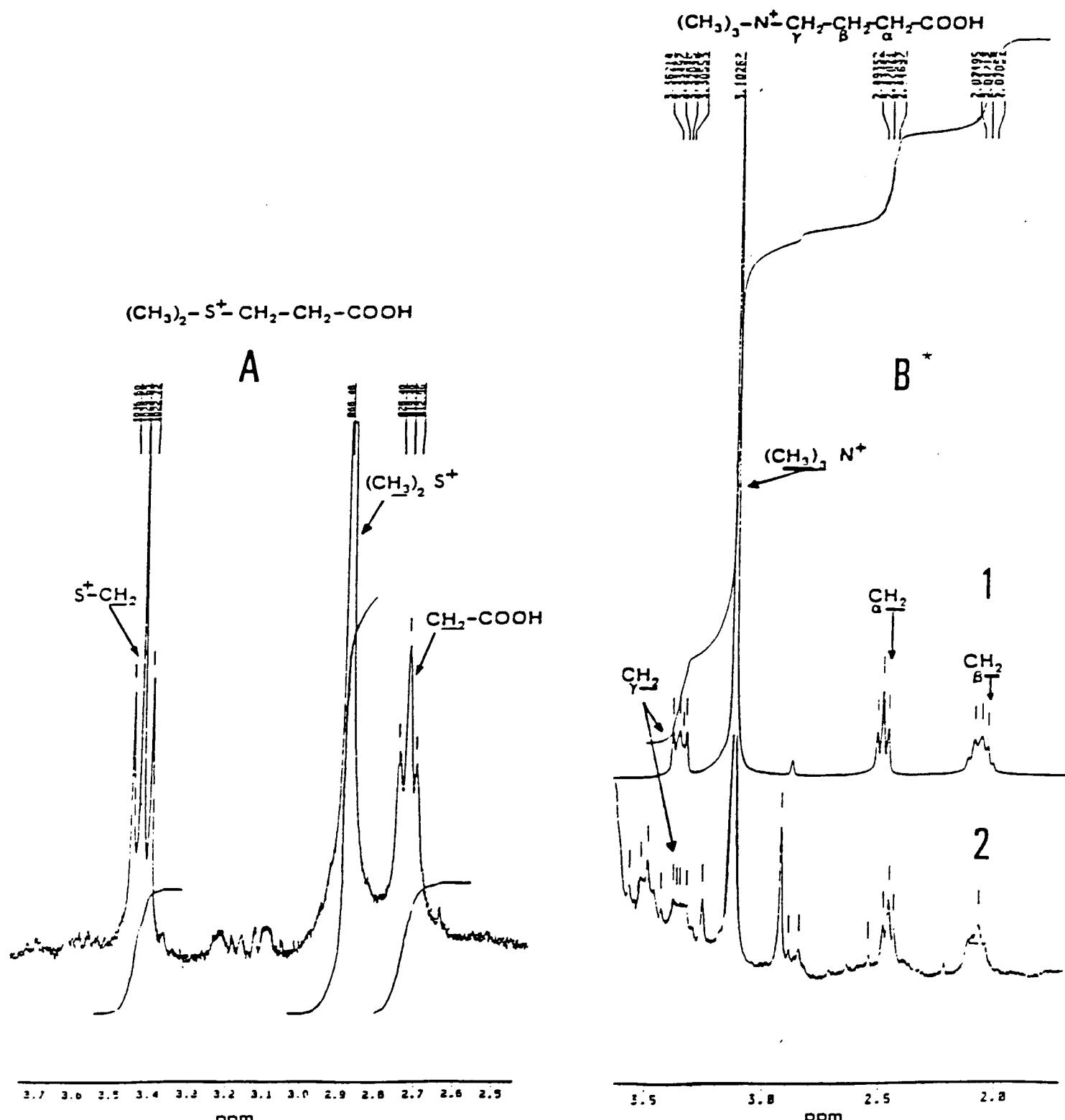
. G.B :

(CH₃)₃N⁺- : 3,27 , singulet ; - CH₂- : 4,00 , singulet.

6 - Discussion

Les algues marines constituent donc une source d'osmoprotection pour E.coli, bactérie de contamination du milieu marin.

Des substances osmoprotectrices très variées ont été décrites chez les



Spectres de RMN-¹H du DMSP (A) et de la γ -butyrobétaine (B).

Fig. 22: (*): superposition des spectres de la γ -butyrobétaine

(1) substance standard (Aldrich Chemical Co)

(2) substance isolée de cultures bactériennes.

algues marines (HORI et COLL, 1979 ; DICKSON et COLL, 1980 ; BLUNDEN et COLL, 1981, 1982a, 1982b, 1984). Les quantités accumulées peuvent être considérables. Parmi celles-ci, les plus répandues semblent être la G.B, le DMSP, la proline bétaine et la γ -butyrobétaine. La G.B a été détectée chez Enteromorpha compressa (HORI et COLL, 1979). Le DMSP a été décrit chez plusieurs espèces d'Ulvaceae (DICKSON et COLL, 1980 ; BLUNDEN et COLL, 1981, 1982b), la γ -butyrobétaine chez Ascophyllum nodosum et Fucus serratus (BLUNDEN et COLL, 1984a). D'un autre côté, KING et COLL (1983) et KING (1988) ont montré que la méthanogénèse dans les sédiments d'environnements salés se réalisait suite à la transformation de G.B. A chaque fois les sédiments étaient associés à des tapis d'algues.

Nos résultats apportent la preuve que les algues marines restaurent la croissance de E.coli en milieux de fortes osmolarités. L'autoclavage permet le relargage de substances diverses et la dégradation des macromolécules en facilitant leur assimilation. L'extraction hydro-alcoolique favorise la solubilisation sélective de protéines, d'acides aminés, de glucides et de composés-oniums. Les algues sont riches en substances nutritives et osmoprotectives, et les forts taux de croissance de E.coli atteints en milieux d'osmolarités élevées en attestent. Les cellules bactériennes accumulent un maximum d'osmoprotecteurs. Les meilleurs rendements sont obtenus en présence de Ulva lactuca et de Rhodymenia palmata puisque dans les 2 cas les teneurs en composés-oniums et en azote aminé sont importantes. Les protéines, par contre, ne semblent pas impliquées dans les processus d'adaptation au sel. En outre, la qualité des substances osmoprotectrices est prépondérante : le cas de la G.B chez Enteromorpha et Rhodymenia est illustratif. Les algues brunes restent les moins performantes : les osmoprotecteurs pompés par les cellules sont en faibles quantités et dominés par la γ -butyrobétaine aux capacités d'osmoprotection moyennes (LARSEN et COLL, 1987). Cependant, Ascophyllum nodosum et Fucus serratus libèrent lors de l'autoclavage des alginates, substances colloïdales, très visqueuses, qui emprisonneraient les cellules bactériennes et fausseraient l'échantillonnage. D'autre part, il est fort probable que Ascophyllum nodosum relarguerait aussi une substance inhibitrice, non soluble dans l'éthanol 70%, dont l'effet s'ajouterait à celui de l'osmolarité du milieu. BLUNDEN et COLL (1984) ont isolé des polyphénols qui inhibent certaines enzymes digestives des mammifères.

Une autre caractéristique de la relation E.coli-algues est représentée par la morphologie et la texture propres à chacune d'elles. Les algues brunes sont fermes, leur structure épaisse et solide rend leur extractibilité difficile. Par contre, Enteromorpha, Ulva et Rhodymenia possèdent des structures fines et fragiles, elles perdent facilement leurs substances cellulaires.

Les algues marines sont très répandues dans les côtes bretonnes. Elles prolifèrent en certains points du littoral où elles constituent des problèmes de nuisance.

Leur décomposition entraîne la libération de quantités considérables de substances nutritives et osmoprotectives. Il n'est pas rare de trouver des débris d'algues joncher la partie sédimentaire des estuaires et on a démontré que E.coli survit en présence de sédiments marins en pompant de la G.B.

Plus que toute autre source d'osmoprotection bactérienne, les algues marines doivent constituer, à notre avis, la source principale. En leur présence, les flores bactériennes pathogènes se maintiennent aisément dans le littoral grâce à la quantité et à la diversité des osmoprotecteurs et des substances nutritives qu'elles renferment.

CONCLUSION

Du point de vue de la santé publique, la survie de E.coli dans l'environnement marin est d'un grand intérêt. Malgré l'effet inhibiteur exercé par le milieu marin, les bactéries pathogènes allochtones survivent en certains points du littoral où l'apport de matière organique est important. Cette survie suppose aussi de la part des bactéries une adaptation à la salinité de l'eau de mer, donc une halotolérance.

L'halotolérance de E.coli revêt plusieurs aspects physiologiques, biochimiques et de régulation. La stratégie mise en oeuvre par la cellule bactérienne face à une augmentation de la pression osmotique du milieu extérieur est multiple et hiérarchisée. La réaction primaire est l'accumulation de potassium (K^+), celle-ci est immédiate et brève. Son rôle est d'éviter la plasmolyse cellulaire. Sa teneur intracellulaire augmente avec le stress osmotique. Elle est suivie immédiatement par une synthèse endogène d'acides aminés et principalement de glutamate chargé négativement à pH neutre. Son rôle est de contrecarrer au moins en partie les charges positives du potassium dont les effets sont délétères pour la fonction enzymatique, et de participer aux biosynthèses cellulaires. Le tréhalose est ensuite synthétisé pour devenir l'osmoprotecteur majeur de la cellule. Il permet à la cellule de résister ,à long terme, à des osmolarités faibles ou moyennes du milieu.

Cependant, E.coli acquiert sa meilleure osmotolérance en pompant dans le milieu extérieur des osmoprotecteurs tels la proline, la G.B ou le DMSP. En présence de G.B, les taux de K^+ , d'acides aminés et de glutamate, et de tréhalose se normalisent.

Le comportement de E.coli ou d'autres Enterobacteriaceae diffère selon les souches. Cette différence existe au niveau des capacités de synthèse intracellulaire et celles de transport d'osmoprotecteurs à partir du milieu extérieur. Les 2 phénomènes peuvent aussi se compléter. Cependant, la meilleure halotolérance est acquise suite à une plus importante accumulation cytoplasmique de G.B, ou à une croissance en milieu complexe.

La glycine bétaine est un puissant osmoprotecteur. Elle est retrouvée en fortes teneurs essentiellement dans le monde végétal où sa présence est liée à une adaptation au sel. Aussi, il n'est pas étonnant de la rencontrer dans le milieu marin. Les résultats obtenus in vitro mettent en évidence l'accumulation bactérienne de G.B à partir de sédiments autoclavés. Les sédiments estuariens constituent donc une source de carbone et d'osmoprotection pour E.coli.

L'osmoprotection peut aussi être intrinsèque au milieu marin qui renferme divers organismes vivants adaptés à la salinité. L'exemple des algues est typique. Leur décomposition rendrait disponibles les substances nutritives et osmoprotectrices. Ainsi nous avons démontré que E.coli soumis à un stress osmotique accumulait *in vitro* divers osmoprotecteurs à partir de cinq algues communes aux côtes bretonnes. Ce sont surtout la G.B, le DMSP et la γ -butyrobétaire. Cependant, les résultats concernant la survie de E.coli à partir de sédiments et d'algues doivent être confirmés par des études *in situ*.

Un autre aspect de l'étude de l'halotolérance a concerné l'utilisation du CCCP, un découplant de la chaîne de phosphorylation oxydative, afin de discerner entre bactéries halophiles et bactéries halotolérantes. Vibrio alginolyticus et V.parahaemolyticus sont très sensibles au CCCP, et la CMI ne dépend pas de la salinité du milieu. Par contre E.coli et autres Enterobacteriaceae sont résistants. Cette résistance diminue quand le stress salin devient important.

E.coli possède des capacités intrinsèques de l'haloadaptation. Sa survie dans l'environnement marin dépend de plusieurs facteurs, elle est améliorée par la présence de matière organique : source de carbone, d'énergie et d'osmoprotection.

Les problèmes de pollution marine sont plus que jamais d'actualité. Ils revêtent plusieurs aspects. La conférence technique de la F.A.O. sur la pollution des mers et sur ses effets sur les ressources biologiques de la pêche (ROME, 1970) a proposé la définition suivante : la pollution est "l'introduction par l'homme dans le milieu marin de substances pouvant entraîner des effets délétères, tels que dommages aux ressources biologiques, dangers pour la santé humaine, entraves aux activités maritimes, y compris les pêcheries, détérioration des qualités de l'eau de mer pour son utilisation et réduction des possibilités dans le domaine des loisirs". La contamination microbienne du milieu marin a des incidences sur la santé publique. Elle concerne les animaux marins et à fortiori l'homme via la chaîne alimentaire (toxi-infections). Le cas de Salmonella est caractéristique. E.coli, bactérie-test lorsqu'il s'agit de mesurer le taux de contamination de l'eau et donc les risques qu'elle constitue, survit en eau de mer. Cette survie est d'autant meilleure que les volumes des rejets arrivant en mer sont considérables et riches en substances nutritives. L'autre facteur impliqué dans le maintien des bactéries en eau de mer est l'osmoprotection. Elle permet à E.coli de résister à la salinité marine.

L'osmoprotection constitue donc un nouvel aspect dans la compréhension des phénomènes qui régissent la survie des bactéries allochtones dans le milieu marin. Elle permet en outre une meilleure approche et appréhension des problèmes. Les moyens de lutte restent, il est vrai, à trouver.

Enfin sur le plan économique, la menace que pèse la contamination du littoral sur la conchyliculture, par exemple, peut avoir des répercussions catastrophiques. Le choix des lieux de culture doit plus que toujours être judicieux.

NOM et PRENOM

GHOUL MOSTEFA

TITRE DE LA THESE

HALOTOLERANCE DE ESCHERICHIA COLI
EFFET DES OSMOPROTECTEURS NATURELS.

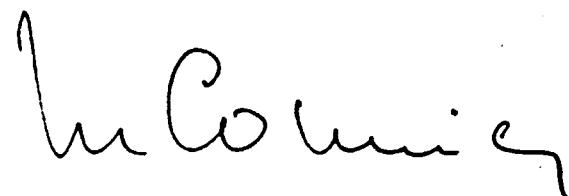
DR 12/90/Phie/1 n°85

07 JUIN 1990

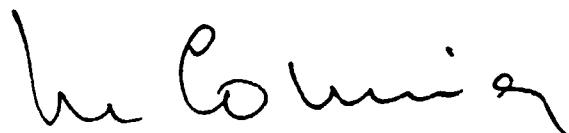
RENNES, le

Vu et permis d'imprimer

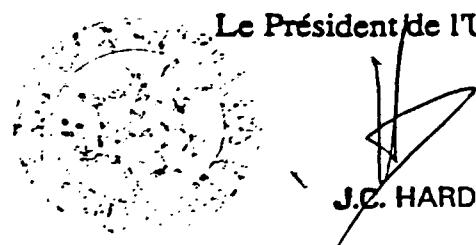
Le Président de thèse



Le Directeur de thèse



Le Président de l'Université



J.C. HARDOUIN

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, et J.D. WATSON. 1986. Biologie moléculaire de la cellule, p 510. Flammarion - Médecine Sciences - Paris.
- ANDERSON, R.R., R. MENZEL, et J.M. WOOD. 1980. Biochemistry and regulation of a second L-proline transport system in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 141 : 1071-1076
- ANDERSON, I.C., M.W. RHODES, et H.I. KATOR. 1979. Sublethal stress in E.coli : a function of salinity. Appl. Environ. Microbiol. 38 : 1147-1157
- ARAKAWA, T., et S.N. TIMASHEFF. 1985. The stabilization of proteins by osmolytes. Biophys. J. 47 : 411-414
- AUBERT, J. 1972. La pollution microbienne des eaux de mer et ses conséquences sur l'hygiène publique. Bull. Inst. Pasteur. 70 : 375-390
- AUBERT, J., et N. DESIROTTE. 1968. Théorie formalisée de la diffusion bactérienne. Rev. Int. Oceanogr. Méd. 12 : 5-48
- AUBERT, M., H. LEBOUT, et J. AUBERT. 1964. Role of plankton in the antibiotic activity of sea water. Annls. Inst. Pasteur. Paris. 106 : 147-150
- BAICH, A. 1969. Proline synthesis in E.coli. A proline-inhibitable glutamic acid kinase. Bioch. Biophys. Acta. 192 : 462-467
- BAKKER, E.P., I.R. BOOTH, U. DINNBIER, W. EPSTEIN, et A. GAJEWSKA. 1987. Evidence for multiple K⁺ export systems in E.coli. J. Bacteriol. 169 : 3743-3749
- BARRON, A., G. MAY, E. BREMER, et M. VILLAJERO. 1986. Regulation of enveloppe protein composition during adaptation to osmotic stress in E.coli. J. Bacteriol. 167 : 433-438
- BEERS, J.R. 1967. The species distribution of some naturally occurring quaternary ammonium compounds. Comp. Biochem. Physiol. 21 : 11-21
- BERGER, E.A. 1973. Different mechanisms for energy coupling for the active transport of proline and glutamine in E.coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70 : 1514-1518
- BERNARD, T., J.A. POCARD, B. PERROUD, et D. LE RUDULIER. 1986. Variations in the response of salt-stressed Rhizobium strains to betaines. Arch. Microbiol. 143 : 359-364
- BISSONNETTE, G.K., J.J. JEZESKI, G.A. Mc FETERS, et D.G. STUART. 1975. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural water. Appl. Microbiol. 29 : 186-194
- BLUNDEN, G., M.M. EL BAROUNI, S.M. GORDON, W.F.H. Mc LEAN, et D.J. ROGERS. 1981. Extraction, purification and characterisation of Dragendorff-positive compounds from some British marine algae. Bot. Mar. 24 : 451-456
- BLUNDEN, G., S.M. GORDON, et G.R. KEYSSELL. 1982a. Lysine betaine and other quaternary ammonium compounds from British species of the Laminariales. J. Natural. Products. 45 : 449-452
- BLUNDEN, G., S.M. GORDON, W.F.H. McLEAN, et M.D. GUIRY. 1982b. The distribution and possible taxonomic significance of quaternary ammonium and other Dragendorff-positive compounds in some genera of marine algae. Bot. Mar. 25 : 563-567

BLUNDEN, G., S.M. GORDON, B.E. SMITH, et R.L. FLETCHER. 1985 . Quaternary ammonium compounds in species of the Fucaceae (Phaeophyceae) from Britain. Br. Phycol. J. 20 : 105-108.

BLUNDEN, G., D.J. ROGERS, et C.J. BARWELL. 1984 . Biologically-active compounds from British marine algae, p.179-190. In P. KROGSGAARD-LARSEN, B. CHRISTENSEN ET H. KOFOD (ed.), Natural products and drug development. Munksgaard, Copenhagen.

BOOTH, I.R. 1985. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. Microbiol. Rev. 49 : 359-378

BOSS, W., U. EHMANN, E. BREMER, A. MIDDENDORF, et P. POSTMA. 1987. Trehalase of E.coli : mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity conditions. J. Biol. Chem. 262 : 13212-13218

BRITTEN, R.J., et F.T. Mc CLURE. 1962. The amino acid pool in E.coli. Bacteriol. Rev. 26 : 292-335

BROWN, A.D. 1976. Microbial water stress. Bact. Rev. 40 : 803-846

BROWN, A.D., K.F. MACKENZIE et K.K. SINGH. 1986. Selected aspects of microbial osmoregulation. FEMS. Microbiol. Rev. 39 : 31-36

BROWN, A.D., et J.R. SIMPSON. 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts : the role of intracellular polyols. J. Gen. Microbiol. 72 : 589-591

BROWN, C.M., et S.O. STANLEY. 1972. Environment-mediated changes in the cellular content of the "pool" constituents and their associated changes in cell physiology. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22 : 363-389.

BUKAU, B., M. EHRMANN, et W. BOOS. 1986. Osmoregulation of the maltose regulon in E.coli. J. Bacteriol. 166 : 884-891

CAIRNEY, J., I.R. BOOTH, et C.F. HIGGINS. 1985a. Salmonella typhimurium proP gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. J. Bacteriol. 164 : 1218-1223

CAIRNEY, J., I.R. BOOTH, et C.F. HIGGINS. 1985b. Osmoregulation of gene expression in Salmonella typhimurium : proU encodes an osmotically induced betaine transport system. J. Bacteriol. 164 : 1224-1232

CAIRNEY, J., C.F. HIGGINS, et I.R. BOOTH. 1984. Proline uptake through the major transport system of Salmonella typhimurium is coupled to sodium ions. J. Bacteriol. 160 : 22-27

CAMPBELL, L. E.J. CARPENTER, et V.J. IACONO. 1983. Identification and enumeration of marine chroococcoid cyanobacteria by immunofluorescence. Appl. Environ. Microbiol. 46 : 553-559

CARLUCCI, A.F., et D. PRAMER. 1959. Factors affecting the survival of bacteria in sea water. Appl. Microbiol. 7 : 388-391

CARLUCCI, A.F., et D. PRAMER. 1960. An evaluation of factors affecting the survival of E.coli in sea water II salinity, pH and nutrients. Appl. Microbiol. 8 : 247-250

CASTLE, A.M., R.M. MACNAB, et R.G. SHULMAN. 1986. Coupling between the sodium and proton gradients in respiring E.coli cells measured by ^{23}Na and ^{31}P nuclear magnetic resonance. *J. Biol. Chem.* 261 : 7797-7806

CHAI, T.J. 1983. Characteristics of E.coli grown in bay water as compared with rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 1316-1323

CHAMBERS, S.T., et C.M.KUNIN. 1985. The osmoprotective properties of urine for bacteria : the protective effect of betaine and human urine against low pH and high concentrations of electrolytes, sugars and urea. *J. Infect. Dis.* 152 : 1308-1315

CHAMBERS, S.T., C.M.KUNIN., D.MILLER, et A.HAMADA. 1987. Dimethylthetin can substitute for glycine betaine as an osmoprotectant molecule for E.coli. *J.Bacteriol.* 169 : 4845-4847

CHRISTIAN, J.H.B. 1955a. The influence of nutrition on the water relations of Salmonella oranienburg. *Aust. J. Biol. Sci.* 8 : 75-82

CHRISTIAN, J.H.B. 1955b. The water relations of growth and respiration of Salmonella oranienburg at 30°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 8 : 430-497

CHRISTIAN, J.H.B., et J. WALTHO. 1961. The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *J. Gen. Microbiol.* 25 : 97-102

COHEN, G.N., et H.V. RICKENBERG. 1956. Concentration spécifique réversible des amino-acides chez E.coli. *Ann. Inst. Pasteur.* 91 : 693-720

COLWELL, R.R., BRAYTON P.R., GRIMES. D.J., D.B. ROSZAK, S.A. HIUQ, et L.M. PALMER. 1985. Viable but non-culturable Vibrio cholerae and related pathogens in the environment : implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio/Technology.* 3 : 817-820

CRONAN, J.E., Jr, R.B. GENNIS, et S.R. MALOY. 1987. Cytoplasmic membrane. p31-50 In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed.), E.coli and S. typhimurium : cellular and molecular biology. American Society for microbiology, Washington, DC.

CROWE, J.H., L.M. CROWE, et D. CHAPMAN. 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms : the role of trehalose. *Science.* 223 : 701-703

CSONKA, L.N. 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in Salmonella typhimurium. *Mol. Gen. Genet.* 182 : 82-86

CSONKA, L.N. 1982. A third L-proline permease in Salmonella typhimurium which functions in media of elevated osmotic strength. *J. Bacteriol.* 151 : 1433-1443

CSONKA, L.N. 1988. Regulation of cytoplasmic proline levels in Salmonella typhimurium. Effect of osmotic stress on synthesis, degradation and cellular retention of proline. *J. Bacteriol.* 170 : 2374-2378

CSONKA, L.N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53 : 121-147

DALEY, R.J., et J.E. HOBBIE. 1975. Direct counts of aquatic bacteria by modified epifluorescence technique. *Limnol. Oceanogr.* 20 : 875-882

- DATTANANDA, C.S., et J. GOWRISHANKAR. 1989. Osmoregulation in E.coli : complementation analysis and gene-protein relationships in the proU locus. *J. Bacteriol.* 171 : 1915-1922
- DAWSON, K.A., et J.A. BOLING. 1987. Effects of potassium ion concentrations on the antimicrobial activities of ionophores against ruminal anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 2363-2367
- DE GIAXA. 1989. Ueber das Verhalten emiger pathogener mikroorganism in meerwasser. *Z. Hyg. Infekt. Kr.* 6 : 161-224
- DEYMIE, B., J.L. MULTON, et D. SIMON. 1981. Dosage des glucides : méthode à l'anthrone. p. 88. In *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*. Tome 4. Coll : Sciences et Techniques agro-alimentaires - Paris
- DICKSON, D.M., R.G. WYN JONES, et J. DAVENPORT. 1980. Steady state osmotic adaptation in Ulva lactuca. *Planta*. 150 : 158-165
- DIMROTH, P. 1987. Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* 51 : 320-340
- DINNBIER, U., E. LIMPINSEL, R. SCHMID, et E.P. BAKKER. 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of E.coli K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* 150 : 348-357
- DULANEY, E.L., D.D. DULANEY, et E. L. RICKES. 1968. Factors in yeast extract which relieve growth inhibition of bacteria in defined medium of high osmolarity. *Dev. Ind. Microbiol.* 9 : 260-269
- DUNLAP, V.J., et L.N. CSONKA. 1985a. Osmotic regulation of L- proline transport in Salmonella typhimurium. *J. Bacteriol.* 163 : 296-304
- DUNLAP, V.J., et L.N. CSONKA. 1985b. Regulation of the osmotically stimulated transport of proline and glycine betaine in Salmonella typhimurium. p.115-128. In J.L. KEY et T. KOSUGE (ed), *cellular and molecular biology of plant stress*. Alan R. Liss, Inc., New York.
- DUPRAY, E. 1986. Hétérogénéité phénotypique et pouvoir pathogène de Vibronaceae isolées de zones littorales bretonnes. Thèse de Doctorat de l'Université de Rennes I.
- ENZINGER, R.M., et R.C. COOPER. 1976. Role of bacteria and protozoa in the removal of E.coli from estuarine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 : 758-763
- EPSTEIN, W. 1985. The Kdp system : a bacterial K⁺ transport ATP-ase : Cur. Top. memb. Transp. 23 : 153-175
- EPSTEIN, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in E.coli. *FEMS. Microbiol. Rev.* 39 : 73-78
- EPSTEIN, W., et L. LAIMINS. 1980. Potassium transport in E.coli : diverse systems with common control by osmotic forces. *Trends Biochem. Sci.* 5 : 21-23
- EPSTEIN, W., et S.G. SCHULTZ. 1965. Cation transport in E.coli : V: Regulation of cation content. *J. Gen. Physiol.* 49 : 221-234

- EPSTEIN, W, et S.G. SCHULTZ. 1968. Ion transport in osmoregulation in bacteria. p:186-193. In *Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms*. L.B. Guze.(Ed), The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA
- ESHOO, M.W. 1988. *lac* Fusion analysis of the *bet* genes of *E.coli* : Regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline and glycine-betaine. *J. Bacteriol.* 170 : 5208-5215
- FAATZ, E., A. MITTENDORF, et E. BREMER. 1988. Cloned structural genes for the osmotically regulated binding-protein-dependent glycine betaine transport system (ProU) of *E.coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 2 : 265-279
- FAUST, M.A., A.E. AOTAKY, et M.T. HARGADON. 1975. Effect of physical parameters on the in situ survival of *E.coli* MC-6 in an estuarine environment. *Appl. Microbiol.* 30 : 800-806
- FIELDER, W., et M. ROTTERING. 1988. Properties of *E.coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 263 : 14684-14689
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. 1970. Conférence technique sur la pollution des mers et sur ses effets sur les ressources biologiques de la pêche. 8-18 Décembre - Rome - Italie
- FUJIOKA, R.S., H.H. HASHIMOTO, E.B. SIWAK, et R.H.F. YOUNG. 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 : 690-696
- GALINSKI, E., et H.G. TRÜPER. 1982. Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototropic bacterium *Ectothiorhodospira halocloris*. *FEMS. Microbiol. Lett.* 13 : 357-360
- GAMPER, H., et V. MOSES. 1974. Enzyme organization in the proline biosynthetic pathway of *E.coli*. *Bioch. Biophys. Acta.* 354 : 75-87
- GAUTHIER, M. 1969. Substances antibactériennes produites par les bactéries marines. I : Etude systématique de l'activité antagoniste de souches bactériennes marines vis-à-vis de germes telluriques aérobies. *Rev. Int. Océanogr. Med.* 15-16 : 41-60
- GAUTHIER, M.J., P.M. MUNRO, et S. MOHAJER. 1987. Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *E.coli* from seawater. *Curr. Microbiol.* 15 : 5-10
- GERBA, C.P., et J.S. Mc LEOD. 1976. Effect of sediments on the survival of *E.coli* in marine waters. *App. Environ. Microbiol.* 32 : 114-120
- GERBA, C.P., S.M. GOYAL, E.M. SMITH, et J.L. MELNICK. 1977. Distribution of viral and bacterial pathogens in a coastal canal community. *Mar. Pollut. Bull.* 8 : 279-282
- GIAVER, H.M., O.B. STYRVOLD, I. KAASEN, et A.R. STRØM. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *E.coli*. *J. Bacteriol.* 170 : 2841-2849
- GOOSENS, H, P. DEMOL, H. COIGNAU, J. LEVY, O. GRADOS, G. GHYSELS, H. INNOCENT, et J.P. BUTZLER. 1985. Comparative in vitro activities of aztreonam, ciprofloxacin, norfloxacin, ofloxacin, HR810 (a new cephalosporin), RU 28965 (a new macrolide), and other agents against enteropathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 27 : 388-392

- GOWRISHANKAR, J. 1985. Identification of osmoreponsive genes in E.coli : Evidence for participation of potassium and proline transport systems in osmoregulation. *J. Bacteriol.* **164** : 434-445
- GOWRISHANKAR, J. 1986a. proP-mediated proline transport also plays a role in E.coli osmoregulation. *J. Bacteriol.* **166** : 331-333
- GOWRISHANKAR, J. 1987. A model for the regulation of expression of the potassium-transport operon, kdp, in E.coli. *J. Genet.* **66** : 87-92
- GOWRISHANKAR, J. 1989. Nucleotide sequence of the osmoregulatory proU operon of E.coli. *J. Bacteriol.* **171** : 1923-1931
- GOWRISHANKAR, J., P. JAYASHREE, et K. RAJKUMARI. 1986b. Molecular cloning of an osmoregulatory locus in E.coli : increased proU gene dosage results in enhanced osmotolerance. *J. Bacteriol.* **168** : 1197-1204
- GREENBERG, A.E. 1956. Survival of enteric organisms. *Publ. Healt.Rept (U.S.)*. **71** : 77-86
- GRIMES, D.J., R.W. ATWELL, P.R. BRAYTON, L.M. PALMER, D.M. ROLLINS, D.B. ROSZAK, F.L. SINGLETON, M.L. TAMPLIN, et R.R. COLWELL. 1986. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol. Sci.* **3** : 324-329
- GROTHE, S., R.L. KROGSRAD, D.J. Mc CLELLAN, J.L. MILNER, et J.M. WOOD. 1986. Proline transport and osmotic stress response in E.coli K-12. *J. Bacteriol.* **166** : 253-259
- GUELIN, A., et D. LAMBLIN. 1966. Sur le pouvoir bactéricide des eaux. *Bull. Acad. Nat. Med. (Paris)*. **150** : 526-532
- GUFFANTI, A.A., S. CLEJAN, L.H. FALK, D.B. HICKS, et T.A. KRULWICH. 1987. Isolation and characterization of uncoupler. Resistant mutants of Bacillus subtilis. *J. Bacteriol.* **169** : 4469-4478
- GUTHRIE, R.K. et M.A. SCOVILL. 1984. Recovery of E.coli and Vibrio cholerae from aquatic microcosms. *Water Res.* **18** : 1055-1057
- HALL, M.N. et T.J. SILHavy. 1979. Transcriptional regulation of E.coli K-12 major outer membrane protein 1b. *J. Bacteriol.* **140** : 342-350
- HALL, M.N., et T.J., SILHavy. 1981. Genetic analysis of the major outer membrane proteins of E.coli. *Ann. Rev. Genet.* **15** : 91-142
- HAMAIDE, F., D.J. KUSHNER, et G.D. SPROTT. 1983. Proton motive force and Na^+/H^+ antiport in a moderate halophile. *J. Bacteriol.* **156** : 537-544
- HANCOCK, R.E.W. 1987. Role of porins in outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **169** : 929-933
- HANES, N.B. et R. FRAGALA. 1967. Effect of sea water concentration on survival of indicator bacteria. *J. Water. Pollut. Control Fed.* **39** : 97-104
- HANSTEIN, W.G. 1976. Uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochem. Biophys. Acta*. **456** : 129-148

- HAYZER, D.J., et T. LEISINGER. 1980. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in E.coli. J. Gen. Microbiol. 118 : 287-293
- HAYZER, D.J., et T. LEISINGER. 1981. Proline biosynthesis in E.coli. Biochem. J. 197 : 269-274
- HEEFNER, D.L., et F.M. HAROLD. 1982. ATP-driven sodium pump in Streptococcus faecalis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 2798-2802
- HELLER, K., E. LIN., et T. WILSON. 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of E.coli. J. Bacteriol. 144 : 274-278
- HEYDE, M., et R. PORTALIER. 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of E.coli K-12 by pH. Mol. Gen. Genet. 208 : 511-517
- HICKS, S.J., et R.J. ROWBURY. 1987. Bacteriophage resistance of attached organisms as a factor in the survival of plasmid-bearing strains of E.coli. Lett. Appl. Microbiol. 4 : 129-132
- HIGGINS, C.F., J.CAIRNEY, D.A. STIRLING, L.SUTHERLAND, et I.R.BOOT. 1987a. Osmotic regulation of gene expression : ionic strength as an intracellular signal? Trends. Biochem. Sci. 12 : 339-344
- HIGGINS, C.F., C.J.DORMAN, D.A. STIRLING, L.WADDELL, I.R. BOOTH, G. MAY, et E. BREMER. 1988. A physiological role for DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in S.typhimurium and E.coli. Cell. 52:569-584
- HIGGINS, C.F., I.D. HILES, K. WHALLEY, K. JAMIESON, et D.J. JAMIESON. 1985. Nucleotide binding by membrane compounds of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport systems. EMBO Journal. 4 : 1033-1040
- HIGGINS, C.F., L.SUTHERLAND, J.CAIRNEY, et I.R.BOOT. 1987b. The osmotically regulated proU locus of Salmonella typhimurium encodes a periplasmic betaine-binding protein. J. Gen. Microbiol. 133 : 305-310
- HOBBIE, J.E., R.J. DALEY, et S. JASPER. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 1225-1228
- HOOD, M.A., et G.E. NESS. 1982. Survival of Vibrio cholerae and Escherichia coli in estuarine waters and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 43 : 578-584
- HORI, K., T. YAMAMOTO, K. MIYAZAWA, et K. ITO. 1979. Distribution of quaternary ammonium bases in seven species of marine algae. J. Fac. Appl. Biol. Sci. 18 : 65-73
- HUA, S.-S., Y. TSAI, G.M. LICHENS, et A.T. NOMA. 1982. Accumulation of amino acids in Rhizobium sp. strain WR 1001 in response to sodium chloride salinity. Appl. Environ. Microbiol. 441 : 135-140
- HUTKINS, R.W., W.L. ELLEFSON, et E.R. KASHKET. 1987. Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2275-2281
- IFREMER. 1981. Etude de l'acceptabilité du milieu- Rade de Brest.

IMHOFF, J.F. 1986. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. FEMS. Microbiol. Rev. 39 : 57-66

INGRAHAM, J.L. 1987. Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth. p.1543-1554. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.), Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ITO, M., Y. OHNISHI, S. ITOH, et M. NISHIMURA. 1983. Carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone-resistant E.coli mutant that exhibits a temperature-sensitive Unc phenotype. J. Bacteriol. 153 : 310-315

JAGGER, J. 1975. Inhibition by sunlight of the growth of E.coli B/r. Photochem. Photobiol. 22 : 67-70

JOCELYN, L.M., D.J. McCLELLAN, et J.M. WOOD. 1987. Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in E.coli K12. J. Gen. Microbiol. 133 : 1851-1860

JONAS, R.B., C.C. GILMOUR, D.L. STONER, M.M. WEIR, et J.H. TUTTLE. 1984. Comparison of methods to measure acute metal and organometal toxicity to natural aquatic microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 47 : 1005-1011

JOVANOVICH, S.B., M. MARTINELLI, M.T. RECORD, Jr., et R.B. BURGESS. 1988. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in E.coli and Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. 170 : 534-539

KAPUSCINSKI, R.B., et R. MITCHEL. 1981. Solar radiation induces sublethal injury in E.coli in sea water Appl. Environ. Microbiol. 41 : 670-674

KAWAJI, H., T. MIZUNO, et S. MIZUSHIMA. 1979. Influence of molecular size and osmolarity of sugars and dextrans on the synthesis of outer membrane proteins 0-8 and 0-9 of E.coli K12. J. Bacteriol. 140 : 843-847

KENNEDY, E.P. 1982. Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane-derived oligosaccharides in E.coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 1092-1095

KENNEDY, E.P. 1987. Membrane-derived oligosaccharides. p.672-679. In F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed), E.coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology. American Society for microbiology, Washington, DC.

KETCHUM B.H., J.C. AYRES, et R.F. VACCARO. 1952. Processes contributing to the decrease of coliform bacteria in a tidal estuary. Ecology. 33 : 247-258

KING, G.M. 1988. Methanogenesis from methylated amines in a hypersaline algal mat. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 130-136

KING, G.M., M.J. KLUG, et D.R. LOVLEY. 1983. Metabolism of acetate, methanol, and methylated amines in intertidal sediments of Lowes Cove, Maine. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 1848-1853

KINOSHITA, N., T. UNEMOTO, et H. KOBAYASHI. 1984. Proton motive force is not obligatory for growth of E.coli. J. Bacteriol. 160 : 1047-1077

- KLEIN, D.A., et S.WU. 1974. Stress : a factor to be considered in heterotrophic microorganism enumeration from aquatic environments. *Appl. Microbiol.* 27 : 429-431
- KOGURE, K., U. SIMIDU, et N. TAGA. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25 : 415-420
- KORN, E. 1985. Etude des mécanismes d'halotolérance de souches de E.coli provenant du milieu marin. DEA de Microbiologie - Université Paris Sud.
- KRASSILNIKOVA, E.N. 1961. Propriétés antibiotiques des micro-organismes marins isolés à différentes profondeurs. *Mikrobiologija.* 30 : 653-791
- KRINSKY, N.I. 1976. Cellular damage initiated by visible light. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 26 : 209-230
- KUSHNER, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations : halophilic bacteria, p.317-368. In D.J. Kushner(ed), *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, London.
- La BELLE, R.L., C.P. GERBA, S.M. GOYAL, J.L. MELNICK, I. CECH, et G. BOGDAN. 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 588-596
- LAIMINS, L.A., D.B. RHOADS, et W. EPSTEIN. 1981. Osmotic control of kdp operon expression in E.coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 : 464-468
- LANDFALD, B., et A.R. STRØM. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in E.coli. *J. Bacteriol.* 165 : 849-855
- LARHER, F., J. HAMELIN, et P. STEWART. 1977. L'acide diméthyl-sulphonium-3-propanoïque de Spartina anglica. *Phytochemistry.* 16 : 2019-2020
- LARSEN, H. 1962. Halophilism. p.297-342. In I.C. Gunsalus et R.Y. Stanier (ed), *The bacteria*. Academic Press, N.Y.
- LARSEN, H. 1986. Halophilic and halotolerant microorganisms - an overview and historical perspective. *FEMS. Microbiol. Rev.* 39 : 3-7
- LARSEN, P.I., L.K. SYDNE, B. LANDFALD, et A.R. STRØM. 1987. Osmoregulation in E.coli by accumulation of organic osmolytes : betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch. Microbiol.* 147 : 1-7
- LECLERC, H. 1977. Sur les méthodes d'étude de la contamination bactérienne de la mer. *Rev. Int. oceanogr. Med.* XLVII. 113-122
- LE GUYADER, F. 1989. Colonisation bactérienne et implantation de E.coli dans le sédiment d'origine littorale. Thèse de doctorat de l'Université de Rennes I
- LEHNINGER, A.L. 1972. Biochimie. p.384. Flammarion-Médecine Sciences, Paris.
- LEISINGER, T. 1987. Biosynthesis of proline. p.345-351. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter et H.E. Umbarger (ed), *Escherichia coli and Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- LE RUDULIER, D., et T. BERNARD. 1986. Salt tolerance in Rhizobium : a possible role for betaines. FEMS.Microbiol. Rev. **39** : 67-72
- LE RUDULIER, D., T. BERNARD, et G. GOAS. 1984. Osmoregulation in Klebsiella pneumoniae : enhancement of anaerobic growth and nitrogen fixation under stress by proline betaine, γ -butyrobétaire, and other related compounds. Can. J. Microbiol. **30** : 299-305
- LE RUDULIER, D., et L. BOUILLARD. 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in Klebsiella pneumoniae and others members of the Enterobacteriaceae. Appl. Environ. Microbiol. **46** : 152-159
- LE RUDULIER, D., et R.C. VALENTINE. 1982. Genetic engineering in agriculture : osmoregulation. Trends Biochem. Sci. **7** : 431-433
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR, et R.J. RANDALL. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193** : 265-275
- LUGTENBERG, B., R. PETERS, H. BERNHEIMER, et W. BERENDSEN. 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of E.coli. Mol. Gen. Genet. **147** : 251-262
- MACH, P.A., et D.J. GRIMES. 1982. R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. Appl. Environ. Microbiol. **44** : 1395-1403
- MACKAY, M.A., R.S. NORTON, et L.J. BOROWITZKA. 1984. Organic osmoregulatory solutes in cyanobacteria. J. Gen. Microbiol. **130** : 2177-2191
- MAKEMSON, J.E., et J.W. HASTINGS. 1979. Glutamate functions in osmoregulation in a marine bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **38** : 178-180
- MALONEY, P.C. 1987. Coupling to an energized membrane : role of ion-motive gradients in the transduction of metabolic energy. p.222-243. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H.E. Umbarger (ed), E.coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- MARECHAL, L.R. 1984. Transport and metabolism of trehalose in E.coli and Salmonella typhimurium. Arch. Microbiol. **137** : 70-73
- MATSUMOTO, J., et T. OMURA. 1980. Some factors affecting the survival of fecal indicator bacteria in sea water. Tech.Rep. Tokoku. Univ. **25** : 169-185
- MAY, G., E. FAATS, M. VILLAJERO, et E. BREMER. 1986. Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in E.coli K-12. Mol. Gen. Genet. **205** : 225-233
- MEASURES, J.C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. Nature (London). **257** : 398-400
- MENZEL, R., et J. ROTH. 1980. Identification and mapping of a second proline permease in Salmonella typhimurium. J. Bacteriol. **141** : 1064-1070
- MEURY, J. 1988. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in E.coli. Arch. Microbiol. **149** : 232-239

- MEURY, J., et A. KEPES. 1982. Glutathione and gated potassium channels of E.coli. EMBO.J. 1 : 339-343
- MEURY, J., A. ROBIN, et P. MONNIER-CHAMPEIX. 1985. Turgor-controlled K⁺ fluxes and their pathways in E.coli. Eur.J. Biochem. 151 : 613-619
- MILNER, J.L., S. GROTHE, et J.M. WOOD. 1988. Proline PorterII is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of E.coli K-12. J. Biol. Chem. 263 : 14900-14905
- MILNER, J.L., D.J. McLELLAN, et J.M. WOOD. 1987. Factors reducing and promoting the effectiveness of proline as an osmoprotectant in E.coli K-12. J. Gen. Microbiol. 133 : 1851-1860
- MILNER, J.L., et J.M. WOOD. 1989. Insertion proQ220 :: Tn5 alters regulation of proline porter II, a transporter of proline and glycine betaine in E.coli. J. Bacteriol. 171 : 947-951
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature. 191 : 144-148
- MITCHELL, P. 1970. Membranes of cells and organelles : morphology, transport and metabolism. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 20 : 121-166
- MITCHELL, P. 1976. Vectorial chemistry and the molecular mechanics of chemiosmotic coupling : power transmission by proticity. Biochem. Soc. Trans. 4 : 399-430
- MITCHELL, R. 1968. Factors affecting the decline of non-marine micro-organisms in seawater. Wat. Res. 2 : 535-543
- MCLEOD, R.A., G. A. WISSE, et F.L. STEJSKAL. 1988. Sensitivity of some marine bacteria, a moderate halophile and E.coli to uncouplers at alkaline pH. J. Bacteriol. 170 : 4330-4337
- MORRISON, W.D., R.V. MILLER, et G.S. SAYLER. 1978. Frequency of F116-mediated transduction of Pseudomonas aeruginosa in a fresh-water environment. Appl. Environ. Microbiol. 36 : 724-730
- MULLER, E.K., FAHLBUSH, R. WALTHER, et G. GOTTSCHALK. 1981. Formation of N, N-dimethylglycine, acetic acid and butyric acid from betaine by Eubacterium Limosum. Appl. Environ. Microbiol. 42 : 439-445
- MUNRO, G.F., K. HERCULES, J. MORGAN, et W. SAUERBIER. 1972. Dependence of putrescine content of E.coli on the osmotic strength of the medium. J. Biol. Chem. 247 : 1272-1280
- NAKAE, T. 1976. Identification of the major outer membrane protein of E.coli that produces transmembrane channels in reconstituted vesicle membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71 : 877-884
- NIKAIDO, H., et M. VAARA. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49 : 1-32

NIKAIDO, H., et M. VAARA. 1987. Outer membrane, p.7-22. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, et H.E. Umbarger (ed), *E.coli* and *Salmonella typhimurium* : cellular and molecular biology. American society for Microbiology, Washington, D.C.

OGINO, T., C. GARNER, J.L. MARKLEY, et K.M. HERRMANN. 1982. Biosynthesis of aromatic compounds : ^{13}C -NMR spectroscopy of whole *E.coli* cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79 : 5828-5832

OHWADA, T., et S. SAGISAKA. 1988. The differential roles of potassium, proline, and betaine in osmoregulation of *E.coli*. B. Agric. Biol. Chem. 52 : 313-320

OLSON, B.H. 1978. Enhanced accuracy of coliform testing in seawater by a modification of the most-probable-number method. Appl. Environ. Microbiol. 36 : 438-444

ORLOB, G.T. 1956. Viability of sewage bacteria in sea-water. Sewage. Ind. Wastes. 28 : 1147-1167

PALEG, L.G., G.R. STEWART, et R. STARR. 1985. The effect of compatible solutes on proteins. Plant and Soil. 89 : 83-94

PALMER, L.M., A.M. BAYA, D.J. GRIMES, et R.R. COLWELL. 1984. Molecular genetic and phenotypic alteration of *E.coli* in natural water microcosms containing toxic chemicals. FEMS. Microbiol. Letters. 21 : 169-173

PELEG, E., A. TIETZ, et I. FRIEDBERG. 1980. Effects of salts and ionophores on proline transport in a moderately halophilic halotolerant bacterium. Biochim. Biophys. Acta. 596 : 118-128

PERROUD, B., et D. LE RUDULIER. 1985. Glycine betaine transport in *E.coli* : osmotic modulation. J. Bacteriol. 161 : 393 - 401

RAFAELI-ESHKOL, D., et Y. AVI DOR. 1968. Effect of betaine on salt resistance of the respiratory system. Biochem. J. 109 : 687-691

RATZKIN, B., M. GRABNAR, et J. ROTH. 1978. Regulation of the major proline permease in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 133 : 737-743

REED, R.H., et W.D.P. STEWART. 1985. Evidence for turgor-sensitive K^+ influx in the cyanobacterium *Anabena variabilis* ATCC 29413 and *Synechocystis* PCC 6714. Biochim. Biophys. Acta. 812 : 155-162

RHOADS, D.B., et W. EPSTEIN. 1977. Energy coupling to net K^+ transport in *E.coli* K-12. J. Biol. Chem. 252 : 1394-1401

RHOADS, D.B., et W. EPSTEIN. 1978. Cation transport in *E.coli*. IX: regulation of K^+ transport. J. Gen. Physiol. 72 : 283-295

RHOADS, D.B., F.B. WATERS, et W. EPSTEIN. 1976. Cation transport in *E.coli* . VIII Potassium transport mutants. J. Gen. Physiol. 67 : 325-341

RICHEY, B., D.S. CAYLEY, M. C. MOSSING, C. KOLKA, C.F. ANDERSON, T.C. FARRAR, et M.T. RECORD, Jr. 1987. Variability in the intracellular ionic environment of *E.coli* : differences between in vitro and in vivo effects of ion concentrations on protein-DNA interactions and gene expression. J. Biol. Chem. 262 : 7157-7164

ROD, M.L., K.Y. ALAM, P.R. CUNNINGHAM, et D.P. CLARK. 1988. Accumulation of trehalose by E.coli K-12 at high osmotic pressure depends on the presence of Amber suppressors. *J. Bacteriol.* **170** : 3601-3610

ROLLER, S.D., et G.D. ANAGNOSTOPOULOS. 1982. Accumulation of carbohydrate by E.coli B/r/1 during growth at low water activity. *J. Appl. Bacteriol.* **52** : 425-434

ROSEN, B.P. 1987. ATP coupled solute transport systems p.760-767. In F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, et H.E. Umbarger (ed), E.coli and Salmonella typhimurium : cellular and molecular Biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ROSZAK, D.B., et R.R. COLWELL. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2889-2983

ROSZAK, D.B., D.J. GRIMES, et R.R. COLWELL. 1984. Viable but non recoverable stage of Salmonella enteridis in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* **30** : 334-338

ROTH, W.G., M.P. LECKIE, et D.N. DIETZLER. 1985. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by E.coli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126** : 434-441

ROTH, W.G., M.P. LECKIE, et D.N. DIETZLER. 1988. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed E.coli by betaine. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 3142-3146

SAKAGUCHI, K. 1960. Betaine as a growth factor for Pediococcus soyae VIII: Studies on the activities of bacteria in soy sauce brewing. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.* **24** : 489-496

SCHOBERT, B., et H. TSCHESCHE. 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* **541** : 270-277

SHIARIS, M.P., A.C. REX, G.W. PETTIBONE, K. KEAY, P. McMANUS, M.A. REX, J. EBERSOLE, et E. GALLAGHER. 1987. Distribution of indicator bacteria and Vibrio parahaemolyticus in sewage-polluted intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 1756-1761

SIEBERS, A., L. WIECZOREK, et K. ALTENDORF. 1987. K⁺-ATPase from E.coli : isolation and characterization. *Methods Enzymol.* **157** : 668-680

SMITH, L.T. 1985. Characterization of a γ -glutamyl kinase from E.coli that confers proline overproduction and osmotic tolerance. *J. Bacteriol.* **164** : 1088-1093

SPEED, D., et M. RICHARDSON. 1968. Chromatographic methods for the isolation and identification of the products of choline oxidation. *J. Chromatog.* **35** : 497-505

STEWART, L.M.D., E.P. BAKKER, et I.R. BOOTH. 1985. Energy coupling to K⁺ uptake via the Trk system in E.coli : the role of ATP. *J. Gen. Microbiol.* **131** : 77-85

STOCK, J.B., B. RAUCH, et S. ROSEMAN. 1977. Periplasmic space in Salmonella typhimurium and E.coli. *J. Biol. Chem.* **252** : 7850-7861

STOLP, H., et M.P. STARR. 1963. Bdellovibrio bacteriovirus, genus and species, a predatory ectoparasitic, and bacteriolytic micro-organism. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **29** : 217-248

STOREY, R., et R.G. WYN JONES. 1977. Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochem.* **16** : 447-453

STRØM, A.R., P. FALKENBERG, et B. LANDFALD. 1986. Genetics of osmoregulation in *E.coli* : uptake and biosynthesis of organic osmolytes. *FEMS. Microbiol. Rev.* **39** : 79-86

STRØM, A.R., D. LE RUDULIER, M.W. JAKOWEC, R.C. BUNNELL, et R.C. VALENTINE. 1983. Osmoregulatory (Osm) genes and osmoprotective compounds. p.39-59 In T.Kosuge, C. Meredith and A. Hollaender (ed), *Genetic engineering of plants*. Plenum publishing Corp., New York.

STYRVOLD, O.B., P. FALKENBERG, B. LANDFALD, H.W. ESHOO, T. BJØRNSEN, et A.R. STRØM. 1986. Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *E.coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* **165** : 856-863

SUGIURA, M., et M. KISUMI. 1985. Proline-hyperproducing strains of *Serratia marcescens* : enhancement of proline analog-mediated growth inhibition by increasing osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **49** : 782-786

SUTHERLAND, L., J. CAIRNEY, M.J. ELMORE, I.R. BOOTH, et C.F. HIGGINS. 1986. Osmotic regulation of transcription : induction of the *proU* betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.* **168** : 805-814

TABOR, C.W., et H. TABOR. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbial. Rev.* **49** : 81-99

TEMPEST, D.W., J.L. MEERS, et C.M. BROWN. 1970. Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J. Gen. Microbiol.* **64** : 171-185

TOKUDA, H., et T. UNEMOTO. 1982. Characterization of the respiration dependent Na^+ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* **257** : 10007-10014

TOKUDA, H., et T. UNEMOTO. 1983. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V.costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na^+ pump functions. *J. Bacteriol.* **156** : 636-643

TSUCHIYA, T., et S. SHINODA. 1985. Respiration-driven Na^+ pump and Na^+ circulation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **162** : 794-798

VACCARO, R.F., M.P. BRIGGS, C.L. CAREY, et B.H. KETCHUM. 1950. Viability of *E.coli* in sea water. *Am. J. Publ. Hlth.* **40** : 1257-1266

VAN ALPHEN, W., et B. LUGTENBERG. 1977. Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *E.coli*. *J. Bacteriol.* **131** : 623-630

VAN DONSEL, D.J., et E.E. GELDREICH. 1971. Relationships of *Salmonellae* to fecal coliforms in bottom sediments. *Water.Res.* **5** : 1079-1087

VASCONCELOS, G.J., et R.G. SWARTZ. 1976. Survival of bacteria in seawater using a diffusion chamber apparatus *in situ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31** : 913-920

VILLAVERDE, M., et C.C. CASE. 1984. *envZ* mediates transcriptional control by local anesthetic but is not required for osmoregulation in *E.coli*. *J. Bacteriol.* **159** : 883-887

- VILLAJERO, M. J.L. DAVIS, et S. GRANETT. 1983. Osmoregulation of alkaline phosphatase synthesis in E.coli K-12. *J. Bacteriol.* **156** : 975-978
- WALDERHAUG, M.O., E.D. LITWACK, et W. EPSTEIN. 1989. Wide distribution of homologs of Escherichia coli Kdp K⁺-ATPase among Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **171** : 1192-1195
- WALL, J.S., D.D. CHRISTIANSON, R.J. DIMLER, et F.R. SENTI. 1960. Spectrophotometric determination of betaines and other quaternary nitrogen compounds as their periodides. *Anal. Chem.* **32** : 870-874
- WEST, I.C., et P. MITCHELL. 1974. The proton-translocating ATPase of E.coli. *FEBS Lett.* **40** : 1-4
- WON, W.D., et H. ROSS. 1973. Persistence of virus and bacteria in seawater. *J. Environ. Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng.* **99** : 205-211
- WOOD, E.J.F. 1963. Heterotrophic micro-organisms in the oceans. *Oceanogr. Mar. Biol. (Ann. Rev.)*, **197-222**
- WOOD, J.M., et D. ZADWORNY. 1979. Characterization of an inducible porter required for L-proline catabolism by E.coli K-12. *Can. J. Biochem.* **57** : 1191-1199
- WYN JONES, R.G. 1980. An assessment of quaternary ammonium and related compounds as osmotic effectors in crop plants, p.155-170. In D.W. Rains, R.C. Valentine and A. Hollaender (ed.), *Genetic engineering of osmoregulation. Impact on plant productivity for food, chemicals and energy*. Plenum Publishing Corp. New York.
- WYN JONES, R.G., et R. STOREY. 1981. Betaines.p.171-235. In L.G. Paleg et D. Aspinall (ed) . *Physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. Academic Press Inc, New York.
- XU, H.S., N. ROBERTS, F.L. SINGLETON, R.W. ATTWELL, D.J. GRIMES, et R.R. COLWELL. 1982. Survival and viability of nonculturable E.coli and V.cholerae in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8** : 313-323
- YANAGITA, T., et M. TAKAGI. 1980. Model experiments on the growth of enteric bacteria in fresh and sea water. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26** : 299-305
- YANCEY, P.H., M.E. CLARK, S.C. HAND, R.D. BOWLUS, et G.N. SOMERO. 1982. Living with water stress : evolution of osmolyte systems. *Science* : **217** : 1214-1227
- YEMM, E.W., et E.C. COCKING. 1955. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analyst*. **80**:209-213.
- ZOBELL, C. 1936. Bactericidal action of seawater. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **34** : 113-116

COMMUNICATIONS

- GHOUL, M., E. DUPRAY, D. LE RUDULIER, et M. CORMIER. 1987. Haloadaptation by Enterobacteria isolated from sea water. Third european marine microbiology symposium - Bangor, UK. 14-19 Sept.

- GHOUL, M., M. POMMEPUY, A. BATT, et M. CORMIER. 1988. Effets du carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) sur l'halotolérance de E.coli. Atelier-colloque de microbiologie marine. Société Française de Microbiologie. Villefranche-sur-Mer, France. 22-23 Nov.

- GHOUL, M., E. DUPRAY, T. BERNARD, M. POMMEPUY, et M. CORMIER. 1989. Marine sediments and halotolerance of E.coli. 5th international symposium on microbial ecology. Kyoto, Japan. 27 Aug-1st Sept.

PUBLICATIONS

- CORMIER, M., J. MINET, F. LE GUYADER, C. DESMONTS, E. KORN, M. GHOUL, M. POMMEPUY et E. DUPRAY. 1987. Various aspects of the behavior of bacteria of enteric origin in the marine environment. p.12-15. In. Pollution and the coastal environment : a symposium. Maryland sea grant publication, University of Maryland, College Park. USA.

- GHOUL, M., M. POMMEPUY, A. MOILLO-BATT, et M. CORMIER. 1989. Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on E.coli halotolerance. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1040-1043.

- GHOUL, M., T. BERNARD, et M. CORMIER. 1990. Evidence that E.coli accumulates glycine betaine from marine sediments. Appl. Environ. microbiol. 56 : 551-554.

Soumis à Publication

- GHOUL, M., T. BERNARD, S. SINBANDHIT, et M. CORMIER. 1990. Marine algae as osmoprotective source for E.coli. Appl. Environ. Microbiol.

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	2D	0,5	0,85	1,20
2	6S	0,68	1,02	1,20
3	54C	0,68	0,85	1,02
4	54S	0,5	0,68	1,02
5	62D	0	0,68	1,02
6	82C/ZB400	0,68	0,85	1,20
7	87S	0,5	0,68	1,20
8	117D	0,5	0,5	1,20
9	118C	0,5	0,68	1,02
10	179D	0	0,85	1,20
11	200C	0,68	0,68	1,20
12	1009C	0,5	0,68	1,20
13	1066S	0,5	0,68	1,20
14	1090S	0,68	0,68	1,02
15	1130C/ZB401	0,5	0,5	1,02
16	1140D	0,5	0,85	1,02
17	1157D/ZB402	0,68	0,68	0,85
18	1163C	0,5	0,68	1,02
19	1165D	0,68	0,85	1,02
20	1168C	0	0,68	1,20
21	1222D	0	0,85	1,02
22	1412C/ZB403	0,68	0,68	1,02
23	1413C	0,5	0,68	1,02
24	1415C	0,5	1,02	1,02
25	1418C	0,5	0,68	1,20
26	1422C	0,5	0,68	1,02
27	21C	0	0,85	1,02
28	33C	0,5	0,85	1,02
29	35D	0	0	0,85
30	40D	0	0,68	0,85
31	56D	0,5	0,68	0,85
32	72D	0,5	0,68	1,02
33	77D	0,5	1,02	1,02
34	124C	0	0,68	1,02
35	131D	0	0,5	1,02
36	177C	0,5	0,68	0,85
37	181D	0	0,68	1,02
38	1023C	0,5	0,68	1,02
39	1026C	0	0,85	1,02
40	1032C	0	0,85	1,02
41	1108C	0,68	0,85	1,02
42	1121C	0,5	0,85	1,02
43	1142C	0	0,85	1,02
44	1150C	0,5	0,68	1,02
45	1170C	0,5	0,85	1,02
46	1175C	0,68	0,85	1,20
47	1184C	0	0,85	1,20
48	1190C	0,5	0,85	1,20
49	1214C	0,5	0,85	1,02
50	1224C	0,5	0,85	1,02

ANNEXE 1 : Appréciation de l'halotolérance de souches de E.coli isolées du milieu marin, après 24h de culture

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	1111	0,68	1,02	1,20
2	1604	0	0,85	1,20
3	2174	0,5	1,02	1,20
4	2414	-	0,68	1,20
5	5900	-	-	1,20
6	7869	0,68	1,02	1,20
7	11007	0	0,68	1,20
8	11460	0,5	0,85	1,20
9	12098	0,68	0,68	1,20
10	13818	0	0,68	1,20
11	17375	0,5	0,85	1,20
12	18390	0	0,68	1,20
13	89638	0,5	0,85	1,20
14	89649	0	0,85	1,20
15	89671	0	0,68	1,20
16	90739	0,5	0,85	1,20
17	91072	0	0,85	1,20
18	91877	-	0,68	1,20
19	92825	0,68	0,85	1,20
20	95299	-	0,85	1,20
21	96021	0	0,68	1,20
22	91167	0	0,68	1,20
23	98778	0	0,5	1,20
24	99088	0	0,68	1,20
25	99530	0	0,68	1,20
26	99711	0,5	0,85	1,20
27	2254	0	0,68	1,02
28	98694	0	0,5	0,85
29	98752	0,5	0,68	1,20
30	3927	0,5	0,68	1,20
31	98275	0	0	1,02
32	3450	0,5	0,85	1,20
33	8057	0,5	0,85	1,20
34	6492	0,5	0,85	1,20
35	5795	0,5	0,85	1,20
36	9694L ⁻	0	0,68	1,02
37	9978	0,5	0,85	1,02
38	4588	0,5	0,85	1,02
39	96043	0	0,68	1,20
40	15766	0,5	1,02	1,20
41	9694L ⁺	0	0,85	1,02
42	34997	0	0,85	1,02
43	76862	0,5	0,85	1,20
44	96032	0,5	0,68	1,20
45	441	0,5	0,68	1,20
46	3097	0	0,85	1,20
47	12724	0	0,85	1,20
48	7972L ⁺	0	0,68	1,20
49	2957	0	0,68	1,20
50	7972L ⁻	0	0,85	1,20

ANNEXE 2 : Appréciation de l'halotolérance de souches de E.coli
d'origine hospitalière, après 24h de culture

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	49-1	0	0,68	1,02
2	49-3	0,5	0,85	1,20
3	B132-1	0,5	0,68	1,02
4	B132-2	0,5	0,85	1,20
5	B132-3	-	0	1,02
6	B134-2	0,5	0,85	1,20
7	B140-2	0,5	0,85	1,20
8	B140-3	0	0	1,02
9	B142-2	0,5	0,68	1,02
10	B143-2	0,5	0,85	1,02
11	B143-3	0,5	0,85	1,02
12	B145-1	0	0,85	1,02
13	B145-3	0,5	0,85	1,20
14	B145-4	0,5	0,85	1,02
15	BS213-2	0	0,68	1,02
16	BS217-1	0,5	0,68	1,02
17	BS230-2	0,5	0,85	1,20
18	BS230-3	0,5	0,85	1,02
19	BS232-1	0,5	1,02	1,20
20	BS233-1	0	0,68	1,02
21	BS234-1	0	1,02	1,20
22	BS234-2	0,5	1,02	1,20
23	BS234-3	0,5	0,85	1,20
24	BS235-2	0	0,68	1,02
25	BS236-4	0,5	0,85	1,02
26	BS241-1	0	0,68	0,85
27	BS243-1	0,5	0,85	1,20
28	BS244-3	0,5	0,85	1,02
29	BS244-4	0,5	0,85	1,02

ANNEXE 3 : Appréciation de l'halotolérance de souches de E.coli isolées de l'Elorn, après 24h de culture

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée			
		M63	M63+GB	M63+DMSP	BTS
1	2D	0,5	0,68	0,68	1,02
2	6S	0,5	1,02	0,68	1,20
3	54C	0,68	0,85	0,68	1,02
4	54S	0,5	0,68	0,68	1,02
5	62D	0	0,5	0,5	1,20
6	82C	0,68	1,02	0,68	1,20
7	87S	0,5	0,85	0,68	1,20
8	117D	0,5	0,68	0,68	1,02
9	118C	0,5	0,85	0,68	1,02
10	179D	0	0,68	0,5	0,85
11	200C	0,5	0,85	0,68	1,02
12	1009C	0,5	0,85	0,68	1,02
13	1066S	0,5	0,85	0,68	1,02
14	1090D	0,5	0,85	0,68	1,02
15	1140D	0,5	0,85	0,68	1,20
16	1157D	0,5	0,85	0,68	0,85

ANNEXE 4 : Osmoprotection par le DMSP de souches de E.coli isolées du milieu marin.

N°	Souches <u>K. oxytoca</u>	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	77D	0,68	0,68	0,85
2	1030D	0,5	0,5	1,20
3	1051D	0,5	1,02	1,02
4	1054D	0,5	0,85	1,02
5	1055D	0	0,68	1,02
6	1069D	0	0,5	0,85
7	1088D	0	0,5	1,02
8	1115C	0,5	1,02	1,02
9	1117C	0,5	0,85	1,20
10	1131C	0,5	0,85	1,02
11	1135C	0	0,5	0,85
12	1138C	0	0,85	1,02
13	1182C	0,68	0,68	1,02
14	1183C	0	0,68	1,02
15	1231C	0,5	0,85	1,02
16	1403D	0,5	0,68	1,02
17	1409C	0,68	1,20	1,20
18	1417C	0,68	1,20	1,20
19	1422Db	0,5	0,85	1,02
20	1422Dc	0,5	0,85	1,02
21	1425C	0,5	0,68	1,02
Souches <u>K. pneumoniae</u>				
22	45Da	0,5	0,85	1,02
23	45Db	0,5	0,68	1,20
24	59D	0,5	0,85	1,02
25	61D	0,68	0,85	0,85
26	1036D	0,5	0,85	0,68
27	1052D	0,5	0,68	1,20
28	1055D	0,5	0,5	0,85
29	1059D	0,5	0,85	1,02
30	1101D	0,5	0,68	1,02
31	1110D	0,5	0,85	1,02
32	1129D	0,5	0,68	1,02
33	1170D	0,5	0,85	1,02
34	1183D	0	0,5	0,85
35	1185D	0,5	1,02	0,68
36	1187D	0	0,68	0,85
37	1209D	0	0,68	0,85
38	1225C	0	0,85	1,20
39	1231C	0,68	1,02	1,20
40	1408D	0,5	1,02	1,02
41	1417C	0,68	1,02	1,02
42	1419C	0,5	0,85	1,20
43	1420C	0	0,85	0,85
44	1421C	0,5	0,68	1,02
45	1422D	0,5	0,85	1,02
46	1425C	0,5	0,68	1,02

ANNEXE 5 : Appréciation de l'halotolérance de souches de Klebsiella oxytoca et K.pneumoniae isolées du milieu marin, après 24h de culture

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	161-1-1	0	0,68	0,85
2	161-100-2	0	0,68	0,85
3	161-100-3	0	0,5	0,68
4	161-100-4	0	0,68	0,85
5	161-1000-2	0	0,5	0,68
6	161-1000-3	0,5	0,85	0,85
7	161-1000-4	0,5	0,85	0,85
8	161-1000-8	0,5	0,85	0,85
9	190-100-3	0	0,68	0,68
10	190-550-1	0	0,68	0,68
11	190-550-4	0,5	0,68	0,85
12	190-550-6	0,5	0,68	0,85
13	191-100-1	0,5	0,68	0,85
14	191-100-2	0	0,68	0,85
15	233-550-3	0	0,5	0,5
16	233-550-14	0	0,68	0,85
17	234-1-1000	0	0,68	0,68
18	234-1000-7	0,5	0,85	1,02
19	234-1000-8	0,5	0,85	0,85
20	234-1000-9	0,5	0,68	0,85

ANNEXE 6 : Appréciation de l'halotolérance de souches de Salmonella isolées de l'estuaire de Morlaix, après 24h de culture

N°	Souches <i>P.putida</i>	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	2S	0,5	0,68	1,20
2	2	0,5	0,68	1,02
3	6	0,68	0,85	1,02
4	7	0,68	1,02	1,02
5	8	0,5	0,85	0,85
6	9	0	0,85	0,85
7	10	0,5	0,85	1,02
8	31	0,68	0,85	1,02
9	31C	0,5	0,68	0,85
10	42D	0,5	0,68	1,02
11	51S	0,5	0,68	1,02
12	53D	0,68	1,02	1,20
13	73D	0,68	0,85	1,02
14	75D1	0,68	1,02	1,20
15	75D2	0,5	0,85	1,02
16	98D	0,5	1,02	1,20
17	144D	0,5	0,68	1,20
18	180D	0,5	0,68	1,20
19	1003S	0,5	0,68	1,20
20	1138D	0,5	0,68	1,20
Souches <i>P.aeruginosa</i>				
21	7C1	0,5	0,85	0,85
22	7C2	0,5	0,85	1,02
23	8	0	0,68	1,20
24	23	0	0,68	1,20
25	53D	0,5	0,68	1,20
26	53S	0,5	0,68	1,20
27	90D1	0,5	0,85	1,02
28	90D2	0,5	0,85	0,85
29	126D	0,5	0,68	1,02
30	126C	0,5	0,85	1,02
31	215D	0,5	0,68	1,20
32	224D	0	0,68	1,20
33	225D	0,5	0,68	1,02
34	303S	0,68	0,85	1,20
35	1041C	0,5	0,68	1,20
36	1221C	0,5	0,68	0,85

ANNEXE 7 : Appréciation de l'halotolérance de souches de *Pseudomonas putida* et *P.aeruginosa* isolées du milieu marin, après 24h de culture.

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63	M63+GB	BTS
1	93D	0	0,5	1,20
2	170C	0,5	0,68	1,20
3	196D	0,5	0,68	1,20
4	232C	0,5	0,68	1,02
5	232D	0,5	0,68	1,02
6	234D	0,68	1,02	1,20
7	238S	-	-	1,20
8	245D	0,5	0,68	1,20
9	256S	0,68	1,02	1,20
10	336C	0,68	0,85	1,20
11	346D	0	0,5	0,85
12	348D	0,5	0,68	1,20
13	921D	0	0,68	1,02
14	1063D	0	0	1,20
15	1080S	-	0	1,20
16	1089D	0,5	0,68	1,20
17	1094S	0	-	1,20
18	1117D	0,5	0,68	1,20
19	1181S	0,5	1,02	1,20
20	1182D	0	0,68	1,20
21	1402D	0,5	0,85	1,02
22	1413D	0,5	0,68	1,20
23	1423D	0	0	1,02

ANNEXE 8 : Appréciation de l'halotolérance de souches de Acinetobacter spp isolées du milieu marin, après 24h de culture.

N°	Souches <u>V.alginolyticus</u>	NaCl (M) maximale tolérée		
		M63*	M63+GB*	BTS
1	2	1,02	1,20	1,20
2	14	1,20	1,20	1,20
3	23+	1,02	1,20	1,20
4	31-	1,20	1,20	1,20
5	32	1,20	1,20	1,20
6	35	1,20	1,20	1,20
7	86+	1,02	1,20	1,20
8	87+	1,02	1,20	1,20
9	88+	1,02	1,20	1,20
10	90+	1,20	1,20	1,20
11	92+	1,20	1,20	1,20
12	92-	1,20	1,20	1,20
13	93+	1,02	1,20	1,20
14	94+	1,02	1,20	1,20
15	128+	1,20	1,20	1,20
16	136+	1,20	1,20	1,20

Souches
V.parahaemolyticus

17	R16	1,02	1,20	1,20
18	5179	1,02	1,20	1,20
19	7330	1,02	1,20	1,20
20	86-	1,02	1,20	1,20
21	87-	1,02	1,20	1,20
22	88-	1,02	1,20	1,20
23	90-	1,02	1,20	1,20
24	94-	1,02	1,20	1,20

ANNEXE 9 : Appréciation de l'halophilie chez V.alginolyticus et V.parahaemolyticus, après 24h de culture.

(*) Aucune croissance n'est observée en absence de sel

NaCl (M) maximale tolérée

N°	Souches	37°C						15°C					
		M63		M63+GB		BTS		M63		M63+GB		BTS	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	5j	15j	5j	15j	5j	15j
1	2D	0,5	0,68	0,85	0,85	1,20	1,20	0,5	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
2	6S	0,68	0,68	1,02	1,02	1,20	1,20	0,68	0,85	1,02	1,20	1,20	1,20
3	54C	0,5	0,5	0,68	0,85	1,02	1,02	0,5	0,68	0,85	1,20	1,02	1,02
4	82C	0,68	0,68	0,85	1,02	1,20	1,20	0,5	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
5	117D	0,5	0,5	0,85	0,85	1,20	1,20	0,68	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
6	200C	0,5	0,68	0,85	0,85	1,20	1,20	0,5	0,5	1,02	1,20	1,20	1,02
7	1157D	0,5	0,68	0,85	0,85	1,20	1,20	0,68	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
8	1165D	0,5	0,5	0,85	0,85	1,02	1,02	0,5	0,68	0,85	1,02	1,02	1,20
9	1412C	0,68	0,68	0,85	0,85	1,20	1,20	0,5	0,5	1,02	1,20	1,20	1,20
10	1175C	0,5	0,5	0,68	0,68	1,20	1,20	0,5	0,68	1,02	1,02	1,20	1,02
11	1108C	0,5	0,5	0,85	0,85	1,20	1,20	0,5	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
12	1121C	0,5	0,5	0,85	0,85	1,02	1,02	0,5	0,68	1,02	1,20	1,02	1,20
13	118C	0,5	0,68	0,85	1,02	0,85	0,85	0,5	0,68	0,85	1,20	1,02	1,20
14	1009C	0,5	0,68	0,85	0,85	1,02	1,02	0,5	0,68	0,85	1,20	1,02	1,20
15	1066S	0,5	0,5	0,68	0,85	1,02	1,02	0,5	0,68	0,85	1,02	1,02	1,20
16	1418C	0,68	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20	0,5	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
17	1422C	0,5	0,5	0,68	0,85	1,02	1,20	0,68	0,68	0,85	1,02	1,02	1,02
18	33C	0,5	0,68	0,85	1,85	1,02	1,20	0,5	0,5	1,02	1,20	1,20	1,20
19	77D	0,5	0,68	0,85	1,02	1,02	1,02	0,5	0,5	1,02	1,20	1,20	1,20
20	56D	0	0,5	0,85	0,85	1,02	1,02	0,5	0,5	0,85	1,02	1,02	1,20
21	1150C	0,5	0,68	0,85	0,85	0,85	0,85	0,68	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
22	1170C	0,5	0,68	0,85	1,02	1,02	1,02	0,5	0,5	1,02	1,02	1,02	1,02
23	1190C	0,68	0,68	1,02	1,02	1,20	1,20	0,68	0,68	1,02	1,20	1,20	1,20
24	1214C	0,5	0,5	0,85	0,85	1,02	1,02	0,5	0,5	0,85	1,20	1,02	1,02

ANNEXE 10 : Appréciation de l'halotolérance de souches de E.coli du milieu marin selon la température et la durée d'incubation.

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée							
		Sans CCCP				+ CCCP 20µM			
		M63	M63+GB	M63+PRO	BTS	M63	M63+GB	M63+PRO	BTS
1	2D	0,5	0,68	0,68	1,20	0	0,5	0	0,85
2	62D	0	0,5	0,5	1,20	0	0	0	0,85
3	179D	0	0,5	0,5	1,02	0	0	0	0,5
4	1140D	0,5	0,85	0,68	1,20	0	0,5	0,5	0,85
5	1168C	0	0,5	0,5	0,85	0	0,5	0,5	0,68
6	1222D	0	0,5	0,5	1,20	0	0	0	0,85
7	1415C	0,5	0,85	0,68	1,20	0,5	0,5	0,5	0,85
8	21C	0	0,68	0,5	1,20	0	0,5	0,5	0,68
9	40D	0	0,68	0,5	1,02	0	0,5	0	0,68
10	181D	0	0,68	0,5	1,20	0	0,5	0	0,85
11	1026C	0,5	0,68	0,68	1,02	0	0,5	0,5	0,85
12	1032C	0	0,68	0,5	1,20	0	0	0	0,68
13	1142C	0,5	0,68	0,5	1,02	0	0,5	0,5	0,85
14	1184C	0,5	0,68	0,68	1,20	0	0,5	0,5	0,68
15	1214C	0	0,5	0,5	1,02	0	0,5	0,5	0,85
16	1422C	0,5	0,68	0,68	1,02	0	0,5	0,5	0,5

ANNEXE 11 : Appréciation de l'halotolérance de E.coli (souches du littoral) après 24h de culture, en présence ou en absence de CCCP.

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée							
		Sans CCCP				+ CCCP 20 μ M			
		M63	M63+GB	M63+PRO	BTS	M63	M63+GB	M63+PRO	BTS
1	5795	0,5	0,85	0,85	1,02	0	0	0,5	0,68
2	9694L-	0,5	0,85	0,68	1,02	0	0	0,5	0,68
3	3450	0,5	1,02	0,5	1,02	0	0,5	0,5	0,68
4	2899	0,5	0,85	0,68	1,02	0	0,5	0,5	0,68
5	9195	0,5	1,02	0,68	1,20	0	0,5	0,5	0,68
6	3927	0,5	0,85	0,85	1,02	0	0	0,5	0,68
7	9694L+	0,5	0,85	0,68	1,02	0	0	0,5	0,68
8	9978	0,5	1,02	0,5	1,02	0	0,5	0,5	0,68
9	34997	0,5	0,85	0,68	0,85	0	0	0,5	0,68
10	86651	0,5	0,85	0,85	1,02	0	0,5	0,5	0,68
11	15766	0,5	1,02	0,68	1,20	0	0,5	0,5	0,68
12	6492	0,5	1,02	0,68	1,20	0	0,5	0,5	0,68
13	12724	0	1,02	0,68	1,02	0	0	0	0,68
14	96032	0,68	1,02	0,85	1,20	0,5	0,5	0,68	0,85
15	76862	0,68	1,02	0,85	1,20	0,5	0,5	0,68	0,85
16	7972L-	0,5	0,85	0,5	1,02	0	0,5	0	0,68

ANNEXE 12 : Appréciation de l'halotolérance de E.coli (souches hospitalières) après 24h de culture, en présence ou en absence de CCCP.

N°	Souches	NaCl (M) maximale tolérée					
		Sans CCCP			+CCCP 1,25μM		
		M63*	M63+GB*	BTS	M63*	M63+GB*	BTS
<u>V.algino</u>							
1	23+	1,02	1,20	1,20	0,68	0,85	0,85
2	32	1,20	1,20	1,20	0,85	1,02	1,02
3	35	1,02	1,20	1,20	0,68	0,68	1,02
4	86+	1,02	1,20	1,20	0,68	1,02	0,85
5	90+	1,20	1,20	1,20	0,68	0,85	0,85
6	92+	1,20	1,20	1,20	0,68	1,02	0,85
7	92-	1,02	1,20	1,20	0,68	0,85	0,85
8	136	1,20	1,20	1,20	0,68	0,85	1,02
<u>V.parah.</u>							
9	R16	1,02	1,20	1,20	0,68	0,85	0,85
10	5179	1,02	1,20	1,20	0,5	0,68	1,02
11	7330	1,02	1,20	1,20	0,5	0,68	0,85
12	86-	1,02	1,20	1,20	0,5	0,68	0,85
13	87-	1,02	1,20	1,20	0,68	0,85	1,02
14	88-	1,02	1,20	1,20	0,85	1,02	1,02
15	90-	1,02	1,20	1,20	0,5	0,68	0,68
16	94-	1,02	1,20	1,20	0,68	0,85	0,85

(*) en absence de sel, aucune croissance n'est observée

ANNEXE 13 : Appréciation de l'halophilie chez V.alginolyticus et V.parahaemolyticus, après 24h de culture, en absence ou en présence de CCCP.

N°	E.coli Souches	NaCl (M) maximale tolérée																	
		Témoins		Extraits aqueux					Extraits hydro-alcooliques dilués au 1/100					Extraits hydro-alcooliques dilués au 1/200					
		M63	M63+GB	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
1	2D	0,5	0,85	1,02	1,20	0,85	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,68	0,68	0,68	0,85	0,85	
2	6S	0,68	1,02	0,85	0,85	1,20	1,20	1,20	0,85	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	
3	54C	0,68	0,85	0,85	0,85	1,02	1,20	1,02	0,85	0,85	0,85	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	1,02	0,85	
4	54S	0,5	0,85	1,02	0,68	0,85	1,20	1,02	0,85	0,85	0,68	0,85	0,85	0,68	0,85	0,68	0,85	0,85	
5	62D	0	0,68	0,85	0,68	1,02	1,20	1,20	0,68	0,68	0,85	0,85	0,85	0,5	0,68	0,85	0,85	0,85	
6	82C	0,68	1,02	1,20	1,02	1,20	1,20	1,20	0,85	0,85	0,85	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	1,02	0,85	
7	87S	0,5	0,85	1,02	0,85	1,02	1,20	1,20	0,85	0,85	0,85	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	1,02	0,85	
8	117D	0,5	0,85	0,85	0,85	1,02	1,20	1,02	0,85	0,85	0,68	0,85	0,85	0,68	0,85	0,5	0,85	0,85	
9	118C	0,5	0,68	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,68	0,68	0,68	0,85	0,85	
10	179D	0,5	0,68	0,68	0,5	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,68	0,68	0,68	0,85	0,85	
11	200C	0,5	0,85	0,85	0,85	1,02	1,20	1,02	0,85	0,68	0,68	0,85	0,85	0,68	0,68	0,68	0,85	0,85	
12	1009C	0,5	0,85	0,85	0,68	1,02	1,20	1,20	0,85	0,68	0,68	0,85	0,85	0,68	0,68	0,5	0,85	0,85	
13	1066S	0,5	0,85	0,85	0,85	1,02	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,68	0,68	0,68	0,85	0,85	
14	1090D	0,68	0,85	0,85	0,85	1,02	1,02	1,20	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	0,85	
15	1130C	0	0,85	0,85	0,68	1,02	1,20	0,85	0,68	0,68	1,02	1,02	1,02	0,68	0,68	0,68	1,02	0,68	
16	1140D	0,5	0,85	1,02	0,85	1,02	1,02	1,02	0,85	0,85	0,85	1,02	1,02	0,85	0,85	0,68	1,02	0,85	

ANNEXE 14 : Appréciation de l'halotolérance de *E.coli* du littoral, en présence d'extraits aqueux et extraits hydro-alcooliques d'algues, après 24h de culture.

1-*Ascophyllum nodosum* 2-*Fucus serratus* 3-*Enteromorpha ramulosa*

4-*Ulva lactuca* 5-*Rhodymenia palmata*

ANNEXE 15 :

DETERMINATION DE L'AZOTE AMINE

Intérêt : Les algues marines, matière végétale vivante, constituent une source de substances nutritives diverses pour E.coli. Parmi elles, les acides aminés ont un intérêt certain dans les phénomènes de l'haloadaptation. Aussi, nous avons voulu considérer l'apport d'acides aminés libres par les extraits hydroalcooliques d'algues. Cet apport est quantifié par la détermination de l'azote aminé.

Le principe est basé sur la réaction spécifique entre la fonction α -aminée d'un acide aminé et la ninhydrine. La coloration bleue intense obtenue permet la mesure quantitative des acides aminés par spectrophotométrie à 570nm. Il est à préciser toutefois que les peptides possédant une fonction α -aminée libre sont également dosés alors que la proline dans laquelle cette fonction est substituée fournit un dérivé jaune caractéristique non mesuré par cette méthode.

Technique : La méthode utilisée est celle décrite par YEMM et COCKING (1955) dans laquelle l'acide ascorbique a remplacé le cyanure de potassium.

L'essai est réalisé en duplicita :

1ml de l'extrait (5 espèces d'algues)

+

0.5ml de la solution tamponnée à pH = 5.2

(18,4g d'acide citrique.1H₂O; 6,4g de NaOH sont dissous dans 70ml d'H₂O distillée bouillie. Ajuster le pH et compléter à 100ml).

+

1.2ml de la solution de ninhydrine

(290mg de ninhydrine sont dissous dans 25ml de méthylcellosolve, ajouter 1ml d'une solution d'acide ascorbique à 1% dans l'eau distillée. Ajouter 5ml de méthylcellosolve. Agiter).

Agiter vigoureusement.

Boucher les tubes à l'aide d'une bille de verre.

Porter au bain-marie bouillant pendant 20min.

Refroidir dans de la glace.

Ajouter 3ml d'éthanol à 60°.

Agiter et lire la densité optique à 570nm

- Réaliser deux témoins "à blanc" en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée.

- Etalonner à partir de solutions de référence de leucine. Pour ceci, préparer

les dilutions suivantes (1/4, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40) à partir d'une solution-mère de leucine 2,5 mM.

ANNEXE 16 :
DOSAGE DES COMPOSES-ONIUMS

La méthode utilisée est celle décrite par WALL et COLL (1960) et modifiée par STOREY et WYN JONES (1977). Elle est très sensible mais non spécifique des bétaines puisqu'elle permet le dosage simultané des composés sulfoniuns. Des modifications de pH doivent être toutefois apportées au protocole pour le dosage de la choline (STOREY et WYN JONES, 1977) ou du bétainal (SPEED et RICHARDSON, 1968).

Le principe de la méthode est basé sur la formation, en milieu acide, de dérivés périodatés colorés et leur mesure spectrophotométrique à 365nm.

Technique :

100 μ l de réactif iodé (7,5g d'iode + 10g de iodure de potassium dissout dans 100ml de HCl.N)

+

250 μ l échantillon (125 μ l extrait + 125 μ l HCl 2N)

Maintenir dans de la glace et agiter occasionnellement pendant au moins 90min.

Ajouter 1ml d'eau distillée (4°C) et 5ml de dichloroéthane gardé à -20°C.

Faire barboter de l'air pendant 2min au vortex pendant 15 à 30s. Garder dans de la glace.

Diluer la phase organique au 1/3 avec du dichloroéthane à température ambiante.

Lire aussitôt au spectrophotomètre à 365nm contre une gamme étalon (0 à 1000nmoles) préparée à partir d'une solution-mère de glycine bétaine anhydre (4mM dans HCl N) (Sigma Co). Les différentes dilutions se feront à l'aide de HCl N.

ANNEXE 17 :
DOSAGE DES PROTEINES

Méthode de LOWRY et COLL (1951)

- Utiliser 10 μ l de l'échantillon et compléter à 0,20ml par NaOH 0,72N.
- Rajouter 5ml du réactif au cuivre (1) et laisser agir 10min à température ambiante.
- Rajouter 0,5ml du réactif de Folin dilué au 1/3 (2). Laisser la coloration se

développer 30min à l'obscurité.

- Lire la densité optique à 660nm.
 - Réaliser l'étalonnage à partir d'une solution de Sérum-Albumine Bovine (Sigma Co) (500µg/ml dans NaOH 0,72N) avec les concentrations suivantes : 0 - 25 - 50 - 75 et 100µg/0,20ml NaOH 0,72N.

(1) 49ml d'une solution (2% de Na₂CO₃ dans NaOH 0,1N),

Ajouter simultanément :

- 0,5ml d'une solution de CuSO₄-1%
 - 0,5ml d'une solution de tartrate double de Na/K 2%

(2) 5ml d'une solution de Folin-Ciocalteu (MERCK) + 10ml H₂O.

ANNEXE 18 :

SYNTHESE DU DMSP (Diméthylsulfoniopropionate) selon CHAMBERS et COLL (1987)

A 30ml de chlorure de méthylène, on ajoute 5ml de diméthylsulfure. A 0°C, on introduit 2ml d'acide acrylique dans ce mélange.

Dans cette solution maintenue à 0°C, sous agitation, on fait barboter, pendant 20min, du chlorure d'hydrogène. Le solide formé est filtré et recristallisé dans le mélange méthanol/ether : 50/50 ; son point de fusion est de 125°C.

ANNEXE 19 :

BOUILLON TRYPTICASE-SQJA (AES)

- Hydrolysat trypsique de caséine	17g
- Peptone papaïnique de soja	5g
- NaCl	5g
- Phosphate bipotassique	2,5g
- Glucose	5g

Dissoudre 30g dans 1000ml d'eau distillée.

pH final : 7,3 (environ).

ANNEXE 20 :

DETERMINATION DES PRESSIONS OSMOTIQUES

Elles sont déterminées à l'aide d'un micro-osmomètre (Adv.instruments, Modèle 3MO) par la mesure du point de congélation. Les résultats sont exprimés en mOsm/kg.

Eau de mer	eau		M63		BTS	
	Nacl (M)	osmolalité	Nacl (M)	osmolalité	Nacl (M)	osmolalité
950 à 1100	0,17	321	0	289	0,085	318
	0,5	951	0,5	1228	0,5	1125
	0,68	1267	0,68	1540	0,68	1476
	0,85	1567	0,85	1835	0,85	1780
	1,02	1899	1,02	2135	1,02	2080
	1,20	2200	1,20	2435	1,20	2380

ANNEXE 21 :

DETERMINATION DU POIDS SEC BACTERIEN

Les bactéries récupérées sur membrane sont mises à sécher à 106°C jusqu'à poids constant. Les variations de poids d'une membrane seule sont vérifiées.

ANNEXE 22 :

REACTIF A L'ANTHRONE

- 0,2g d'anthrone ultra-pure (Sigma Co)
 - 100ml d'acide sulfurique exempt de nitrates (FLUKA Chemie AG-Suisse).
- Le réactif est préparé au moins 4h avant d'être utilisé et ne se conserve pas.

ANNEXE 23 :

REACTIF DE DRAGENDORFF

- Solution A : Iodure de Potassium à 30% dans l'eau.
- Solution B : Carbonate de Bismuth à 8% dans HCl 2N.

Prélever 10ml de A, les introduire dans une fiole de 200ml. Ajouter goutte à goutte 10ml de B. Ajuster à 200ml avec HCl 1N.

ANNEXE 24 :

REACTIF A LA NINHYDRINE

- Peser 0,4g de ninhydrine (MERCK), ajouter 100ml de π -butanol + 4ml d'acide acétique.
- Agiter 1 à 2 heures.
- Chauffer vers 80-100°C pendant environ 5min.

Remarque : Les produits chimiques utilisés sont de qualité "pure" ou "ultrapure".