

45000

EG10 - G00 - E

UNIVERSITE DE RENNES I

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1995

N° 50

THESE

EN VUE DU

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE RENNES I

Mention:

SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 30 mars 1992

**ETUDE DE LA LUMIERE VISIBLE COMME
FACTEUR LIMITANT DE LA SURVIE DE
ESCHERICHIA COLI EN MILIEU MARIN**

par

Michèle Gourmelon

Présentée et soutenue publiquement le 28 avril 1995

JURY

Président :	Monsieur M. Cormier	Professeur Université de Rennes I
Directeur de thèse :	Monsieur M. Cormier	
Membres du jury :	Madame I. Barcina	Professeur Université du pays basque Bilbao Directeur de recherche CNRS Institut Jacques Monod Paris
	Madame D. Touati	Professeur Université de Paris XI
	Monsieur P. Bourlioux	Professeur associé Université de Rennes I
	Madame M. Pommepuy	Chargé de recherche CNRS Université de Montpellier II
	Monsieur M. Troussellier	

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10083

UNIVERSITE DE RENNES I

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1995

N° 50

THESE

EN VUE DU

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE RENNES I

Mention:

SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 30 mars 1992

**ETUDE DE LA LUMIERE VISIBLE COMME
FACTEUR LIMITANT DE LA SURVIE DE
ESCHERICHIA COLI EN MILIEU MARIN**

par

Michèle Gourmelon

Présentée et soutenue publiquement le 28 avril 1995

JURY

Président :	Monsieur M. Cormier	Professeur Université de Rennes I
Directeur de thèse :	Monsieur M. Cormier	
Membres du jury :	Madame I. Barcina	Professeur Université du pays basque Bilbao
	Madame D. Touati	Directeur de recherche CNRS Institut Jacques Monod Paris
	Monsieur P. Bourlioux	Professeur Université de Paris XI
	Madame M. Pommeppy	Professeur associé Université de Rennes I
	Monsieur M. Troussellier	Chargé de recherche CNRS Université de Montpellier II

Résumé

L'étude de *Escherichia coli* en microcosmes d'eau de mer à 34 ‰ de salinité, exposé à la lumière visible montre que cette bactérie évolue rapidement (en quelques heures) vers un état viable non cultivable tandis qu'à l'obscurité, la capacité à cultiver se maintient plus longtemps.

Deux facteurs principaux semblent déterminer la survie de *Escherichia coli* dans l'eau de mer lors de l'exposition à la lumière visible : l'état de la bactérie au moment du rejet et la qualité du milieu récepteur.

L'état de la bactérie avant exposition à la lumière visible joue un rôle important dans sa survie : en effet, quand il est en début de phase stationnaire avant son séjour dans l'eau de mer, *Escherichia coli* résiste mieux au stress lumineux que lorsqu'il est en phase exponentielle de croissance. Cette meilleure survie en phase stationnaire lors de l'exposition à la lumière visible est due, au moins en partie, au facteur KatF. Nos résultats ont montré que cet effet protecteur du facteur KatF est du, en partie, à une synthèse des catalases HPI et HPII et de la protéine Dps. Par contre, l'exonucléase III ou les enzymes de synthèse du tréhalose ne sont pas impliquées dans cette protection par le facteur KatF.

L'eau de mer, par sa haute teneur en sels et son caractère oligotrophique, joue un rôle non négligeable dans la sensibilité de la bactérie à la phototoxicité. En effet, quand la salinité est abaissée à 20‰ ou mieux à 10 ‰, l'entérobactérie survit beaucoup mieux au stress lumineux. De même, l'apport d'une faible quantité de nutriments (glucose à 18 mg.l⁻¹ par exemple) dès l'immersion dans l'eau de mer permet à *Escherichia coli* de mieux résister à la phototoxicité. Lorsque l'addition est retardée de 24 ou 48 heures, la protection est beaucoup plus faible, la bactérie ayant déjà subi des dommages. De plus, quand les bactéries sont placées 24 ou 48 heures à l'obscurité dans l'eau de mer, elles survivent mieux ensuite à l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer.

Enfin, nos résultats ont montré que la lumière visible agit sur les bactéries immergées dans l'eau de mer, en présence d'oxygène, par un phénomène de photosensibilisation endogène : en effet, des espèces oxygénées réactives notamment l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ont été mises en évidence dans les cellules (par des techniques indirectes). Ces composés peuvent ensuite endommager des composés cellulaires tels que les ADNs plasmidiques par exemple. Par contre, l'exposition à la lumière visible ne conduit pas à une modification importante du profil des acides gras membranaires.

Mots clés : *Escherichia coli* ; lumière visible ; eau de mer ; espèces oxygénées réactives (ROS) ; facteur KatF ; phase stationnaire ; stress osmotique.

FACULTE DE PHARMACIE
PERSONNELS ENSEIGNANTS

1994-1995

Laboratoire de BIOCHIMIE

Monsieur le Docteur BIHAIN Bernard, Chef de Service
Monsieur HANNOUCHE Nabil, Maître de Conférences
Mademoiselle FRANCES YEN, Maître de Conférences
Monsieur CHEVREUIL, ATER
Madame LE ROY Brigitte, assistante
Mademoiselle KHALLOU Jamila, ATER

Laboratoire de BIOLOGIE CELLULAIRE & VEGETALE

Monsieur le Professeur CILLARD Pierre, Chef de Service
Madame le Professeur CILLARD Josiane
Madame DELAGE Elisabeth, Maître de Conférences
Mademoiselle MOREL Isabelle, Maître de Conférences
Madame FERRY Jocelyne, ATER

Laboratoire de CHIMIE ANALYTIQUE & BROMATOLOGIE

Monsieur le Professeur BURGOT Jean-Louis, Chef de Service
Madame PLANTARD Claude, Maître de Conférences
Monsieur BOUDEVILLE Philippe, Maître de Conférences
Madame BURGOT Gwénola, Maître de Conférences
Monsieur BERTRAND Hugues, ATER

Laboratoire de CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Madame le Professeur SAULEAU Armelle
Monsieur le Professeur LEBORGNE Jean-Yves
Madame DAVID Michèle, Maître de Conférences
Monsieur SAULEAU Jean, Maître de Conférences
Monsieur URIAC Philippe, Maître de Conférences
Monsieur CORBEL Jean-Charles, Assistant
Monsieur MEILLARD Didier, Assistant
Madame OLLIVIER Christine, Assistante
Mademoiselle MARTIN Ghislaine, ATER
Monsieur JEGO Jean-Michel, ATER

Laboratoire de BIO-MATHEMATIQUES ET PHYSIQUE PHARMACEUTIQUES

Monsieur le Professeur SEGUI Alain, Chef de Service
Monsieur le Professeur TAIEB Guy (en congé thématique)
Monsieur GUERIN Jacques, Maître de Conférences
Monsieur HOUeix Alain, Maître de Conférences
Madame LE FLOCH Marie, Maître de Conférences

Laboratoire de MICROBIOLOGIE & IMMUNOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Monsieur le Professeur CORMIER Michel, Chef de Service
Madame le Professeur GENETET Noëlle
Madame POMMEPUY Monique, Professeur Associé
Madame SAUVAGER Françoise, Maître de Conférences
Monsieur MINET Jacques, Maître de Conférences
Madame SCHAAN Marisella, ATER

Laboratoire de PARASITOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Monsieur le Professeur DEUNFF Jean, Chef de Service
Madame BEAUCOURNU Françoise, Maître de Conférences
Madame BUNETEL Laurence, Maître de Conférences

Laboratoire de PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE & PHARMACIE CLINIQUE

Monsieur le Professeur LEVERGE Roger, Chef de Service
Madame le Professeur ACAR Liliane,
Monsieur le Professeur SADO Pierre
Monsieur LECORRE Pascal, Maître de Conférences
Monsieur GIBASSIER Denis, Maître de Conférences

Laboratoire de PHARMACODYNAMIE et PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE

Monsieur Le Professeur LEGRAND Alain, Chef de Service
Monsieur le Professeur LAGENTE Vincent, ATER
Madame LAGENTE, ATER
Melle MARTIN Corinne, ATER

Laboratoire de PHARMACOGNOSIE & MYCOLOGIE

Monsieur le Professeur GIRRE René-Loïc, Chef de Service
Madame AMOROS Maryvonne, Maître de Conférences
Monsieur BOUSTIE Joël, Maître de Conférences

Laboratoire de PHYSIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Monsieur le Professeur RAULT Bernard, Chef de Service
Monsieur SAIAG Bernard, Maître de Conférences
Monsieur FARDEL Olivier, ATER
Madame GIRRE Annie, Assistante

Laboratoire de TOXICOLOGIE

Monsieur le Professeur ANGER Jean-Pierre, Chef de Service
Madame PELLISSIER Catherine, Maître de Conférences
Madame ANGER Françoise, Assistante

ANGLAIS

Monsieur BOUER Guy

AVANT-PROPOS

Je remercie Monsieur M. Cormier qui me fait l'honneur de présider le jury de la thèse pour les conseils qu'il m'a donnés tout au long de ce travail en tant que directeur de thèse.

Je remercie vivement Madame M. Pommepuy qui est à l'origine de cette recherche, pour m'avoir accueillie au laboratoire de Microbiologie du Département Environnement Littoral à IFREMER où s'est déroulée cette étude. Je tiens également à lui exprimer ma reconnaissance pour son aide au cours du travail expérimental.

Je remercie Madame I. Barcina pour avoir accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur. Je tiens également à la remercier pour son accueil à Bilbao.

J'adresse tous mes remerciements à Madame D. Touati qui me fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je la remercie vivement pour ses conseils et pour m'avoir fourni de nombreuses souches bactériennes.

J'exprime ma gratitude à Monsieur P. Bourlioux et à Monsieur M. Troussellier pour avoir accepté de juger ce travail et de participer à ce jury.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à ce travail :

- l'ensemble des personnes du département Environnement Littoral à IFREMER centre de Brest,

- tout particulièrement, l'équipe du laboratoire de Microbiologie de Brest : Madame M.P. Caprais, Mademoiselle A. Derrien, Madame E. Dupray, Madame D. Guillerm ainsi que l'équipe de Microbiologie de Nantes,

- Patricia Chaquin, Fabrice Ferrand, Hassiba Melikechi et Anne Pignier pour leur aide au cours de stages effectués au laboratoire,

- les personnes du laboratoire de Biotechnologie à IFREMER pour m'avoir accueillie pour certaines expériences et tout particulièrement Christine Labrat et Laurence Cornec pour leur aide technique et leurs conseils,

- les personnes du laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique de l'Université de Rennes I et tout particulièrement Marisela Schaan pour ses conseils lors des extractions plasmidiques,

- Madame J. Cillard et Monsieur P. Cillard du laboratoire de Biologie Cellulaire et Végétale de la Faculté de Pharmacie à Rennes pour m'avoir accueillie dans leur laboratoire et pour leurs conseils,

- Monsieur R. Pichon et Madame N. Kervarec du laboratoire RMN de la faculté des Sciences à l'Université de Bretagne Occidentale à Brest pour avoir effectué les analyses par spectroscopie RMN,

- Monsieur J.C. Caprais pour son aide lors de l'étude du profil des acides gras bactériens et Monsieur G. Cahet pour les expériences avec la ³H méthylthymidine.

Cette étude a été financée par une bourse IFREMER.

SOMMAIRE

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I DIFFERENTS FACTEURS LIMITANT LA SURVIE DES BACTERIES ENTERIQUES EN MER.....	4
I-1 Les facteurs physiques.....	4
I-1-1 LA DILUTION ET LA SEDIMENTATION	4
I-1-2 LA TEMPERATURE.....	4
I-1-3 L'ENSOLEILLEMENT (UV ET LUMIERE VISIBLE).....	5
I-2 Les facteurs chimiques.....	7
I-2-1 LA SALINITE	7
I-2-2 L'OLIGOTROPHIE	7
I-2-3 LE PH	8
I-3 Les facteurs biologiques.....	8
I-3-1 LA PREDATION.....	8
I-3-2 LA COMPETITION DE FLORE	8
II ETUDE DE LA LUMIERE VISIBLE	9
II-1 Les photosensibilisateurs	9
II-1-1 EXCITATION DE PHOTOSENSIBILISATEURS PAR LA LUMIERE VISIBLE	9
II-1-2 LES PHOTOSENSIBILISATEURS ENDOGENES	10
II-1-3 LES PHOTOSENSIBILISATEURS EXOGENES	11
II-2 Les réactions de photo-oxydation.....	11
II-2-1 LE TYPE I.....	11
II-2-2 LE TYPE II-FORMATION D'OXYGENE SINGULET	12
II-2-3 AUTRE DEFINITION DU TYPE I ET DU TYPE II.....	13
III PRODUCTION DES ROS ET EFFETS SUR LES BACTERIES DES ROS ET DE LA LUMIERE VISIBLE	13
III-1 Production des espèces oxygénées réactives (ROS).....	13
III-1-1 PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE.....	13
III-1-2 PRODUCTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE.....	14
III-1-3 PRODUCTION DU RADICAL HYDROXYLE.....	14

III-2 Dommages cellulaires	15
III-2-1 LES DOMMAGES DUS AU STRESS OXYDATIF	15
III-2-2 LES DOMMAGES DUS A L'EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE	16
III-3 Les systèmes de défense bactériens.....	17
III-3-1 LES SYSTEMES PREVENTIFS	17
III-3-2 LES SYSTEMES CURATIFS	19
 IV ETUDE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA BACTERIE.....	 22
IV-1 Phase exponentielle et phase stationnaire	22
IV-1-1 PHASE EXPONENTIELLE.....	22
IV-1-2 PHASE STATIONNAIRE	22
IV-2 Gène <i>katF</i>	23
 MATERIELS ET METHODES	 26
I PREPARATION DES SOUCHES.....	27
I-1 Souches utilisées	27
I-2 Préparation des cultures.....	28
II PREPARATION DE L'EAU	29
III EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE DE <i>E. COLI</i>	29
IV APPORT DE DIFFERENTS COMPOSES.....	31
IV-1 Utilisation de piègeurs de ROS	31
IV-1-1 PIEGEURS DU RADICAL HYDROXYLE (OH°)	31
IV-1-2 PIEGEURS DE L'OXYGENE SINGULET (¹ O ₂)	31
IV-1-3 CHELATEUR DU FER	31
IV-1-4 ENZYMES	31
IV-2 Apport de nutriments.....	32
IV-3 Apport d'osmoprotecteurs.....	32
V EXPERIENCE EN ANAEROBIOSE	32

VI NUMERATIONS BACTERIENNES	32
VI-1 Methodes directes.....	32
VI-1-1 DENOMBREMENT TOTAL DES BACTERIES PAR EPIFLUORESCENCE.....	32
VI-1-2 DENOMBREMENT DES BACTERIES VIABLES : DVC (DIRECT VIABLE COUNT) (KOGURE <i>et al.</i> , 1979).....	33
VI-1-3 LE CYANODITOLYL TETRAZOLIUM (CTC)	36
VI-2 Dénombrement des bactéries cultivables	36
VII MESURE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE BACTERIENNE PAR INCORPORATION DE LA ³H METHYL-THYMIDINE	36
VIII ETUDE DU PROFIL DES ACIDES GRAS MEMBRANAIRES.....	39
IX ETUDE DES PROTEINES	41
IX-1 Dosage des protéines totales	41
IX-2 Mesure des activités enzymatiques	42
IX-2-1 PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES	42
IX-2-2 DOSAGE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE	42
IX-2-3 ELECTROPHORESES NATIVES : VISUALISATION DES SOD ET DES CATALASES	43
X ETUDE DU PROFIL PLASMIDIQUE.....	44
X-1 Technique d'extraction.....	44
X-2 Préparation du gel	45
XI ETUDE DES COMPOSES ACCUMULES DANS LA BACTERIE PAR RMN ¹H et ¹³C	46
XI-1 Préparation des échantillons	46
XI-2 Analyse par spectroscopie RMN.....	47
XII PRESENTATION DES RESULTATS	47

RESULTATS ET DISCUSSION	48
I DECROISSANCE BACTERIENNE PAR EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE DANS L'EAU DE MER.....	49
I-1 Bactéries totales (AODC, coloration au DAPI)	50
I-2 Bactéries viables (DVC).....	50
I-3 Bactéries ayant une activité respiratoire (CTC).....	51
I-4 Bactéries cultivables.....	51
II ETUDE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA SURVIE DE <i>E. COLI</i> DANS L'EAU DE MER LORS DE L'EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE ..	54
II-1 Rôle de l'état physiologique de la bactérie avant illumination.....	54
II-1-1 PHASE EXPONENTIELLE ET PHASE STATIONNAIRE.....	54
II-1-2 ROLE DU GENE <i>katF</i>	55
II-2 Stress oligotrophique.....	63
II-2-1 APPORT DE MILIEU RICHE DANS L'EAU DE MER.....	63
II-2-2 APPORT DE MILIEU MINIMUM M63 ET DE GLUCOSE	64
II-3 Stress osmotique	67
II-3-1 ETUDE AVEC DIFFERENTES SALINITES	67
II-3-2 COMPARAISON EAU DOUCE-EAU DE MER.....	68
II-3-3 APPORT D'OSMOPROTECTEURS TELS QUE LA GLYCINE BETAINE (1 mM)	71
II-3-4 ACCUMULATION D'OSMOPROTECTEURS LORS D'APPORT DE NUTRIMENTS (RECHERCHE PAR RMN ¹ H ET ¹³ C).....	72
II-4 Pré-incubation à l'obscurité avant exposition à la lumière visible.....	78
III ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE LA LUMIERE VISIBLE DANS L'EAU DE MER	79
III-1 Hypothèse du stress oxydatif et de la production de ROS	80
III-1-1 ROLE DE L'OXYGENE.....	80
III-1-2 PRODUCTION DES ESPECES OXYGENEES REACTIVES ¹ O ₂ , O ₂ ⁻ , H ₂ O ₂ , °OH.....	81
III-2 Les cibles cellulaires.....	95
III-2-1 LES ACIDES NUCLEIQUES	95
III-2-2 LES PROTEINES	100
III-2-3 LA MEMBRANE ET LES ACIDES GRAS	104

CONCLUSION	107
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	111
ABBREVIATIONS UTILISEES.....	126
LISTE DES ILLUSTRATIONS	129
ANNEXES.....	135

INTRODUCTION

Le rejet des bactéries, en particulier des entérobactéries d'origine humaine ou animale en mer pose de nombreux problèmes sanitaires et économiques : contamination des coquillages, pollution des eaux de baignades... Il nécessite l'implantation de stations de traitements des eaux. De nombreuses études ont été menées afin d'étudier la survie des bactéries entériques en mer et d'évaluer les facteurs limitant cette survie. Pour cela, deux types d'approche existent : l'étude globale *in situ* et l'évaluation de l'impact des différents facteurs, en laboratoire, en microcosmes d'eau de mer.

Dans les eaux marines, les entérobactéries se retrouvent dans un environnement défavorable très différent de leur milieu d'origine où elles subissent principalement des variations de salinité (stress osmotique), le manque de nutriments, les changements de température, l'effet des rayonnements solaires. Ce dernier facteur serait prédominant pour limiter la survie des entérobactéries en eau de mer. Les rayons ultraviolets (UV) étant arrêtés rapidement dans les eaux côtières, la lumière visible jouerait un rôle non négligeable dans la décroissance bactérienne en milieu marin.

Le but de ce travail est d'étudier le mécanisme d'action de la lumière visible sur *Escherichia coli* en eau de mer. Nous avons, dans un premier temps, étudié des facteurs pouvant modifier la sensibilité des bactéries à la lumière c'est-à-dire l'état physiologique de la bactérie et l'action de l'eau de mer sur les cellules par les stress osmotique et oligotrophique. Dans un deuxième temps, le rôle de l'oxygène et l'éventuelle formation des espèces oxygénées réactives (ROS) ont été étudiés lors de l'exposition à la lumière visible de *Escherichia coli* en milieu marin ; en effet, ces différentes espèces toxiques, une fois formées, sont susceptibles d'attaquer des constituants cellulaires.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I DIFFERENTS FACTEURS LIMITANT LA SURVIE DES BACTERIES ENTERIQUES EN MER

Les entérobactéries vivant habituellement dans le tube digestif de l'homme ou des animaux sont, tout d'abord, rejetées dans les eaux usées ou sur le sol. Elles vont y séjourner un certain temps puis seront déversées en mer au niveau des stations d'épuration ou par les rivières (Dupray *et al.*, 1991 ; Dupray et Derrien, sous presse). Ces bactéries se retrouvent alors dans un milieu hostile.

Lors des études *in situ*, la disparition des entérobactéries est estimée généralement par la mesure des T90 c'est-à-dire le temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus retrouvées par culture, technique classique de dénombrement des bactéries (Bellair *et al.*, 1977 ; Bonnefont *et al.*, 1990 ; Bravo et De Vicente, 1992 ; Solic et Krstulovic, 1992). Ce T90 est pratique pour comparer les résultats obtenus sur différents sites et pour évaluer l'importance des différents facteurs. Il est intégré dans des modèles permettant d'étudier le devenir des bactéries en mer (Bonnefont *et al.*, 1990 ; Salomon et Pommepuy, 1990).

Dans l'eau de mer, les entérobactéries vont être soumises à plusieurs facteurs physiques, chimiques ou biologiques qui vont limiter leur survie dans cet environnement.

I-1 Les facteurs physiques

I-1-1 LA DILUTION ET LA SEDIMENTATION

Les bactéries provenant des eaux usées vont, tout d'abord, être diluées dans la masse d'eau (Salomon et Pommepuy, 1990). Selon l'hydrodynamique des sites, cette dilution diminue faiblement (Bravo et De Vicente, 1992) ou sensiblement (Guillaud *et al.*, 1993) la concentration en bactéries cultivables dans l'eau de mer. Les entérobactéries vont se présenter sous un état libre, en amas ou agrégées sur des particules ou des floes. Les bactéries adsorbées vont pouvoir sédimenter (Mitchell et Chamberlin, 1975). Ce dernier phénomène semble lent : *in vitro*, 10 heures environ sont nécessaires pour que les concentrations bactériennes diminuent d'1 unité logarithmique (U log) dans une colonne d'eau de 2 mètres (Pommepuy *et al.*, 1991).

I-1-2 LA TEMPERATURE

Une température élevée limite généralement le temps de survie des bactéries entériques en milieu marin (Ayres, 1977 ; Faust *et al.*, 1975 ; Sørensen, 1991 ; Solic et Krstulovic, 1992). L'effet de la température va souvent de pair avec les rayonnements solaires (Solic et Krstulovic, 1992) ou la prédation (Sørensen, 1991). Cet auteur a obtenu une meilleure survie de *E. coli* dans une eau estuarienne (salinité de 7 à 15 ‰) à 7 °C plutôt qu'à 15 ou 20 °C. L'augmentation de température permettrait, entre autre, la multiplication de

flagellés et donc la prédation par ces organismes (meilleure survie de *E. coli* en présence d'inhibiteurs eucaryotiques éliminant ces prédateurs).

I-1-3 L'ENSOLEILLEMENT (UV ET LUMIERE VISIBLE)

La survie des entérobactéries en eau de mer varie sensiblement suivant le cycle nyctéméral (Bellair *et al.*, 1977 ; Bonnefont *et al.*, 1990 ; Pommepuy *et al.*, 1991). Les T90 sont faibles (de l'ordre de 2 heures) lors de la journée et importants (de l'ordre de 40 heures) durant la nuit (Bellair *et al.*, 1977). L'effet néfaste de l'ensoleillement sur les bactéries entériques a été confirmé par les résultats d'autres études (Fujioka *et al.*, 1981 ; Kapuscinski et Mitchell, 1981 ; Rhodes et Kator, 1990 ; Davies et Evinson, 1991 ; Solic et Krstulovic, 1992 ; Bonnefont *et al.*, 1994).

L'absorption de la lumière visible solaire, dans les eaux de mer naturelles filtrées, est minimale pour des longueurs d'onde de 400 à 580 nm environ (Ivanoff, 1975 ; fig. 1) et varie selon l'origine de l'eau de mer (côtère ou du large) (Sverdrup *et al.*, 1970 ; Ivanoff, 1975 ; fig. 1). Les matières en suspension peuvent diminuer la pénétration des rayonnements solaires dans ce milieu (Ivanoff, 1975) et donc l'effet de la lumière sur les bactéries entériques présentes (Pommepuy *et al.*, 1992).

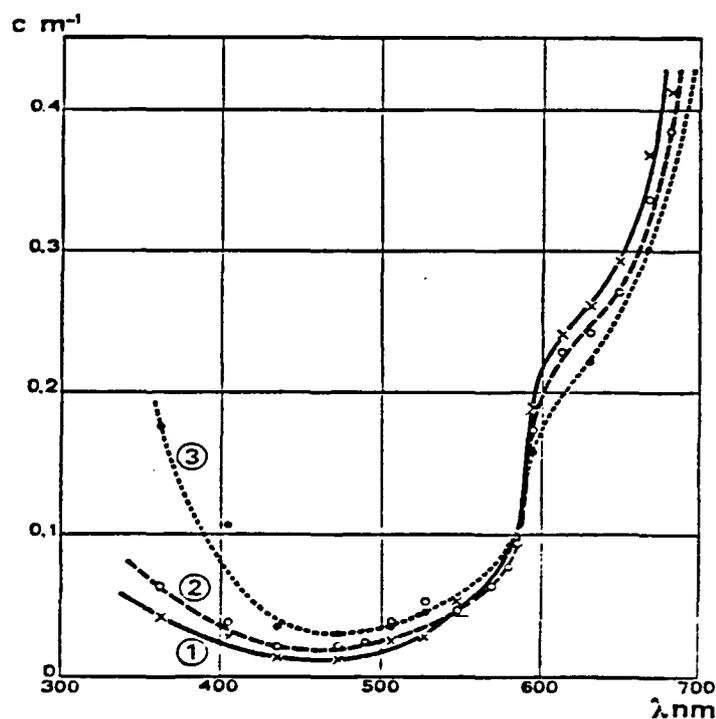


Figure 1 : Variation du coefficient d'atténuation de l'eau pure (courbe 1), d'une eau du large filtrée (courbe 2) et d'une eau côtière filtrée (courbe 3). D'après Clarke et James (1939) repris par Ivanoff (1975). Le coefficient d'atténuation (c), exprimé en m^{-1} , correspond à la somme des coefficients d'absorption et de diffusion.

Les rayonnements solaires agiraient par l'intermédiaire des ultra-violets (essentiellement les UV-A) et de la lumière visible (Davies-Colley *et al.*, 1994 ; Sinton *et al.*, 1994). La lumière visible pourrait intervenir directement sur les bactéries ou par l'intermédiaire de photosensibilisateurs dans l'eau de mer (Chamberlin et Mitchell, 1978).

I-1-3-1 Les rayonnements ultra-violets :

Ils peuvent être classés en trois catégories (Whitelam et Codd, 1986) :

(1) Les UV-C : 200-290 nm

Les UV lointains sont bien connus pour leur propriété bactéricide par action directe sur l'ADN. Des lampes UV sont utilisées en laboratoire et en traitement des eaux usées ou potables dans un but de désinfection (Mechsner *et al.*, 1991).

Cependant, ces rayonnements solaires sont arrêtés par la couche d'ozone atmosphérique (Johnson *et al.*, 1976) et ne peuvent donc pas être responsables des dommages causés par les rayonnements solaires au niveau des bactéries dans l'eau de mer.

(2) Les UV-B : 290-320 nm

Les UV-B sont responsables des dommages biologiques des rayonnements solaires (cancers cutanés... ; Epstein, 1976). Ils agissent également directement au niveau de l'ADN.

Mopper et Zhou (1990) ont mis en évidence une production de radical hydroxyle par les UV-B dans l'eau de mer. Cependant, d'après d'autres auteurs, l'action des UV-B serait négligeable sur les bactéries entériques dans l'eau de mer, surtout estuarienne, en raison de la faible pénétration de ces rayonnements dans ce milieu (Davies-Colley *et al.*, 1994 ; Sinton *et al.*, 1994) : ils seraient rapidement arrêtés par le matériel organique dissous, la chlorophylle, les matières particulaires...

(3) Les UV-A (UV proches) 320-400 nm

Les UV-A pénètrent dans l'eau de mer et sont responsables d'une partie des atteintes bactériennes lors de l'exposition à la lumière solaire (Rhodes et Kator, 1990 ; Sinton *et al.*, 1994). Ils provoquent des dommages cellulaires en agissant par l'intermédiaire de photosensibilisateurs autres que l'ADN, en présence d'oxygène. Ceci conduit à la formation de dérivés toxiques de l'oxygène.

Les rayonnements ultra-violets étant très vite arrêtés ou atténués dans l'eau de mer, la lumière visible aurait un rôle non négligeable dans la perte de cultivabilité des coliformes en milieu marin (Bonfont *et al.*, 1990 ; Sinton *et al.*, 1994).

I-1-3-2 La lumière visible

Différentes études en laboratoire ou *in situ* ont permis de mettre en évidence le rôle de la lumière visible sur des bactéries en milieu de culture (Barran *et al.*, 1974 ; D'Aoust *et al.*, 1974), en milieux aquatiques d'origine naturelle : eau de rivière ou eau de mer (Barcina *et al.*, 1989 ; Barcina *et al.*, 1990) ou dans les lagunes (Curtis *et al.*, 1992 ; Curtis et Mara, 1994).

La lumière visible agit par l'intermédiaire de photosensibilisateurs présents dans le milieu aquatique ou de photosensibilisateurs présents dans la bactérie autres que l'ADN (il n'absorbe pas dans ces longueurs d'ondes) (Chamberlin et Mitchell, 1978). La présence de l'oxygène, lors de l'exposition à la lumière, est nécessaire pour permettre la formation d'espèces oxygénées réactives qui seraient toxiques pour les cellules (Curtis et Mara, 1994).

I-2 Les facteurs chimiques

I-2-1 - LA SALINITE

L'eau de mer, du fait, de sa haute osmolarité est un milieu défavorable pour les bactéries d'origine entérique. Différents auteurs ont montré qu'une augmentation de la salinité diminue la survie des entérobactéries en mer (Carlucci et Pramer, 1960 ; Ayres, 1977 ; Anderson *et al.*, 1979 ; Solic et Krstulovic, 1992). Le choc hyperosmotique modifie la membrane bactérienne et les capacités de transports (Houssin *et al.*, 1990 ; Gauthier *et al.*, 1992a). Cependant, en milieu marin, l'entérobactérie peut, dans certaines conditions, trouver des composés osmoprotecteurs tels que la glycine bêtaïne qui vont lui permettre d'éviter la déshydratation (Ghoul *et al.*, 1990 ; Pommepuy *et al.*, 1992 ; Dupray *et al.*, sous presse).

I-2-2 L'OLIGOTROPHIE

Carlucci et Pramer (1960) ont montré que le taux de matière organique est limitant pour le maintien des bactéries entériques en mer. En effet, lorsque les bactéries sont dans une eau de mer carencée en matières nutritives, elles évoluent rapidement vers un état viable non cultivable, elles ne sont plus retrouvées par culture (Grimes *et al.*, 1986). La concentration en substrats organiques de l'eau de mer peut varier de traces à quelques mg.l^{-1} (de l'ordre du g.l^{-1} en milieu de culture). De plus, ces éléments ne sont pas tous assimilables par la bactérie et les capacités de transport de la cellule peuvent être diminuées de façon importante dans l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1992a ; Gauthier *et al.*, 1993). Pour survivre dans ce milieu oligotrophe, les cellules subissent alors des modifications : diminution de taille, dégradation de certaines protéines ..., afin de maintenir un certain niveau énergétique indispensable (Kjelleberg *et al.*, 1987).

Cependant, dans certaines eaux estuariennes, la concentration en matière organique peut être suffisante pour permettre aux bactéries de survivre (présence d'éléments nutritifs et d'osmoprotecteurs) (Pommepuy *et al.*, 1992 ; Dupray *et al.*, sous presse).

I-2-3 LE PH

Le pH de l'eau de mer varie de 7,5 à 8,5 (Carlucci et Pramer, 1960). Leurs essais ont mis en évidence un pH optimum de 5 pour la persistance de *E. coli* dans l'eau de mer. Pour Solic et Krstulovic (1992), le pH est un facteur moins efficace que les autres pour limiter la survie des coliformes fécaux en mer en raison de la faible variation du pH dans ce type d'eau. Le pH optimum de survie, d'après ces auteurs, serait entre 6 et 7 avec une diminution rapide de la survie pour des valeurs inférieures ou supérieures. Le pH des eaux naturelles (environ de 8) est défavorable à la survie de cette entérobactérie.

I-3 Les facteurs biologiques

I-3-1 LA PREDATION

La prédation, essentiellement par les ciliés, flagellés et crustacés zooplanctoniques serait un facteur non négligeable pour limiter la survie des bactéries allochtones en mer (Rhodes et Kator, 1988 ; Rhodes et Kator, 1990 ; Sørensen, 1991 ; Mesplé *et al.*, 1994).

Roper et Marshall (1978) ont montré que les entérobactéries servaient de proie à des micro-organismes de diverses tailles (survie de *E. coli* variable selon la filtration de l'eau de mer) qui prolifèrent surtout près des rejets des eaux usées. González *et al.* (1990), en suivant le devenir de bactéries marquées par un dérivé de la fluorescéine (fluorescence-labeled bacteria ; FLB) en eau de mer naturelle, ont confirmé le broutage de *E. coli* par les flagellés et les ciliés présents dans le milieu marin. De même que Sørensen (1991), Barcina *et al.* (1991) ont mis en évidence l'action conjointe de la prédation par les protozoaires et de la température pour diminuer la survie des entérobactéries en milieu marin ; l'augmentation de température conduisant à une prolifération de ces prédateurs.

I-3-2 LA COMPETITION DE FLORE

Le Guyader *et al.* (1991) ont obtenu une décroissance rapide de *E. coli* dans l'eau de mer en présence de la flore autochtone ; cette diminution du nombre de bactéries allochtones est due à une pression de sélection des bactéries marines. Celles-ci, étant mieux adaptées que les entérobactéries à la survie en mer, vont être plus aptes à assimiler les faibles quantités d'éléments nutritifs disponibles dans ce milieu.

Parmi ces facteurs qui limitent la survie des entérobactéries en mer, la dilution et les rayonnements solaires (plus précisément la lumière visible) seraient les plus efficaces pour diminuer la concentration bactérienne. Le sujet de cette étude est donc d'évaluer les effets de la lumière visible sur *Escherichia coli* en microcosmes d'eau de mer et de déterminer le mécanisme d'action de la lumière sur les bactéries dans ce milieu. La lumière visible a été étudiée par d'autres auteurs dans des conditions différentes (souvent en milieu nutritif).

II ETUDE DE LA LUMIERE VISIBLE

La sensibilité des bactéries à la lumière visible n'est pas constante de 400 à 700 nm. Les longueurs d'onde les plus toxiques seraient celles de 400 à 500 nm environ (Webb et Malina, 1970 ; Webb et Brown, 1979) ; différentes souches de *E. coli* sont insensibles à une lumière de longueur d'onde de 650 nm (Webb et Brown, 1976).

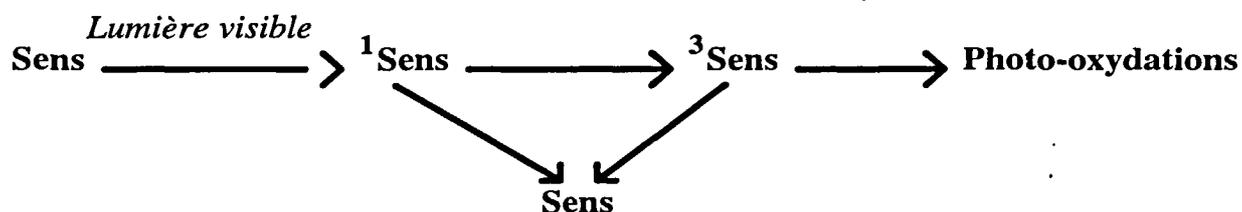
L'effet toxique de la lumière visible semble être dû à un phénomène de photo-oxydation faisant intervenir des photosensibilisateurs (Foote, 1976).

II-1 Les photosensibilisateurs

Toute molécule qui absorbe la lumière dans les longueurs d'onde entre 290 et 750 nm est susceptible d'être un photosensibilisateur (Whitelam et Codd, 1986).

II-1-1 EXCITATION DE PHOTOSENSIBILISATEURS PAR LA LUMIERE VISIBLE

L'absorption de la lumière visible par des photosensibilisateurs produit des oxydations qui peuvent être létales pour des organismes vivants. Les photosensibilisateurs en absorbant la lumière déclenchent une réaction chimique qui n'existerait pas en leur absence. Ils peuvent être modifiés ou non au cours de cette réaction. Le photosensibilisateur (Sens) en absorbant un photon entre dans un état excité électroniquement pendant 10^{-9} - 10^{-6} s : l'état singulet (1 Sens). Ce premier produit d'absorption de la lumière, peut ensuite retourner à l'état initial (Sens) ou passer à un stade excité plus stable : l'état triplet (3 Sens) de plus longue durée de vie (10^{-3} - 10 s) (Foote, 1976) :



La lumière visible agit sur les bactéries en mer par l'intermédiaire de photosensibilisateurs exogènes dans l'eau de mer (Cooper et Zika, 1983) ou par des photosensibilisateurs endogènes, localisés dans la cellule (Chamberlin et Mitchell, 1978).

II-1-2 LES PHOTOSENSIBILISATEURS ENDOGENES

Hollander, en 1943, a montré que les rayonnements de 350 à 490 nm étaient efficaces pour provoquer la mort de *E. coli*. Il a émis l'hypothèse que des composés, autres que les acides nucléiques n'absorbant pas dans le visible, tels que la riboflavine pouvaient jouer le rôle de photosensibilisateur. D'autres composés de la bactérie sont susceptibles d'être des sensibilisateurs : les cytochromes, le NADH, les protéines de synthèse de l'hème, le tryptophane, le FAD (flavine adénine dinucléotide)... (Eisenstark, 1971 ; Webb et Brown, 1976 ; Chamberlin et Mitchell, 1978 ; D'Aoust *et al.*, 1980 ; Whitelam et Codd, 1986). Beaucoup de chromophores possibles sont des parties intégrantes de la membrane (Eisenstark, 1971).

Des bactéries mutées (mutants *visA* ou *visB*) très sensibles à l'exposition à la lumière visible (de longueur d'onde de 460 nm environ) ont été isolées (Miyamoto *et al.*, 1991 ; Nakahigashi *et al.*, 1992). Cette sensibilité est due à une accumulation de photosensibilisateurs dans ces mutants conduisant à la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS ; reactive oxygen species) en présence d'oxygène (Nakahigashi *et al.*, 1991) :

- Le mutant *visA* ne possédant plus l'activité ferrochélatase (permettant de transformer la protoporphyrine, intermédiaire de synthèse de l'hème en protohème) accumule alors de la protoporphyrine, composé photosensibilisateur (Frustaci et O'Brian, 1993).

- Le mutant *visB* est altéré dans la synthèse de l'ubiquinone, élément de la chaîne respiratoire conduisant également à une accumulation d'un composé intermédiaire photosensibilisateur dans les cellules (Nakahigashi *et al.*, 1992).

Lorsque les bactéries vivent en présence de lumière (cas des bactéries photosynthétiques), elles possèdent à la fois un photosensibilisateur tel que la chlorophylle et des composés photoprotecteurs tels que les caroténoïdes leur permettant de se défendre contre les espèces toxiques formées lors de l'exposition à la lumière (Whitelam et Codd, 1986).

II-1-3 LES PHOTOSENSIBILISATEURS EXOGENES

Parmi les photosensibilisateurs exogènes, nous pouvons citer les colorants, tels que le bleu de méthylène, le rose de bengal, l'éosine, l'acridine orange... L'action de la lumière visible sur ces chromophores a été étudiée afin de mieux connaître les photosensibilisations par les médicaments, la mutagénèse...(Martin et Logsdon, 1987 ; Martin *et al.*, 1988). Des expériences associant la lumière visible solaire et des colorants (comme le bleu de méthylène) ont été également conduites dans un but d'épuration des effluents domestiques en zones arides (Archer et Juven, 1977 ; Archer *et al.*, 1994).

En mer, divers composés dissous ou en suspension sont susceptibles de jouer le rôle de photosensibilisateurs : les substances humiques (Cooper et Zika, 1983), la riboflavine et ses produits de dégradation (Mopper et Zika, 1987). Les concentrations en flavines dissoutes dans l'eau de mer de l'ordre de 0,1 à 2 nM sont suffisamment importantes pour que ces composés soient considérés comme des chromophores potentiellement importants dans le milieu marin (Mopper et Zika, 1987).

Ces différents sensibilisateurs en présence de lumière solaire et d'oxygène conduisent à la formation d'anion superoxyde (Cooper et Zika, 1983 ; Petasne et Zika, 1987), de peroxyde d'hydrogène (Cooper et Zika, 1983 ; Cooper *et al.*, 1988 ; Szymczak et Waite, 1988) dans l'eau de mer.

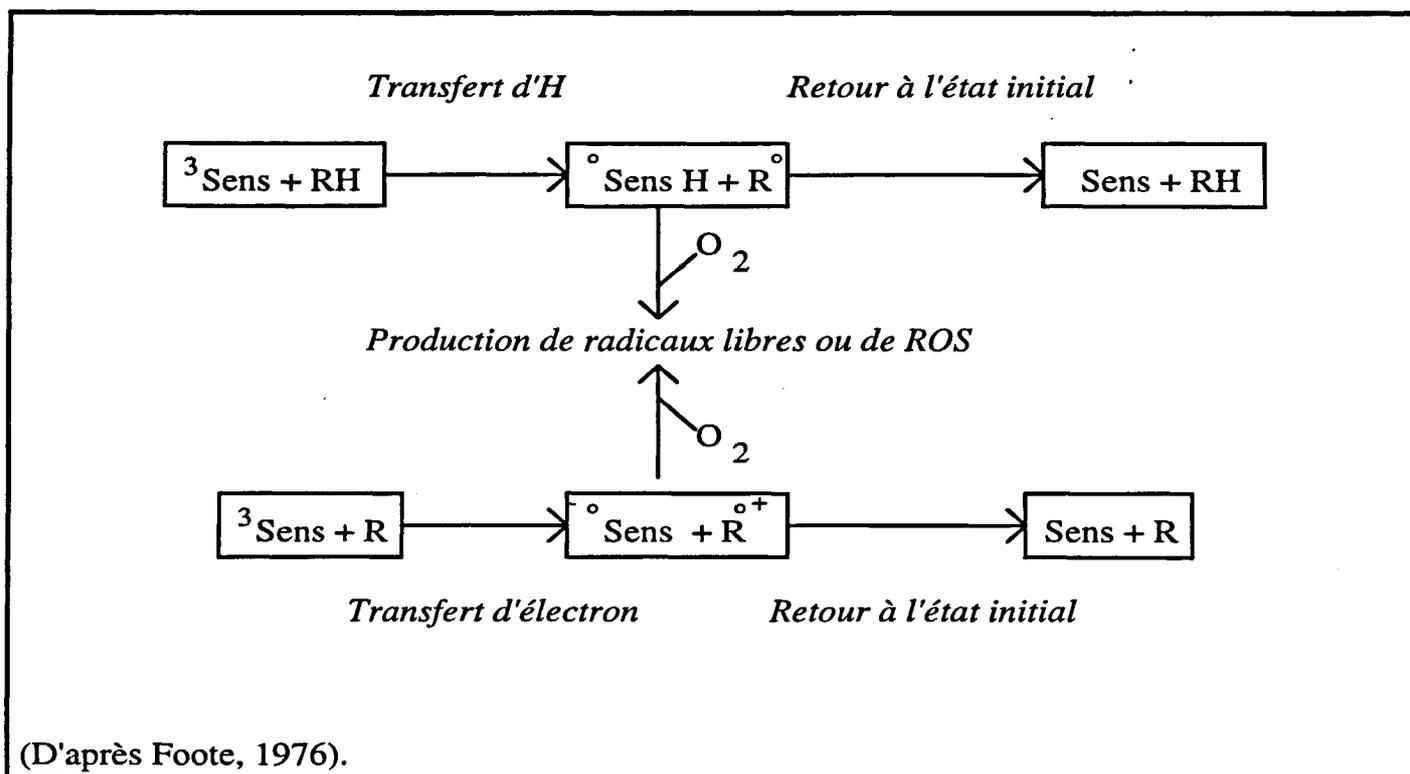
Le photosensibilisateur excité à l'état triplet peut ensuite réagir avec différentes molécules selon deux types de réactions de photo-oxydation.

II-2 Les réactions de photo-oxydation

Les réactions de photo-oxydation se répartissent en deux classes principales (Foote, 1991 ; Vidocky, 1992) :

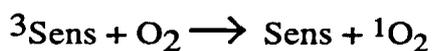
II-2-1 LE TYPE I

Le sensibilisateur excité (à l'état triplet) réagit directement avec une autre molécule (substrat réduit) en transférant un électron ou un atome d'hydrogène (H), conduisant à la formation d'un sensibilisateur semi-réduit et à un substrat semi-oxydé. Le sensibilisateur semi-réduit peut ensuite retourner au stade initial en réagissant avec l'oxygène avec formation d'anion superoxyde (Foote *et al.*, 1984).



II-2-2 LE TYPE II - FORMATION D'OXYGENE SINGULET

L'énergie est transférée du sensibilisateur à l'état triplet à l'oxygène pour donner de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Foote, 1976).



Il existe deux niveaux énergétiques différents pour l'oxygène singulet :

- $^1\Delta$ $^1\text{O}_2$ où les 2 électrons célibataires sont appariés. Il possède une énergie de 22,4 kcal/mole. Il est 1 000 à 10 000 fois plus réactif que l'oxygène moléculaire.

- $^1\Sigma_g$ $^1\text{O}_2$ où deux électrons sont non appariés et antiparallèles. De plus courte durée de vie, il possède une énergie de 37 kcal/mole.

Le terme d'oxygène singulet est couramment utilisé pour l'état excité le plus faible : $^1\Delta^1\text{O}_2$, le seul à permettre des réactions dans les cellules (Foote, 1976). Cette réaction est très

rapide et explique la plupart des "quenching" des sensibilisateurs à l'état triplet par l'oxygène. Sa durée de vie dans l'eau est de 4 μ s, il oxyde de nombreuses molécules telles que l'ADN, les protéines et les membranes (Foote *et al.*, 1984).

Certains photosensibilisateurs excités peuvent être oxydés en présence d'oxygène et permettre la formation d'anion superoxyde (O_2^-). Ce processus est minoritaire (Foote, 1976).

II-2-3 AUTRE DEFINITION DU TYPE I ET DU TYPE II

D'après Vidocky (1992), les deux types de réaction doivent être redéfinis :

- le type I serait caractérisé par un transfert d'électron vers ou provenant d'un photosensibilisateur excité (incluant simultanément le transfert d'un proton correspondant au transfert d'un atome d'hydrogène) conduisant à la formation de radicaux libres.

- le type II serait caractérisé par un transfert d'énergie à partir du photosensibilisateur excité et non plus seulement réduit à la seule formation d'oxygène singulet.

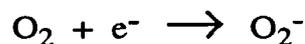
III - PRODUCTION DES ROS ET EFFETS SUR LES BACTERIES DES ROS ET DE LA LUMIERE VISIBLE

III-1 Production des espèces oxygénées réactives (ROS)

L'exposition à la lumière visible pourrait aboutir à la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). Ces espèces oxygénées réactives sont des radicaux libres tels que le radical hydroxyle ($^{\circ}OH$) et l'anion superoxyde (O_2^-) ou des espèces non radicalaires telles que l'oxygène singulet (1O_2) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les radicaux libres sont des atomes ou des molécules possédant un électron célibataire sur leur orbitale externe. De durée de vie très courte, ils sont très réactifs. Pour réapparier leur électron célibataire, ils vont attaquer les molécules environnantes et amorcer des réactions radicalaires en chaîne (Deby, 1991).

III-1-1 PRODUCTION DE L'ANION SUPEROXYDE

La réduction de l'oxygène en un mono radical chargé négativement, l'anion superoxyde, a lieu selon la réaction suivante nécessitant un apport énergétique :



Il s'agit souvent de réactions enzymatiques. L'anion superoxyde est relativement peu réactif (Fee, 1982), il se comporte comme un agent réducteur modéré en milieu aqueux (Halliwell, 1994). Mais, il peut permettre la formation de composés plus toxiques (Fee, 1982).

Il ne peut pas traverser la membrane bactérienne (Hassan et Fridovitch, 1979).

L'anion superoxyde O_2^- peut aussi être formé à partir de 1O_2 en présence de donneurs d'électrons (NADH...) (Saito et Matsuura, 1984).

III-1-2 PRODUCTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE

La dismutation de l'anion superoxyde catalysée par la superoxyde dismutase (SOD) permet la production du peroxyde d'hydrogène.



Le peroxyde d'hydrogène est très réactif et a un fort pouvoir oxydant. Il diffuse facilement à travers la membrane bactérienne.

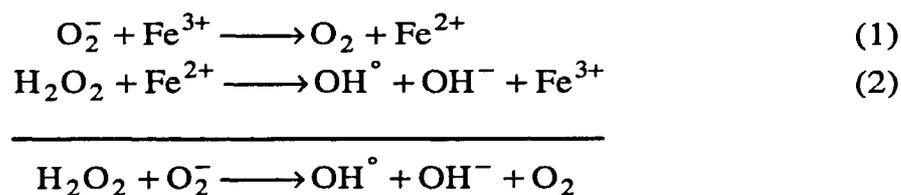
Il est éliminé par la catalase chez les bactéries aérobies.

III-1-3 PRODUCTION DU RADICAL HYDROXYLE

Le radical $^{\circ}OH$ est obtenu par la réaction d'Haber-Weiss catalysée par les métaux, notamment le fer. Cette réaction correspond à l'interaction de O_2^- et de H_2O_2 . Elle se décompose en deux étapes :

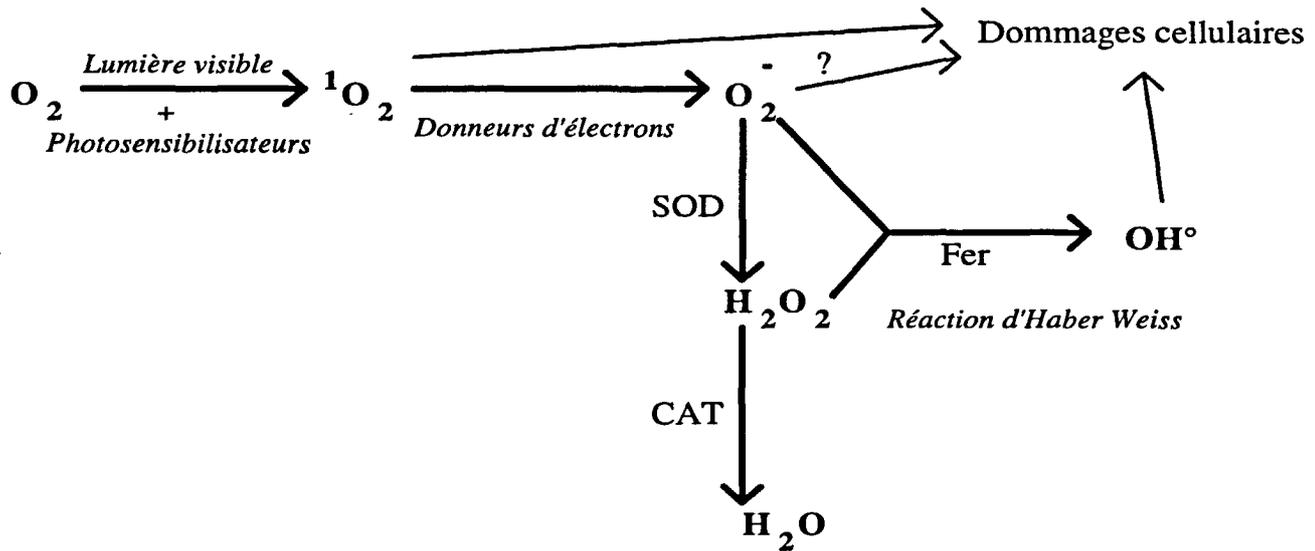
- premièrement, l'ion ferrique (Fe^{3+}) est réduit par O_2^- (1),

- deuxièmement, l'interaction de H_2O_2 et de l'ion ferreux (Fe^{2+}) aboutit à la formation du radical $^{\circ}OH$. Elle correspond à la réaction de Fenton (2).



Les radicaux $^{\circ}OH$ sont très réactifs et agissent sur leur lieu de production en raison de leur durée de vie très courte $10^{-6}s$.

Le schéma 1 décrit une hypothèse de formation d'espèces réactives de l'oxygène lors de l'exposition à la lumière :



SOD : superoxyde dismutase

CAT : catalase

III-2 Dommages cellulaires

III-2-1 LES DOMMAGES DUS AU STRESS OXYDATIF

Les altérations cellulaires (au niveau des acides nucléiques, des lipides ou des protéines) résultant de la production d'espèces oxygénées réactives constituent le stress oxydatif.

III-2-1-1 Au niveau de l'ADN

Lorsque les systèmes de défense contre le stress oxydatif sont dépassés ou neutralisés par construction de mutants par exemple, il existe une augmentation des mutations spontanées au niveau de l'ADN bactérien (Imlay et Linn, 1988).

Les ROS (principalement le $^\bullet\text{OH}$) attaquent l'ADN au niveau des bases ou des sucres provoquant des coupures ou des lésions (Farr et Kogoma, 1991). Le radical $^\bullet\text{OH}$ peut attaquer tous les composés de l'ADN tandis que l'oxygène singulet agit préférentiellement au niveau des guanines (Halliwell, 1994).

L'attaque au niveau des bases conduit principalement à la formation de 8 hydroxyguanine, de dérivés thymine glycol (par oxydation des thymines), de

formamidopyrimidines (c'est-à-dire de purines dont le cycle imidazole est ouvert) et des dimères de thymine (Demple et Harrison, 1994 ; Halliwell, 1994).

Au niveau des sucres, l'attaque par les ROS conduit à une fragmentation du sucre et des coupures avec des terminaisons 3'-phosphate ou 3'-phosphoglycolate.

Ces dommages par les ROS empêche la réplication par l'ADN polymérase.

III-2-1-2 Au niveau membranaire

Bien que *E. coli* ne possède pas d'acides gras polyinsaturés, les plus sensibles à l'oxydation, les ROS peuvent attaquer les acides gras mono-insaturés membranaires et provoquer une accumulation de peroxydes lipidiques (Imlay et Linn, 1988). La peroxydation lipidique conduit à une perméabilisation de la membrane et à une production de composés toxiques tels que des aldéhydes, des époxydes ou des 4-hydroxyalkénals.

Une altération des systèmes de transport membranaire est aussi observée (Storz *et al.*, 1990).

III-2-1-3 Au niveau des protéines

Beaucoup de protéines de *E. coli* sont sensibles au stress oxydatif (Davies et Lin, 1988). Les ROS, provoquent une perte d'activité de certaines enzymes, de cytochromes en oxydant les groupements -SH ou en attaquant certains acides aminés tels que la méthionine, la cystéine, l'arginine ou la proline ...

III-2-2 LES DOMMAGES DUS A L'EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE

Les atteintes cellulaires lors de l'exposition à la lumière visible n'ont pas ou peu été étudiées sur des bactéries entériques dans l'eau de mer. Les différents travaux sur les effets de la lumière visible sur des bactéries ont eu lieu généralement dans des bouillons nutritifs et en lumière artificielle. De plus, les bactéries étaient souvent exposées, à la fois, aux rayonnements UV proches et à la lumière visible.

III-2-2-1 Au niveau de l'ADN

Les effets sur l'ADN dépendent des longueurs d'onde de la lumière utilisée. Webb et Brown (1976) ont mis en évidence une plus grande sensibilité à la lumière visible (460 nm) d'un *E. coli* déficient en deux systèmes de réparation de l'ADN (excision : mutant *uvrA* et recombinaison : mutant *recA*). Ceci suggère que la lumière visible agit au niveau de l'ADN et que les lésions sont réparables par l'intervention du système excision et du système recombinaison. L'absence de ces deux systèmes de réparation n'affecte pas la survie de *E. coli* exposé à une lumière de longueur d'onde 650 nm (Webb et Brown, 1976).

III-2-2-2 Au niveau membranaire

Une inhibition de la respiration et une inhibition de certains systèmes de transports actifs (alanine, glycine, méthylthio- β -galactoside...) chez *E. coli* ont été observées par différents auteurs (Barran *et al.*, 1974 ; D'Aoust *et al.*, 1974 ; D'Aoust *et al.*, 1980). D'après Sprott *et al.* (1976), l'effet inhibiteur de la lumière n'est pas simplement du à une augmentation non-spécifique de la perméabilité membranaire.

Curtis *et al.* (1992a) indiquent que les radiations solaires endommagent la membrane cellulaire, rendant ainsi la cellule beaucoup plus sensible aux conditions extérieures.

III-2-2-3 Au niveau des protéines

Mitchell et Anderson (1965) ont montré que la catalase de *Sarcina* était inactivée par l'exposition à la lumière visible. Différentes flavoprotéines telles que des déshydrogénases sont également altérées par ces rayonnements (D'Aoust *et al.*, 1980).

Pour faire face au stress oxydatif qui peut survenir lors de l'exposition des bactéries à la lumière visible, la bactérie possède différents systèmes de défense.

III-3 Les systèmes de défense bactériens

Certains ont une action préventive en détruisant les ROS ; d'autres ont une action curative en réparant les dommages cellulaires commis par les ROS.

III-3-1 LES SYSTEMES PREVENTIFS

Les systèmes préventifs se répartissent en systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

III-3-1-1 Les systèmes enzymatiques

Ces systèmes ubiquitaires peuvent agir directement sur les espèces réactives de l'oxygène ou indirectement en produisant des substances antioxydantes non enzymatiques.

1) Les superoxydes dismutases (SOD)

La superoxyde dismutase est présente chez tous les organismes vivant en aérobie : procaryotes et eucaryotes (Fridovich, 1975).

Escherichia coli possède trois types de SOD, métallo-protéines dimériques qui catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène :

- la SOD à manganèse (Mn-SOD) codée par le gène *sodA*,
- la SOD à fer (Fe-SOD) codée par *sodB*,
- la CuZn-SOD codée par le gène *sodC* (Benov et Fridovich, 1994).

Les Mn-SOD et Fe-SOD sont localisées dans le cytoplasme et la CuZn-SOD dans le périplasme.

Le fer et le manganèse sont des métaux de transition qui facilitent les transferts d'électrons. La Fe-SOD et la Mn-SOD sont actives dans des conditions de croissance aérobie normale. La Mn-SOD n'est pas synthétisée dans des conditions anaérobies et est produite en plus grande quantité dans le cas d'un stress par O_2^- . L'expression de Fe-SOD est indépendante de l'oxygène (Touati, 1989). L'activité SOD/mg de protéine est plus importante dans les cellules en phase stationnaire que dans les cellules en phase exponentielle (rapport de 1,5 à 1) (Touati, 1983).

La CuZn-SOD était considérée comme une superoxyde dismutase spécifique des cellules eucaryotes. En raison de sa localisation dans le périplasme (elle était éliminée par les techniques classiques de lyse), de son caractère très thermolabile, de sa sensibilité à une variation du pH (le pH optimum étant de 6,8), sa présence chez *E. coli* a été longtemps ignorée (Benov et Fridovich, 1994). De plus, l'activité SOD dépendante de cette CuZn-SOD ne représente qu'une part mineure de l'activité SOD totale (environ 2 %). L'expression de cette enzyme est induite par une croissance en aérobie (Benov et Fridovich, 1994).

2) Les catalases (CAT)

Ces enzymes sont des protéines porphyriniques ferriques qui catalysent la réaction suivante :



Cette réaction est exothermique et ne nécessite pas d'ATP.

Les catalases sont produites en abondance par les bactéries à métabolisme respiratoire (aérobies strictes et facultatives) qui peuvent ainsi détruire très rapidement le peroxyde d'hydrogène. Chez *E. coli*, la catalase HPI codée par le gène *katG* est localisée dans le périplasme et la catalase HPII codée par le gène *katE* se trouve au niveau du cytoplasme (Heimberger et Eisenstark, 1988). La synthèse de la catalase HPI est induite par le peroxyde d'hydrogène (Storz *et al.*, 1990). HPI intervient dans le transport membranaire et protège la cellule durant le stress oxydatif (Eisenstark *et al.*, 1991). La synthèse de la catalase HPII est induite lors de la phase stationnaire (Loewen *et al.*, 1985). Récemment, il a été mis en

évidence que la synthèse de la catalase HPI est également sous la dépendance du facteur de transcription alternatif de la phase stationnaire, KatF (Ivanova *et al.*, 1994).

3) Les peroxydases

Elles nécessitent, contrairement aux catalases, du NADH ou du NADPH comme source d'électron. *Escherichia coli* ne possède pas de peroxydase NADH-dépendante spécifique du H₂O₂.

4) Les alkylhydroperoxydes réductases (Ahp)

Ces composés, indépendants du glutathion, codés par *ahpC* et *ahpF* permettent de réduire les hydroperoxydes organiques comme les hydroperoxydes de thymine et les hydroperoxydes linoléiques en leurs alcools correspondants (Storz *et al.*, 1990).

5) La glutathion synthétase et la glutathion réductase

La glutathion synthétase codée par le gène *gshAB* permet la synthèse du glutathion (GSH) qui est un important anti-oxydant. Le GSH peut réagir avec H₂O₂ ou O₂⁻ pour former un radical stable GS°. Les radicaux GS° se dimérisent. La glutathion réductase codée par *gorA* réduit ensuite le glutathion oxydé (GSSG) en GSH en transférant un électron à partir du NADPH. La glutathion réductase permet donc de maintenir un pool de glutathion réduit dans la cellule et donc un environnement intracellulaire réducteur (Farr et Kogoma, 1991). Le GSH peut réduire les ponts disulfures dans les protéines oxydées.

III-3-1-2 Les systèmes non enzymatiques

Dans la cellule bactérienne, il existe également des substances non enzymatiques qui permettent de prévenir le stress oxydatif telles que la thioredoxine codée par *trxA*...

L'ubiquinone et la ménadione peuvent jouer le rôle d'anti-oxydants associés à la membrane bactérienne (Farr et Kogoma, 1991).

III-3-2 LES SYSTEMES CURATIFS

Ces systèmes permettent de réparer les dommages causés par les ROS.

III-3-2-1 Réparation de l'ADN altéré

La réparation de l'ADN s'effectue en deux phases :

1) La première phase est la reconnaissance de l'altération permettant d'exciser la base altérée et d'entraîner une coupure simple brin de l'ADN au niveau de la lésion.

Dans un premier temps, les bases modifiées sont reconnues par des glycosylases spécifiques. Leur action permet la formation d'un ADN ponctuellement dépuriné ou dépyrimidé. Les glycosylases suivantes sont présentes chez les bactéries (Kaplan et Delpesch, 1989) :

- uracile ADN glycosylase codée par *urg*,
- hypoxanthine glycosylases I et II codées respectivement par *tag* et *alk*,
- formamidopyrimidine ADN glycosylase (Fpg protéine) codée par *fpg*,
- pyrimidine-dimère glycosylase codée par *denV*,
- photolyase codée par *phr*,
- O⁶ méthyl-transférase codée par *mex*,
- excinuéclases UVR A, UVR B, UVR C codées par les gènes *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*.

Dans un deuxième temps, les AP endonucléases (exonucléases III à V chez *E. coli*) ou les UVR endonucléases effectuent une coupure endonucléasique simple brin au niveau de l'ADN dépuriné ou dépyrimidé. Une AP endonucléase reconnaît un site avec une base manquante dans l'hélice d'ADN et coupe le squelette phosphodiester de l'ADN au niveau du site modifié. Ces enzymes se répartissent en deux classes suivant que la coupure ait lieu en 3' (enzyme de classe I) ou en 5' (enzyme de classe II) de la base excisée. Ces enzymes n'ont pas de propriétés exonucléasiques.

2) La deuxième phase consiste en la restauration de la molécule originelle.

Le résultat de cette seconde étape est un ADN entièrement réparé et identique à la molécule de départ avant la lésion. Ceci est obtenu par l'intervention de l'ADN polymérase I et l'ADN ligase.

La plupart des gènes codant pour les enzymes de réparation font partie du système SOS. La réponse SOS est induite par des agents ou des conditions qui provoquent des dommages au niveau de l'ADN ou qui interfèrent avec la réplication de l'ADN. Ce système est constitué d'une vingtaine de gènes. L'expression des gènes est sous la dépendance de deux protéines RecA ayant une activité protéasique et LexA se comportant comme un répresseur. L'induction du système SOS provoque l'activité protéasique de la protéine RecA qui va agir sur d'autres protéines dont LexA. Cette dernière protéine étant détruite, elle ne peut plus réprimer les gènes du système SOS. Les différents produits du système SOS peuvent alors agir.

Au cours du stress oxydatif, différentes protéines sont induites afin de protéger la cellule bactérienne. Différents systèmes de régulation permettent de réguler l'expression de ces protéines suivant qu'elles sont induites par un stress dû à l'O₂⁻ (*soxR*) ou au H₂O₂ (*oxyRS*). Des protéines peuvent être régulées par ces systèmes ou par d'autres comme ceux de la réponse SOS ou la réponse heat shock. Certaines protéines induites par l'entrée en phase stationnaire (KatF dépendantes) peuvent également protéger du stress oxydatif.

Les gènes régulés par *soxR* sont principalement *sodA* (Mn-SOD), *nfo* (endonucléase IV), *zwf* (glucose-6-phosphate deshydrogénase). Ceux régulés par *oxyR* sont *katG* (catalase HPI), *ahpC* et *ahpF* (alkylhydroperoxyde réductases), *gorA* (glutathion réductase) et *dps* (DNA binding protein from starved cells) (Christman *et al.*, 1985 ; Altuvia *et al.*, 1994)... L'induction des gènes *katE* (catalase HPII) et *xthA* (exonucléase III) dépend du gène *katF*.

III-3-2-2 Réparation des dommages protéiques

Des protéinases spécifiques dégradant les protéines oxydées chez *E. coli* ont été mises en évidence (Davies et Lin, 1988). Cette voie de dégradation ne nécessiterait pas d'ATP. Ceci permettrait de recycler les acides aminés ou d'éviter une accumulation de protéines altérées.

III-3-2-3 Réparation des dommages membranaires

Chez *E. coli*, il pourrait exister un système de réparation membranaire inductible. Il a été montré que H₂O₂ perturbe les fonctions membranaires à des doses non létales. Lorsque les bactéries sont prétraitées par des faibles doses de H₂O₂, elles supportent ensuite des doses plus importantes de H₂O₂ toxiques pour elles sans ce traitement (Farr *et al.*, 1988).

La survie des entérobactéries dans l'eau de mer (en présence de lumière visible, dans notre étude) dépendrait de la nature du milieu récepteur (marin) mais aussi du passé de la bactérie avant son immersion (Gauthier, 1993). Dupray et Derrien (sous presse) ont ainsi montré que le séjour des bactéries entériques dans les eaux usées diminuait ensuite leur sensibilité à l'eau de mer.

IV - ETUDE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DE LA BACTERIE

IV-1 Phase exponentielle et phase stationnaire

IV-1-1 PHASE EXPONENTIELLE

Quand les bactéries disposent d'éléments nutritifs en quantité suffisante, elles vont avoir une activité métabolique importante (synthèse d'ADN, d'ARN, de protéines...) et se diviser très rapidement (le temps de génération est d'environ 20 minutes à 37°C en milieu riche tandis qu'il peut être de plusieurs heures dans l'environnement).

De plus, elles vont pouvoir mettre en place des systèmes de défense spécifiques à des stress donnés auxquels elles sont confrontées. Par exemple, en présence de peroxyde d'hydrogène, ces cellules vont synthétiser une plus grande quantité de catalase HPI, enzyme permettant de détruire ce composé toxique.

IV-1-2 PHASE STATIONNAIRE

Les bactéries passent une grande partie de leur existence dans des conditions de carence alimentaire dans lesquelles une croissance rapide n'est pas possible. Cet état rappelle la phase stationnaire définie dans les milieux de culture (Roszak et Colwell, 1987a).

Dans l'eau de mer, les bactéries vont progressivement évoluer vers un état de dormance (Roszak et Colwell, 1987b). Elles perdent tout d'abord leur capacité à cultiver sur milieu gélosé (technique classique) et évoluent vers un stade viable non cultivable : elles possèdent encore la capacité à assimiler des nutriments et à synthétiser des composants membranaires, cet état est observable par la technique du direct viable count (DVC ; Kogure *et al.*, 1979). Puis, cette viabilité peut disparaître.

Les bactéries ont une remarquable capacité à maintenir leur viabilité quand les conditions sont défavorables, et à reprendre rapidement leur croissance quand les nutriments sont à nouveau disponibles. Les bactéries telles que *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio* s'adaptent aux conditions de carence en devenant métaboliquement moins actives et plus résistantes (Siegele et Kolter, 1992).

La cellule en phase stationnaire subit plusieurs changements : diminution de taille, passage à une forme sphérique, augmentation du volume du périplasme, condensation du cytoplasme (Siegele et Kolter, 1992). Lors de la carence nutritionnelle des bactéries, le métabolisme global diminue tout en conservant un minimum d'activité métabolique endogène. De même, le taux d'ATP diminue mais reste à un niveau minimum pour permettre le transport de substrats dans la cellule (Siegele et Kolter, 1992). Pour maintenir une activité métabolique

endogène, un plus grand taux de dégradation des protéines est observé (Reeve *et al.*, 1984b) et la stabilité des ARN est diminuée. Ceci permet la synthèse *de novo* de protéines indispensables pour la survie des bactéries en état de carence (Reeve *et al.*, 1984a). La bactérie met en place par anticipation différents systèmes de défense qui pourront lui être utiles lors d'un éventuel stress survenant en phase stationnaire.

Plus de 30 protéines sont induites dans ce cas, beaucoup ne sont pas synthétisées pendant la phase exponentielle de croissance (Groat *et al.*, 1986). En marquant les protéines synthétisées à différents stades de la croissance bactérienne, il a été mis en évidence que les protéines néo-synthétisées en phase stationnaire étaient très différentes des protéines néo-synthétisées en phase exponentielle ou celles apparaissant au cours des premières heures de la phase stationnaire (Kolter, 1992).

IV-2 Gène *katF*

L'étude de la régulation de l'expression des gènes au cours de la phase stationnaire a permis de mettre en évidence le gène régulateur *katF* (*rpoS*, *appR*). La séquence du gène *katF* possède de grandes similitudes avec le gène codant pour le facteur σ^{70} sous-unité de l'ARN polymérase (Mulvey et Loewen, 1989). Le produit du gène *katF* est un facteur d'initiation de transcription sigma alternatif lors de la phase stationnaire (Tanaka *et al.*, 1993). Cette protéine KatF (RpoS, σ^S , σ^{38}) contrôle de façon positive de nombreux gènes dépendant de la phase stationnaire. Un signal de carence déclenche la synthèse de KatF qui active l'ARN polymérase permettant la transcription des gènes régulés par le gène *katF* (Hengge-Aronis, 1993b).

Le produit du gène *katF* contrôle la synthèse de plus de 32 protéines induites par la carence en carbone (Mc Cann *et al.*, 1991). Les gènes suivants sont régulés par le facteur KatF :

- *katE* codant pour la catalase HPII permettant la résistance au peroxyde d'hydrogène (Loewen et Triggs, 1984),
- *katG* codant pour la catalase HPI (Ivanova *et al.*, 1994),
- *xthA* codant pour l'exonucléase III (Sak *et al.*, 1989). L'exonucléase III permet la réparation de l'ADN et la résistance au peroxyde d'hydrogène. Elle reconnaît et enlève les nucléosides 5 monophosphates près des sites apuriques et apyrimidiques dans les ADN endommagés.

- *appA* codant pour la phosphatase acide périplasmique avec un pH optimum de 2,5 (Touati *et al.*, 1986),
- *appY* dont le produit régule l'expression de *cyxAB-appA*, la phosphatase acide (Atlung *et al.*, 1989),
- *cyx AB-appA (appCBA)* codant pour une cytochrome oxydase et la phosphatase acide (Dassa *et al.*, 1992),
- *csgA* codant pour la sous-unité curli, permettant la fixation du fibrinogène (Olsén *et al.*, 1993),
- *bolA* morphogène contrôlant le changement de forme de la cellule lors de son entrée en phase stationnaire (Aldea *et al.*, 1989 ; Lange et Hengge - Aronis, 1991a),
- *glgS* codant pour une protéine GlgS intervenant dans la synthèse du glycogène (Lange et Hengge-Aronis, 1991b),
- *csi-5 (osmY)* codant pour une protéine qui pourrait avoir une structure apparentée aux histones, qui protègent l'ADN dans les cellules eucaryotes ("histone-like protein") dans ce cas spécifique de la phase stationnaire (Hengge-Aronis, 1993),
- *osmB* codant pour une lipoprotéine localisée dans la membrane externe (Hengge-Aronis *et al.*, 1991),
- *otsA* et *otsB* codant respectivement pour la tréhalose-6-phosphate synthétase et pour la tréhalose 6 phosphatase permettant la synthèse du tréhalose qui intervient dans la protection au stress osmotique et la thermotolérance (Giaever *et al.*, 1988 ; Hengge-Aronis *et al.*, 1991),
- *treA (osmA)* codant pour une tréhalase périplasmique permettant la dégradation du tréhalose, par les bactéries, dans les milieux à haute osmolarité (Boos *et al.*, 1987 ; Hengge-Aronis *et al.*, 1991),
- *mcc* codant pour l'expression plasmidique de certains petits peptides antibiotiques tels que la microcin C7 (Diaz-Guerra *et al.*, 1989),

- *dps* (*vtm*) codant pour une protéine Dps (DNA-binding protein from starved cells), induite par la phase stationnaire, protégeant l'ADN et régulant l'expression d'autres gènes (Almiron *et al.*, 1992 ; Kolter *et al.*, 1993),

- *poxB* codant pour une pyruvate oxydase (Chang *et al.*, 1994),

- *cfa* codant pour la CFA synthétase (cyclopropane fatty acids synthetase) permettant la synthèse des acides gras cyclopropanoïques (Wang et Cronan, 1994),

- *fic* régulateur de la division cellulaire (Utsumi *et al.*, 1993),

- *htrE* opéron codant pour la synthèse des pili (Raina *et al.*, 1993).

Le gène *katF* régule également au moins la synthèse de 6 Pex protéines et de 2 Cst protéines (Mc Cann *et al.*, 1991), de facteurs de virulence chez *Salmonella typhimurium* (Fang *et al.*, 1992). Les Pex protéines sont induites dans différentes conditions de carence indépendamment de l'adenosine mono-phosphate (AMPc). Elles permettent aux bactéries carencées de résister à différents stress (Jenkins *et al.*, 1988 ; Jenkins *et al.*, 1990 ; Matin, 1991). Ce groupe de protéines comprend par exemple les protéines DnaK, GroEl... (Matin, 1991). Les Cst protéines nécessitent la présence d'AMP cyclique pour leur induction. Certaines protéines sont co-régulées par l'AMPc et le produit du gène *katF* (Mc Cann *et al.*, 1991). Elles n'interviennent pas dans le phénomène de résistance liée à la carence. Pour Schultz *et al.* (1988), ces Cst préparent les cellules à la sortie de l'état de carence.

Les mutations au niveau du gène *katF* rendent les bactéries très sensibles au peroxyde d'hydrogène et aux UV proches (300 - 400 nm) sans être sensibles aux UV lointains (254 nm) (Tuveson, 1980 ; Eisenstark *et al.*, 1991).

MATERIELS ET METHODES

I PREPARATION DES SOUCHES

I-1 Souches utilisées

Les souches utilisées sont décrites dans le tableau I.

Tableau I : Souches bactériennes utilisées

Souche	Génotype	Origine
<i>E. coli</i>		
H10407		Joly, Evans <i>et al.</i> , 1975
GC4468	F ⁻ Δ (<i>arg-lac</i>) U169 <i>rpsL</i>	D'Ari R.
QC772	GC4468 Φ(<i>sodA-lacZ</i>)49	Carlioz et Touati, 1986
QC773	GC4468 Φ(<i>sodB-kan</i>)Δ2	Carlioz et Touati, 1986
QC774	GC4468 Φ(<i>sodA-lacZ</i>)49 Φ(<i>sodB-kan</i>)Δ2	Carlioz et Touati, 1986
QC 2095	GC4468 Δ <i>recA</i>	Touati D.
QC 1114	GC4468 Φ(<i>sodA-lacZ</i>)49 Φ(<i>sodB-kan</i>)Δ2 <i>katF</i> ::Tn10	Touati D.
MP180	HfrH, <i>thi-1</i>	Pearson, 1972
UM 120	MP180 <i>katE12</i> ::Tn10	Loewen et Triggs, 1984
UM 122	MP 180 <i>katF13</i> ::Tn10	Loewen et Triggs, 1984
UM 202	MP 180 <i>katG17</i> ::Tn10	Loewen <i>et al.</i> , 1985
BW35	Hfr KL16 <i>thi relA1 spoT1</i>	Weiss B.
BW295	BW35 <i>xthA</i>	Weiss B.
C600	<i>leu thr thi lac V^r1,5</i>	Appleyard, 1954
HB 101	F ⁻ <i>recA leu met pro thi</i>	Boyer et Rouhland-dussoix, 1969
QC2270	GC4468 <i>fpg</i> ::Tn5 <i>uvrA</i> ::Tn10	Touati D.
MG1655	prototrophe	Bachmann B.
QC2404	MG1655 <i>katE</i> ::Tn10 <i>katG</i> ::Tn10 <i>rha</i> ::Tn5	Touati D.
QC2408	MG1655 <i>dps</i> :: <i>kan</i>	Touati D.
MC4100	F ⁻ Δ(<i>arg-lac</i>)U169 <i>araD139 rpsL150 ptsF25 flbB5301 rbsR deoC relA1</i>	Silhavy <i>et al.</i> , 1984
RO22	MC4100 <i>otsA</i> ::Tn10 Φ (<i>otsB</i> :: <i>lacZ</i>)8(λ <i>placMu55</i>)	Hengge-Aronis <i>et al.</i> , 1991
RH90	MC4100 <i>katF359</i> ::Tn10	Lange et Hengge-Aronis, 1991
QC 2438	Hfr Cavalli (CGSC 4410) <i>relA1 spoT1 metB1 rmB2 mcrB1 phoM510</i>	Bachmann B. (CGSC)
QC 2430	QC 2438 <i>hemA</i> (CGSG S4806)	Bachmann B. (CGSC)

Afin d'étudier le mécanisme d'action de la lumière visible sur *Escherichia coli* en eau de mer, nous avons comparé la survie à la lumière visible de bactéries mutées, déficientes en certaines protéines et la survie des souches sauvages correspondantes. Les mutants et la souche parentale correspondante sont dans le même état physiologique (phase exponentielle ou phase stationnaire) lors de leur exposition à la lumière visible.

Nous avons donc comparé la sensibilité à la lumière visible de :

- bactéries déficientes en Mn-SOD (QC772 ; GC4468 *sodA*), en Fe-SOD (QC773 ; GC4468 *sodB*) et à la fois en Mn-SOD et Fe-SOD (QC774 ; GC4468 *sodA sodB*) et la souche sauvage (GC4468),
- bactéries déficientes en catalase HPI (UM120 ; MP180 *katE*), en catalase HPII (UM202 ; MP180 *katG*) et la souche sauvage (MP180),
- bactéries déficientes en catalase HPI et en catalase HPII (QC2404 ; MG1655 *katE katG*), déficientes en système de protection de l'ADN (la protéine Dps) (QC2408 ; MG1655 *dps*) et la souche parentale (MG1655),
- bactéries déficientes en système de réparation de l'ADN : bactéries déficientes en système de recombinaison (QC2095 ; GC4468 *recA*), en formamidinopyrimidine glycosylase et excinuéclase A (QC2270 ; GC4468 *fpg uvrA*) et la souche sauvage (GC4468),
- bactéries déficientes en exonuéclase III (BW295 ; BW35 *xthA*) et la souche parentale (BW35).
- bactéries déficientes en facteur KatF (RpoS) (UM122 ; MP180 *katF*) et la souche sauvage (MP180),
- bactéries déficientes en enzymes de synthèse du tréhalose : tréhalose 6 phosphate synthétase et tréhalose 6 phosphatase (RO22 ; MC4100 *otsA otsB*), déficientes en facteur KatF (RH90 ; MC4100 *katF*) et la souche sauvage (MC4100),
- bactéries déficientes en enzyme de synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (QC2430 ; QC2838 *hemA*) et la souche sauvage (QC 2438)

I-2 Préparation des cultures

Au cours des premières expériences, les souches H10407 étaient pré-incubées pendant 16 heures dans du bouillon trypticase soja (BTS ; BBL). Puis, un millilitre était repris dans 19 ml de bouillon (BTS) et incubé pendant 4 heures à 37 °C sans agitation.

Puis, le protocole a été modifié afin d'améliorer les conditions de croissance dans les cultures en milieu riche : agitation, faible inoculum de préculture dans les subcultures (<1/100), utilisation du milieu Luria Bertani, milieu de choix pour *E. coli*, meilleure différenciation des cellules en phase exponentielle et en phase stationnaire. Les précultures sont réalisées, à partir de colonies isolées, dans du bouillon Luria Bertani (LB ; 10 g.l⁻¹ tryptone, 10 g.l⁻¹ NaCl et 5 g.l⁻¹ extrait de levure ; Difco) si nécessaire en présence des

antibiotiques appropriés afin de sélectionner les bactéries portant des marqueurs de résistance (chloramphénicol 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; kanamycine 40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; tétracycline 26 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; Sigma). Elles sont ensuite incubées à 37 °C sous agitation continue à 200 rpm pendant 10-12 heures. Les subcultures sont inoculées à partir des précultures dans le même milieu préchauffé et placées à 37 °C dans les mêmes conditions que précédemment jusqu'à la DO voulue.

Les bactéries sont récupérées par centrifugation 3 500 tr.min^{-1} , à 4 °C, pendant 20 min, lavées 2 fois par de l'eau physiologique stérile (9 g.l^{-1} NaCl) et reprises dans le milieu utilisé pour étudier la survie des bactéries (généralement de l'eau de mer artificielle stérile).

Cette suspension bactérienne permet d'ensemencer l'eau à une concentration de 10^7 bactéries/ml environ.

II PREPARATION DE L'EAU

Différents types d'eau ont été utilisés au cours des expériences.

Dans la plupart des cas, l'eau employée était de l'eau de mer artificielle Instant Ocean (salinité 34 ‰ ; pH 8,4). Cette eau peut être diluée dans de l'eau distillée pour obtenir des salinités plus faibles : 10 ou 20 ‰ de salinité. Certaines expériences ont également été conduites avec de l'eau de mer naturelle, propre, prélevée à Argenton (Finistère). Sa salinité est de 35 ‰. La concentration en carbone organique dissous (COD) dans l'eau naturelle après traitement est de 2,5 mg.l^{-1} environ et dans l'eau de mer artificielle de 0,7 mg.l^{-1} .

L'eau douce est de l'eau du réseau (pH 8,2). Ces eaux de différentes origines sont filtrées sur filtre 0,2 μm (Sterivex, Millipore) et autoclavées pendant 20 mn, à 110 °C pour l'eau douce et l'eau de mer naturelle et à 120 °C pour les eaux Instant Ocean.

III EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE DE *E. COLI*

Les expériences ont été conduites dans des bouteilles de verre (borosilicate, Duran) de 2 litres, 1 litre, 500 ml ou de 250 ml ou dans des tubes à essai (en verre) contenant respectivement 1 litre, 500 ml, 250 ml, 100 ml ou 20 ml d'eau stérile.

Lors de l'étude du mécanisme de toxicité de la lumière visible, les essais ont été conduits en lumière artificielle continue dans une armoire thermostatée (Luminincube II, Analis) avec deux jeux de six néons fluorescents de 20 watts (Lumière de jour, Claude ; spectre fig. 2) répartis à l'avant et à l'arrière de l'armoire ou dans un incubateur New Brunswick G25 avec 7 néons horizontaux Lumilux de luxe 32 (Osram, Allemagne ; spectre fig. 3). Les expériences sont effectuées à 20 °C. Les bouteilles sont agitées à 180 rpm. Des témoins sont gardés à l'obscurité (flacons recouverts de papier d'aluminium).

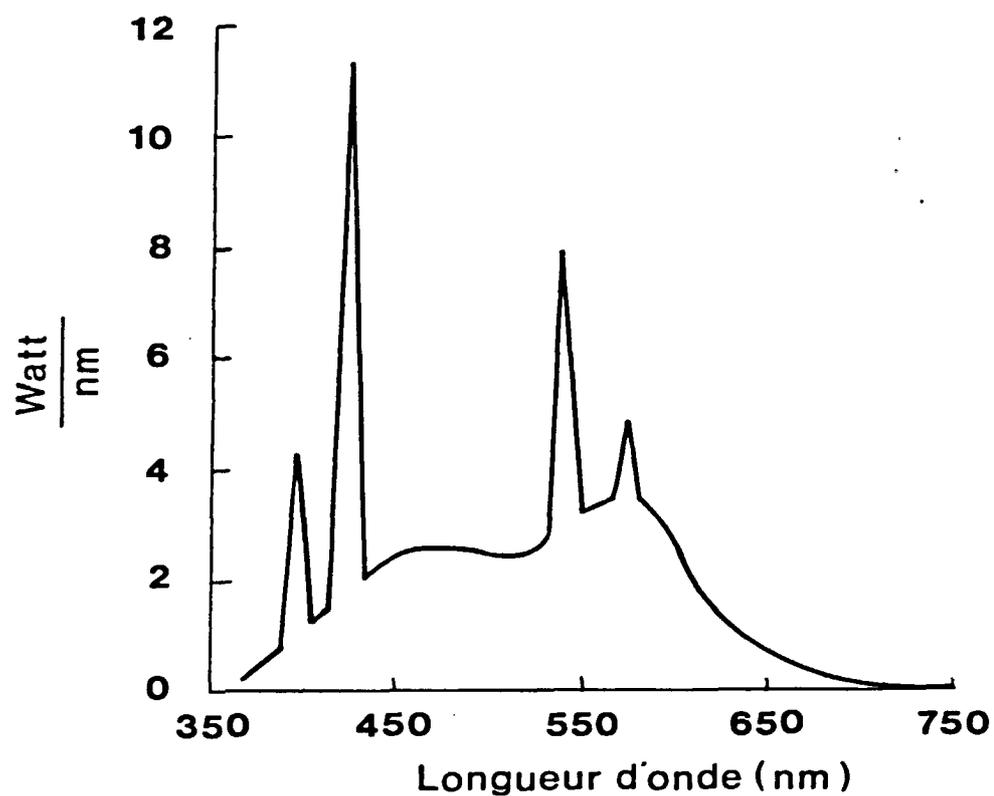


Figure 2 : Spectre lumineux des néons fluorescents utilisés dans l'armoire thermostatée : Lumière de jour (Claude).

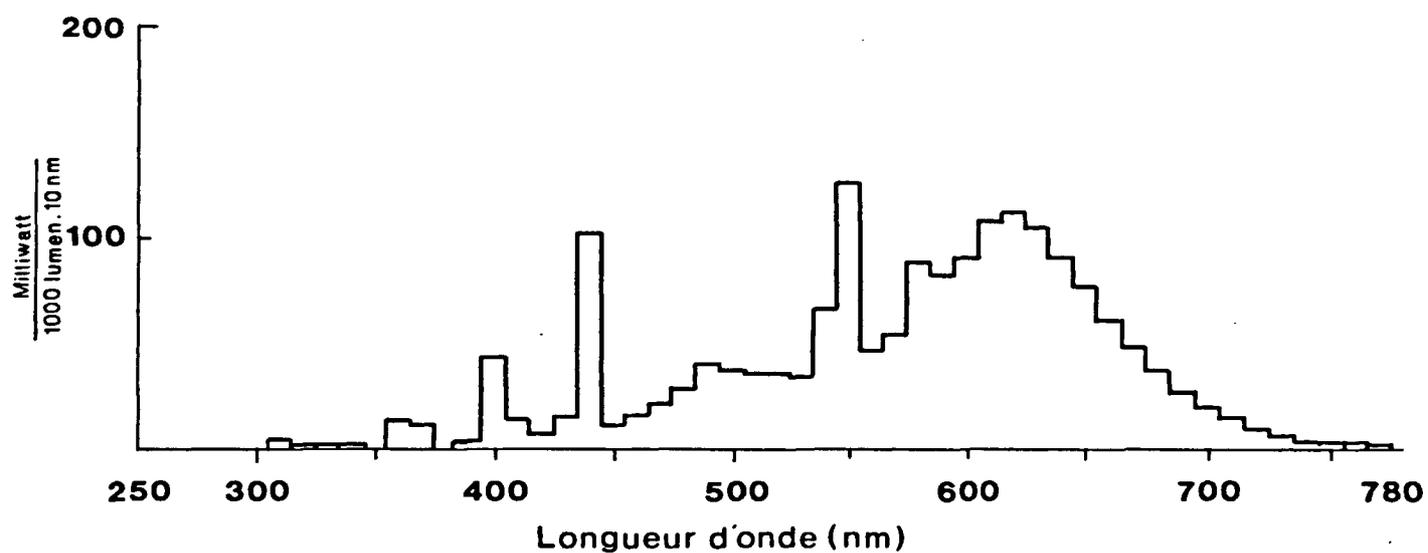


Figure 3 : Spectre lumineux des néons fluorescents utilisés dans l'incubateur New Brunswick : Lumilux de luxe 32 (Osram).

L'intensité lumineuse est mesurée grâce à un Licor LI 1 000 Data Logger avec une ampoule 193SA immergeable (spectre en annexe 1). Elle est de $500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ (soit 40 klux environ) dans l'armoire thermostatée, de $900 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ dans l'incubateur New Brunswick

IV APPORT DE DIFFERENTS COMPOSES

Dans l'eau de merensemencée en bactéries, différentes substances sont ajoutées dans le but d'appréhender le mécanisme de la toxicité de la lumière visible sur les bactéries :

IV-1 Utilisation de piègeurs de ROS

IV-1-1 PIEGEURS DU RADICAL HYDROXYLE (OH°)

- Thiourée 100 mM (Prolabo)
- Diméthylsulfoxyde (DMSO) 100, 250 et 500 mM (Prolabo)
- Benzoate de sodium 100 mM (Prolabo)

IV-1-2 PIEGEURS DE L'OXYGENE SINGULET ($^1\text{O}_2$)

- β carotène (provitamine A) 0,1 mM (Sigma) solubilisé dans de l'éthanol
- Nicotinamide adénine dinucleotide phosphate (NADPH) 1 mM (Boehringer Mannheim)
- Histidine 100 mM (Prolabo)

IV-1-3 CHELATEUR DU FER

- Desferal[®] (Desferrioxamine B ; Ciba-Geigy) 1, 50 et 500 μM

IV-1-4 ENZYMES

- Superoxyde dismutase (SOD) 55 UI.ml^{-1} (Sigma)
- Catalase (CAT) 220 UI.ml^{-1} (Sigma)
- Ces enzymes ont également été dénaturées (afin d'éliminer leur activité enzymatique et tester leur action par la seule propriété d'apport de protéines) par chauffage à 95°C dans du tampon borate pH 9 pendant une heure.

IV-2 Apport de nutriments

Des milieux nutritifs ont également été apportés séparément : milieux riches : BTS (composition en annexe 2) à 1% ou 1‰ ou LB (composition en annexe 2) à 1%, ou milieu minimum M 63 (Cohen et Rickenberg, 1956) modifié (7 g de chlorure de potassium, 2 g de sulfate d'ammonium, 0,1 mg de sulfate de magnésium, 1 mg de sulfate de fer par litre d'eau de mer stérile) à 1% ou 1‰. Le glucose est additionné à la concentration finale de 1,8 mg.l⁻¹ ou 18 mg.l⁻¹.

IV-3 Apport d'osmoprotecteurs

Dans certaines expériences, de la glycine bêtaïne (Sigma) a été apportée à la concentration de 1mM.

V EXPERIENCE EN ANAEROBIOSE

Afin d'étudier le rôle de l'oxygène dans la phototoxicité, nous avons comparé la survie à la lumière visible de bactéries placées dans une eau de mer appauvrie en oxygène à celle de bactéries placées dans une eau de mer n'ayant pas subi de traitement particulier. Les échantillons en anaérobiose sont obtenus par barbotage à l'azote de l'eau de mer et par passage dans une enceinte anaérobie (Bubble system, La Caldhène) qui permet de remplacer l'air contenu dans les bouteilles par un mélange de 90 % d'azote, de 5 % de dioxyde de carbone et de 5 % d'hydrogène. Les bouteilles sont serties. Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une seringue à travers le bouchon en caoutchouc. Le volume de suspension bactérienne prélevé est remplacé par un volume d'azote au moins équivalent pour éviter les dépressions dans les bouteilles qui se traduiraient par une entrée d'air.

VI NUMERATIONS BACTERIENNES

VI-1 Méthodes directes

VI-1-1 DENOMBREMENT TOTAL DES BACTERIES PAR EPIFLUORESCENCE

- Acridine Orange Direct Count (AODC) (Hobbie *et al.*, 1977).

Un volume variable de l'échantillon formolé est filtré sur filtres en polycarbonate (Nucléopore ; taille des pores 0,2 µm ; diamètre des filtres 25 mm) coloré en noir. Après

incubation avec 2 ml d'acridine orange (BioMerieux) pendant 2 mn, l'échantillon est lavé à l'eau distillée stérile. L'acridine orange se fixe sur les acides nucléiques et fluoresce en orange ou en vert, en lumière UV (photo 1). L'observation des bactéries se fait au grossissement x 100 à immersion avec un microscope à épifluorescence Olympus BX60.

- Diamidino-phénylindole (DAPI) (Porter et Feig, 1980)

L'échantillon formolé est filtré sur filtre Nucléopore (diamètre 25 mm, pore 0,2 μm) coloré en noir. Le filtre est incubé 15 mn avec une solution de DAPI à 2,5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ à l'abri de la lumière et monté entre lame et lamelle. L'observation a lieu à 450 nm. Les bactéries fluorescent en bleu (photo 3)

VI-1-2 DENOMBREMENT DES BACTERIES VIABLES : DVC (DIRECT VIABLE COUNT) (KOGURE *et al.*, 1979)

Cette technique consiste à incuber les échantillons pendant 15 mn à 37 °C en présence d'extrait de levure (concentration finale 0,025 %) et d'acide nalidixique, antibiotique inhibiteur de l'ADN gyrase empêchant donc toute division cellulaire. L'acide nalidixique (Sigma) est apporté à la concentration 0,012 % légèrement supérieure à la concentration minimale inhibitrice (CMI) qui est de 0,006 % pour la souche *E. coli* H10407. Les échantillons sont ensuite gardés environ 18 heures à 37 °C puis ils sont formolés. Les cellules viables, en assimilant l'extrait de levure, augmentent de taille contrairement aux cellules non viables. L'échantillon est ensuite filtré et coloré à l'acridine orange comme décrit précédemment. Toute cellule sera considérée comme viable si sa longueur est 4 fois supérieure à celle des cellules observées en épifluorescence AODC (photo 2).



Photo 1 : Visualisation des bactéries par coloration à l'acridine orange au microscope à épifluorescence.



Photo 2 : Visualisation des bactéries viables par la technique du direct viable count (DVC) après coloration à l'acridine orange au microscope à épifluorescence.



Photo 3 : Visualisation des bactéries ayant une activité respiratoire par réduction du CTC en cristaux rouges de CTC-formazan et des bactéries totales par coloration au DAPI au microscope à épifluorescence.

Expression des résultats :

Les bactéries fluorescentes sont comptées sur des champs aléatoires de filtre monté sur lame (soit environ 250 bactéries ou 50 champs).

La formule suivante est appliquée pour ramener le nombre de bactéries observées par champ à la concentration par ml dans l'échantillon :

$$X = N \cdot 1/V \cdot D \cdot A$$

où N = nombre moyen de bactéries par champ

V = volume d'échantillon filtré

D = taux de dilution de l'échantillon

A = nombre de champs par filtre = $\pi \cdot R^2 / L \times l$ soit $2,83 \cdot 10^4$

X = nombre de bactéries/ml.

VI-1-3 LE CYANODITOLYL TETRAZOLIUM (CTC)

Le CTC (Polyscience), lorsqu'il est réduit par la chaîne respiratoire, forme des cristaux insolubles de formazan qui fluorescent en rouge sous lampe UV (photo 3). Les cristaux sont stables et sont facilement détectés dans les cellules bactériennes (Rodriguez *et al.*, 1992).

L'échantillon est mis en contact avec le CTC à la concentration finale de 3 mM en présence de 0,025 % d'extrait de levure (Merck) pendant 4 h à 20 °C sous légère agitation, à l'abri de la lumière puis il est formolé. L'échantillon est filtré sur Nucléopore noir puis le filtre est recouvert d'une solution de DAPI (contre-coloration permettant de visualiser les bactéries totales en bleu) à la concentration finale de 2,5 µg.ml⁻¹ pendant 15 mn. L'observation microscopique a lieu à 590 nm pour les cristaux de CTC-formazan et à 450 nm pour les bactéries totales.

VI-2 Dénombrement des bactéries cultivables

Les bactéries cultivables sont dénombrées par étalement de 0,1 ml de la suspension bactérienne, à la dilution appropriée, sur des géloses LB (Difco), trypticase soja (AES) ou Mueller Hinton (Diagnostics Pasteur) si nécessaire en présence des antibiotiques appropriés afin de sélectionner les bactéries portant des marqueurs de résistance (chloramphénicol 20 µg.ml⁻¹ ; kanamycine 40 µg.ml⁻¹, triméthoprim 20 µg.ml⁻¹ ; acide nalidixique 50 µg.ml⁻¹) selon les cas et placées 24 h à 37 °C.

Les résultats sont exprimés en UFC/ml (Unité Formant Colonie).

VII MESURE DE L'ACTIVITE METABOLIQUE BACTERIENNE PAR INCORPORATION DE LA ³H METHYL-THYMIDINE

L'incorporation de ³H méthyl-thymidine dans les bactéries est généralement utilisée pour étudier la production bactérienne dans les eaux naturelles (eaux douces ou eaux de mer) (Robarts et Wicks, 1989 ; Iriberry *et al.*, 1993). Dans notre problématique, cette technique peut permettre d'étudier les conséquences de l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer ou l'eau douce de *E. coli*.

Cette technique d'après Robarts *et al.* (1986) et Robarts et Wick (1989) consiste à mesurer l'incorporation dans les bactéries d'un composé organique traceur la ³H méthyl-thymidine identifiable par sa radioactivité. L'assimilation totale et l'incorporation au niveau des macromolécules synthétisées (protéines et ADN) peuvent être connues. D'après la

littérature, l'ARN n'est pas marqué dans les expériences de courte incubation (Robarts *et al.*, 1986 ; Moriarty, 1986).

Vingt millilitres du milieu expérimental sont prélevés. La ^3H méthyl-thymidine est apportée dans 20 ml d'échantillon à la concentration finale de 20 nmol.l^{-1} ($48 \text{ mCurie}/\mu\text{mole}$ de méthyl-thymidine). Le temps d'incubation est de 30 mn. Chaque mesure a été doublée.

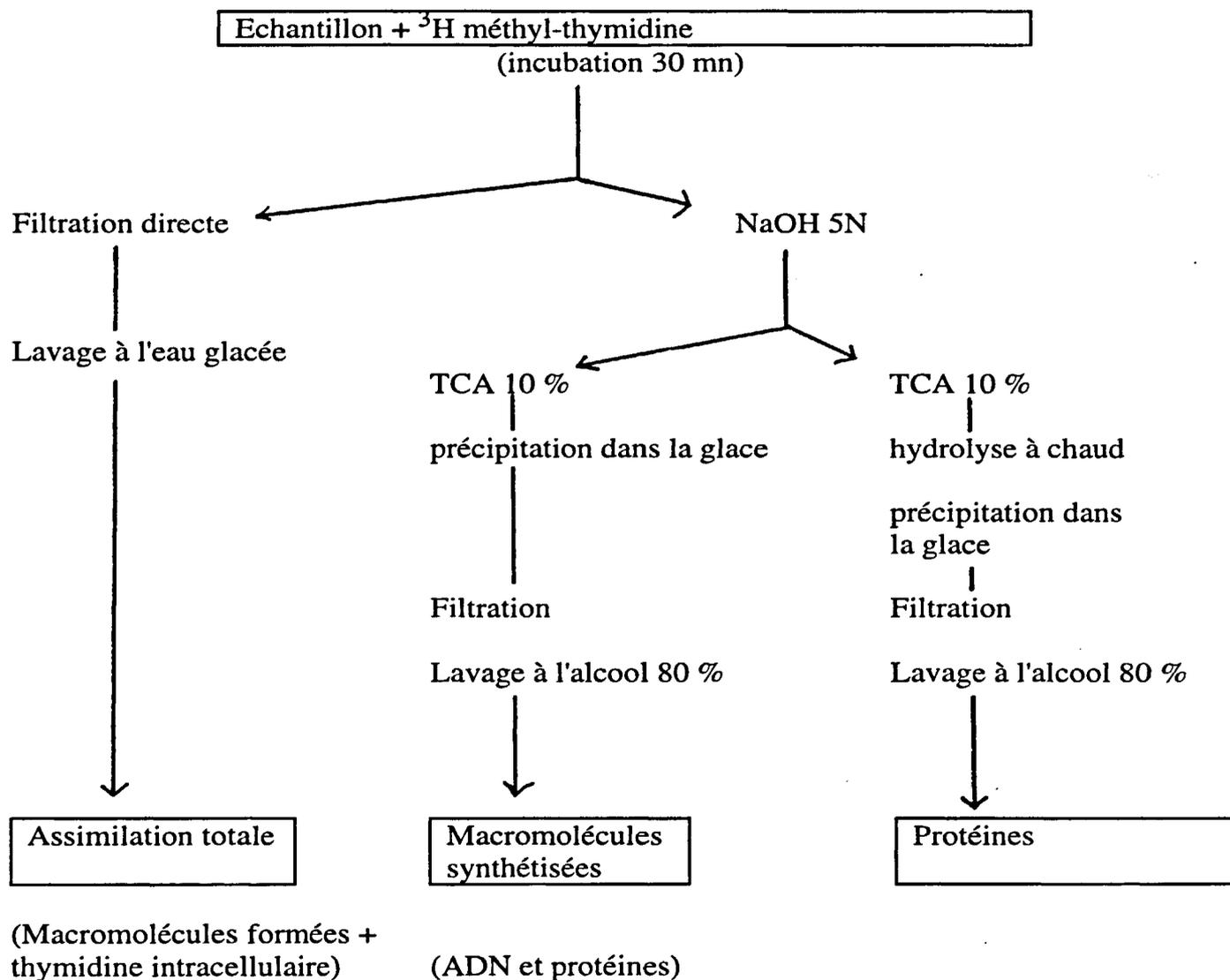


Figure 4 : Protocole expérimental appliqué à l'incorporation de ^3H méthyl-thymidine dans les bactéries.

Les échantillons sont ensuite partagés en trois fractions afin de mesurer l'assimilation totale (macromolécules synthétisées et thymidine intracellulaire), l'incorporation dans les protéines et l'ADN, et enfin l'incorporation dans les protéines seules.

1) La ^3H méthyl-thymidine totale incorporée est déterminée par filtration sur filtre de porosité $0,2 \mu\text{m}$ Durapore GV (Millipore) après lavage par 10 ml d'eau de mer froide. Les filtres sont séchés et placés dans un flacon à scintillation avec un mélange scintillant : Dynagel (Baker). L'incorporation du tritium par les bactéries est mesurée par un compteur à scintillation liquide Beckman LS 5 000 E avec comme référence 20 nmol.l^{-1} de la solution initiale de ^3H méthyl-thymidine directement filtrée. Les valeurs (en désintégration par minute ou dpm) sont corrigées automatiquement par l'appareil en tenant compte du rendement de comptage de la solution (43-44 %). Les temps d'incubation utilisés dans cette méthode sont trop courts pour marquer l'ARN, aussi la synthèse d'ARN n'est pas prise en compte (Robarts *et al.*, 1986 ; Moriarty, 1986).

2) L'ADN et les protéines marqués néosynthétisés sont évalués par addition de 5 mol.l^{-1} de NaOH (0,2 ml) à 3 ml d'échantillon. Les macromolécules sont ensuite précipitées par addition d'acide trichloro-acétique (TCA) glacial pour obtenir une concentration finale de 10%. Afin d'obtenir une précipitation totale, le temps d'incubation est de 30 mn à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Les protéines et l'ADN sont ensuite collectés par filtration sur filtre Durapore $0,2 \mu\text{m}$ et lavés avec de l'éthanol (80 %) glacé.

3) Les protéines et l'ADN sont séparés par traitement de l'échantillon avec du TCA à 10 % dans un bain marie bouillant qui détruit l'ADN. Les protéines sont récupérées par filtration comme précédemment.

L'ADN marqué est obtenu par calcul des différences de radioactivité pour l'ADN et les protéines (2) et les protéines seules (3).

Les résultats sont exprimés en pourcentage de radioactivité (désintégrations par minutes) retrouvée dans les trois compartiments (bactérie totale, ADN et protéines) par rapport à la radioactivité de la ^3H méthyl-thymidine apportée initialement.

VIII ETUDE DU PROFIL DES ACIDES GRAS MEMBRANAIRES

Les bactéries en suspension dans l'eau de mer sont récupérées après exposition à la lumière ou incubation à l'obscurité par centrifugation à 8 000 g pendant 15 mn. Elles sont lavées par de l'eau distillée stérile et lyophilisées pendant 48 h (lyophilisateur RP 2V serail) afin de déterminer la composition en acides gras membranaires.

Les lipides sont extraits de la bactérie par une technique modifiée de celle de Bligh et Dyer (1959).

Les acides gras extraits sont transformés en méthylesters, purifiés et analysés par chromatographie en phase gazeuse (CPG). L'identification des acides gras est effectuée par couplage chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse (CPG/SM).

Vingt milligrammes de cellules (poids sec) sont placés dans 57 ml d'un mélange méthanol-dichlorométhane-eau distillée (2 : 1 : 0,8 v/v) sous agitation magnétique pendant 4 heures à température ambiante. Les lipides totaux sont séparés en différentes classes par chromatographie sur colonne d'acide silicique (1 g). Les lipides neutres sont élués par du dichlorométhane (10 ml), les glycolipides avec de l'acétone (10 ml) et les phospholipides avec du méthanol (10 ml). Seuls, les acides gras de la fraction phospholipidique sont étudiés. Les méthylesters d'acides gras (FAME) sont obtenus par méthanolyse acide. La phase méthanolique est évaporée sous courant d'azote. Le résidu sec est dissous dans 2 ml de méthanol - acide chlorhydrique - dichlorométhane (10 : 1 : 1 v/v) avec 25 ng d'acide nonadécanoïque C₁₉ : 0 (Sigma) comme standard interne, témoin de méthanolyse et chauffé à 100 °C pendant 1 heure. Les échantillons sont purifiés par chromatographie sur couche mince (HPTLC, Merck). La séparation des différents FAME est obtenue sur colonne capillaire en silice fondue non polaire, CPSIL 5CB de longueur 50 m, de diamètre interne 0,25 mm (Chrompack). La chromatographie en phase gazeuse est effectuée sur un Carlo Erba 4160 (Milan, Italie) équipé d'un système d'injection "on-column" à froid et d'une détection à ionisation de flamme. Le gaz vecteur est l'hydrogène à la pression de 1,4 bar.

Les méthylesters d'acides gras bactériens sont en solution finale dans du dichlorométhane. Un microlitre est injecté dans le chromatographe en phase gazeuse.

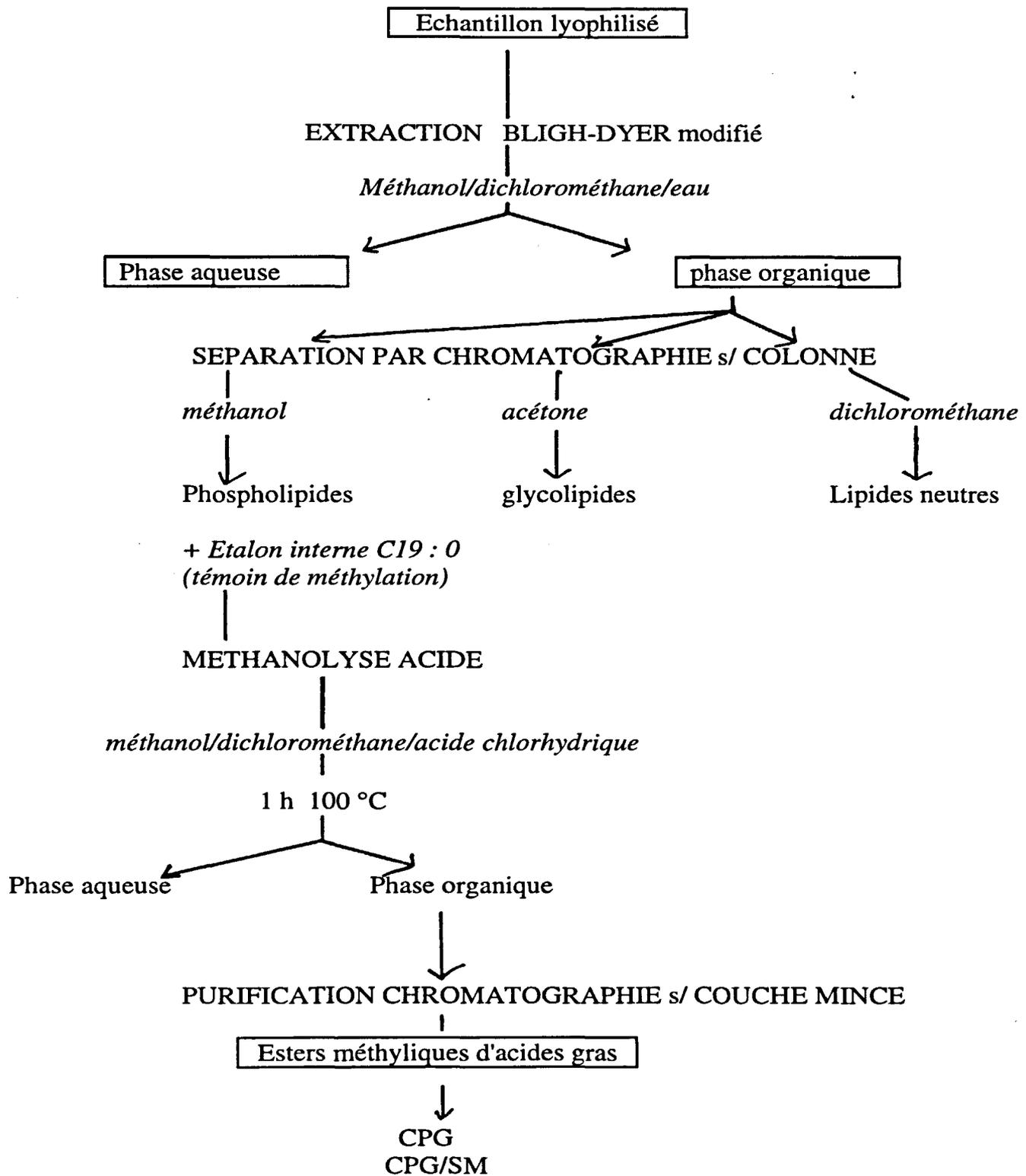


Figure 5 : Protocole d'extraction des acides gras membranaires de *E. coli* (d'après Guezennec, 1986).

Tableau II : Programmation de la température du four et du détecteur.

	Programmation de la température		
	Température	Vitesse	Durée
Four			
1ère étape	50°C		2 min
2ème étape	50 °C	15°C/min	
3ème étape	140 °C	2 °C/ min	
4ème étape	280 °C		10 min
Détecteur	280°C		

Une solution contenant différents méthylesters d'acides gras bactériens (BAME) de chez Supelco et une solution quantitative contenant les méthylesters des principaux acides gras retrouvés chez *E. coli* (mélange à partir de lipides standards de Sigma) sont injectés dans le chromatographe. L'identification des pics obtenus par CPG est possible par comparaison des temps de rétention avec ceux des pics des méthylesters des acides gras standards.

Les résultats sont donnés en pourcentage par rapport à l'ensemble des acides gras membranaires.

Certaines identifications ont été confirmées par un spectromètre de masse quadripolaire à impact électronique Nermag (Argenteuil, France) R10-10 C équipé d'un chromatographe Carlo Erba 5160.

IX ETUDE DES PROTEINES

IX-1 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales est effectué selon la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* (1951) utilisant la réaction de Folin à partir des cellules lyophilisées. La technique est adaptée pour doser les protéines bactériennes (Hanson et Phillips, 1984).

Les bactéries lyophilisées sont mises en suspension dans NaOH 1N. Le chauffage pendant 10 mn à 90 °C permet d'obtenir une solubilisation totale des protéines. Une solution mère de sérum albumine bovine (Sigma) à 1 g.l⁻¹ dans NaOH 1N sert de référence. Cette solution est diluée avec NaOH 1N afin d'obtenir une gamme étalon. L'absorbance des solutions est mesurée à 750 nm par un spectrophotomètre spectronic 401 (Milton Roy).

IX-2 Mesure des activités enzymatiques

IX-2-1 PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES

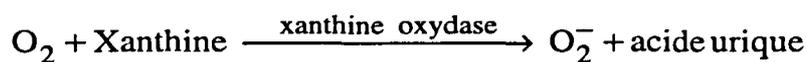
Après un séjour de durée variable dans l'eau de mer, les bactéries sont récupérées par filtration sur filtre Nucléopore puis par centrifugation et remises en suspension dans du tampon phosphate 50 mM pH 7,8 froid (4 °C). Les extraits cellulaires sont obtenus par la méthode de congélation-décongélation d'après Carlioz et Touati (1986).

Les suspensions bactériennes sont centrifugées à nouveau (3 500 tr.mn⁻¹, 4 °C, 20 min) et le culot bactérien est repris dans 0,5 ml de tampon phosphate 50 mM pH 7,8 froid contenant 0,1 mM EDTA, 0,2 mg.ml⁻¹ de lysosyme (Sigma), 10 µg.ml⁻¹ de DNase (Sigma) et 10 mM MgCl₂ (Sigma). La suspension est placée dans un tube Eppendorf et gardée 30 min dans la glace. Les bactéries sont lysées par 6 cycles de congélation-décongélation (à - 80 °C puis dans un bain marie à 44 °C). L'échantillon est ensuite centrifugé à 18 000 g pendant 30 mn. Le surnageant est dialysé à l'aide d'une membrane Spectra Por 10 000 D avec du tampon phosphate 50 mM, 0,1 mM EDTA à 4 °C sous agitation magnétique (200 rpm) pendant 18 h.

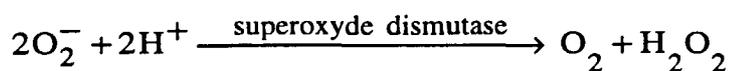
IX-2-2. DOSAGE DE LA SUPEROXYDE DISMUTASE

Principe : La détermination de l'activité SOD est basée sur la production d'ions superoxyde (O₂⁻) en présence d'oxygène de l'air par le système xanthine-xanthine oxydase, (réaction 1), (Mc. Cord et Fridovich, 1969). Les anions superoxydes sont capables de réduire le cytochrome C (Fe III) en un composé (Fe II) absorbant à 550 nm (réaction 2). La SOD s'oppose à cette réduction du cytochrome C en catalysant la dismutation des ions O₂⁻ selon la réaction 3 :

Réaction 1



Réaction 2



Réaction 3



2,8 ml d'un réactif (contenant 0,054 mM de tampon phosphate, 0,107 mM EDTA, 0,011 mM de cytochrome C (Sigma), 0,054 mM xanthine (Sigma)), 0,1 ml d'échantillon à la dilution appropriée et 0,1 ml d'une solution de xanthine oxydase (environ 0,05 unités.ml⁻¹ dans de l'eau milli Q froide à 4 °C ; Sigma) apportée au moment du dosage, sont placés dans une cuve de 1 cm de large.

L'augmentation d'absorbance à 550 nm, due à la réduction du cytochrome C, est suivie sur 3 mn. La réaction a lieu à 25 °C. Une UI de SOD est la quantité d'enzyme entraînant une inhibition du taux de réduction du cytochrome C par le système xanthine-xanthine oxydase de 50 % (Mc Cord et Fridovich, 1969 ; Flohé et Ohing, 1984).

L'activité enzymatique est ensuite rapportée à la quantité de protéines présente dans l'échantillon selon la technique utilisant l'acide bicinchoninique (BCA ; Pierce) (Smith *et al.*, 1985) avec la serum albumine bovine (BSA ; Sigma) comme référence.

IX-2-3 ELECTROPHORESES NATIVES : VISUALISATION DES SOD ET DES CATALASES

Les électrophorèses ont été effectuées dans une cuve pour électrophorèse verticale (Daiichi ou Miniprotean II, Biorad). Les gels utilisés sont des gels précoulés à 7,5 ou 10 % de polyacrylamide (Multigel 10, Daiichi ou Biorad). Vingt-cinq microlitres d'échantillon et 5 µl de tampon d'échantillon (2,5 ml Tris HCl 0,5 M pH 6,8, 2 ml de glycérol, 3 ml d'eau et 0,1 % de bleu de bromophénol ; Sigma) sont déposés dans chaque puits. Les échantillons sont préparés afin de déposer dans chaque puits du gel 40 µg de protéines pour la mise en évidence de la SOD et 30 µg de protéines pour la mise en évidence de la catalase. La migration a lieu à courant constant 30 mA dans du tampon tris/glycine (3 g.l⁻¹ Tris (Sigma), 14,4 g.l⁻¹ glycine (Sigma)). Le pH de la solution de migration est ajusté à 8,1 pour l'étude de la catalase. Le gel est divisé en deux parties : une partie permettra de révéler les activités enzymatiques : SOD ou catalase, l'autre partie les protéines totales.

IX-2-3-1 Révélation des SODs

Après électrophorèse, le gel est incubé à l'obscurité avec une légère agitation pendant 30 min dans 100 ml du mélange composé de :

- 20 mg de nitrobleu de tétrazolium (NBT ; Sigma),
- 65 ml d'eau milliQ,
- 1 ml EDTA 0,1 M,
- 5 ml tampon phosphate 1 M pH 7,8,
- 330 µl tétraméthyléthylène diamine (temed ; Sigma),

où 30 ml de riboflavine (Sigma) 0,1 mM (à l'obscurité) sont ajoutés au dernier moment.

Après 30 min, le gel est rincé rapidement à l'eau distillée et exposé à la lumière pendant 5 min dans l'incubateur New Brunswick G25.

IX-2-3-2 Révélation des catalases (d'après Clare et al., 1984)

Après électrophorèse, le gel est incubé à l'obscurité dans une solution contenant 2,5 mg de peroxydase dans 50 ml de tampon phosphate 50 mM, 0,1 mM EDTA pH 7,0 pendant 45 min, puis 10 mn dans la solution précédente, complétée par 50 ml de tampon phosphate pH 7,0 contenant 10 mM d'H₂O₂.

Le gel est rincé deux fois dans de l'eau distillée, puis est placé dans du tampon phosphate pH 7,0 avec 5 mg.ml⁻¹ de diaminobenzidine (Sigma) jusqu'à coloration.

IX-2-3-3 Visualisation des protéines

Le gel est coloré au bleu de Coomassie. Le gel est placé sous légère agitation dans une solution contenant 0,1 % de bleu de Coomassie, 50 % d'éthanol absolu, 10 % d'acide acétique et 40 % d'eau. L'excès de bleu est éliminé par la solution de décoloration contenant 30 % d'éthanol absolu, 10 % d'acide acétique, 60 % d'eau.

X ETUDE DU PROFIL PLASMIDIQUE

X-1 Technique d'extraction

La technique employée est un protocole amélioré par Ish-Horowicz et Burke (1981) de la méthode Birnboim et Doly (1979).

Deux millilitres d'une culture en bouillon LB ou de suspension bactérienne dans de l'eau milli Q (obtenue par filtration, lavage et remise en suspension dans l'eau milli Q des bactéries après un séjour dans l'eau à 20 ou 34 ‰ de salinité) sont déposés dans des tubes Eppendorf.

Chaque tube est centrifugé 5 min à + 4 °C à 16 000 tr.mn⁻¹, puis les culots sont séchés après élimination des surnageants.

La membrane bactérienne est fragilisée après remise en suspension dans 100 μ l d'une solution froide de :

- glucose 50 mM (Merk),
- EDTA (éthylène diamine) 10 mM (Sigma),
- tris HCl 25 mM (pH 8, Sigma),
- lysozyme 4 mg.ml⁻¹ (Sigma).

Dans les étapes suivantes, les centrifugations seront effectuées à + 2 °C.

Après 5 mn, les bactéries sont ensuite lysées par addition de 200 μ l de solution NaOH à 0,2 M, SDS (1 ‰ en concentration finale) et incubées dans la glace pendant 5 mn.

L'ADN plasmidique est séparé par précipitation des débris cellulaires et de l'ADN chromosomique, grâce à l'ajout de 150 μ l de solution froide d'acétate de potassium (3M pour le potassium, 5 M pour l'acétate, pH 4,8). Le mélange est incubé 5 mn dans la glace.

Après centrifugation (5 mn, 16 000 tr.mn⁻¹), le surnageant est transvasé dans des tubes Eppendorf froids. Un volume égal de phénol-chloroforme-alcool isoamylique est ajouté afin d'éliminer les protéines.

Une nouvelle centrifugation permet d'avoir l'ADN plasmidique dans la phase supérieure. Il est ensuite précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu. Chaque tube est placé à - 20 °C pendant une nuit.

Après une centrifugation de 30 mn à 16 000 tr.mn⁻¹, le culot est séché puis lavé avec 1 ml d'éthanol à 70 %. L'ADN plasmidique est décollé puis centrifugé une nouvelle fois (avec élimination du surnageant et séchage 1 heure à + 37 °C). Le culot est finalement remis en suspension dans 10 μ l de tampon Tris-EDTA contenant de la RNase pancréatique (afin de purifier les échantillons en éliminant l'ARN) à 50 μ g.ml⁻¹. Puis, il est séché 3/4 d'heures à +37°C.

Avant l'électrophorèse, 5 μ l de bleu de bromophénol sont ajoutés aux différents échantillons.

Toutes les solutions utilisées sont conservées à + 4 °C, sauf l'éthanol absolu placé à - 20 °C.

X-2 Préparation du gel

175 mg d'agarose NuSieve GTG et 175 mg d'agarose SeaKem GTG (FMC Products) sont dissous dans 50 ml de tampon Tris Acétate EDTA (TAE) (solubilisés par passage au four à micro-ondes), puis 50 μ l de bromure d'ethidium (BET) permettant de visualiser l'ADN, sont ajoutés après refroidissement à + 50 °C.

Le gel est coulé et il sera ensuite placé dans une cuve à électrophorèse après 3/4 d'heure (temps de solidification).

Conditions de migration :

Tension : 50 V puis 60V au bout de 15 mn

Intensité : 50 A

Durée : 2 h - 2 h 30

Les ADN plasmidiques sont ensuite observés sous lampe UV.

XI ETUDE DES COMPOSES ACCUMULES DANS LA BACTERIE PAR RMN ¹H ET ¹³C

XI-1 Préparation des échantillons

Les bactéries après un séjour dans l'eau de mer sont récupérées par filtration sur filtre Nucléopore 0,2 µm et reprises dans 20 ml d'eau de mer.

La technique d'extraction est une modification de celle de Rod *et al.* (1988) reprise par Dupray *et al.* (1992). Après centrifugation à 3 500 tr.mn⁻¹, à 4°C pendant 20 mn, les bactéries sont remises en suspension dans 8 ml d'eau de mer en tube de verre. Après une nouvelle centrifugation, le culot bactérien est mis en contact avec 2 ml d'acide trichloroacétique froid à 10% et placé dans la glace 5 mn. Après centrifugation, le surnageant est conservé à part et l'opération est reconduite.

Ce traitement permet de conserver les molécules de faible poids moléculaire dans le surnageant : sucres, acides aminés, oligonucléotides et protéines de bas poids moléculaires... (Hanson et Phillips, 1984), les macromolécules étant précipitées par ce traitement au TCA.

Les échantillons doivent être déshydratés avant d'être analysés par spectroscopie RMN. Aussi, l'acide trichloroacétique présent dans les surnageants, très hygroscopique est éliminé par traitement à l'éther di-éthylique (4 ml) sous vive agitation à trois reprises. Le TCA passe ainsi dans la phase supérieure étherée. La phase aqueuse est séchée par passage 48 heures dans une étuve à 42 °C. Le résidu sec obtenu pourra alors être utilisé pour évaluer les composés accumulés dans les bactéries par résonance magnétique nucléaire (RMN).

XI-2 Analyse par spectroscopie RMN

L'extrait sec est repris dans 4 ml de D₂O enrichi à 99,98 % en deutérium et analysé par spectroscopie RMN ¹H à 300 Mhz au laboratoire de RMN de la Faculté des Sciences, Université de Bretagne Occidentale, à Brest.

L'appareil utilisé est un spectromètre Bruker AC 300 équipé d'une sonde Duale ¹H/¹³C de 5 mm.

Pour vérifier les composés identifiés par spectroscopie RMN ¹H, des composés standard ont été apportés dans les échantillons. Dupray *et al.* (1992) avaient vérifié que la structure de ces composés n'était pas modifiée par le traitement TCA-éther. Des spectres RMN ³C des échantillons ont également été réalisés.

XII PRESENTATION DES RESULTATS

Les bactéries cultivables lors de l'exposition à la lumière visible et l'incubation à l'obscurité dans l'eau de mer sont dénombrées au cours du temps. Les résultats représentent la moyenne de deux ou trois expériences différentes. Une analyse de variance à deux facteurs a été effectuée pour tester si les différences observées étaient significatives (probabilité (P) inférieure à 0,05).

RESULTATS ET DISCUSSION

I DECROISSANCE BACTERIENNE PAR EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE DANS L'EAU DE MER.

La décroissance bactérienne est étudiée par plusieurs techniques de numérations qui permettent de mettre en évidence des états physiologiques différents : les bactéries totales (mortes, viables et cultivables) par épifluorescence, les bactéries viables capables d'assimiler des nutriments et de synthétiser les parois et membranes bactériennes (technique du DVC), les bactéries ayant une activité respiratoire (réduction du CTC par la chaîne respiratoire en cristaux insolubles de CTC-formazan) et les bactéries cultivables (méthode classique).

L'effet de la lumière visible a été étudié dans une eau de mer naturelle après élimination de la flore autochtone (par filtration à $0,2 \mu\text{m}$ et autoclavage) ou dans une eau de mer artificielle ayant subi le même traitement. Les résultats sont du même ordre dans les deux types d'eaux mais plus reproductibles avec l'eau de mer artificielle. Enfin, les bactéries sont exposées à la lumière visible artificielle en continu d'intensité 500 ou $900 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ suivant le système d'illumination utilisé.

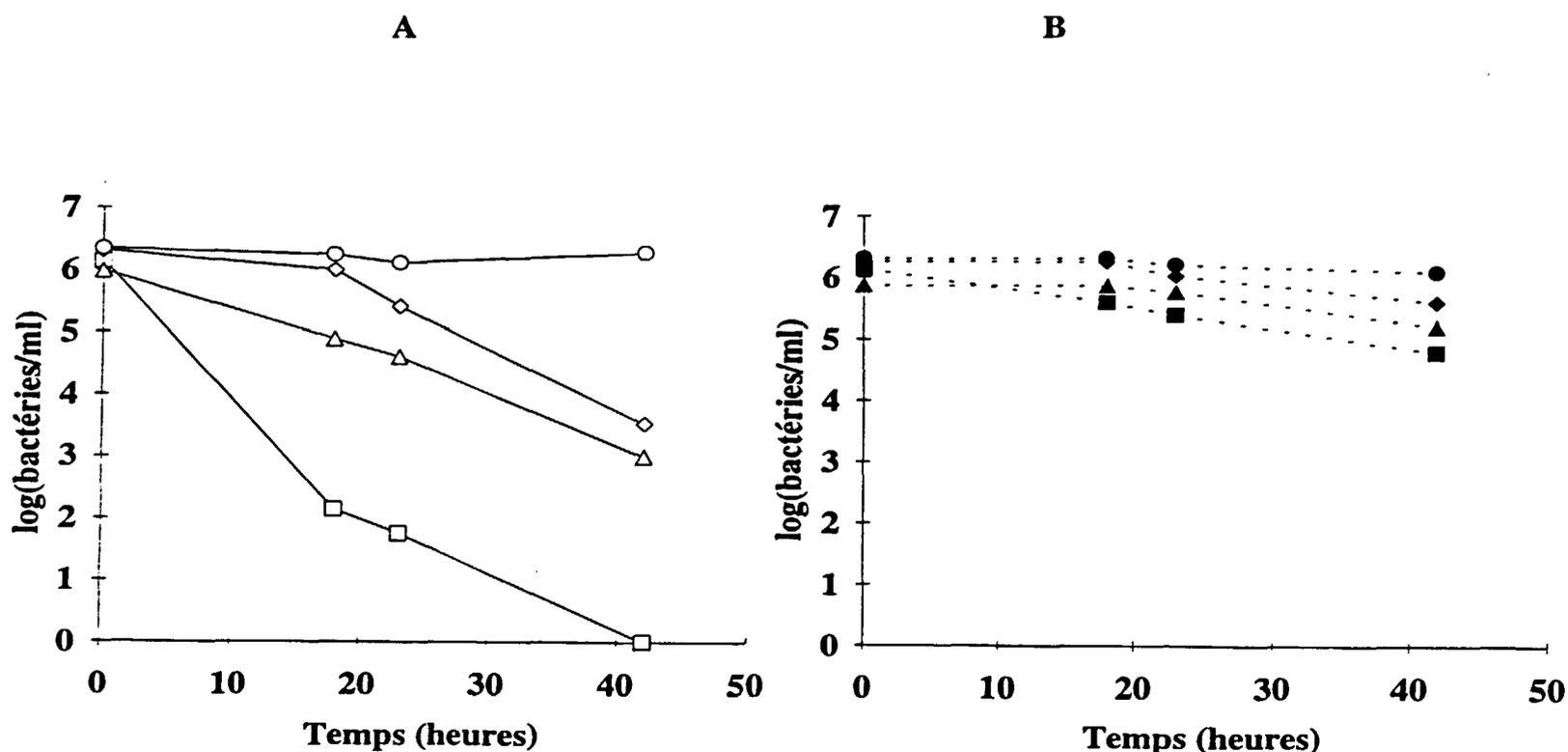


Figure 6 : Survie de *E. coli* H10407, en phase exponentielle, dans l'eau de mer artificielle avec exposition à la lumière visible (A) et incubation à l'obscurité (B) par quatre techniques de numérations différentes. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Dénombrement des bactéries totales par coloration au DAPI (○, ●), des bactéries ayant une activité respiratoire par réduction du CTC (◇, ◆), des bactéries viables par la technique du DVC (Δ, ▲) et des bactéries cultivables (□, ■) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ).

I-1 Bactéries totales (AODC, coloration au DAPI)

L'exposition à la lumière visible ne provoque pas de lyse cellulaire observable au microscope. En effet, le nombre de bactéries totales (cultivables, viables et mortes), évalué par épifluorescence à l'acridine orange ou au 4'6-diamidino-2-phénylindole (DAPI), fluorochromes se fixant au niveau des acides nucléiques, est constant en fonction du temps que les bactéries soient exposées ou non à la lumière (fig. 6).

I-2 Bactéries viables (DVC)

La technique du direct viable count permet de différencier les bactéries pouvant assimiler des nutriments et synthétiser des constituants membranaires (les bactéries viables) de celles ne le pouvant pas (les bactéries non viables). De plus, les bactéries viables se répartissent en bactéries cultivables et en bactéries viables non cultivables (Roszak et Colwell, 1987b).

La lumière visible artificielle en continu entraîne une diminution sensible du nombre de bactéries obtenu par la technique du DVC tandis qu'à l'obscurité, ce nombre diminue faiblement (fig. 6).

Les bactéries évoluent vers un état viable non cultivable lors de l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer. En effet, elles conservent plus longtemps la capacité à assimiler des nutriments que la capacité à cultiver sur milieu gélosé : par exemple, une perte de 4 U log de bactéries cultivables et seulement de 1,5 U log de bactéries viables est observée lors de l'illumination de *E. coli* H10407 (en phase exponentielle) dans l'eau de mer en 24 heures (fig. 6). Puis, les bactéries perdent progressivement leur viabilité (mise en évidence par le DVC).

Roszak et Colwell (1987b) ont montré que l'immersion de *E. coli* dans l'eau de mer conduit à un état viable non cultivable, mais le phénomène est plus lent sans lumière (temps supérieur à celui de nos expériences). Ces bactéries viables non cultivables (en état de dormance ou en état de carence alimentaire) peuvent survivre pendant de longues périodes en eau de mer (Xu *et al.*, 1982). Barcina *et al.* (1990) ont obtenu, de même, une évolution de *Escherichia coli* et de *Enterococcus faecalis* vers un état viable non cultivable lors de leur exposition à la lumière visible dans des eaux de mer ou des eaux douces naturelles.

I-3 Bactéries ayant une activité respiratoire (CTC)

Le CTC, réduit par la chaîne respiratoire bactérienne, permet de mettre en évidence les bactéries possédant encore une activité respiratoire. D'après Smith et McFeters (1994), ce composé agit en tant qu'accepteur d'électrons dans les premières étapes de la chaîne respiratoire c'est-à-dire au niveau de la NADH déshydrogénase, à un stade avant l'ubiquinone.

Dans nos expériences, le CTC a été apporté dans les échantillons, en présence de substrat nutritif (extrait de levure). Ceci permet donc d'évaluer une activité respiratoire potentielle (Rodriguez *et al.*, 1992 ; Troussellier *et al.*, 1994).

Les bactéries exposées à la lumière visible perdent progressivement leur capacité à réduire le CTC tandis que cette propriété se maintient à l'obscurité (fig. 6). Cependant, à la lumière, elles conservent plus longtemps leur activité respiratoire que leur capacité à cultiver sur milieu gélosé (fig. 6).

Troussellier *et al.* (1994) observent, par contre, une décroissance plus rapide de la proportion des cellules réduisant le CTC que celles des cellules cultivables (en présence de hautes teneurs en sels ou en présence des rayonnements solaires, en absence de nutriments). Les résultats différents obtenus par ces auteurs s'expliquent par le fait que dans leurs expériences le CTC était apporté pendant un temps plus court et surtout sans apport de substrat nutritif.

L'apport de nutriments a permis de montrer que le séjour dans l'eau de mer n'affecte pas les potentialités respiratoires des bactéries tandis que l'exposition à la lumière visible conduit à une atteinte cellulaire importante et à une perte significative de la capacité à réduire le CTC. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette diminution de la capacité à réduire le CTC ; la lumière visible par l'intermédiaire de composés toxiques pourrait endommager la chaîne respiratoire ou elle pourrait diminuer les activités métaboliques bactériennes. Enfin, le nombre de bactéries ayant une activité respiratoire évoluent sensiblement de la même façon que celui des bactéries viables observables par la technique du DVC lors de l'exposition à la lumière visible (fig. 6).

I-4 Bactéries cultivables

La lumière visible provoque une perte rapide de la capacité à cultiver sur milieu gélosé riche non sélectif (Luria Bertani ou trypticase soja doux) des *Escherichia coli* dans l'eau de mer (fig. 6). Cependant, la perte de cultivabilité des bactéries varie selon les souches, l'inoculum et l'état physiologique de la bactérie avant exposition à la lumière. A l'obscurité, le nombre de bactéries cultivables diminue faiblement (fig. 6) et reste du même ordre de grandeur que le nombre de bactéries viables évalué par la technique du DVC.

De plus, l'aspect des colonies sur milieu gélosé est différent selon que les bactéries ont été exposées à la lumière visible ou incubées à l'obscurité. L'illumination des bactéries conduit à la formation de colonies de tailles très diverses : apparition de nombreuses petites colonies généralement après 24 heures (photo 4). Par contre, les bactéries incubées à l'obscurité dans l'eau de mer donnent des colonies de taille identique sur milieu gélosé au cours du temps. La bactérie illuminée est plus lente à se développer sur boîte de Pétri mais peut ensuite, lors d'un repiquage, conduire à la formation de colonies de taille semblable à celles provenant de bactéries non illuminées : la lumière visible ne provoque donc pas de mutations conservables par les bactéries après repiquage. Une diminution progressive de la taille des colonies après exposition des bactéries à la lumière a été observée également par Barcina *et al.* (1990) et A. Gougeon (1994).

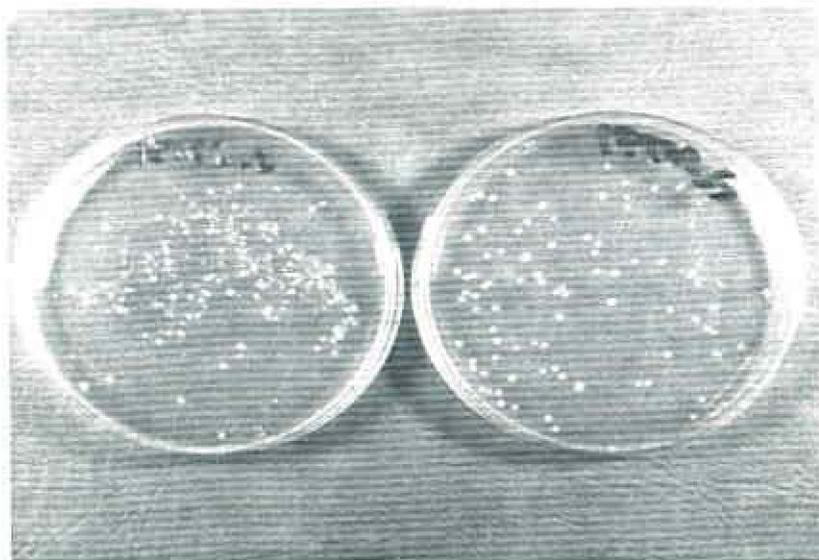


Photo 4 : Aspect des colonies bactériennes sur gélose LB obtenues après exposition à la lumière visible de *E. coli* dans l'eau de mer. A : après exposition à la lumière visible ; B : après incubation à l'obscurité.

En assimilant la décroissance des numérations bactériennes à une cinétique du premier ordre, il est possible de déterminer une droite de régression : $\log(\text{UFC/ml}) = f(\text{temps})$. Ainsi, nous pouvons calculer à partir de la pente un coefficient d'abattement horaire K (en h^{-1}) et un $T_{90} = \frac{1}{K}$ (en h). A partir de nos expériences (*E. coli* H10407 en phase exponentielle ; fig. 6), des T_{90} de l'ordre de 4,5 h à la lumière (intensité d'environ $900 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ soit $3,24.10^6 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$) et de 34 h à l'obscurité ont été mesurés. Cependant, l'état physiologique de la bactérie (phase stationnaire ou phase exponentielle) et les souches bactériennes influencent ces résultats. Les T_{90} peuvent varier et être sensiblement augmentés pour des conditions de lumière identiques.

Lors d'étude *in situ*, la mesure des T_{90} a permis de mettre en évidence le rôle prédominant des rayonnements solaires (et tout particulièrement la lumière visible). Pommepey *et al.* (1991), à partir de résultats obtenus en laboratoire et *in situ* (en immergeant *E. coli* H10407 en phase stationnaire dans des chambres à diffusion dans la baie de Morlaix et de Toulon), en lumière solaire ont montré qu'il existe une assez bonne corrélation entre le T_{90} et l'intensité lumineuse. Ces résultats ont été confirmés par des études plus récentes en Martinique (baie de Fort de France). Les T_{90} étaient alors de 2 h environ à la lumière (intensité lumineuse de 1000 à $1600 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et de 7 à 30 heures à l'obscurité (Pommepey *et al.*, sous presse).

En conclusion, lors de son exposition à la lumière visible dans l'eau de mer, *Escherichia coli* évolue, dans un premier temps, vers un état viable mais non cultivable. Il perd ensuite progressivement son activité respiratoire et sa capacité à assimiler des nutriments et à synthétiser des constituants membranaires.

Le dénombrement des bactéries cultivables est le principal test utilisé au cours de nos expériences pour déterminer l'effet toxique de la lumière et étudier le mécanisme de phototoxicité. Il faut également rappeler que cette technique (par culture) est actuellement utilisée pour le contrôle des coliformes fécaux dans les eaux de baignade et les eaux conchylicoles (cf. normes CEE).

II ETUDE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA SURVIE DE *E. COLI* DANS L'EAU DE MER LORS DE L'EXPOSITION A LA LUMIERE VISIBLE

II-1 Rôle de l'état physiologique de la bactérie avant illumination

II-1-1 PHASE EXPONENTIELLE ET PHASE STATIONNAIRE

Des auteurs ont montré le rôle prépondérant de l'état physiologique des cellules sur leur survie ultérieure en eau de mer ou lors de l'exposition à d'autres stress (Kjelleberg *et al.*, 1987 ; Jenkins *et al.*, 1988 ; Gauthier *et al.*, 1992b). Gauthier *et al.* (1992b) ont montré que la survie de *E. coli* dans l'eau de mer, sans exposition à la lumière, diminue pendant la phase de latence puis augmente progressivement pendant la phase exponentielle de croissance et devient maximale pendant la phase stationnaire.

Afin d'étudier l'influence de l'état physiologique de la bactérie, en eau de mer, sur sa survie lors du stress lumineux, des bactéries en phase exponentielle de croissance ou en phase stationnaire ont été immergées dans l'eau de mer et illuminées. Les bactéries sont apportées dans les différentes expériences à la même concentration soit environ 10^7 bactéries/ml.

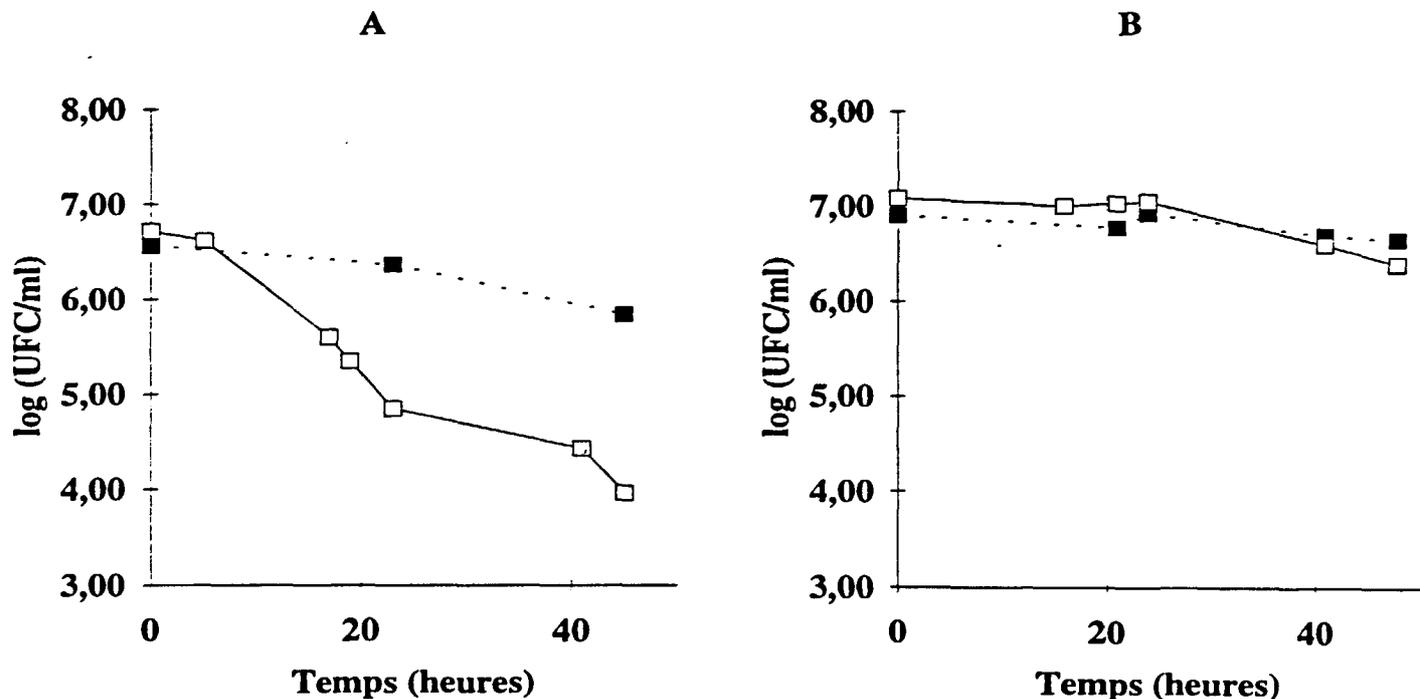


Figure 7 : Survie de *E. coli*, dans l'eau de mer, exposé à la lumière visible, selon la phase de croissance. Lumière (□), obscurité (■). A : MP180 en phase exponentielle. B : MP180 en début de phase stationnaire (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

Les résultats obtenus montrent qu'une bactérie en phase stationnaire survit mieux dans l'eau de mer et résiste d'avantage à la phototoxicité qu'une bactérie en phase exponentielle (fig.7). En effet, la perte de cultivabilité est significativement plus faible ($p < 0,05$) quand la souche *E. coli* MP180 est en début de phase stationnaire avant d'être immergée dans l'eau de mer qu'en phase exponentielle (fig. 7).

Les bactéries en phase stationnaire ou en état de carence s'adaptent à ces conditions en devenant métaboliquement moins actives et plus résistantes (Siegele et Kolter, 1992). Elles survivent mieux à différents stress tels que l'exposition au peroxyde d'hydrogène, le choc thermique, le choc osmotique et l'irradiation par les UV proches (Sammartano *et al.*, 1986 ; Jenkins *et al.*, 1988 ; Jenkins *et al.*, 1990 ; Lange et Hengge-Aronis, 1991). La résistance à ces différents stress est même supérieure pour des cellules en phase stationnaire que pour des cellules pré-adaptées spécifiquement à chaque stress par une exposition à des doses faibles et non létales de ces facteurs (Siegele et Kolter, 1992). Les cellules posséderaient des systèmes de défense non exprimés pendant la phase exponentielle qui répareraient les dommages au niveau de l'ADN et protégeraient les protéines et les membranes en phase stationnaire (Hengge-Aronis, 1993b).

II-1-2 ROLE DU GENE *katF*

Devant la différence de sensibilité des bactéries face à la phototoxicité selon leur phase de croissance (phase exponentielle ou phase stationnaire), nous avons étudié le devenir d'une souche *E. coli* déficiente en protéine KatF lors de l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer. En effet, cette protéine, facteur sigma alternatif de la phase stationnaire, régule l'expression de nombreux gènes de cette phase (Tanaka *et al.*, 1993 ; Hengge-Aronis, 1993a).

La perte de cultivabilité d'une souche déficiente en facteur KatF (UM122) lors de l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer a été suivie en parallèle avec celle de la souche parentale (MP180).

La souche mutée sur le gène *katF* (UM122) est beaucoup plus sensible à la lumière visible que la souche témoin (MP180) quand ces deux souches sont en début de phase stationnaire (après environ 11 h à 37 °C) lors de l'ensemencement de l'eau de mer (fig. 8). L'effet de la lumière visible sur la capacité à cultiver sur milieu gélosé pour la souche déficiente en KatF n'apparaît qu'après un temps de latence de 10 heures d'exposition environ (fig. 8).

A l'obscurité, la perte de cultivabilité bien que faible est significativement plus importante dans le cas de la souche déficiente en KatF ($p < 0,05$).

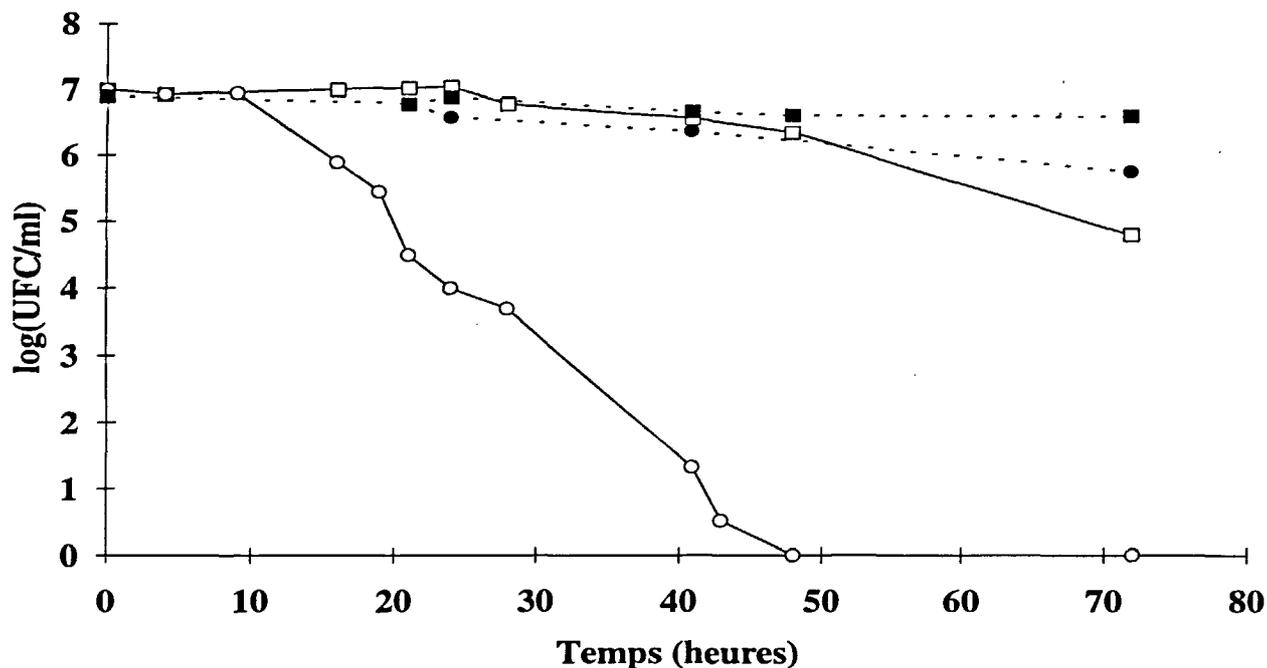


Figure 8 : Effet de la mutation *katF* sur la survie de *E. coli* en début de phase stationnaire, dans l'eau de mer, exposé à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MP180 (□, ■), UM122 mutant *katF* (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

Par contre, lorsque les cellules sont en phase exponentielle avant d'être placées dans l'eau de mer, nous n'observons pas de différence significative dans la sensibilité à la lumière visible entre les deux souches (fig. 9) parce que le facteur KatF est vraisemblablement non exprimé ou peu exprimé lors de la phase exponentielle.

De plus, la souche déficiente en KatF supporte mieux le stress lumineux quand elle est en phase exponentielle que lorsqu'elle est en phase stationnaire. Ceci implique qu'un autre système de protection, KatF-indépendant, existe durant la phase exponentielle et est remplacé par le système de protection KatF-dépendant en phase stationnaire. Les bactéries utilisent donc un mécanisme de défense contre les effets néfastes de la lumière visible en eau de mer différent en phase exponentielle et en phase stationnaire.

La souche sauvage possédant le facteur KatF est plus résistante à la lumière en phase stationnaire qu'en phase exponentielle suggérant que le système de protection est plus efficace en phase stationnaire comme cela est le cas pour la résistance à d'autres stress. Des systèmes de protection contre différents stress sont induits lors de la phase exponentielle (non KatF-dépendants, régulés par *oxyR* par exemple ; Christman *et al.*, 1985 ; Altuvia *et al.*, 1994) et d'autres sont induits pendant la phase stationnaire (Hengge-Aronis, 1993b).

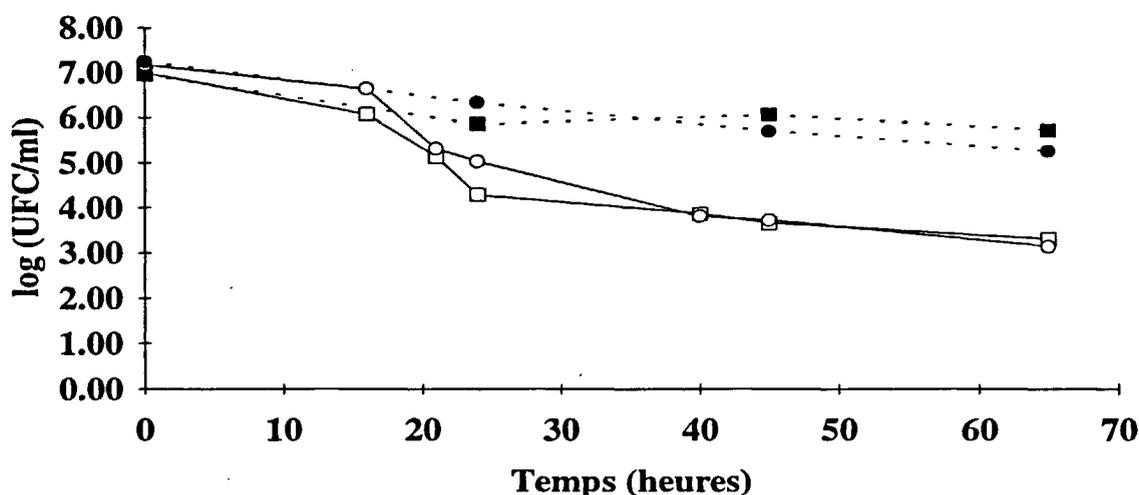


Figure 9 : Effet de la mutation *katF* sur la survie de *E. coli* en phase exponentielle, dans l'eau de mer, exposé à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MP180 (□, ■) , UM122 mutant *katF* (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

Nos résultats suggèrent que, au moins en partie, des systèmes utilisés lors de l'exposition de la bactérie à la lumière visible sont sous la dépendance du facteur KatF.

Le produit du gène *katF* est connu pour contrôler de très nombreux gènes dont les gènes *katE* et *katG* qui codent pour l'expression de la catalase HPII et la catalase HPI respectivement en phase stationnaire (Loewen et Triggs, 1984 ; Ivanova *et al.*, 1994), le gène *xthA* qui code pour l'expression d'une enzyme de réparation de l'ADN : l'exonucléase III (Sak *et al.*, 1989), le gène *dps* codant pour une protéine Dps (DNA-binding protein from starved cells) protégeant l'ADN par recouvrement en phase stationnaire (Almiron *et al.*, 1992) et les gènes *otsA* *otsB* codant respectivement pour la tréhalose-6-phosphate synthétase et pour la tréhalose 6 phosphatase (Giaever *et al.*, 1988), permettant la synthèse d'un osmoprotecteur (le tréhalose). L'induction de la synthèse de ces différentes protéines par l'intermédiaire du facteur KatF pourrait expliquer la meilleure survie de la souche parentale (possédant le facteur KatF) lors du stress lumineux dans l'eau de mer des cellules en phase stationnaire.

Afin de savoir si la sensibilité du mutant *katF* était due à l'absence de production de catalase HPII, des catalases HPI et HPII, de l'exonucléase III, de la protéine Dps ou des protéines permettant la synthèse du tréhalose toutes dépendantes du gène *katF*, nous avons suivi le devenir de différentes souches ne possédant pas les protéines KatE, KatE KatG, XthA, Dps ou OtsA OtsB. Les bactéries sont toutes en début de phase stationnaire.

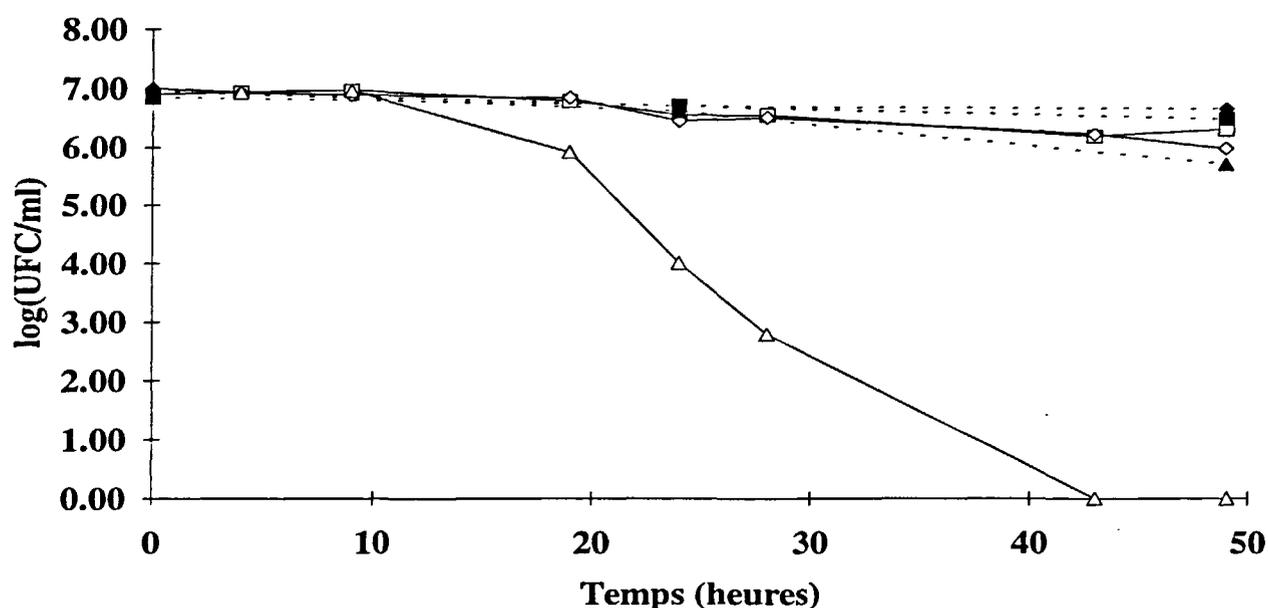


Figure 10 : Effet de la mutation *katE* (catalase HPII) sur la sensibilité à la lumière visible de *E. coli* en début de phase stationnaire dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MP180 (□, ■), UM 120 mutant *katE* (◇, ◆), UM122 mutant *katF* (Δ, ▲) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

Il n'existe pas de différence significative entre la perte de cultivabilité de la souche *katE* déficiente en catalase HPII (UM 120) et celle de la souche témoin (MP180) lors de l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer (fig. 10). La sensibilité de la bactérie *katF* ne semble donc pas être due à l'absence d'expression du gène *katE*. Cependant, si la bactérie est déficiente à la fois en catalase HPI et en catalase HPII, la survie est différente (fig. 11). Le double mutant catalase est plus sensible à la lumière visible que la souche témoin. La sensibilité du mutant *katF* est donc due, en partie, à l'absence de synthèse des deux catalases.

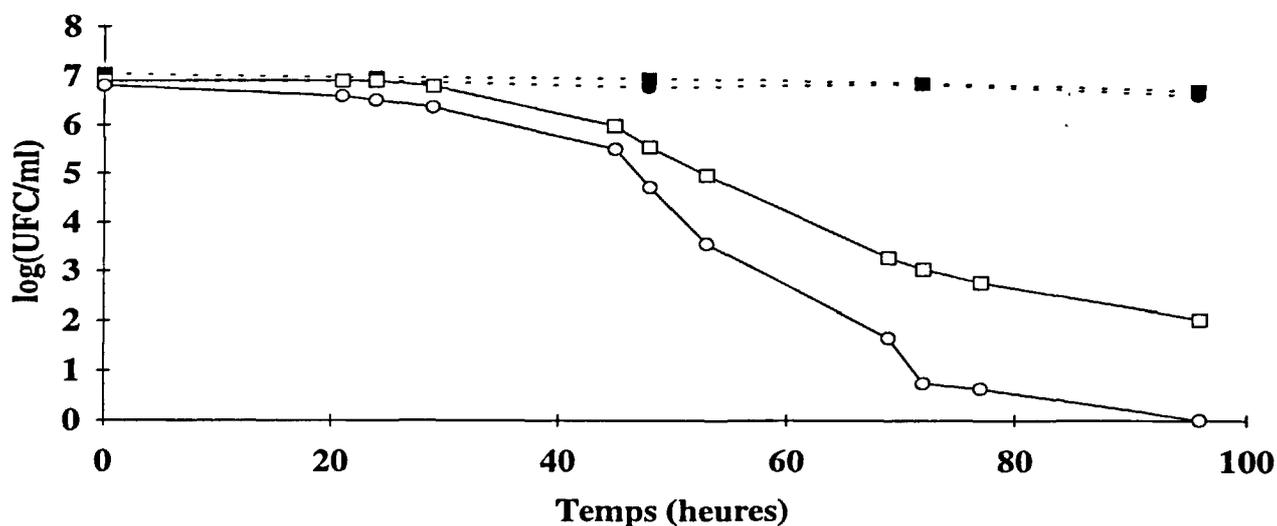


Figure 11 : Effet de la mutation *katE* (catalase HP11) et *katG* (catalase HP1) sur la sensibilité à la lumière visible de *E. coli* en début de phase stationnaire dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MG 1655 (□, ■), QC2404 mutant *katE katG* (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

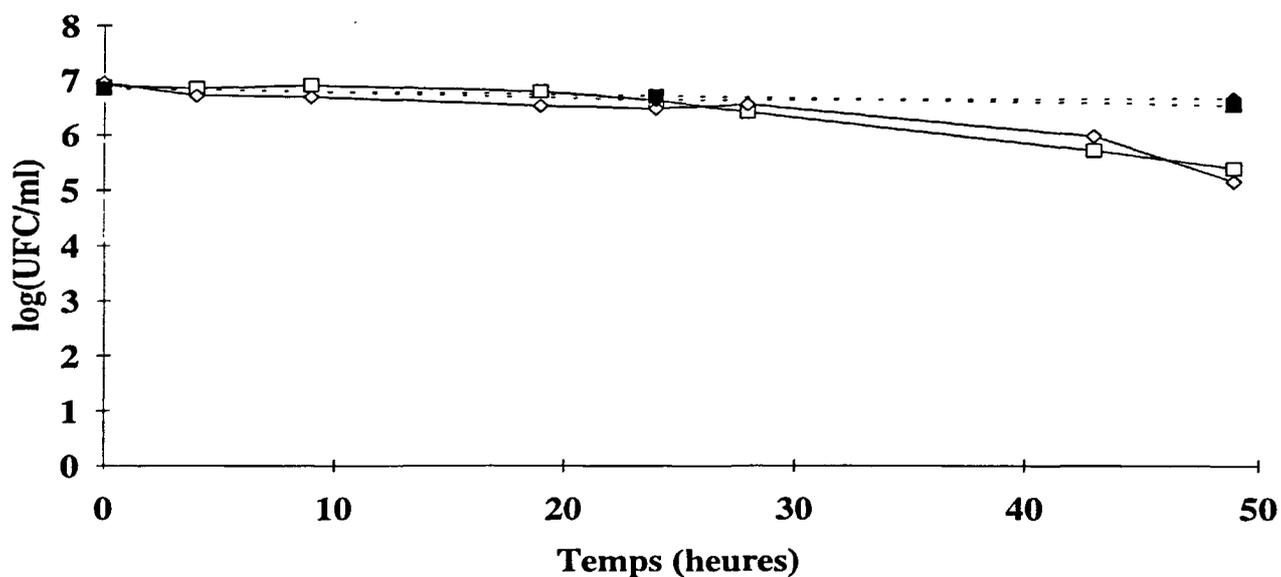


Figure 12 : Effet de la mutation *xthA* (exonucléase III) sur la sensibilité à la lumière visible de *E. coli* dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). BW 35 (□, ■), BW 295 mutant *xthA* (◇, ◆) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

La perte de cultivabilité lors de l'exposition à la lumière visible de la souche témoin (BW 35) et celle de la souche déficiente en exonucléase III (*xthA* ; BW 295) ne diffèrent pas (fig. 12). La sensibilité de la souche *katF* ne semble pas être due à l'absence d'expression du gène *xthA*.

La sensibilité du mutant *katF* est due en partie à l'absence de synthèse de la protéine Dps. En effet, la suppression du gène *dps* rend la bactérie plus sensible à l'illumination dans l'eau de mer (fig. 13) : la perte de cultivabilité à la lumière visible est plus importante pour la souche déficiente en protéine Dps (QC2408) que pour la souche parentale (MG1655).

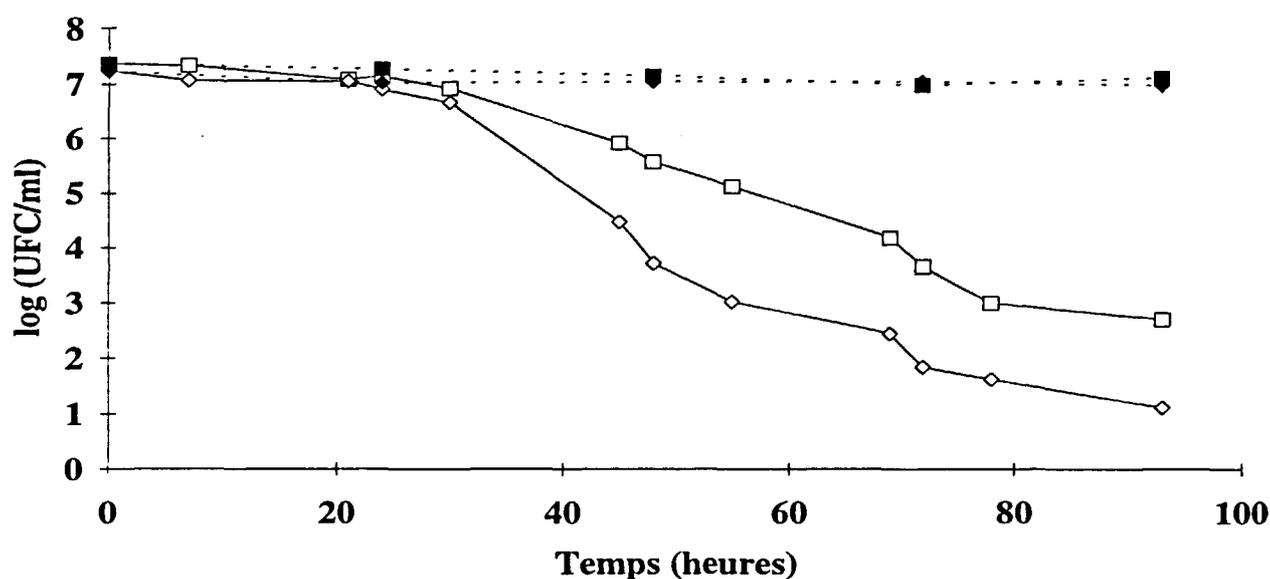


Figure 13 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau de mer de *E. coli* déficiente en protéine Dps. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MG1655 (□, ■), QC 2408 mutant *dps* (◇, ◆) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

La souche déficiente pour le facteur KatF étant très sensible à la lumière visible (fig. 8) et cette sensibilité étant plus importante dans une eau de mer que dans une eau douce (fig. 20), nous avons voulu savoir si cette fragilité du mutant *katF* était due au fait qu'il était incapable de synthétiser du tréhalose, composé permettant à la bactérie de lutter contre le stress osmotique (Csonka, 1989) et contre le choc thermique (Hengge-Aronis *et al.*, 1991).

Nous avons donc immergé *E. coli otsA otsB* à la fois dans l'eau de mer et dans l'eau douce afin d'étudier si le tréhalose pourrait éventuellement avoir un effet protecteur vis à vis

de la phototoxicité indirectement par une action sur le stress osmotique ou directement sur le stress lumineux.

La perte de cultivabilité de *E. coli otsA otsB* (RO22) exposé à la lumière visible dans l'eau de mer ou dans l'eau douce est du même ordre que celle de la souche parentale MC4100 (fig. 14 et fig. 15). La sensibilité du mutant *katF* lors du stress lumineux n'est donc pas liée à l'absence des enzymes permettant la synthèse du tréhalose. Cependant, cette synthèse par la bactérie nécessite des nutriments ; aussi, la bactérie possédant le facteur KatF pouvait difficilement synthétiser du tréhalose dans l'eau de mer artificielle, en raison de son caractère oligotrophique.

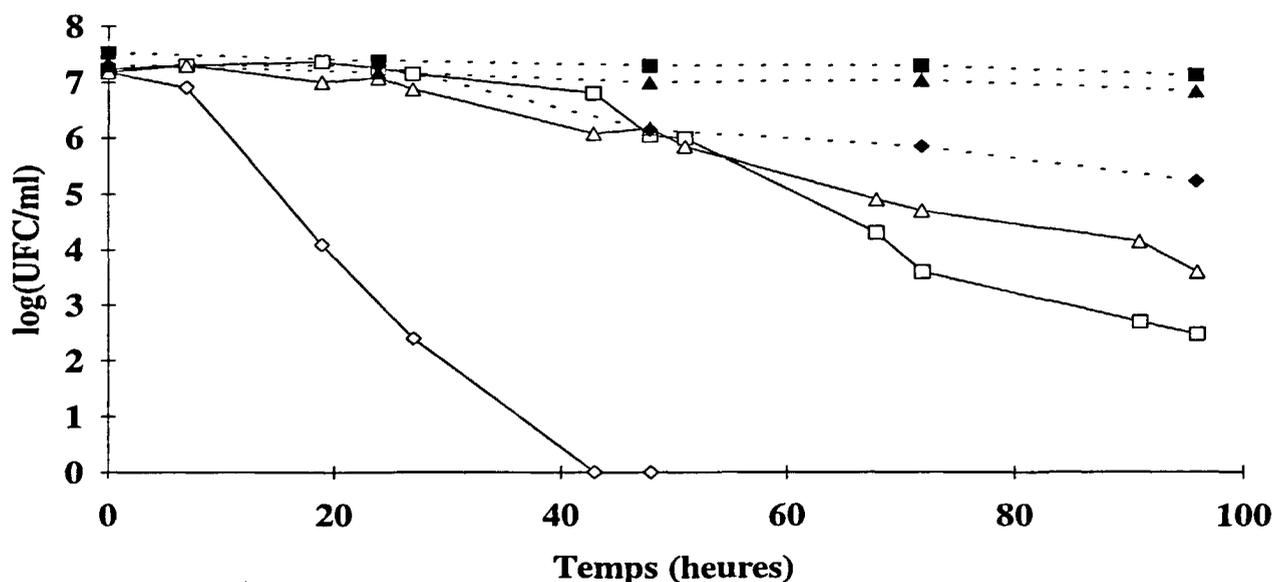


Figure 14 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau de mer de *E. coli* incapable de synthétiser du tréhalose. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MC4100 (□, ■), RH90 mutant *katF* (◇, ◆) et RO22 mutant *otsA otsB* (△, ▲) (intensité lumineuse : 900 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

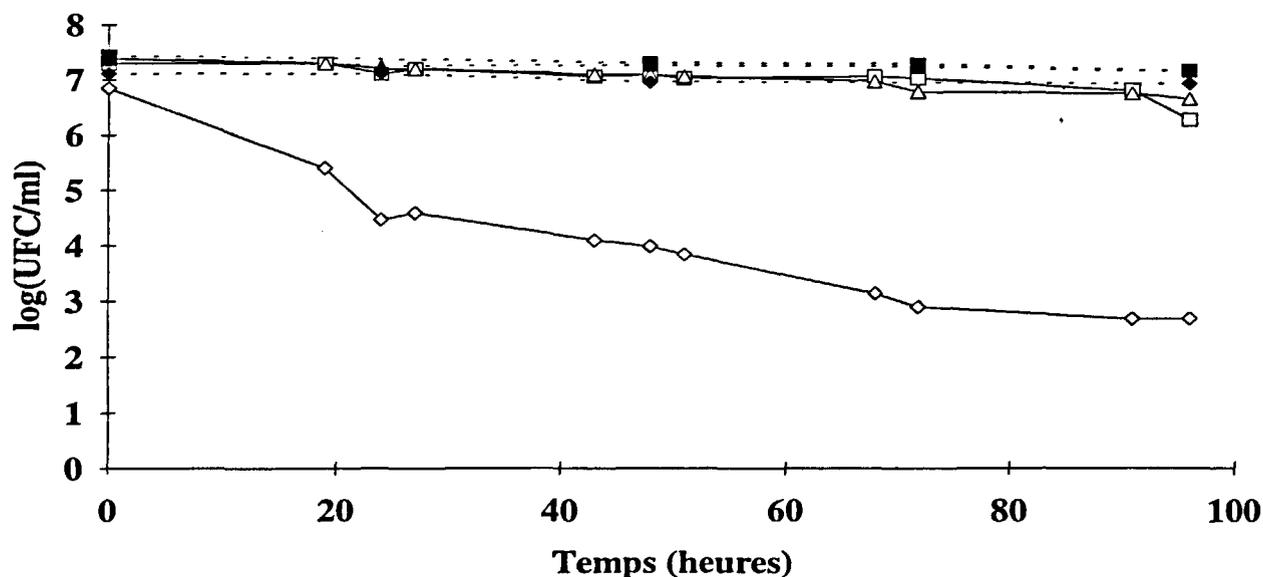


Figure 15 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau douce de *E. coli* incapable de synthétiser du tréhalose. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). MC4100 (□, ■), RH90 mutant *katF* (◇, ◆) et RO22 mutant *otsAotsB* (Δ, ▲) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

Ces résultats montrent que le facteur KatF est impliqué dans la défense de la bactérie entérique face au stress lumineux en milieu aquatique. Parmi les protéines régulées par ce facteur, étudiées car susceptibles de jouer un rôle primordial dans la résistance des cellules à divers stress (par exemple, à un stress oxydatif), les catalases, permettant de détruire le peroxyde d'hydrogène et la protéine Dps qui aurait plutôt un rôle préventif en se fixant de façon non spécifique à l'ADN et un rôle d'activation ou de répression de certains gènes (Almiron *et al.*, 1992), seraient impliquées dans la protection par le facteur KatF. En effet, la suppression des deux catalases ou de la protéine Dps conduit à une plus grande sensibilité des bactéries à l'effet de la lumière visible. Les autres protéines étudiées ne permettent pas d'expliquer comment agit le facteur KatF contre la phototoxicité. L'exonucléase III est connue pour réparer les dommages au niveau de l'ADN. Le tréhalose étant connu pour lutter contre les stress osmotique et thermique, les enzymes permettant sa synthèse auraient pu agir contre le stress lumineux en milieu salin.

Ces résultats suggèrent que le facteur KatF agirait par l'intermédiaire des catalases ou de la protéine Dps mais également d'autres protéines, connues ou non pour être sous la dépendance du gène *katF*. En effet, l'absence des catalases ou de la protéine Dps rend les bactéries beaucoup moins sensibles à la lumière visible que l'absence du facteur KatF (fig. 8 et fig. 11). D'autre part, d'autres systèmes, non KatF-dépendant peuvent protéger également la bactérie de l'exposition à la lumière visible.

Par exemple, Nyström et Neidhart (1994) ont découvert une protéine UspA (universal stress protein) chez *E. coli* induite lors de l'entrée de la cellule en phase stationnaire dont la synthèse est indépendante de KatF ; cette protéine aurait une fonction protectrice non spécifique contre divers stress. D'autres protéines KatF-indépendantes sont synthétisées pendant la phase stationnaire (Slp, starvation lipoprotein, codée par le gène *slp* ; Alexander et St John, 1994 ou SspA et SspB codées par les gènes *sspA* et *sspB* respectivement ; Williams *et al.*, 1994).

En plus de l'état physiologique de la bactérie lorsqu'elle est soumise au stress lumineux, le milieu (eau de mer) dans lequel elle est immergée interviendrait pour limiter sa survie lors de l'exposition à la lumière visible. En effet, ce milieu est très pauvre en nutriments facilement assimilables par les bactéries (stress oligotrophique) et très riche en sels (stress osmotique).

II-2 Stress oligotrophique

II-2-1 APPORT DE MILIEU RICHE DANS L'EAU DE MER

Lorsque *E. coli* est exposé à la lumière visible dans une eau de mer artificielle ou naturelle stérile très pauvre en matière organique (Carbone Organique Dissous (COD) = 2,5 mg.l⁻¹ pour l'eau naturelle), il est très sensible à l'illumination (fig. 6).

Dans un premier temps, nous avons suivi la survie de *E. coli* lors de l'exposition à la lumière visible en présence d'une très faible quantité de milieu riche (milieu LB), facilement assimilable par la bactérie dans l'eau de mer.

L'apport de milieu LB à faible concentration (1 % en concentration finale) permet de protéger de façon significative ($p < 0,05$) les bactéries de l'effet de la lumière visible (fig. 16).

La survie des bactéries immergées dans l'eau de mer à l'obscurité est également améliorée de façon significative ($p < 0,05$) lors de l'addition de nutriments (fig. 16). Des résultats identiques (non reportés) sont obtenus en utilisant un autre type de milieu riche (trypticase soja). Le bouillon trypticase soja contient des oligo-éléments, des facteurs de croissance, des glucides, des acides aminés, éventuellement des substances osmoprotectrices (Ghoul *et al.*, 1990) et des donneurs ou accepteurs d'électrons qui peuvent stimuler la respiration.

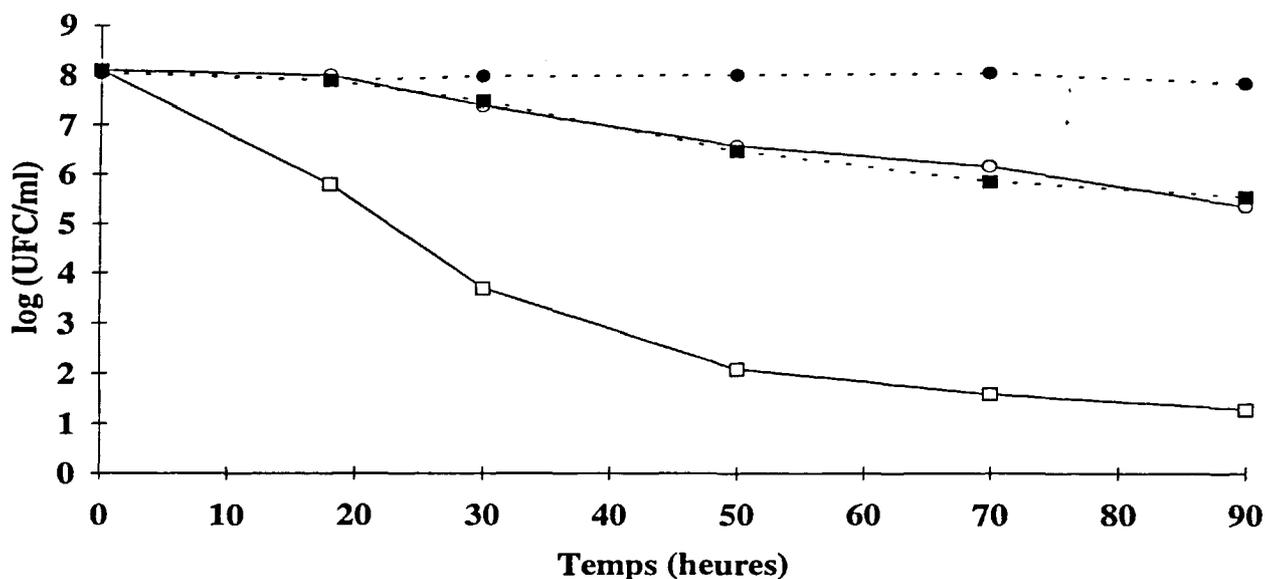


Figure 16 : Effet de l'apport de nutriments sur la survie de *E. coli* H10407 exposé à la lumière visible dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apport (□, ■), avec apport de milieu LB à 1 % (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

Les nutriments pourraient diminuer la toxicité (en piégeant les espèces toxiques formées), augmenter la protection (par la mise en place de système de défense par la bactérie) ou diminuer la formation de ces espèces toxiques en évitant, par exemple, l'accumulation de photosensibilisateurs générateurs de dérivés oxygénés toxiques lors de l'exposition à la lumière visible.

II-2-2 APPORT DE MILIEU MINIMUM M63 ET DE GLUCOSE

Afin de comprendre ce qui conférait la protection apportée par le milieu riche, nous avons additionné des sels minéraux et du glucose (milieu minimum) dans l'eau de mer contenant une bactérie témoin (MP180) et une bactérie mutée pour le gène *katF* (UM122). Ces bactéries sont en début de phase stationnaire lors de leur immersion dans l'eau de mer. Sans apport de nutriments, les bactéries *katF* perdent rapidement leur capacité à cultiver lors de l'exposition à la lumière visible contrairement aux bactéries possédant le facteur KatF : temps de latence de moins de 10 heures pour *E. coli katF* et plus de 24 heures pour la souche parentale (fig. 17).

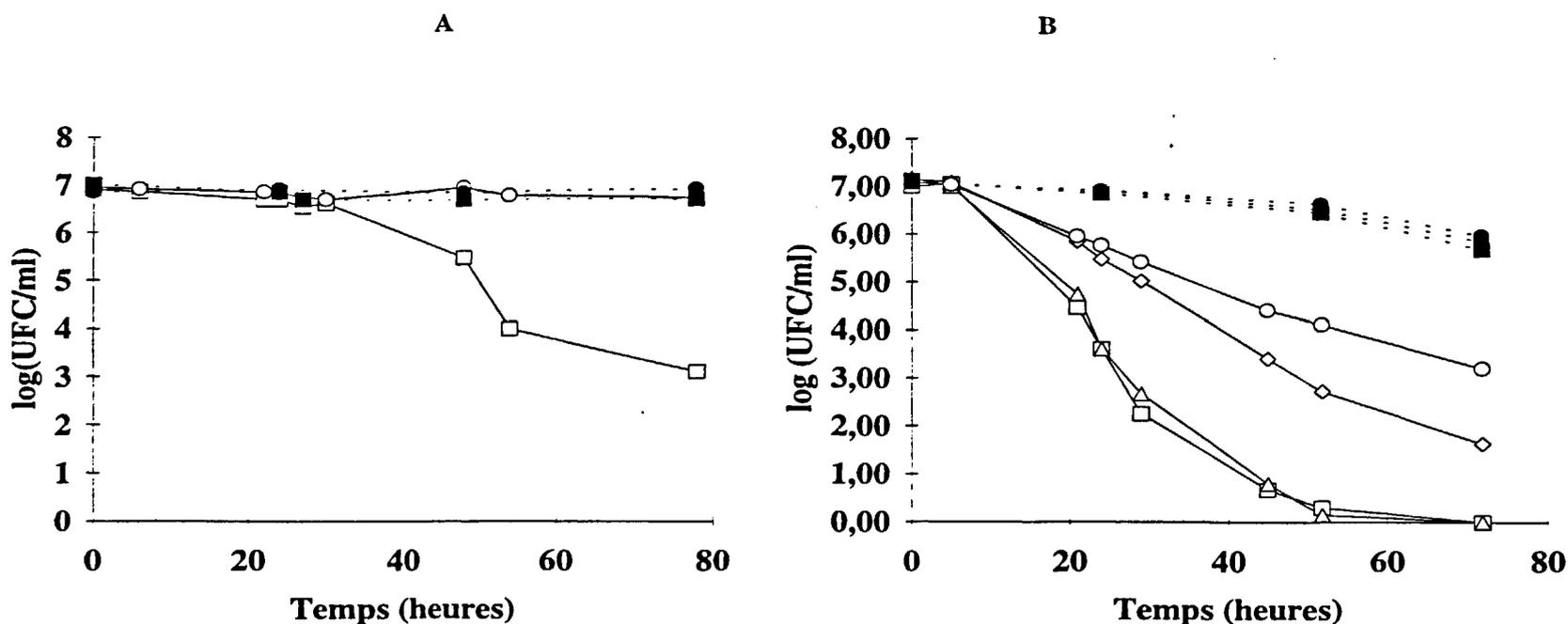


Figure 17 : Effet de l'apport de nutriments sur la survie en mer de *E. coli* MP180 (A) et *E. coli* UM122 mutant *katF* (B) exposés à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (trait pointillés et sigles pleins). Sans apports (□, ■) ; M63 à 1 % (Δ, ▲) ; glucose 18 mg.l⁻¹ (◇, ◆) ; M63 à 1 % + glucose 18 mg.l⁻¹ (○, ●) (intensité lumineuse : 900 μE.m⁻².s⁻¹ environ).

L'addition de glucose (18 mg.l⁻¹) ou de milieu M63 avec glucose à 1 % permet une bonne protection aussi bien pour la bactérie témoin (MP180) que pour la bactérie mutée pour le gène *katF* (UM122), la diminution du nombre de bactéries cultivables étant significativement plus faible ($p < 0,05$) dans ce cas (fig. 17). L'addition de milieu M63 avec glucose à 1 % permet de maintenir le nombre d'UFC des bactéries possédant le facteur KatF (soit une perte de moins d'1 U log au lieu de 3,5 U log sans apport de nutriments). Il permet de ralentir la perte d'UFC de bactéries mutées *katF* (soit de 3,5 U log au lieu de 7 U log sans apport de nutriments). Lors de ces expériences, ces différents composés n'ont pas modifié de façon significative la survie des bactéries lors de l'incubation à l'obscurité.

L'apport de milieu M63 sans glucose (seulement des sels minéraux) au 1/100 ne permet pas de protéger la bactérie de l'effet de la lumière. La perte de cultivabilité lors de l'exposition à la lumière visible lors de l'ajout de milieu M63 est du même ordre que la perte de cultivabilité sans addition (fig. 17). Une source énergétique (glucose, par exemple) serait donc indispensable pour limiter la perte de cultivabilité à la lumière. Une autre hypothèse possible serait que le glucose pourrait piéger des composés toxiques éventuellement formés lors de l'illumination des bactéries.

Pour tenter de comprendre comment s'effectue la protection apportée par le milieu M63 avec glucose (1 % en concentration finale) contre l'effet toxique de la lumière visible, ce milieu a été apporté à la suspension bactérienne 24 et 48 heures après l'immersion des cellules dans l'eau de mer. Ceci devrait permettre de savoir si la lumière visible provoque des dommages immédiats corrigibles ou non par l'apport de nutriments.

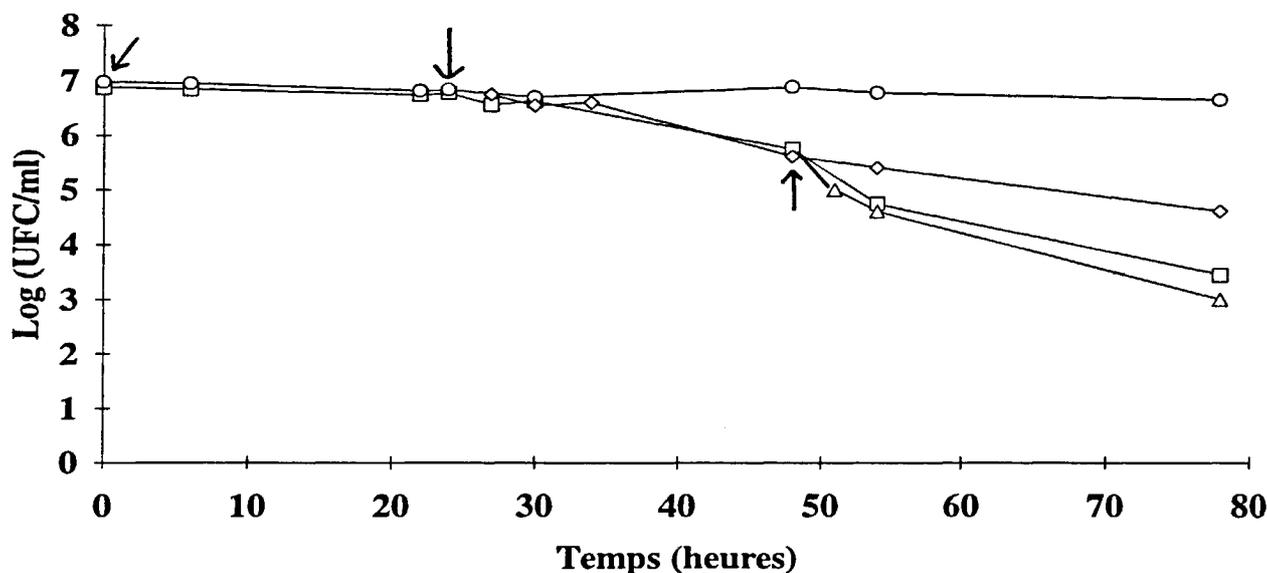


Figure 18 : Effet de l'apport de nutriments (milieu M63 glucosé à la concentration de 1%) à différents temps sur la survie de *E. coli* MP180 dans l'eau de mer exposé à la lumière visible. Sans apports (□) ; apport de M63 à 1 % + 18 mg.l⁻¹ de glucose à T0 h (○) ; apport à T24 h (◇) et apport à T48 h (△) (intensité lumineuse : 900 μE.m⁻².s⁻¹ environ).

La perte de cultivabilité de *E. coli* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer est d'autant plus importante que l'apport de milieu M63 avec glucose dans l'eau de mer est retardé. Les bactéries devenues non cultivables par exposition à la lumière visible ne semblent plus capables de récupérer leur capacité à cultiver quand des nutriments (M63 + glucose 18 mg.l⁻¹) sont apportés à la suspension bactérienne après 48 heures (fig. 18). De plus, même si l'apport de nutriments a lieu alors que la perte de cultivabilité est négligeable (24 heures d'exposition à la lumière visible), la survie au stress lumineux est beaucoup moins bonne que lors d'un apport dès le début de l'illumination (fig. 18) : après 70 heures d'exposition, il existe une différence de 2 U log de bactéries cultivables entre les échantillons avec le milieu M63 glucosé apporté dès le T0 et ceux avec le même milieu apporté après 24 heures. La lumière visible conduit donc à des dommages cellulaires non totalement réparés par l'apport retardé de nutriments à la concentration utilisée dans nos expériences. De faibles quantités de nutriments (M63 + glucose 18 mg.l⁻¹) ne permettent pas de récupérer la capacité à cultiver sur milieu solide après exposition à la lumière visible.

L'apport immédiat de nutriments permettrait à la bactérie de s'adapter au changement de milieu (de riche : milieu de culture à pauvre : eau de mer) et au stress lumineux.

Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'effet protecteur des composés apportés dans l'eau de mer par le milieu riche ou le milieu minimum glucosé :

- les composés additionnés pourraient éventuellement piéger les espèces oxygénées réactives présentes dans l'eau de mer lors de l'exposition à la lumière. Par exemple, de nombreuses molécules peuvent piéger le radical hydroxyle qui est très réactif (Haliwell et Gutteridge, 1989).

- les nutriments, par l'intermédiaire des osmoprotecteurs tels que la glycine bêtaïne par exemple, éventuellement présents dans le milieu riche, pourraient contrer le stress osmotique, ce qui permettrait à la bactérie de mieux supporter l'exposition à la lumière qui constitue un stress supplémentaire.

- l'ajout de nutriments pourrait permettre aux bactéries de se protéger en synthétisant des protéines éliminant les espèces toxiques telles que la SOD ou la catalase par exemple, ou de réparer les dommages cellulaires induits par l'exposition à la lumière visible.

- le glucose en tant que donneur d'électrons permettrait l'énergétisation de la membrane.

- les nutriments pourraient éviter la formation des espèces toxiques en permettant une meilleure activité métabolique de la cellule.

Les bactéries placées à la lumière visible dans l'eau de mer doivent supporter un autre stress : le choc osmotique.

II-3 Stress osmotique

En effet, les bactéries avant d'être immergées dans l'eau de mer se sont développées dans un milieu riche tamponné à basse osmolarité (Luria Bertani ou trypticase soja). Une fois dans l'eau de mer, elles se retrouvent dans un milieu avec une haute osmolarité.

II-3-1 ETUDE AVEC DIFFERENTES SALINITES

Comme la lumière visible diminue le nombre de bactéries cultivables dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité, nous avons étudié son action dans des eaux de mer diluées : eau de mer estuarienne (20 ‰ de salinité) ou eau à 10 ‰ de salinité. Ceci afin de savoir si le stress osmotique modifie la sensibilité à la lumière visible.

A l'obscurité, la survie des bactéries est améliorée lors d'une diminution de la salinité. Ceci est conforme aux différents résultats publiés (Munro *et al.*, 1989 ; Solic et Krstulovic, 1992).

Même dans une eau à 10 ‰ de salinité, la lumière provoque une plus grande perte de la capacité à cultiver des bactéries (fig. 19). Mais, la survie à la lumière est bien meilleure quand la salinité de l'eau de mer est moins élevée : la perte de cultivabilité à la lumière est plus faible dans une eau à 10 ‰ de salinité que dans une eau de mer à 20 ou 34 ‰ (fig. 19). La salinité potentialise l'action de la lumière visible sur les entérobactéries : après 48 heures d'exposition à la lumière visible, l'écart entre les UFC dans une eau à 34 ‰ de salinité et les UFC dans une eau à 10 ‰ est d'environ de 5 U log tandis qu'après 48 heures d'incubation à l'obscurité, il n'est que de 1 U log environ.

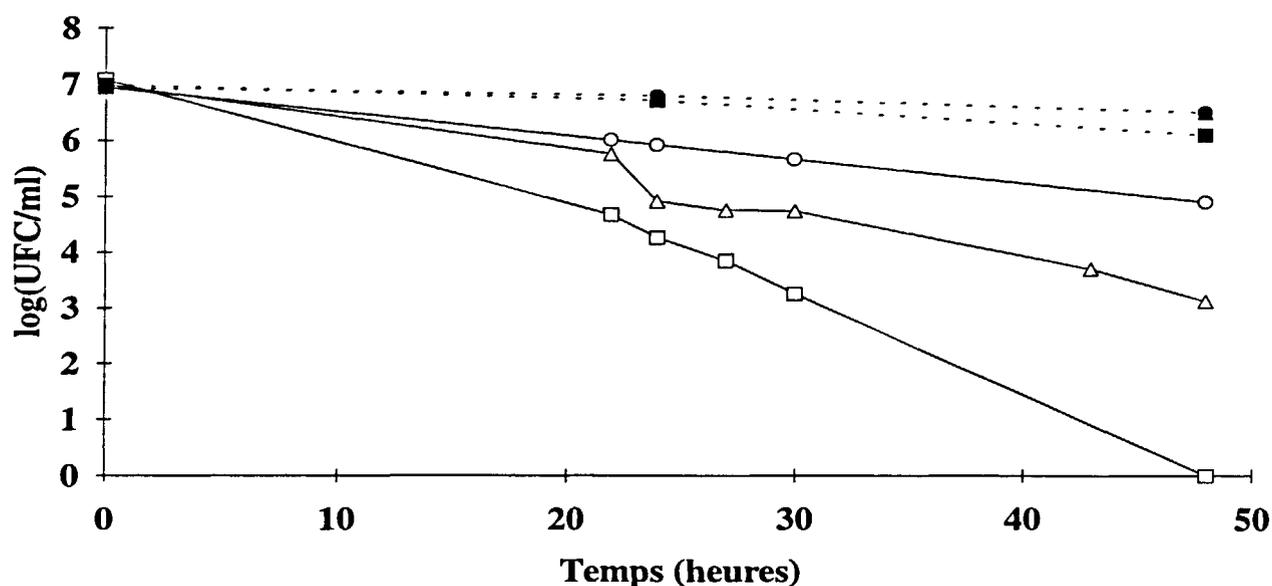


Figure 19 : Effet de la salinité de l'eau sur la survie de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Salinité de 34 ‰ (□, ■) ; salinité de 20 ‰ (Δ, ▲) ; salinité de 10 ‰ (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

II-3-2 COMPARAISON EAU DOUCE-EAU DE MER

II-3-2-1 Au niveau des numérations bactériennes

Au cours de nos expériences, l'effet toxique de la lumière est étudié sur *E. coli* en survie dans de l'eau de mer naturelle ou artificielle. Après dilution de l'eau de mer pour obtenir

des eaux de plus faible salinité, nous avons obtenu une meilleure survie des bactéries à l'effet néfaste de la lumière que dans une eau de mer à 34 ‰ de salinité.

En comparant la survie des bactéries exposées à la lumière dans l'eau de mer et dans l'eau douce, on obtient une perte de cultivabilité beaucoup plus importante en eau de mer qu'en eau douce aussi bien pour *E. coli* MC4100, souche parentale que pour *E. coli* RH90 *katF*, souche déficiente en KatF (fig. 20). De même, *E. coli* H10407 est moins sensible à l'effet de la lumière visible dans l'eau douce que dans l'eau de mer (résultats en annexe 3).

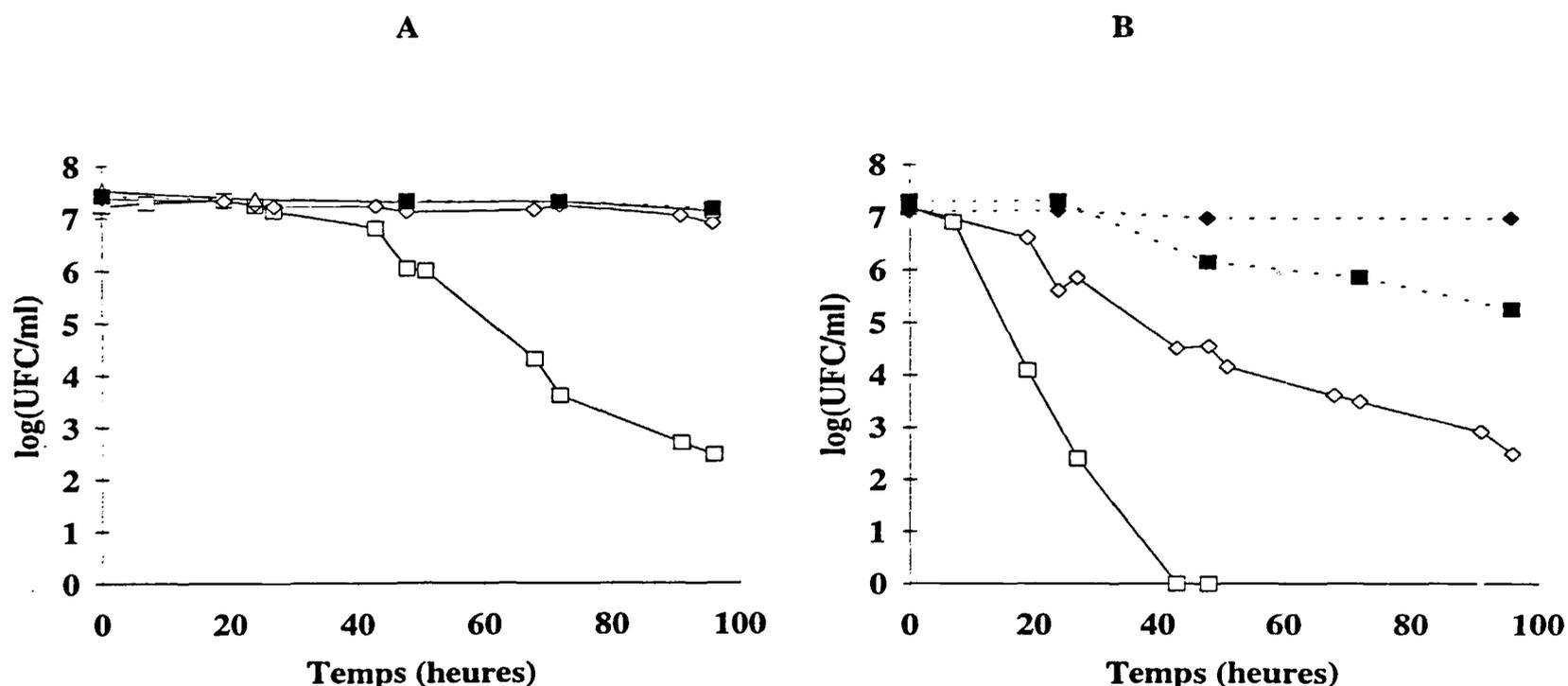


Figure 20 : Effet du milieu (eau de mer ou eau douce) sur la survie de *E. coli* MC4100 (A) et *E. coli* RH90 *katF* (B) exposés à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Eau de mer (□, ■); eau douce (◇, ◆) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

II-3-2-2 Au niveau de l'activité métabolique en utilisant la ^3H méthyl-thymidine

Au cours du DEA (Gourmelon, 1991), nous avons étudié l'effet du milieu (eau de mer ou eau douce) sur les bactéries en incubant celles-ci avec la ^3H méthyl-thymidine dès leur mise en suspension dans l'eau de mer ou dans l'eau douce. L'activité métabolique bactérienne était évaluée sur la base de l'incorporation de la ^3H méthyl-thymidine dans les bactéries, le marquage au tritium de l'ADN et des protéines néosynthétisés.

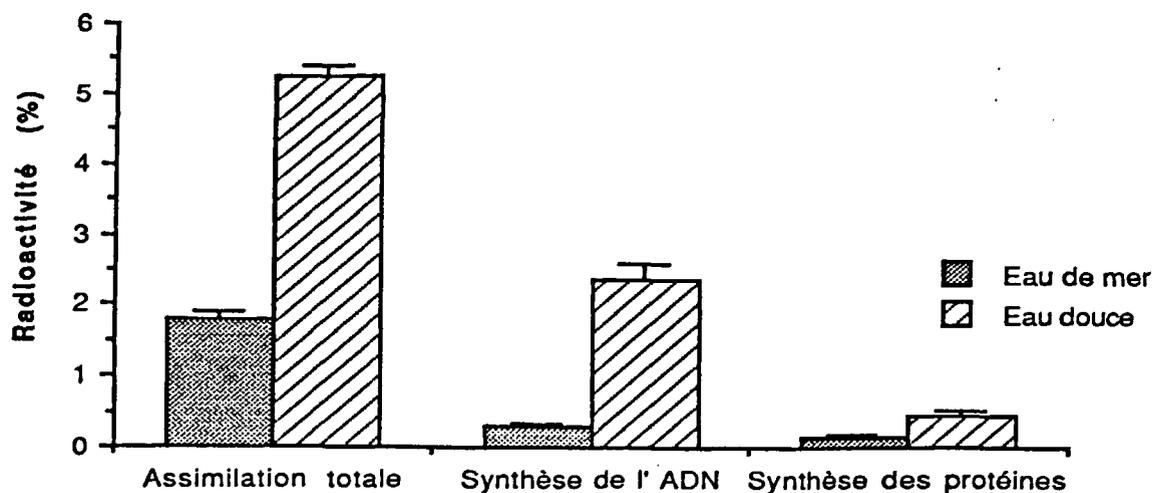


Figure 21 : Effet du milieu (eau de mer et eau douce) sur l'assimilation totale de ^3H méthyl-thymidine, la synthèse d'ADN et la synthèse de protéines. Les résultats sont exprimés en % de radioactivité (désintégrations.mn⁻¹) retrouvée dans 3 compartiments (bactéries totales, ADN et protéines) par rapport à la radioactivité de la ^3H méthyl-thymidine apportée initialement. Chaque valeur représente la moyenne de 4 essais \pm 1 écart-type. D'après Gourmelon (1991).

Même après un séjour très court dans l'eau (inférieur à une heure), l'assimilation totale de la ^3H méthyl-thymidine chez *E. coli* H10407 reste plus élevée dans l'eau douce que dans l'eau de mer (fig. 21). De même, un taux plus faible d'ADN et de protéines néosynthétisés est observé dans l'eau de mer par rapport à l'eau douce (fig. 21).

L'eau de mer aurait donc une action immédiate et inhibitrice sur le transport de ^3H méthyl-thymidine dans *E. coli* H10407 et sur la synthèse de macromolécules (ADN et protéines).

L'effet de l'eau de mer sur la capacité à cultiver ou sur le métabolisme des bactéries entériques a également été mis en évidence par d'autres équipes travaillant *in situ* (Fujioka *et al.*, 1981) ou *in vitro* (Barcina *et al.*, 1990). Ainsi, Barcina *et al.* (1990) utilisant du ^{14}C glucose ont montré que l'assimilation de ce composé par *E. coli* est environ 20 fois plus importante dans l'eau douce que dans l'eau de mer. De plus, une diminution de l'efficacité de systèmes de transport actif de glucides ou d'acides aminés, dans l'eau de mer, a été également mis en évidence par Gauthier *et al.* (1992a).

L'effet du choc osmotique, présent en eau de mer, en modifiant la membrane bactérienne, serait responsable de la diminution de l'incorporation de la ^3H méthyl-thymidine (par transport actif) dans les bactéries plus importante dans cette eau que dans l'eau douce.

II-3-3 APPORT D'OSMOPROTECTEURS TELS QUE LA GLYCINE BETAÏNE (1mM)

La survie à la lumière visible de *E. coli* est plus faible en milieu marin qu'en eau douce. Aussi, nous avons voulu savoir si l'apport de glycine bêtaïne (GB) permettrait de limiter la perte de cultivabilité dans l'eau de mer illuminée en agissant contre la haute teneur en sels de ce milieu. En effet, la glycine bêtaïne est connue pour ses propriétés osmoprotectrices (Le Rudulier et Brouillard, 1983 ; Perroud et Le Rudulier, 1985).

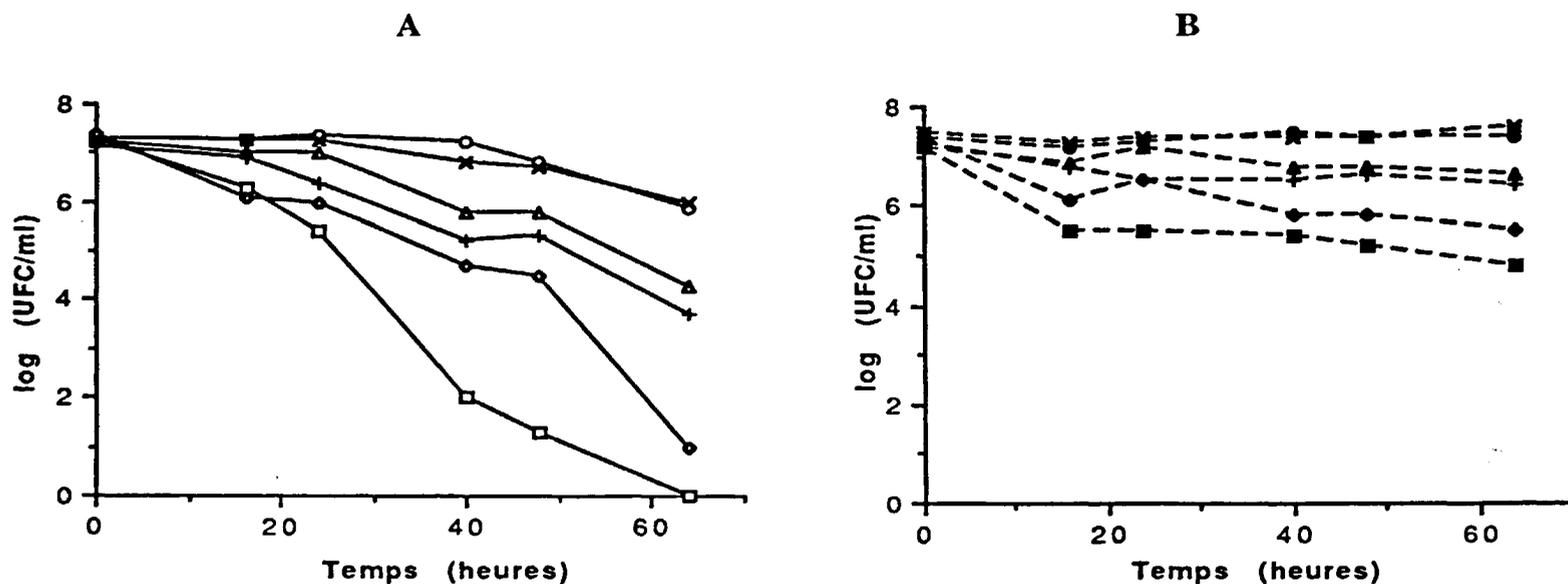


Figure 22 : Effet de l'apport de glycine bêtaïne sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible (A) ou incubé à l'obscurité (B). Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports de nutriments ou d'osmoprotecteurs (□, ■), milieu minimum M63 au 1/1 000 + glucose 1,8 mg^l⁻¹ (◇, ◆), M63 au 1/1 000 + glucose 1,8 mg^l⁻¹ + glycine bêtaïne (GB) 1 mM (+, +), M63 au 1/100 + glucose 18 mg^l⁻¹ (Δ, ▲), M63 au 1/100 + glucose 18 mg^l⁻¹ + GB 1 mM (○, ●), milieu riche (BTS) au 1/100 (x, x) (intensité lumineuse : 500 μE.m⁻².s⁻¹ environ). D'après Gourmelon (1991).

L'apport de milieu minimum est indispensable à la bactérie pour assimiler la glycine bêtaïne. Le transport de la GB est, en effet, un processus actif nécessitant de l'énergie (Ghoul *et al.*, 1990). Les bactéries sont placées 16 h à l'obscurité dans l'eau de mer avant d'être exposées à la lumière. Ceci pour leur permettre d'assimiler les nutriments ou les osmoprotecteurs avant de subir le stress lumineux.

L'apport de glycine bêtaïne à la concentration de 1mM dans l'eau de mer en présence d'une très faible quantité de nutriments permet à la bactérie de mieux supporter le stress

lumineux. En effet, dans ce cas, la bactérie conserve plus longtemps sa capacité à cultiver sur milieu gélosé (fig. 22). Cependant, la pré-incubation de 16 heures à l'obscurité dans l'eau de mer permet peut-être également d'améliorer la survie des bactéries ensuite lors de l'exposition à la lumière visible (cf. II-4 étude de la pré-incubation à l'obscurité avant exposition à la lumière visible).

II-3-4 ACCUMULATION D'OSMOPROTECTEURS LORS D'APPORT DE NUTRIMENTS (RECHERCHE PAR RMN ^1H ET ^{13}C)

L'entérobactérie immergée dans l'eau de mer et exposée à la lumière visible perd progressivement sa capacité à former des colonies. Cependant, l'apport de milieu riche lui permet de limiter ce phénomène (cf. II-2 stress oligotrophique).

Devant ces résultats, après un séjour des bactéries dans l'eau de mer en présence de lumière visible ou non, des nutriments en quantité importante (milieu riche à 10 %) ont été apportés aux suspensions bactériennes. Le but de ces expériences était de déterminer les composés que la bactérie pourrait accumuler ou synthétiser grâce aux nutriments pour lutter contre la phototoxicité. Pour cela, les bactéries sont récupérées en fin d'expérience et les molécules de petite taille (acides aminés, glucides, petits peptides ...), présentes dans les bactéries, non précipitées par le traitement à l'acide trichloro-acétique, sont analysées par spectroscopie RMN ^1H .

L'apport de milieu trypticase soja (à 10 %) a permis aussi bien aux bactéries illuminées qu'à celles placées à l'obscurité d'augmenter considérablement le nombre de bactéries cultivables (annexe 4 : fig. 50 et fig. 51). Cet accroissement du nombre d'UFC a lieu aussi bien dans le cas d'un *E. coli* possédant le facteur KatF, souche parentale (MP180) que d'un *E. coli katF* (UM122) (annexe 4 : fig. 50 et fig. 51).

L'ajout de milieu riche en concentration importante à une bactérie possédant le facteur KatF (MP180) dans l'eau de mer après 48 heures lui permet d'accumuler ou de synthétiser du tréhalose, de l'acide glutamique et de la glycine bêtaïne (aussi bien lors de l'exposition à la lumière visible que lors de l'incubation à l'obscurité) (fig. 23 et fig. 24). Le mutant *katF* (UM122) accumule ou synthétise, dans ces conditions, de la glycine bêtaïne ou de l'acide glutamique (fig. 27 et fig. 28). La mise en évidence du tréhalose uniquement dans la bactérie possédant le facteur KatF s'explique par le fait que le facteur KatF régule l'expression des gènes *otsA* et *otsB* permettant la synthèse de ce disaccharide par *E. coli* (Giaever *et al.*, 1988 ; Hengge-Aronis, 1991).

Ces molécules accumulées sont connues pour leur action protectrice contre le stress osmotique :

- tréhalose, disaccharide formé de 2 molécules de glucose (Csonka, 1989 ; Boos *et al.*, 1990),
- glycine bêtaïne (Le Rudulier et Brouillard, 1983 ; Perroud et Le Rudulier, 1985)
- acide glutamique (Measures, 1975).

Sans apports de nutriments, ces osmoprotecteurs ne sont pas mis en évidence dans les bactéries aussi bien après une exposition à la lumière qu'après une incubation à l'obscurité (annexe 4 : fig. 52 et fig. 53).

L'apport de glucose (à la concentration de $0,2 \text{ g.l}^{-1}$) protège moins bien les bactéries de la phototoxicité et de l'immersion dans l'eau de mer : le nombre d'UFC diminue lors de l'exposition à la lumière visible et se maintient ou diminue faiblement lors de l'incubation des bactéries à l'obscurité (annexe 4 : fig. 50 et fig. 51).

La résolution des pics observables sur les spectres RMN est moins bonne après un séjour dans l'eau de mer des bactéries en présence de glucose (à la concentration de $0,2 \text{ g.l}^{-1}$) qu'en présence de bouillon trypticase soja (à 10 %). En effet, le nombre de bactéries en fin d'expérience était plus faible dans le cas d'un apport de glucose que lors d'un apport de BTS à 10 %. Après un séjour dans l'eau de mer avec apport de glucose, les bactéries métabolisent ce composé et accumulent des osmoprotecteurs (acide glutamique ou tréhalose) seulement à l'obscurité (fig. 26 et fig. 30).

L'analyse des spectres obtenus montre que la bactérie n'accumule pas ou ne synthétise pas de composés spécifiques lors de l'exposition à la lumière visible (fig. 23 et fig. 24 ; fig. 27 et fig. 28).

Les cellules en présence de nutriments chercheraient donc d'abord à lutter contre le stress osmotique qui les rendrait plus sensibles à l'action des rayonnements visibles (meilleure survie des bactéries lors de l'exposition à la lumière visible dans l'eau douce que dans l'eau de mer (fig. 20)). Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus lors des pré-incubations de *E. coli* dans l'eau de mer à l'obscurité avant exposition à la lumière visible : meilleure survie dans le cas d'un séjour de 48 heures dans l'eau de mer avant illumination que lors d'une exposition immédiate (adaptation de la bactérie à l'eau de mer et meilleure résistance au stress lumineux ou adaptation générale au stress permettant à la bactérie ensuite de mieux supporter le second stress).

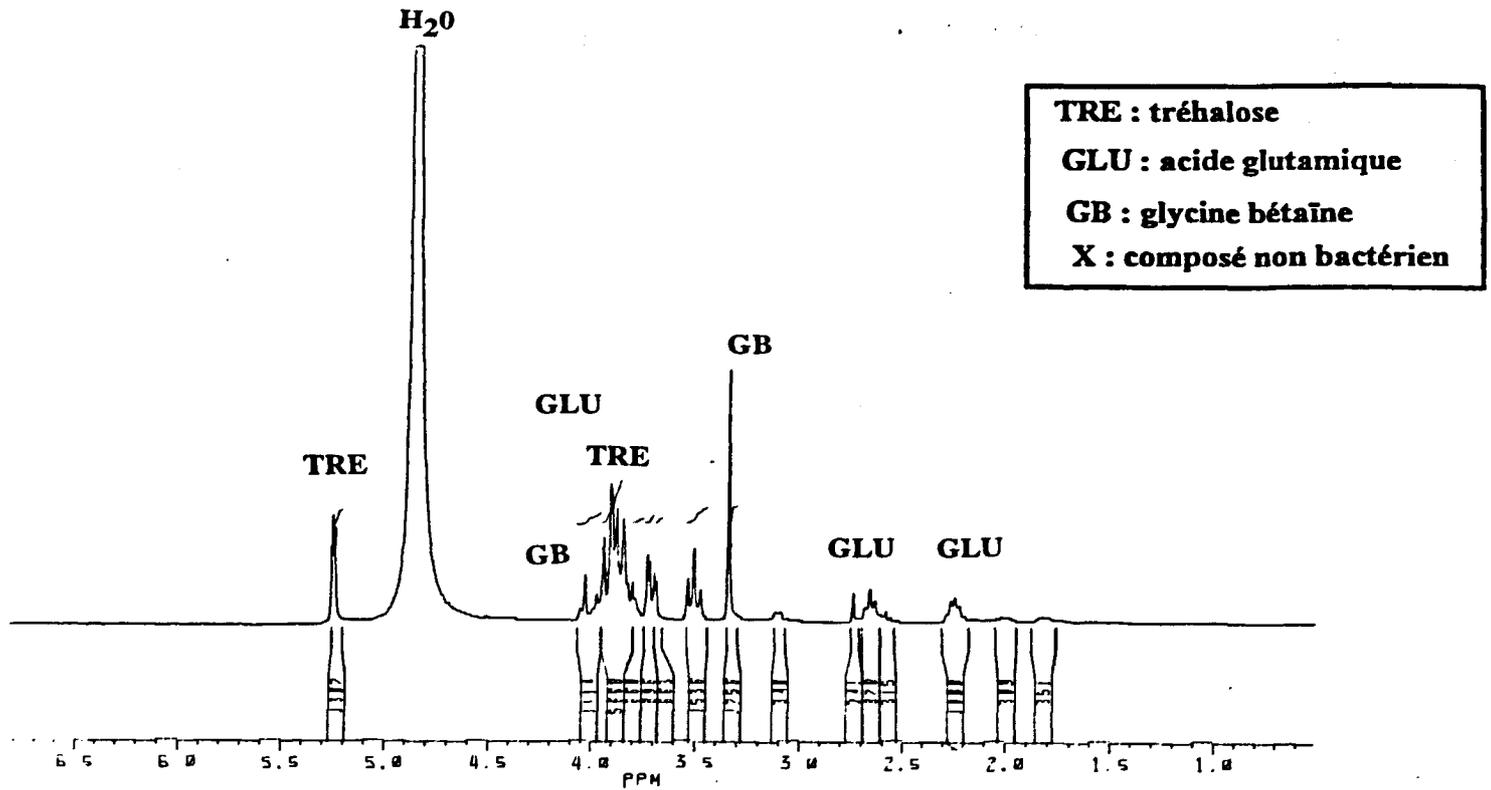


Figure 23 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 (possédant le facteur KatF) exposé à la lumière visible (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ) pendant 4 jours dans l'eau de mer avec apport de milieu trypticase soja (à 10 %) à 48 heures.

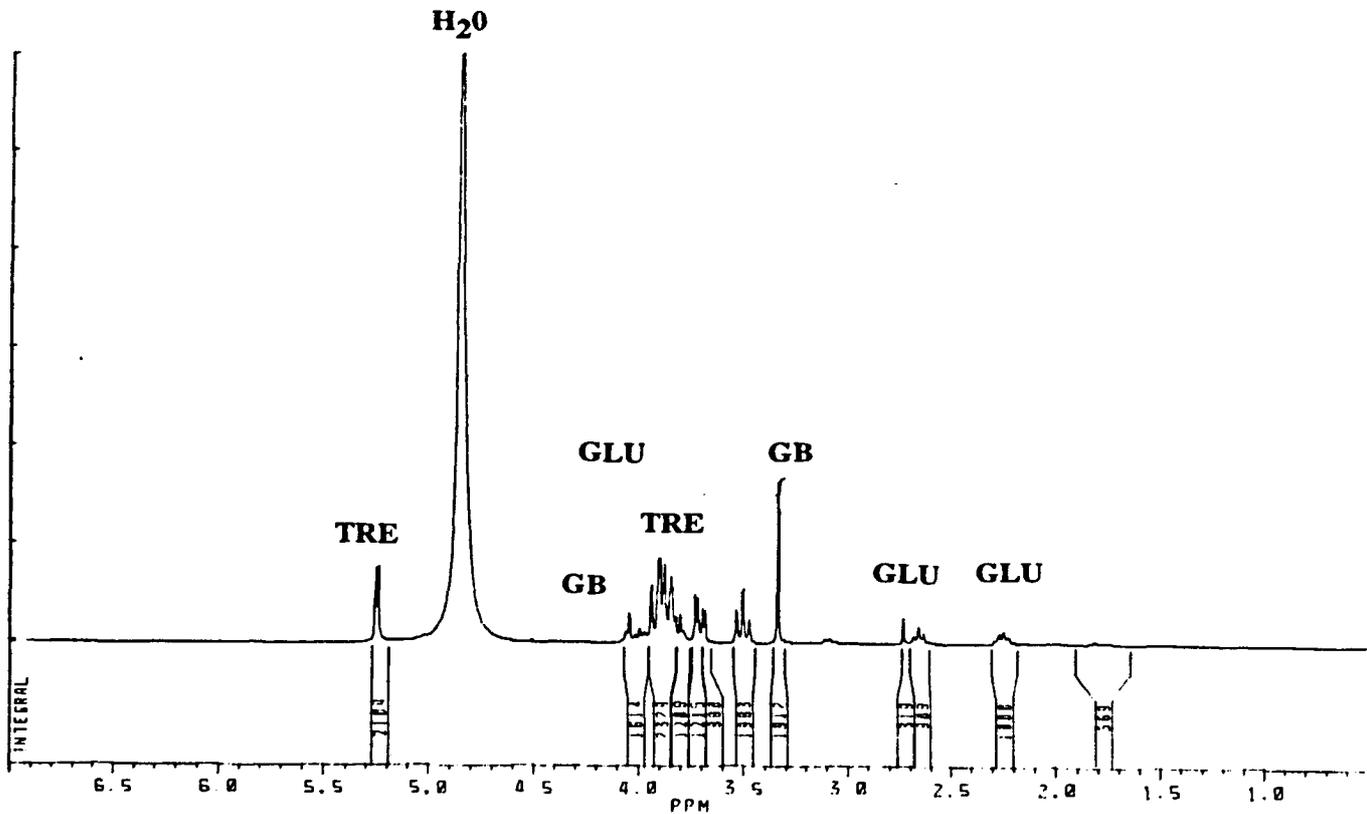


Figure 24 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 après 4 jours dans l'eau de mer à l'obscurité avec apport de milieu trypticase soja (à 10 %) à 48 heures.

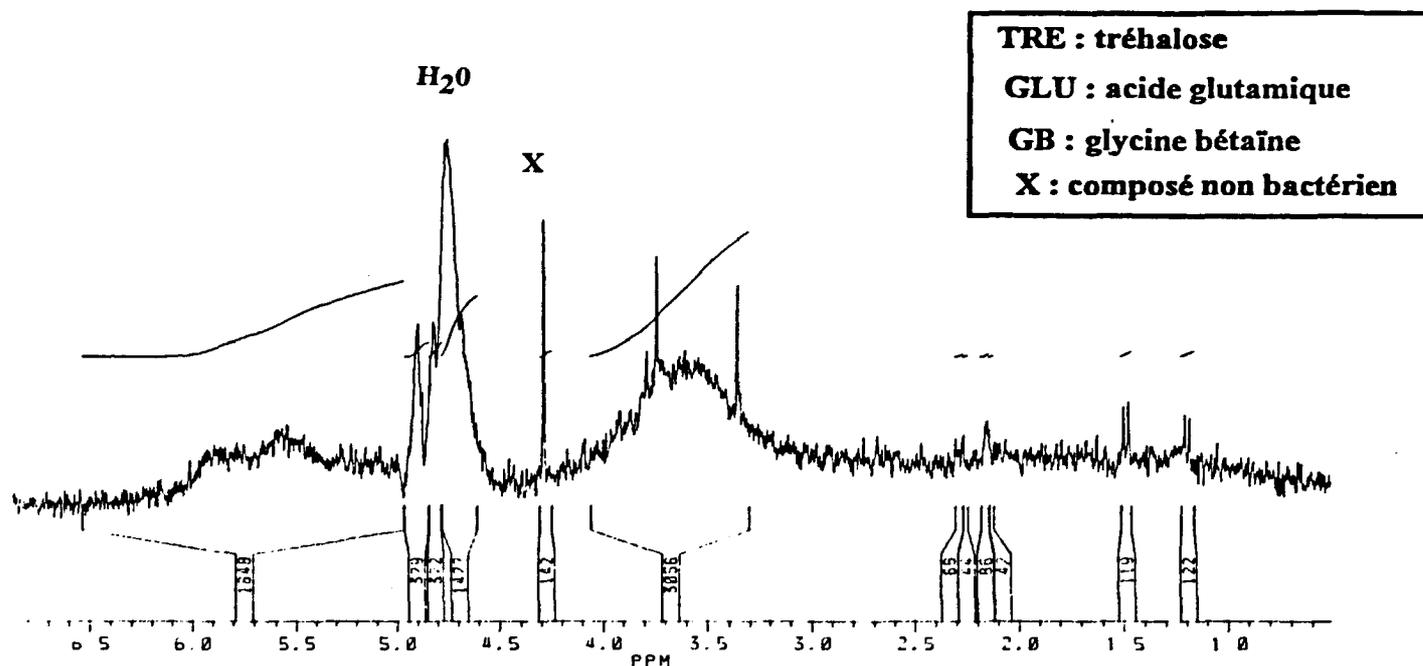


Figure 25 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *E. coli* MP180 exposé à la lumière visible (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ) pendant 4 jours dans l'eau de mer avec apport de glucose ($0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) à 48 heures.

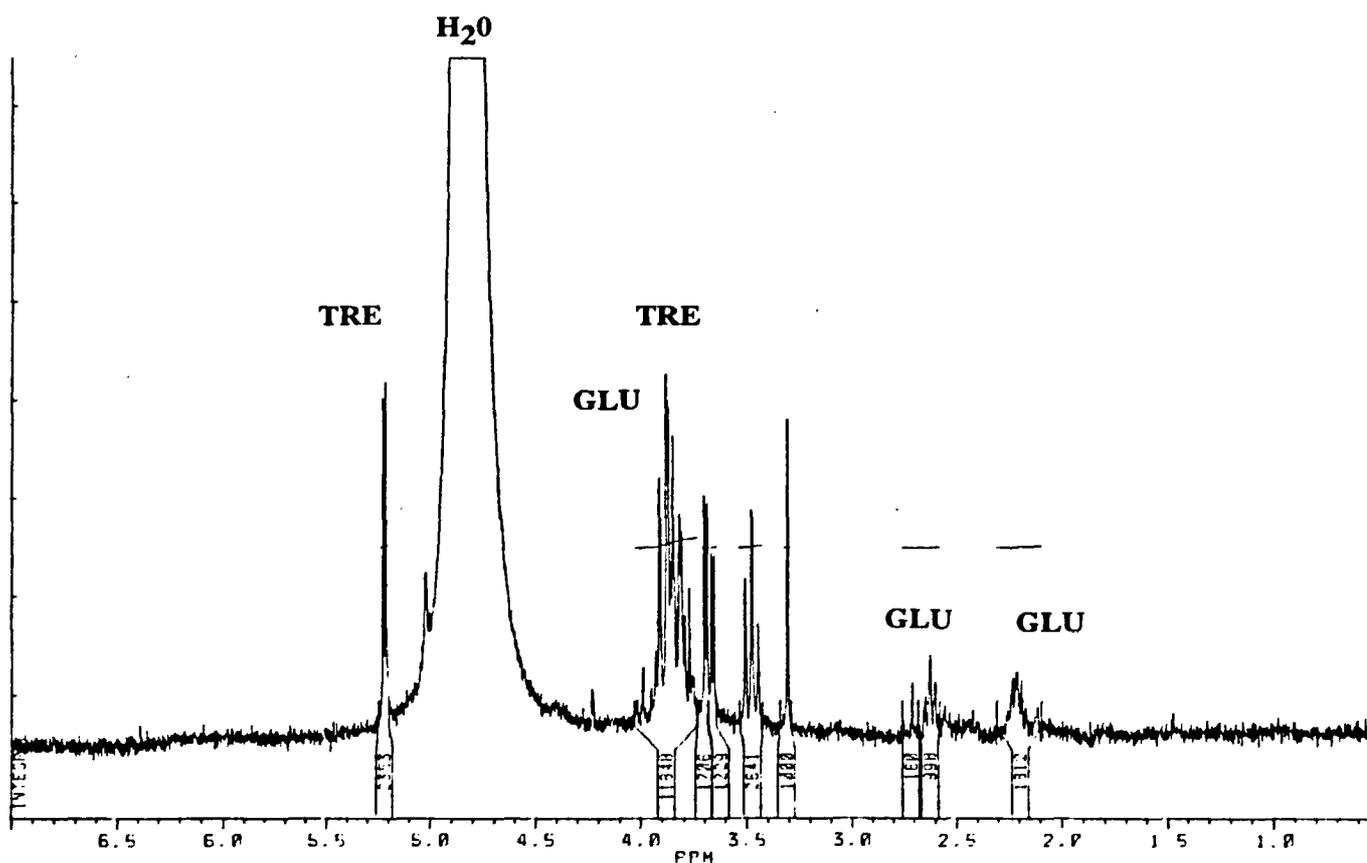


Figure 26 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *E. coli* MP180 après 4 jours dans l'eau de mer à l'obscurité avec apport de glucose ($0,2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) à 48 heures.

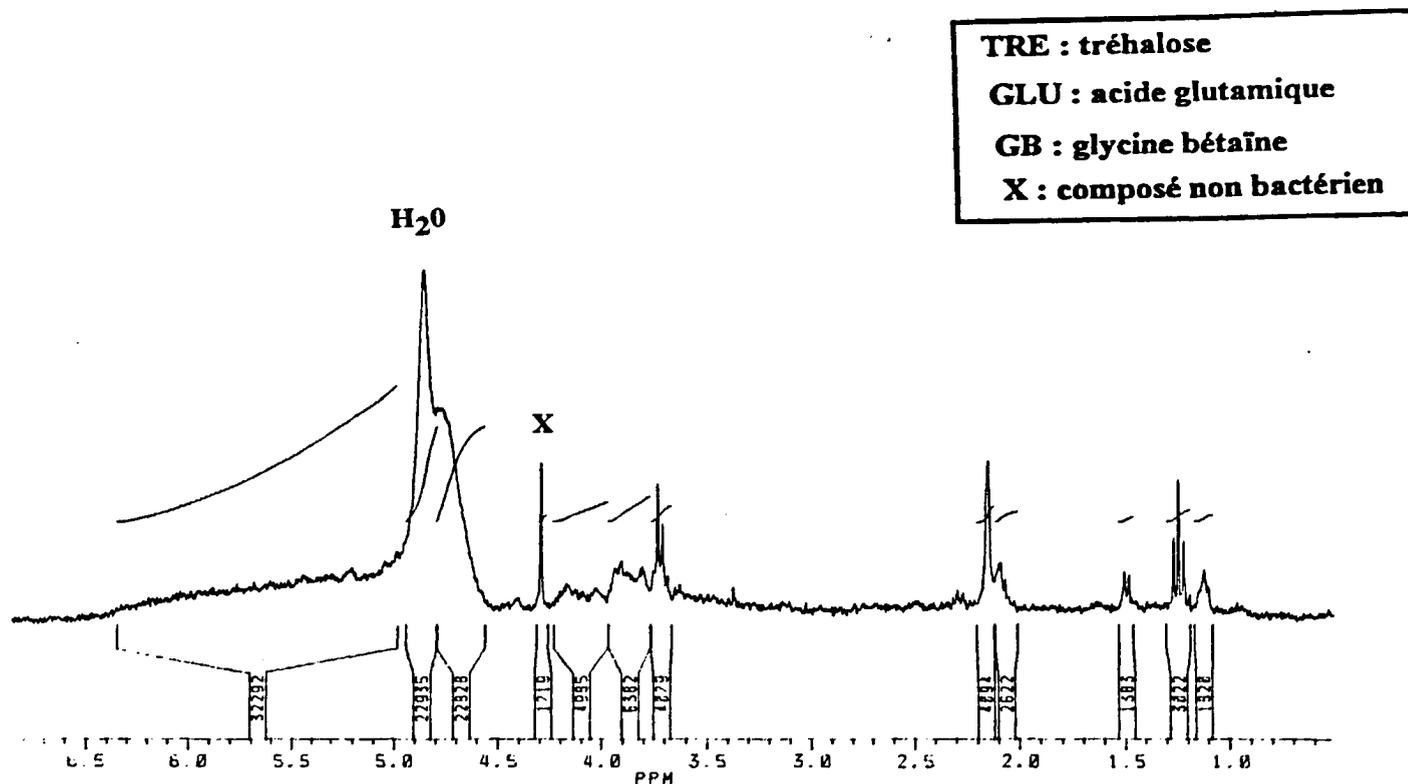


Figure 29 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible (intensité lumineuse : 900 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ) pendant 4 jours dans l'eau de mer avec apport de glucose (0,2 g.l⁻¹) à 24 heures.

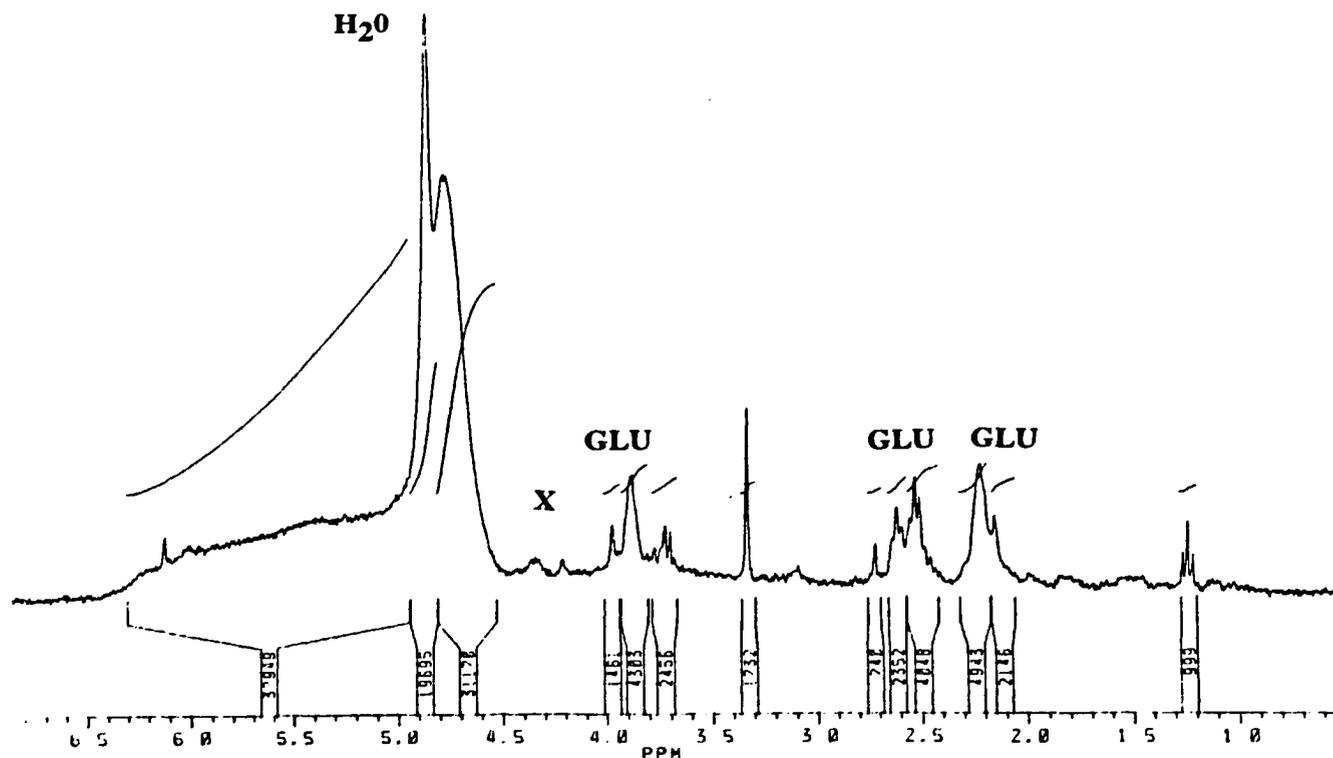


Figure 30 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *E. coli* UM122 *katF* après 4 jours dans l'eau de mer à l'obscurité avec apport de glucose (0,2 g.l⁻¹) à 24 heures.

Ces résultats montrent que *E. coli* ne semble pas synthétiser ou accumuler des composés de petit poids moléculaire en réponse au stress lumineux qui seraient mis en évidence spécifiquement lors de son exposition à la lumière visible. Cependant, la bactérie pourrait synthétiser, en présence de nutriments, des plus grosses molécules (non mises en évidence par cette technique RMN) telles que des protéines ayant une action protectrice face au stress lumineux.

II-4 Etude de la pré-incubation à l'obscurité avant exposition à la lumière visible

Comme nous l'avons vu précédemment, *E. coli* est très sensible à la lumière visible quand il est immergé dans l'eau de mer à une salinité de 34-35 ‰ et cette sensibilité dépend de son état physiologique avant exposition à la lumière visible (fig. 7). Aussi, nous avons voulu savoir si les trois stress : lumineux, oligotrophique et osmotique intervenaient ensemble pour limiter la survie des bactéries en mer. Pour cela, *E. coli* H10407 en phase exponentielle dans un milieu riche (après lavage à l'eau physiologique) est mis en suspension dans l'eau de mer à l'obscurité pendant un certain temps avant d'être exposé à la lumière visible.

Lorsque *E. coli* H10407 est immergé 24 ou mieux 48 heures à l'obscurité dans l'eau de mer avant d'être placé à la lumière, il survit mieux ensuite à l'effet toxique de la lumière visible (fig. 31). Il semblerait donc que la bactérie placée dans l'eau de mer s'y adapte et supporte ensuite mieux le stress lumineux.

Une meilleure survie de *E. coli* dans l'eau de mer, en absence de lumière, a été obtenue par un séjour préalable (de 24 heures) de cette bactérie dans des effluents de station d'épuration (Dupray *et al.*, sous presse). La meilleure résistance à l'eau de mer, dans ce cas, pourrait s'expliquer par une adaptation du métabolisme bactérien à des conditions stressantes : baisse de température, diminution des nutriments assimilables permettant ensuite à la bactérie de lutter contre le stress salin.

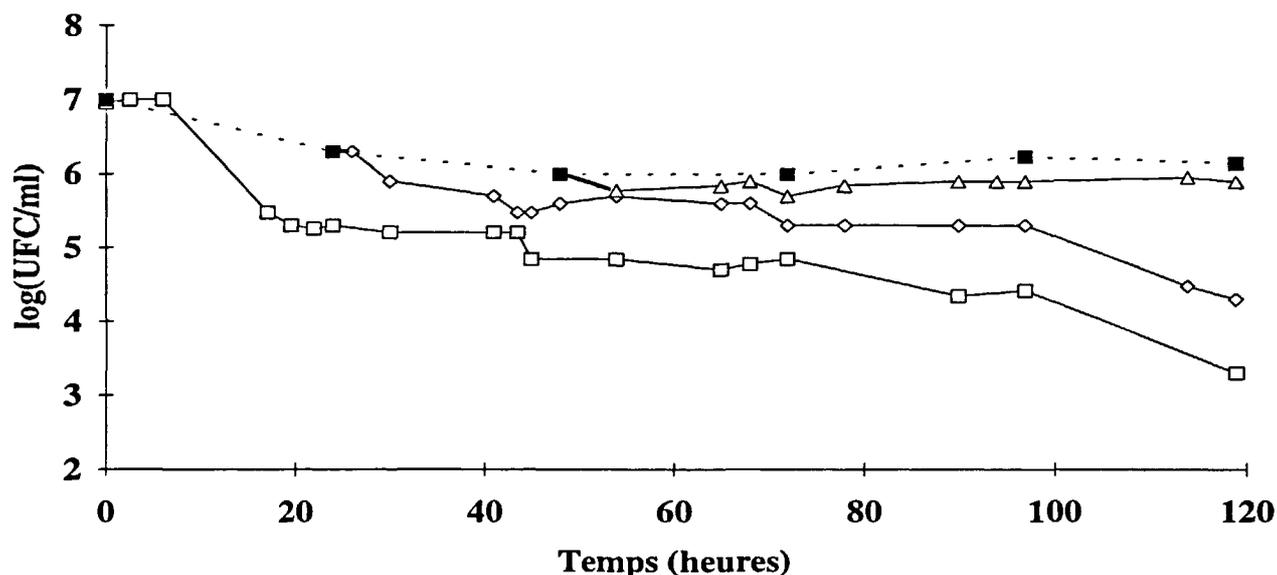


Figure 31 : Effet d'une pré-incubation dans l'eau de mer artificielle à l'obscurité sur la survie de *E. coli* H10407 (en phase exponentielle) exposé à la lumière visible en eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (trait pointillés et sigles pleins). Sans pré-incubation (□), pré-incubation de 24 heures (◇), pré-incubation de 48 heures (△), obscurité (■) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

La survie de *E. coli* dans l'eau de mer lors de l'exposition à la lumière visible dépend de façon évidente de son état physiologique au moment de l'illumination et de sa capacité à surmonter les stress liés au milieu récepteur (eau de mer) c'est-à-dire les stress oligotrophique et osmotique.

III - ETUDE DU MECANISME D'ACTION DE LA LUMIERE VISIBLE DANS L'EAU DE MER

L'exposition des bactéries à la lumière visible conduit à une perte de cultivabilité importante de celles-ci dans l'eau de mer.

Cependant, l'illumination de l'eau de mer avant l'apport de bactéries ne provoque pas une accumulation de composés toxiques stables qui pourraient ensuite altérer les cellules apportées dans ce milieu. En effet, l'exposition de l'eau de mer à la lumière avant

l'ensemencement par *E. coli* ne modifie pas ensuite la survie de ces bactéries aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité (fig. 32).

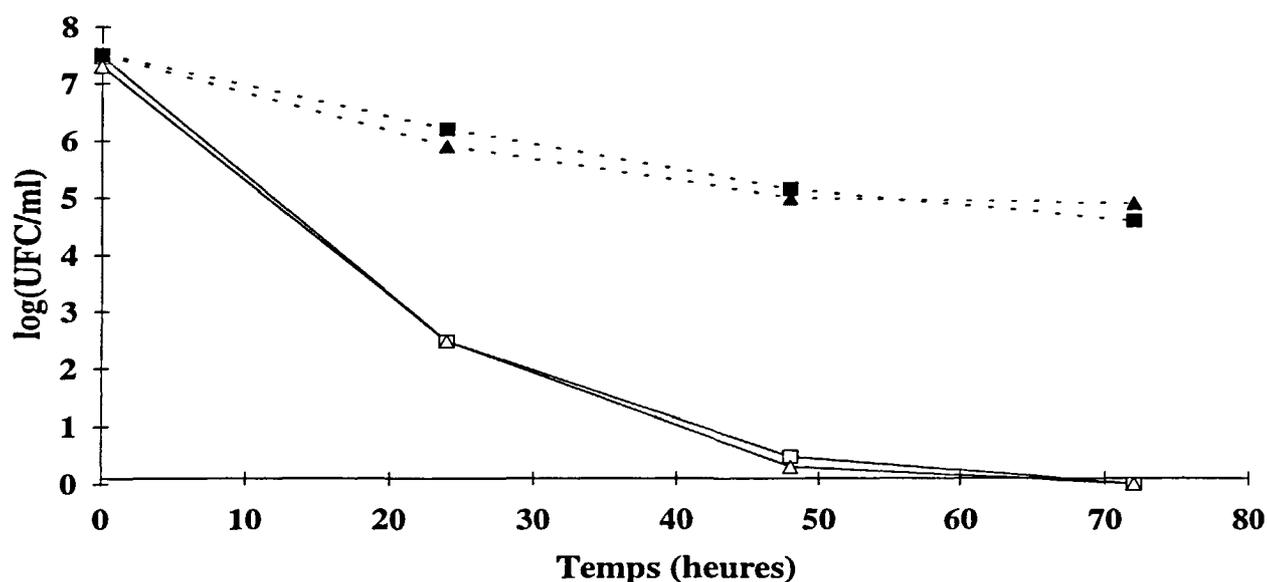


Figure 32 : Effet d'une exposition de l'eau de mer naturelle à la lumière visible avant apport de bactéries sur la survie ultérieure de *E. coli* H10407. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans illumination au préalable de l'eau de mer (\square , \blacksquare) ; avec exposition préalable de l'eau de mer à la lumière (Δ , \blacktriangle) (intensité lumineuse : $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

D'après les données de la littérature (Foote, 1976 ; Curtis et Mara, 1994), la lumière visible agirait plutôt, en présence d'oxygène, par l'intermédiaire de la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS) telles que l'oxygène singulet, l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyle, composés très réactifs et de durée de vie courte. Le schéma 1 (cf. partie bibliographique III-1) décrit une hypothèse de formation de ROS lors de l'exposition à la lumière visible.

III-1 Hypothèse du stress oxydatif et de la production des ROS

III-1-1 ROLE DE L'OXYGENE

Au début de l'étude (au cours du DEA), nous nous sommes intéressés à l'intervention éventuelle de l'oxygène dans la phototoxicité. *Escherichia coli* étant une bactérie aéro-anaérobie facultative, elle a été étudiée en éliminant l'oxygène présent dans l'eau de mer.

Les résultats montrent que la présence d'oxygène dans l'eau de mer en lumière artificielle diminue la cultivabilité de *E. coli* (fig. 33). Par contre, à l'obscurité avec ou sans oxygène, la perte de cultivabilité reste faible (fig. 33).

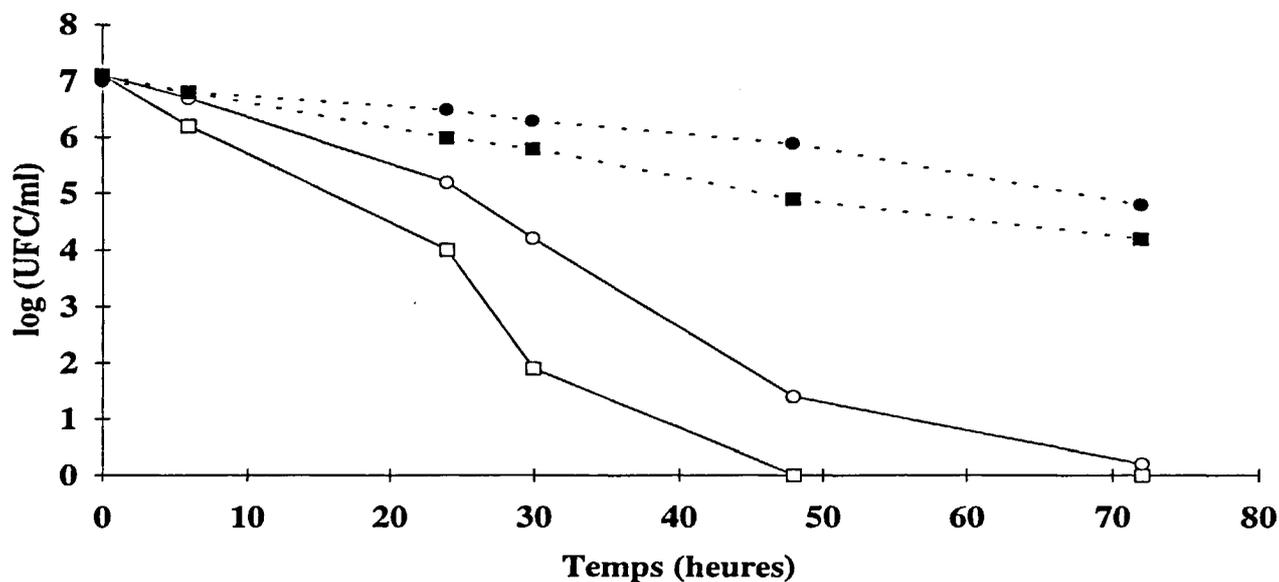


Figure 33 : Influence de l'oxygène sur la survie de *E. coli* H10407 exposé à la lumière visible dans l'eau de mer naturelle (Gourmelon *et al.*, 1994). Eau de mer, lumière (□) ; eau de mer, obscurité (■) ; eau de mer appauvrie en oxygène, lumière (○) ; eau de mer appauvrie en oxygène, obscurité (●) (intensité lumineuse : $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

L'oxygène présent dans l'eau de mer semble donc être impliqué dans la toxicité de la lumière visible sur *E. coli*.

Les rayonnements visibles, en présence d'oxygène, pourraient permettre la formation des ROS (Foote *et al.*, 1984 ; Whitlam et Codd, 1986) qui agiraient au niveau des cellules immergées en eau de mer et conduiraient à une perte de cultivabilité de celles-ci.

III-1-2 PRODUCTION DES ESPECES OXYGENEES REACTIVES : $^1\text{O}_2$, O_2^- , H_2O_2 , $^\circ\text{OH}$

Pour étudier l'éventuelle formation des ROS lors de l'exposition à la lumière visible, nous disposons de plusieurs techniques indirectes : utilisation de composés sensés piéger spécifiquement telle ou telle ROS (expériences effectuées au cours du DEA), utilisation de

bactéries déficientes en enzymes permettant de lutter contre ces ROS ou dosage des activités de ces enzymes de défense bactériennes.

III-1-2-1 Rôle de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

1 - Utilisation de piègeurs d'oxygène singulet

Le rôle potentiel de l' $^1\text{O}_2$ dans la phototoxicité a été évalué, dans un premier temps, grâce à des piègeurs plus ou moins spécifiques de l'oxygène singulet tels que le β carotène (Foote, 1976), l'histidine, le NADPH (Halliwell et Gutteridge, 1989).

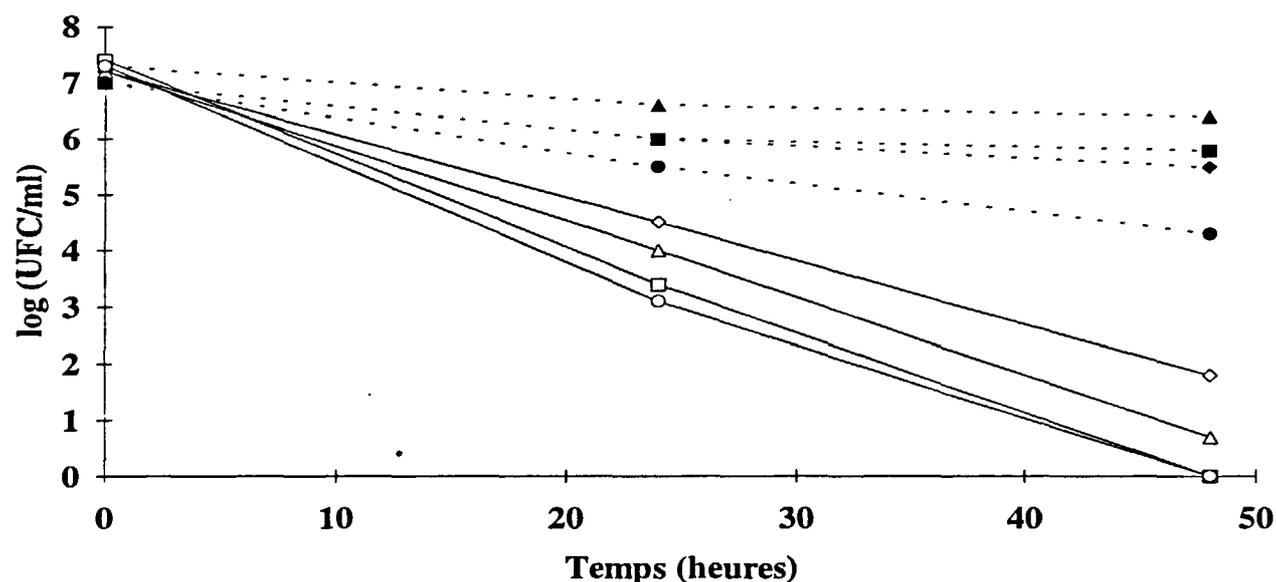


Figure 34 : Influence des piègeurs de l'oxygène singulet sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible (Gourmelon *et al.*, 1994). Lumière (traits pleins et sigles vides). obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports de piègeurs (\square , \blacksquare), β carotène 0,1 mM (\circ , \bullet), Histidine 100 mM (Δ , \blacktriangle), NADPH 1 mM (\diamond , \blacklozenge) (intensité lumineuse : $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

Le β carotène bien qu'il soit le piègeur le plus souvent préconisé (Foote, 1976), ne semble pas apporter de protection contre la phototoxicité (fig. 34). Néanmoins, sa dissolution dans l'eau de mer n'a pu être réalisée de manière satisfaisante malgré l'apport d'éthanol.

L'histidine bien que soluble dans l'eau de mer n'apporte que peu de protection (fig. 34).

Le NADPH permet de diminuer de manière plus marquée la perte de cultivabilité de *E. coli* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer (fig. 34). Il serait converti dans la cellule en NADP^+ en présence de l' $^1\text{O}_2$ (Halliwell et Gutteridge, 1989).

Les piègeurs d'oxygène singulet apparaissent comme étant peu ou pas actifs pour limiter la perte de cultivabilité à la lumière visible. Le manque d'efficacité de certains piègeurs lors de nos expérimentations pourrait s'expliquer par : une absence de pénétration du composé à travers la paroi bactérienne d'une part, une métabolisation des piègeurs par *E. coli* (pour l'histidine par exemple), d'autre part. L'utilisation de ces composés, marqués, pourrait permettre de savoir si ces piègeurs sont capables de pénétrer dans la cellule.

Une production d' $^1\text{O}_2$ dans l'eau de mer par l'action conjuguée de photosensibilisateurs (phéophytines, substances humiques, chlorophylles...) et de lumière semble peu probable car, dans ce cas, les piègeurs auraient dû limiter significativement la perte de cultivabilité. De plus, $^1\text{O}_2$, ayant une durée de vie courte atteindra difficilement les composés intracellulaires lorsqu'il est produit dans le milieu extérieur. Il serait donc plus probable que $^1\text{O}_2$, soit produit dans la bactérie suite à l'exposition à la lumière.

2 - Utilisation d'un mutant déficient en systèmes de réparation des lésions au niveau de l'ADN créées par l'oxygène singulet

Pour étudier l'éventuelle implication de $^1\text{O}_2$ dans la phototoxicité, une autre technique consiste à étudier le devenir d'un *E. coli* connu pour être très sensible à l'exposition à $^1\text{O}_2$. En effet, cette bactérie est déficiente en deux glycosylases, enzymes de réparation des dommages causés par l'oxygène singulet au niveau de l'ADN : la formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg protéine) codée par *fpg* et l'excinuclease UVRA codée par le gène *uvrA*.

La survie du mutant sensible à $^1\text{O}_2$ (QC2270) *fpg uvrA* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer est du même ordre que celle de la souche sauvage (GC4468) dans les mêmes conditions (bactéries en phase exponentielle, résultats non montrés ou en phase stationnaire, fig. 35).

L'exposition à la lumière visible ne semble donc pas conduire à une atteinte importante de l'ADN via la production d'oxygène singulet. La comparaison de la survie des deux souches dans l'eau de mer ne permet donc pas de mettre en évidence une production élevée d'oxygène singulet (par l'étude de l'atteinte de l'ADN). Cependant, une production plus faible d' $^1\text{O}_2$ attaquant d'autres composés cellulaires que l'ADN ne peut être totalement exclue ; les lipides membranaires, certaines enzymes, des acides aminés tels que l'histidine, la méthionine ou le tryptophane sont connus pour leur sensibilité à l'oxygène singulet (Foote *et al.*, 1984). Les deux glycosylases présentes dans la souche parentale ne peuvent peut-être pas agir sans un apport de nutriment, ce qui n'est pas le cas dans l'eau de mer, milieu oligotrophe. L'oxygène singulet dès sa formation pourrait être transformé en anion superoxyde.

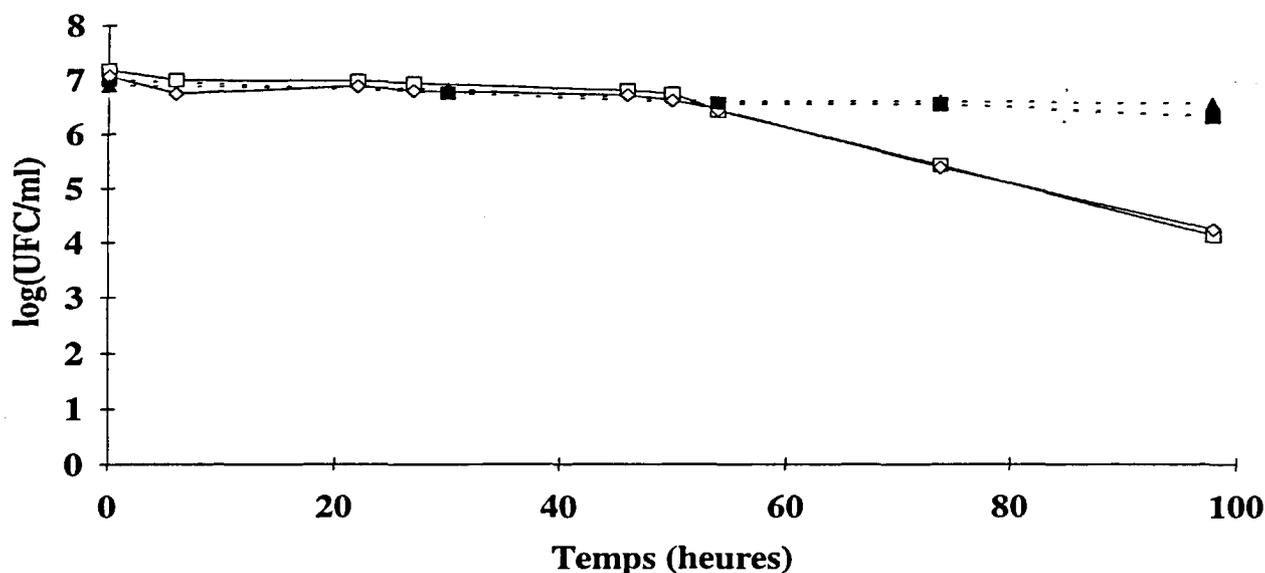


Figure 35 : Effet de la lumière sur *E. coli fpg uvrA* sensible à l'oxygène singulet dans l'eau de mer (en phase stationnaire). Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). GC4468 (□,■) ; QC2270 mutant *fpg uvrA* (◇,◆) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

III-1-2-2 Rôle de l'anion superoxyde (O_2^-)

1 - Apport de superoxyde dismutase

La superoxyde dismutase est connue pour sa propriété de transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et oxygène (Fridovich, 1975). Aussi, elle a été apportée dans les suspensions de *E. coli* dans l'eau de mer exposée à la lumière visible afin de mettre en évidence une éventuelle formation d'anion superoxyde lors de l'illumination des cellules.

La SOD apportée dans les échantillons ne permet pas de lutter contre les effets toxiques de la lumière (fig. 37).

Cette enzyme, ne traversant pas la paroi bactérienne, peut agir seulement contre l'anion superoxyde exogène. En outre, Hassan et Fridovitch (1979), ont montré que cette paroi est imperméable à l'anion superoxyde. La superoxyde dismutase apportée ne peut donc pas protéger les cellules de l'anion superoxyde qui serait formé dans la cellule.

2. - Utilisation de *E. coli* déficient en un ou deux types de superoxyde dismutase

Afin d'évaluer une éventuelle formation intracellulaire d'anion superoxyde lors de l'exposition des bactéries à la lumière visible, des bactéries déficientes en Mn-SOD, en Fe-

SOD ou dans les deux types de SOD sont immergées dans l'eau de mer en présence de lumière visible.

Les bactéries déficientes en un seul type de superoxyde dismutase : Mn-SOD (QC772 ; *sodA*), ou Fe-SOD (QC773 ; *sodB*) ne sont pas plus sensibles à la lumière visible que la souche témoin (GC4468) (fig. 36). La souche déficiente en Fe-SOD et Mn-SOD (QC774 ; *sodA sodB*) survit moins bien au stress lumineux (fig. 36). La perte de cultivabilité de la souche déficiente dans ces deux types de SOD est significativement plus importante que celle de la souche témoin ($p < 0,05$). Dans ce double mutant, il existe encore une activité SOD par la CuZn-SOD, codée par le gène *sodC*, découverte récemment (Benov et Fridovich, 1994). Cependant cette activité est mineure ; elle ne représente pas plus de 2 % de l'activité totale lorsque la bactérie est dans du milieu LB en aérobiose.

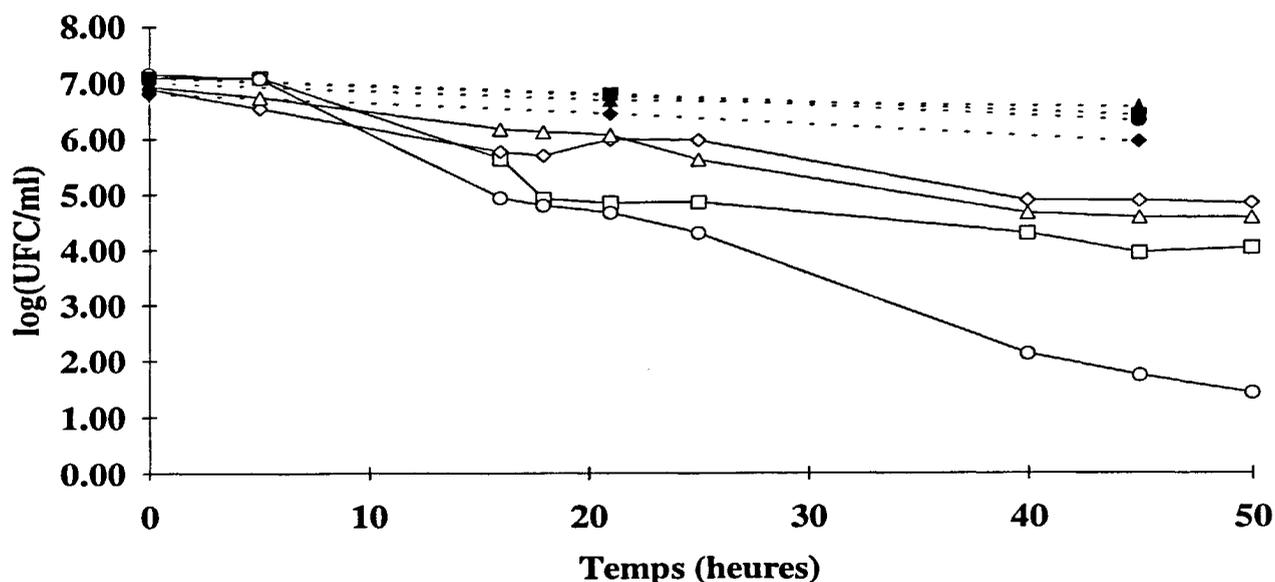


Figure 36 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en superoxyde dismutase dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Souche témoin GC4468 (□, ■) ; QC772 mutant *sodA* (◇, ◆) ; QC773 mutant *sodB* (△, ▲) ; QC774 mutant *sodA sodB* (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

3 - Mesure d'activité enzymatique SOD

L'activité SOD chez *E. coli* H10407 a été évaluée après un séjour de 4 jours dans l'eau de mer à la lumière visible ou à l'obscurité. Lors de la visualisation de l'activité SOD sur gel de polyacrylamide, nous n'observons pas de différences significatives entre l'activité SOD

chez les bactéries exposées à la lumière visible et chez celles incubées à l'obscurité. Ce résultat est confirmé par le dosage spectrophotométrique de l'activité SOD :

- 30 U/mg de protéine à l'obscurité,
- 33 U/mg de protéine à la lumière.

De même, après un séjour de 1 heure, 24 heures ou 3 jours dans l'eau de mer, l'activité SOD évaluée après électrophorèse des protéines et révélation des activités, est du même ordre lors de l'exposition à la lumière visible ou lors de l'incubation à l'obscurité (photo 5).

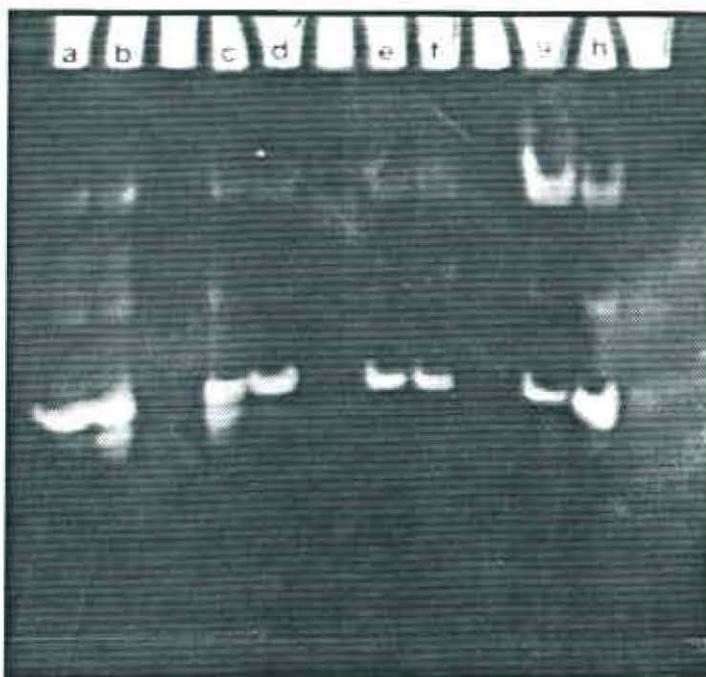


Photo 5 : Activité SOD chez *E. coli* MP180 dans l'eau de mer artificielle exposé à la lumière visible durant 1 heure (a), 24 heures (c), 3 jours (e) ou incubé à l'obscurité durant 1 heure (b), 24 heures (d), 3 jours (f). MP180 dans le milieu LB (g), UM122 *katF* dans le milieu LB (h).

La sensibilité de *Escherichia coli* à la lumière visible serait due plutôt à une augmentation du taux d'anion superoxyde qu'à une perte d'activité SOD.

L'anion superoxyde formé pourrait ensuite permettre la formation de peroxyde d'hydrogène.

III-1-2-3 Rôle du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)

1 - Apport de catalase

La catalase permet la destruction du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène. Elle a donc été apportée dans les échantillons afin d'appréhender le rôle de l' H_2O_2 dans la phototoxicité.

L'apport de catalase permet une diminution de la perte de cultivabilité à la lumière visible (fig. 37). Cette enzyme lorsqu'elle est dénaturée est inefficace contre la phototoxicité (fig. 37). Ceci montre que l'action de la catalase (CAT) n'est pas due à un apport de protéine métabolisable mais plutôt à son activité enzymatique permettant l'élimination de l' H_2O_2 .

En renouvelant l'apport de catalase au cours de l'expérience, la protection par la catalase aurait pu être améliorée. En effet, Arana *et al.* (1992) ont obtenu une meilleure survie de *E. coli* exposé à la lumière visible dans l'eau de rivière en ajoutant ce composé toutes les 24 heures.

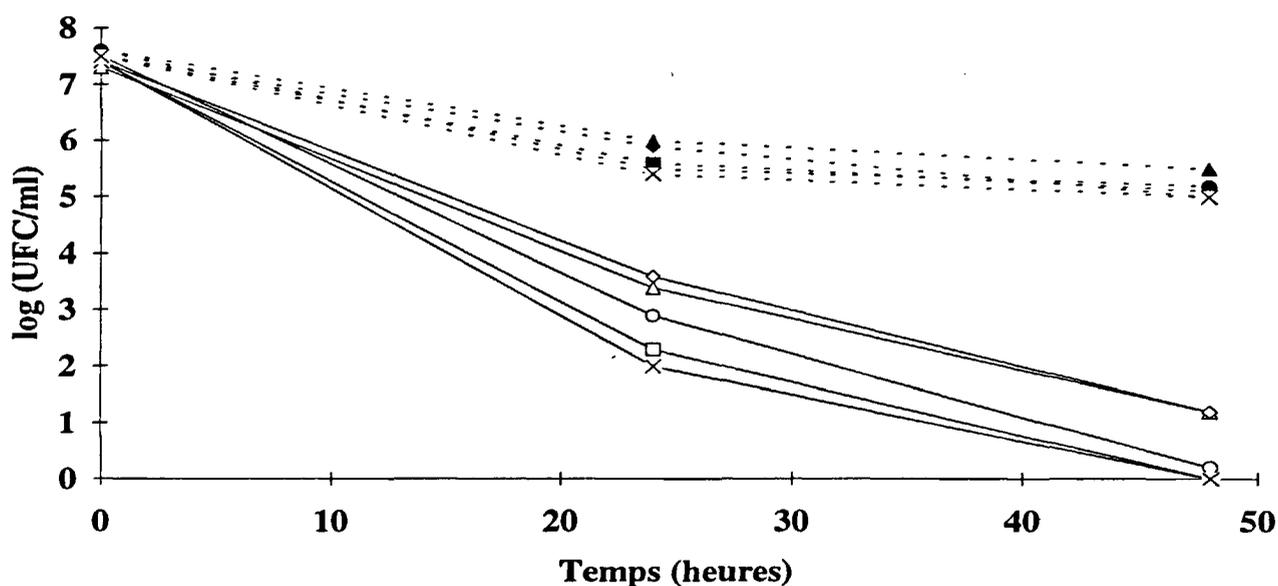


Figure 37 : Influence de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible (Gourmelon *et al.*, 1994). Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins) (intensité lumineuse : $500 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ environ). Sans apports d'enzymes (\square , \blacksquare), SOD (55 UI/ml) (\circ , \bullet), CAT (220 UI/ml) (\triangle , \blacktriangle), SOD + CAT (\diamond , \blacklozenge), SOD + CAT dénaturées (X, X).

La catalase, ne pouvant pénétrer dans la bactérie, agirait en éliminant le peroxyde d'hydrogène extracellulaire :

- Elle pourrait éliminer l' H_2O_2 directement formé dans l'eau de mer. En effet, Cooper et Zika, en 1983, ont mis en évidence la présence d' H_2O_2 dans l'eau de mer exposée à la lumière naturelle. En présence de lumière, certaines substances présentes dans l'eau de mer telles que les substances humiques (photosensibilisateur) pourraient produire de l' O_2^- qui par dismutation spontanée formerait de l' H_2O_2 (Cooper et Zika, 1983). Cependant, cette hypothèse est peu probable : l'eau de mer naturelle, utilisée dans nos expériences est très pauvre en matière organique dissoute (et donc en photosensibilisateurs potentiels) ; de plus, nous obtenons des survies de *E. coli* du même ordre dans cette eau naturelle et dans une eau de mer artificielle *a priori* sans photosensibilisateurs.

- L' H_2O_2 diffusant facilement à travers la membrane bactérienne, la catalase, en éliminant le peroxyde d'hydrogène extracellulaire, conduirait alors à la diminution du taux intracellulaire.

L'apport de SOD, en plus de la catalase ne permet pas de mieux protéger les bactéries contre l'effet toxique de la lumière visible (fig. 37).

2 - Utilisation de mutants de *E. coli* déficient en catalase HPI ou HPII

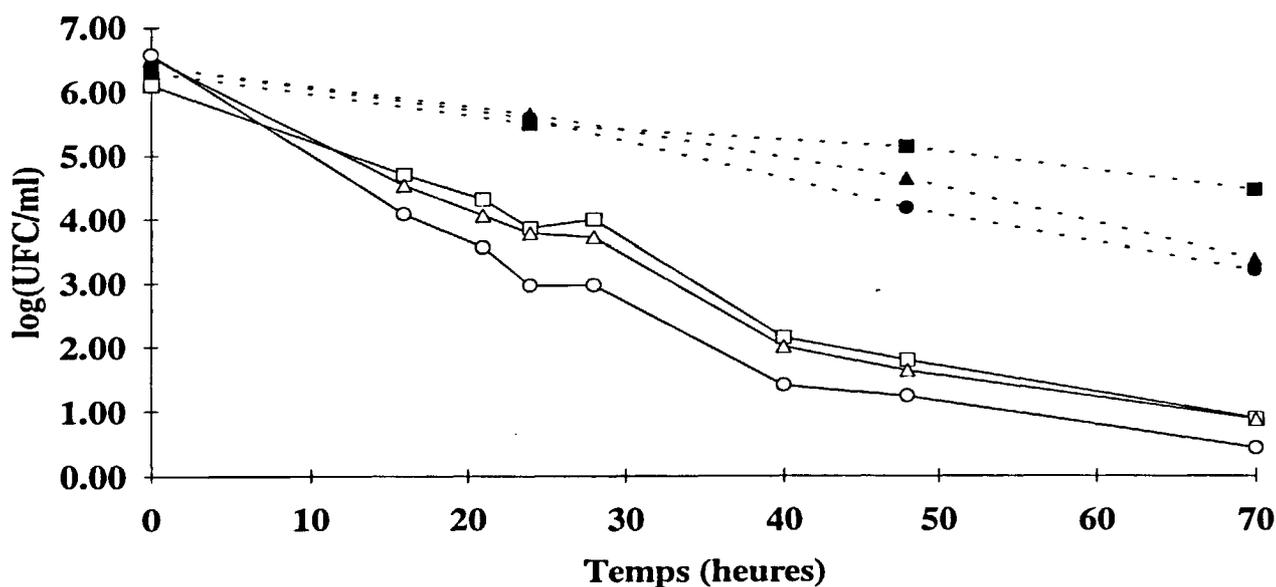


Figure 38 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en catalase dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Souche témoin MP180 (□, ■) ; UM120 *katE* (Δ, ▲), UM202 *katG* (○, ●) (intensité lumineuse : $900 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ environ).

Les bactéries déficientes en catalase HPI (UM202 ; *katG*) ou en catalase HPII (UM120 ; *katE*) ne sont pas plus sensibles à la lumière visible que la souche témoin (MP180) (fig. 38) : la différence entre les numérations bactériennes n'étant pas significative.

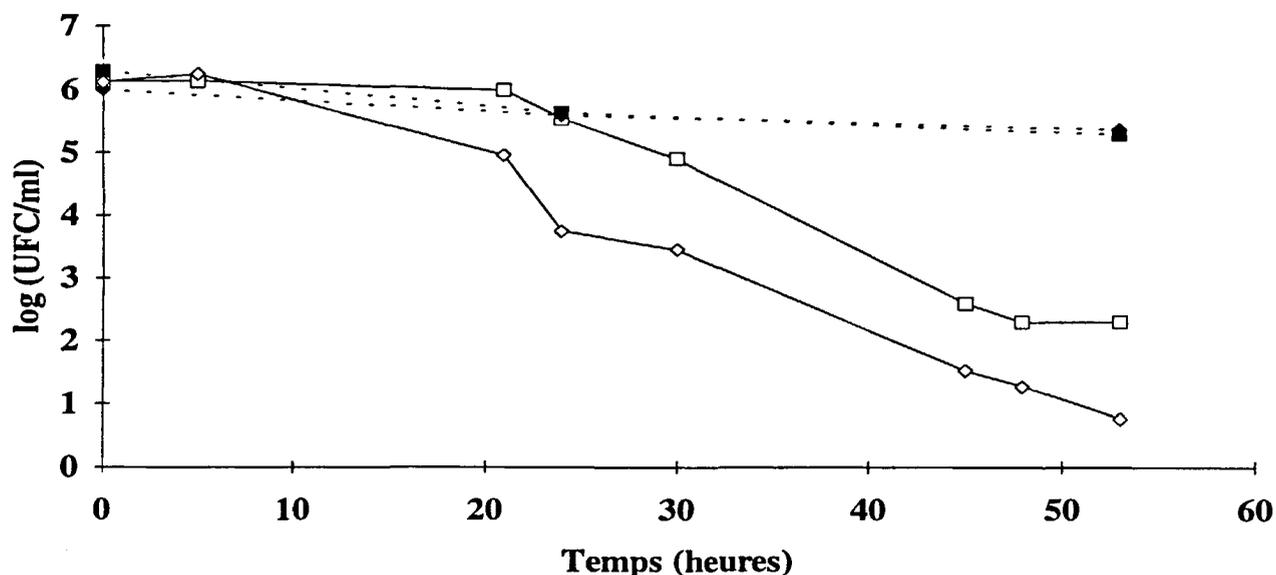


Figure 39 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en catalases HPI et HPII en phase exponentielle dans l'eau de mer. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Souche témoin MG1655 (□, ■) ; QC2404 mutant *katE katG* (◇, ◆) (intensité lumineuse : 900 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

Par contre, la suppression des deux types de catalase rend plus sensible *E. coli* à l'effet toxique de la lumière visible (fig. 11 et fig. 39).

Ces résultats montrent que le peroxyde d'hydrogène est produit lors de l'exposition à la lumière visible. La présence d'une seule catalase (HPI ou HPII) serait suffisante pour détruire le peroxyde d'hydrogène formé lors de l'exposition à la lumière visible suggérant une formation modérée d' H_2O_2 .

3 - Evaluation de l'activité catalase

Lors de la visualisation de l'activité catalase (HPI ou HPII) sur gel de polyacrylamide, nous n'observons pas de différence significative de l'activité catalase entre l'exposition à la lumière et l'incubation à l'obscurité des bactéries (photo 6).

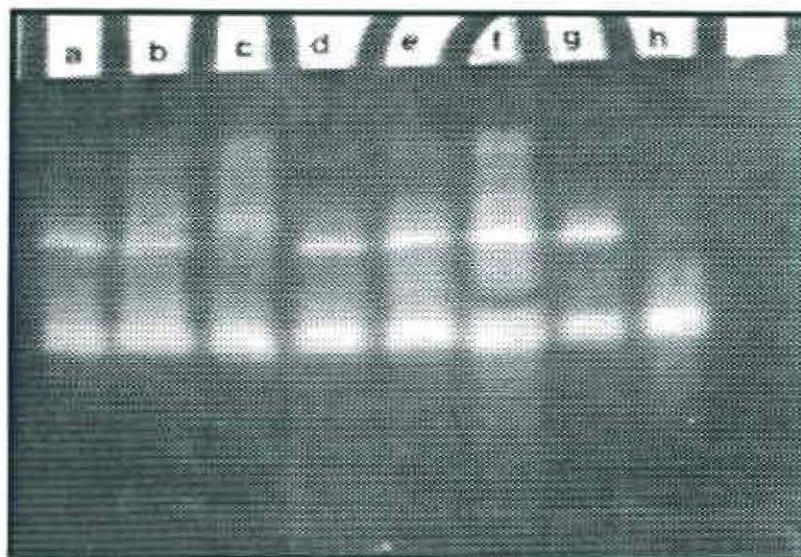


Photo 6 : Activité catalase chez *E. coli* MP180 dans l'eau de mer artificielle exposé à la lumière visible durant 1 heure (a), 24 heures (c), 3 jours (e) ou incubé à l'obscurité durant 1 heure (b), 24 heures (d), 3 jours (f). MP180 dans le milieu LB (g), UM122 *katF* dans le milieu LB (h).

III-1-2-4 Rôle du radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$)

Le radical $^{\circ}\text{OH}$ est susceptible d'être formé par la réaction d'Haber-Weiss ou la réaction de Fenton. Ce radical extrêmement réactif, réagit avec un grand nombre de molécules. Il n'existe pas de piègeur spécifique du radical $^{\circ}\text{OH}$.

Trois piègeurs ont été utilisés dans nos expériences : le benzoate de sodium, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et la thiourée.

La perte de cultivabilité est diminuée par l'apport de thiourée lors de l'exposition à la lumière visible (fig. 40).

Par contre, le benzoate de sodium et le DMSO, ne permettent pas d'observer une diminution des conséquences dommageables de l'exposition à la lumière (fig. 40). Le DMSO à des concentrations supérieures (250 et 500 mM) n'a pas apporté non plus de protection.

Les piègeurs du radical hydroxyle apportent donc une protection variable. Il est important de noter que les différents piègeurs du OH° (comme ceux des autres ROS) n'ont permis, dans aucun cas, une protection totale. Le nombre de bactéries cultivables lors de l'exposition à la lumière même en présence de ces substances, reste très inférieur au nombre de bactéries cultivables lors de l'exposition à l'obscurité.

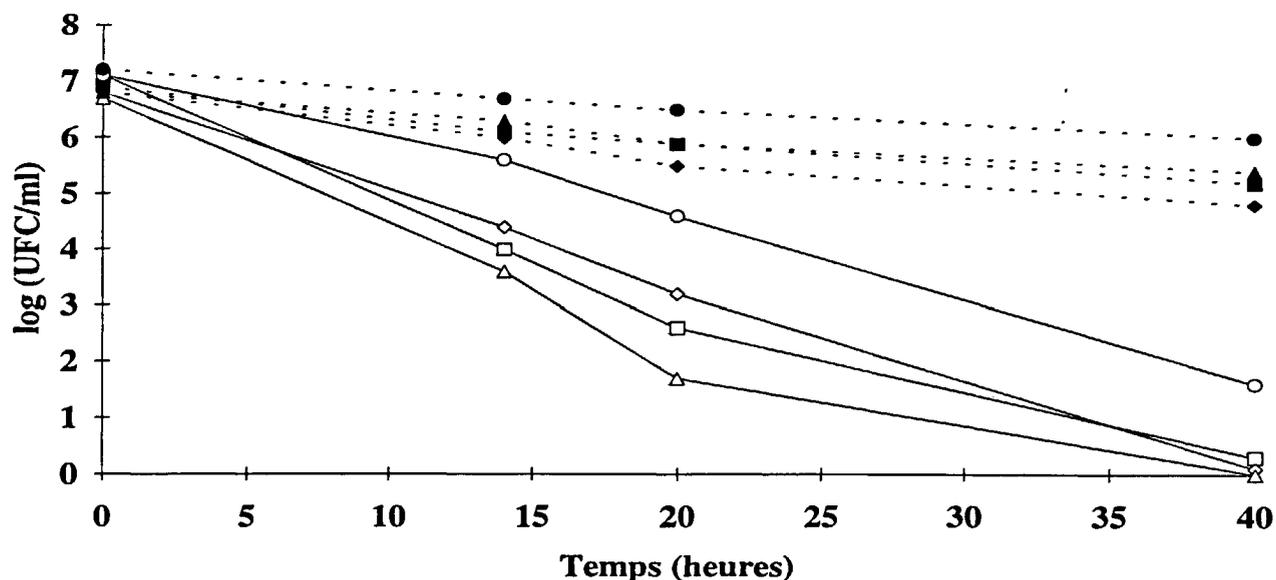


Figure 40 : Influence des piégeurs du radical hydroxyle sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible (Gourmelon *et al.*, 1994). Lumière (traits pleins et sigles vides). obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports de piégeurs (□, ■) ; Thiourée 100 mM (○, ●) ; Benzoate de sodium 100 mM (△, ▲) ; DMSO 100 mM (◇, ◆) (intensité lumineuse : 500 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

III-1-2-5 Rôle du fer (Fe^{2+})

Afin de mettre en évidence une intervention possible du fer dans les dommages induits par la lumière, un chélateur du fer, la desferrioxamine B (Desferal[®]) a été apporté dans les échantillons.

La desferrioxamine B permet de protéger les bactéries de l'effet toxique de la lumière, surtout aux concentrations de 50 et 500 μM (fig. 41).

Il semblerait donc, *a priori*, que le fer intervienne dans le mécanisme de phototoxicité en permettant vraisemblablement la production du radical $^{\circ}\text{OH}$ par la réaction de Fenton.

La desferrioxamine B est connue pour piéger également :

- le radical $^{\circ}\text{OH}$ (Halliwell et Gutteridge, 1989),

- l'anion superoxyde : le piégeage de l' O_2^- par le Desferal[®] ne semble pas pouvoir avoir lieu dans les conditions de concentration utilisée, puisque cette propriété n'apparaît que pour des concentrations supérieures à 1 mM (Sinaceur *et al.*, 1984)

De plus, la thiourée, piégeur de $^{\circ}\text{OH}$ qui a permis de limiter la perte de cultivabilité de *E. coli* lors de l'exposition à la lumière visible est également chélateur de fer. Elle pourrait

protéger les cellules par cette propriété. De plus, le fer pourrait peut-être intervenir à un autre niveau qu'au niveau de la réaction de Fenton (conduisant à la formation des radicaux hydroxyles) et permettre éventuellement la formation d'autres espèces toxiques.

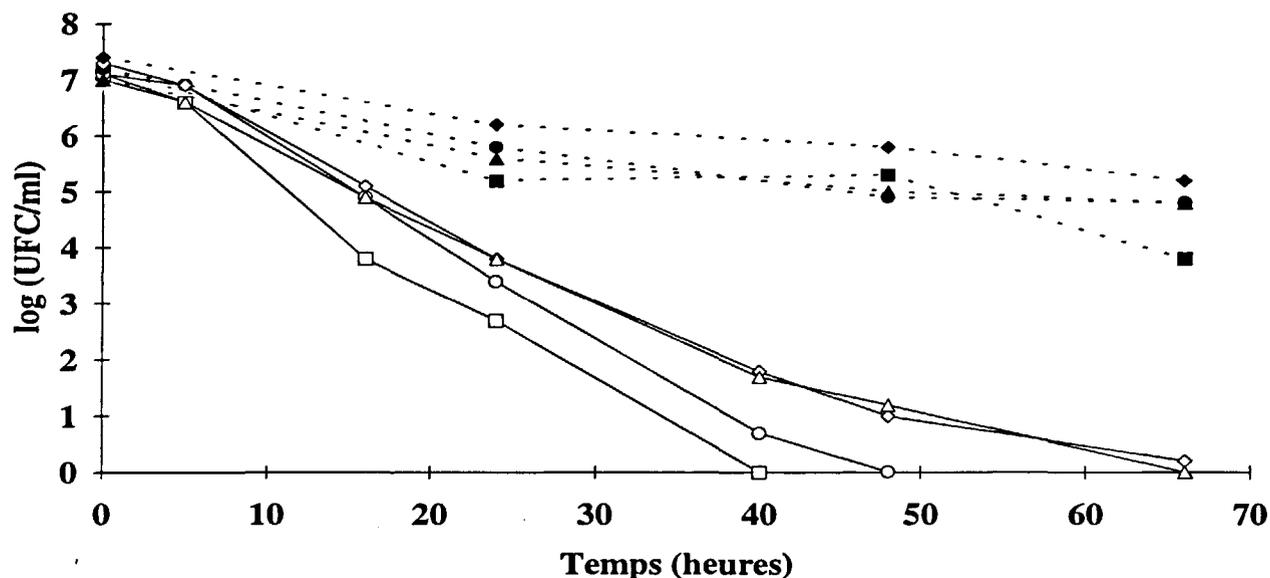


Figure 41 : Influence de la desferrioxamine B (Desferal®) sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible (Gourmelon *et al.*, 1994). Lumière (traits pleins et sigles vides). obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports de Desferal (□, ■) ; Desferal 1 μM (○, ●) ; Desferal 50 μM (◇, ◆) ; Desferal 500 μM (Δ, ▲) (intensité lumineuse : 500 μE.m⁻².s⁻¹ environ).

Nos résultats montrent que la lumière visible provoque une perte de cultivabilité de *E. coli* dans l'eau de mer par l'intervention de ROS telles que l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ... Cependant, la production semble faible : protection faible par les piégeurs, sensibilité légèrement accrue du double mutant SOD ou du double mutant catalase.

Le mécanisme d'action de la lumière visible sur les bactéries entériques en milieu aquatique (eau de rivière ou eau de lagune) a été étudié par d'autres auteurs (Barcina *et al.*, 1989 ; Arana *et al.*, 1992 ; Curtis et Mara, 1994). Leurs résultats montrent également une intervention des ROS dans la phototoxicité :

- l'apport de piégeurs de peroxyde d'hydrogène (catalase, pyruvate de sodium) permet de limiter la sensibilité des entérobactéries à la lumière visible dans l'eau de rivière (Arana *et al.*, 1992),

- de même, dans les eaux de lagunes, l'addition de piègeurs d'oxygène singulet (histidine) ou de peroxyde d'hydrogène (catalase, pyruvate de sodium) améliore la survie des coliformes fécaux lors de l'exposition à la lumière (Curtis *et al.*, 1992 ; Curtis et Mara, 1994).

Dans ces deux types de milieux (eau de rivière et eau de lagune), la lumière visible agirait sur les entérobactéries par un phénomène de photosensibilisation exogène (Arana *et al.*, 1992 ; Curtis et Mara, 1994). L'eau de rivière dans laquelle sont immergées les bactéries contient des quantités non négligeables de matière organique (soit 15,5 mg.l⁻¹ de carbone organique total (COT)), susceptibles de jouer un rôle photosensibilisateur (Arana *et al.*, 1992). L'eau de lagune est très riche en matière organique. Les substances humiques, présentes en grande quantité, joueraient le rôle de photosensibilisateurs (Curtis et Mara, 1994).

Par contre, dans nos expériences, une production extracellulaire de ROS ne semble pas avoir lieu : absence de protection par la SOD apportée, par exemple et utilisation, dans nos expériences, d'une eau de mer *a priori* dépourvue de photosensibilisateurs exogènes. Aussi, la production des ROS aurait lieu plutôt dans les cellules bactériennes. La bactérie possède, en effet, plusieurs composés susceptibles d'être des photosensibilisateurs endogènes : cytochromes, protéines de synthèse de l'hème telles que les porphyrines... (Mitchell et Chamberlin, 1978 ; Whitlam et Codd, 1986).

Au cours de nos expériences, l'augmentation de la salinité conduit à une potentialisation des effets de la lumière visible sur les bactéries. Le stress osmotique (et éventuellement le stress oligotrophique) pourraient peut-être conduire à un ralentissement de la chaîne respiratoire en touchant des étapes finales et donc favoriser l'accumulation de composés photosensibilisateurs. L'accumulation de tels composés explique la sensibilité à la lumière visible (de longueur d'onde de 460 nm environ) de certaines bactéries (mutants *visA* ou *visB*) (Miyamoto *et al.*, 1991 ; Nakahigashi *et al.*, 1992). En présence de lumière visible, les photosensibilisateurs accumulés dans les cellules conduisent à la formation de ROS (Nakahigashi *et al.*, 1991).

Le mutant *visA* ne possède plus l'activité ferrochélatase qui permet de transformer la protoporphyrine, intermédiaire de la synthèse de l'hème en protohème (Frustaci et O'Brian, 1993). La protoporphyrine est alors accumulée dans la cellule et aurait une action photosensibilisatrice en présence de lumière visible (Miyamoto *et al.*, 1992). En présence d'oxygène, ceci conduirait à la formation d'oxygène singulet et peut-être d'anion superoxyde (Nakahigashi *et al.*, 1991).

Le mutant *visB* est altéré dans la synthèse de l'ubiquinone, élément de la chaîne respiratoire (Nakahigashi *et al.*, 1992). Dans ce cas, un composé intermédiaire photosensibilisateur serait également accumulé dans les cellules conduisant à la formation de ROS en présence de lumière visible et d'oxygène (Nakahigashi *et al.*, 1992).

Lorsque les bactéries sont mutées à des étapes antérieures (par exemple, la mutation *hemA* rend les bactéries incapables de synthétiser le précurseur des protéines de synthèse de l'hème : l'acide aminolévulinique), elles ne sont plus aussi sensibles à la lumière visible : en effet, l'accumulation de photosensibilisateurs n'a plus lieu dans ces conditions (Nishimura *et al.*, 1993 ; Nakahigashi *et al.*, 1992).

Dans nos expériences, nous avons ainsi comparé la survie à la lumière visible de bactéries, ne pouvant plus synthétiser l'acide 5 aminolévulinique, *E. coli hemA* (QC 2430) et la souche parentale (QC 2438). *E. coli hemA* est moins sensible à la lumière visible que la bactérie témoin dans l'eau de mer (fig. 42). La suppression de la formation d'une source de photosensibilisateur (protéines dérivées de l'acide aminolévulinique) diminue donc les effets de la lumière visible (fig. 42).

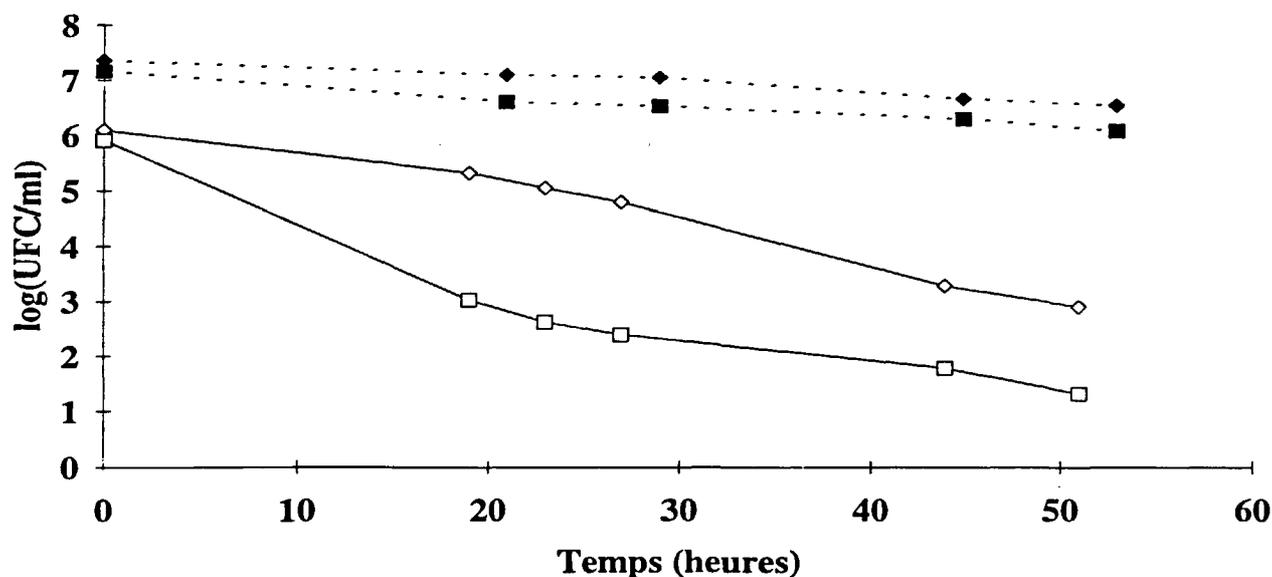


Figure 42 : Effet de la mutation *hemA* (absence de synthèse d'acide aminolévulinique) sur la sensibilité de *E. coli* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer artificielle. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Souche témoin QC2438 (□, ■) ; QC2430 mutant *hemA* (◇, ◆) (intensité lumineuse : 900 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

Les ROS seraient donc produites dans la bactérie par l'intermédiaire de photosensibilisateurs endogènes et le taux augmenterait au cours de l'exposition à la lumière. Ces composés ne seraient peut-être pas les seuls responsables des effets toxiques de la lumière visible.

III-2 Les cibles cellulaires

III-2-1 LES ACIDES NUCLEIQUES

III-2-1-1 Etude des systèmes de réparation ou de protection de l'ADN

La bactérie dispose de plusieurs systèmes de protection ou de réparation afin de maintenir les fonctions de l'ADN.

La protéine RecA intervient dans le système de réparation SOS induit quand l'ADN est en contact avec des agents ou dans des conditions provoquant des dommages au niveau de l'ADN ou interférant avec la réplication de l'ADN. Les glycosylases telles que la formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg protéine) codée par *fpg* et l'excinucléase UVR A codée par le gène *uvrA* reconnaissent de façon spécifique les bases altérées de l'ADN. L'exonucléase III effectue une coupure endonucléasique simple brin au niveau de l'ADN dépuriné ou dépyrimidé. La protéine Dps (DNA-binding protein from starved cells) codée par le gène *dps* protège l'ADN en le recouvrant pendant la phase stationnaire (Almiron *et al.*, 1992).

Des souches déficientes dans l'un ou l'autre des différents systèmes de réparation ou de protection de l'ADN précédemment cités sont exposées à la lumière visible dans l'eau de mer. Leur survie est comparée à celle des souches parentales correspondantes dans les mêmes conditions.

Seule la souche déficiente en protéine Dps (système de protection de l'ADN) s'est avérée plus sensible à la lumière visible dans l'eau de mer (fig. 13) ; les autres souches, déficientes en système de réparation de l'ADN, ont évolué à la lumière visible de la même façon que les souches parentales (tab. III ; *recA* : annexe 5 : fig. 57 ; *fpg uvrA* : fig. 35 ; *xthA* : fig. 12).

Tableau III : Sensibilité à la lumière visible de *E. coli* déficient en un système de protection de l'ADN chromosomique (Dps) ou de réparation des lésions au niveau de l'ADN chromosomique (RecA, Fpg UvrA ou exonucléase III) par rapport à celle de leur souche parentale respective.

Bactéries	Systèmes de réparation ou de protection déficients	Sensibilité / souche de référence
<i>recA</i>	RecA	identique
<i>fpg uvrA</i>	Fpg UvrA	identique
<i>xthA</i>	Exonucléase III	identique
<i>dps</i>	Dps	plus importante

L'ADN semble donc être atteint lors de l'exposition à la lumière visible (sensibilité de *E. coli* accrue lors de l'absence de synthèse de la protéine Dps). Cependant, l'utilisation des mutants déficients en systèmes de réparation de l'ADN ne permet pas d'envisager un type précis de dommage de l'ADN par la lumière visible. Deux hypothèses peuvent être émises : l'ADN est peu altéré par l'exposition de la bactérie à la lumière visible ou la suppression d'un seul type de protéine n'est pas suffisante pour diminuer sensiblement la survie à la lumière visible dans l'eau de mer. Une hypothèse serait que la lumière visible conduit à des lésions de l'ADN réparées par d'autres systèmes que ceux étudiés.

L'étude des atteintes de l'ADN chromosomique semble donc difficile à réaliser, aussi nous avons étudié l'effet de la lumière sur l'ADN plasmidique. Ce dernier est plus facilement accessible et sa persistance dans les cellules illuminées peut être suivie.

III-2-1-2 l'ADN plasmidique

La souche *E. coli* HB101, possédant trois plasmides de taille différente : 4, 33 et 56 kb codant pour des résistances à des antibiotiques, a été placée dans une eau de mer artificielle de 20 ou 34 ‰ de salinité à la lumière visible. Ceci afin de suivre la persistance de l'ADN plasmidique dans la bactérie lors du stress lumineux.



Photo 7 : Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides RP1, R388, pUB824 contenus dans la souche HB101 après exposition à la lumière visible dans l'eau de mer à 20 ‰ de salinité. Ligne 1 : extraits plasmidiques (RP1, R388, pUB824) obtenus après culture en milieu LB (témoin +) ; ligne 2 : *E. coli* C600 (témoin -) ; lignes 4, 6, 8, 10 : extraits plasmidiques obtenus après 24, 72, 96, 192 heures d'exposition à la lumière visible de *E. coli* HB101 dans l'eau de mer ; lignes 3, 5, 7, 9, 11: extraits plasmidiques obtenus après 0, 24, 72, 96, 192 heures d'incubation à l'obscurité de *E. coli* HB101 dans l'eau de mer.

Dans une eau de mer artificielle à 20 ‰, la souche *E. coli* HB101 perd progressivement ses gros plasmides (56 et 33 kb) lors de l'exposition à la lumière visible. Tandis que le plus petit (4 kb) est conservé tout au long de l'expérience. A l'obscurité, les 3 plasmides sont conservés pendant les 8 jours de l'expérience (technique d'extraction et électrophorèse des ADNs) (photo 7).

Dans une eau de mer artificielle à 34 ‰, la souche *E. coli* HB101 perd plus rapidement ses plasmides. Les deux gros plasmides disparaissent à partir de 24 heures lors de l'exposition à la lumière visible. Plus aucun plasmide n'est observé après 48 heures. Par contre, à l'obscurité, les 3 plasmides sont conservés pendant les 7 jours de l'expérience (photo 8).

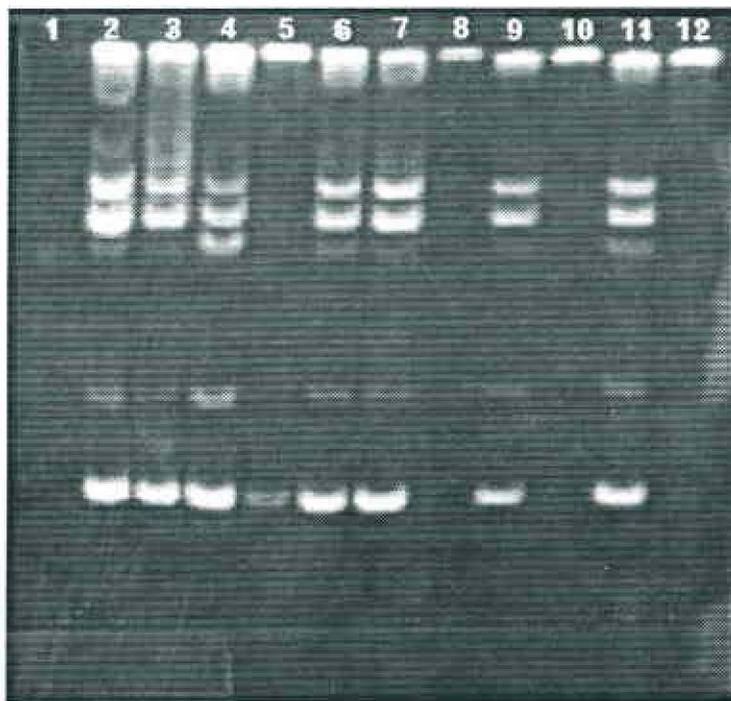


Photo 8 : Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides RP1, R388, pUB824 contenus dans la souche HB101 après exposition à la lumière visible dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité. Ligne 1 : extraits plasmidiques (RP1, R388, pUB824) obtenus après culture en milieu LB (témoin +) ; ligne 2 : *E. coli* C600 (témoin -) ; lignes 3, 5, 8, 10, 12 : extraits plasmidiques obtenus après 0, 24, 46, 69, 162 heures d'exposition à la lumière visible de *E. coli* HB101 dans l'eau de mer ; lignes 4, 6, 7, 9, 11 : extraits plasmidiques obtenus après 0, 24, 46, 69, 162 heures d'incubation à l'obscurité de *E. coli* HB101 dans l'eau de mer.

Lors d'une deuxième expérience, nous avons suivi l'évolution des bactéries cultivables sur des géloses contenant soit de la kanamycine, du triméthoprime ou du chloramphénicol, afin de savoir si la bactérie avait conservé la résistance à ces antibiotiques codée par les trois plasmides. La résistance à la kanamycine est codée par le plus gros plasmide (RP1 ; 56 kb), celle pour le triméthoprime par le plasmide de taille intermédiaire (R388 ; 33 kb) et celle pour le chloramphénicol par le petit plasmide (pUB824 ; 4 kb). La conservation des résistances aux

antibiotiques est suivie dans une eau de mer artificielle à 20 ou 34 ‰ de salinité ou dans une eau naturelle (Argenton) à la lumière ou à l'obscurité.

E. coli HB101 perd sa capacité à cultiver lors de l'exposition à la lumière visible dans les eaux de mer artificielle et naturelle. La perte de cultivabilité est du même ordre sur les géloses avec ou sans antibiotiques (fig. 43) : la résistance aux antibiotiques dans les bactéries cultivables est donc conservée lors du séjour de cette bactérie dans ces eaux en présence ou non de lumière (fig. 43 et fig. 44, annexe 6 : fig. 59, fig. 60, fig. 61 et fig. 62).

A l'obscurité, les trois plasmides sont visibles sur le gel d'électrophorèse aussi bien après un séjour de *E. coli* HB101 dans une eau à 20 ‰ de salinité que dans une eau à 34 ‰ de salinité ; le nombre de copies de plasmides se maintient donc dans les bactéries tout au long de l'expérience. En absence de lumière, la capacité d'expression des plasmides n'est pas affectée par le stress osmotique et le stress oligotrophique liés à l'immersion des bactéries dans l'eau de mer.

Lors de l'exposition à la lumière visible, les grands plasmides (de taille 33 et 56 kb) ne sont plus visibles par électrophorèse au bout d'un certain temps. Trois hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette perte :

- le nombre de copies de plasmides pourrait diminuer lors de l'exposition des bactéries à la lumière dans l'eau de mer. M. Arturo-Loureiro (1993) a montré que les grands plasmides étaient perdus préférentiellement en milieu marin ; leur nombre de copies est faible et ces plasmides sont plus instables dans un environnement hostile. L'absence de nutriments en quantité suffisante dans l'eau associée au stress lumineux diminueraient l'efficacité de la réplication plasmidique.

- la lyse des parois et des membranes bactériennes a été plus difficile lors de l'extraction plasmidique après un long séjour des bactéries dans l'eau de mer en présence de lumière. Ceci peut être dû à une modification des parois et des membranes par le stress osmotique et le stress lumineux.

- lors de l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer à 20 ou 34 ‰ de salinité, les bactéries évoluent vers un état viable non cultivable. Cet état rend peut-être plus difficile l'extraction plasmidique. De plus, Byrd et Colwell (1990) ont obtenu un nombre plus faible de copies plasmidiques dans les bactéries en dormance. Bien que les résistances aux antibiotiques soient conservées dans les bactéries cultivables obtenues après exposition à la lumière visible comme celles obtenues après incubation à l'obscurité, les bactéries non cultivables, plus endommagées par le stress lumineux, ont pu perdre leurs résistances et leurs plasmides surtout ceux de grandes tailles.

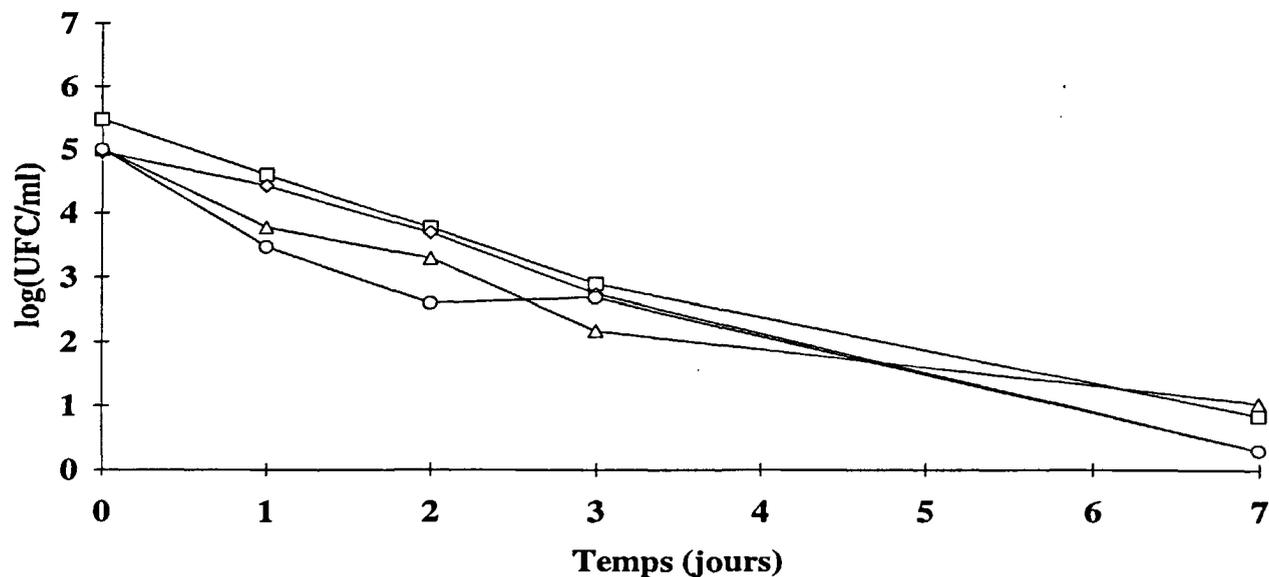


Figure 43 : Effet de la lumière visible sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101 dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité. Bactéries cultivables sur gélose Mueller Hinton (MH) (□), bactéries cultivables sur gélose MH + kanamycine (Δ), bactéries cultivables sur gélose MH + chloramphénicol (◇), bactéries cultivables sur gélose MH + triméthoprime (○) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

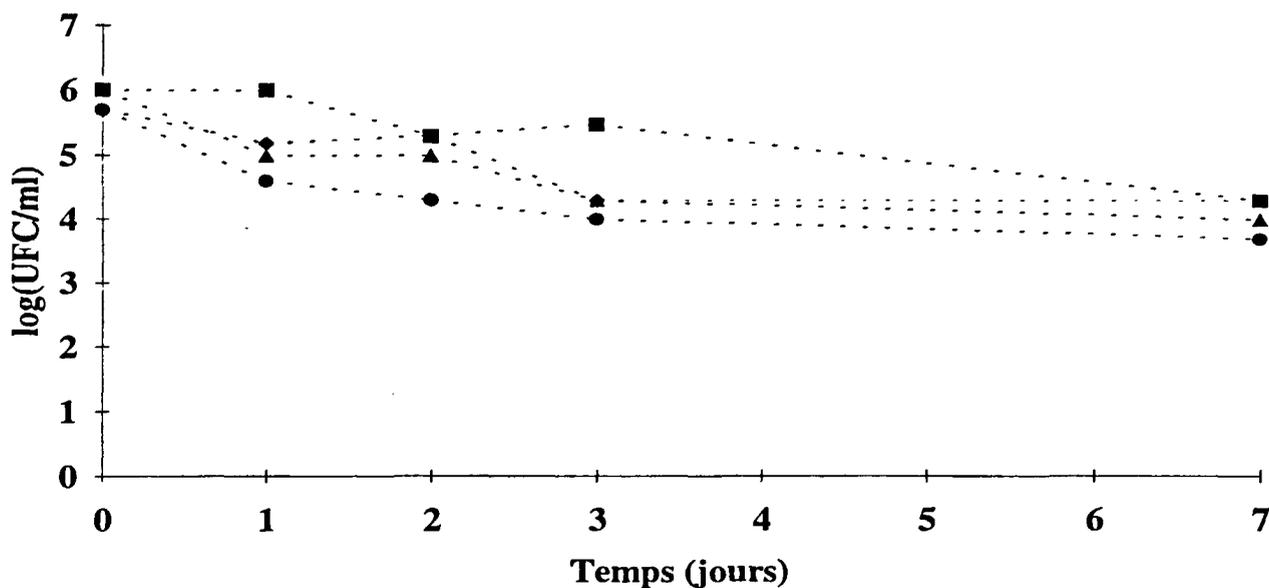


Figure 44 : Effet du séjour dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101. Bactéries cultivables sur gélose MH (■), bactéries cultivables sur gélose MH + kanamycine (▲), bactéries cultivables sur gélose MH + chloramphénicol (◆), bactéries cultivables sur gélose MH + triméthoprime (●).

Le petit plasmide (4 kb) se comporte différemment lors de l'exposition à la lumière (maintien pendant la durée de l'expérience dans l'eau à 20 ‰ de salinité et perte après 48 heures dans une eau à 34 ‰ de salinité). Ceci peut s'expliquer par un plus grand nombre de copies présentes dans les bactéries permettant plus longtemps sa visualisation sur le gel d'électrophorèse.

La lumière visible pourrait donc conduire à une diminution du nombre de copies plasmidiques dans les bactéries immergées dans l'eau de mer.

III-2-2 LES PROTEINES

III-2-2-1 Les protéines totales

Lorsque *E. coli* H10407 est en phase de croissance dans un milieu nutritif (bouillon trypticase soja) à 37°C, les protéines constituent la plus grande partie du poids sec cellulaire soit 52 mg/100 mg de poids sec. La mise en survie de *E. coli* dans l'eau de mer naturelle stérile pendant 72 h à 20 °C provoque une chute importante du taux de protéines totales (40 %). L'incubation à l'obscurité ou l'exposition à la lumière visible provoque la même chute du taux de protéines totales bactériennes. Gauthier *et al.* (1989), de même, ont montré que *E. coli* perdait jusqu'à 50 % de sa quantité initiale de protéines après un séjour de 4 à 5 jours dans l'eau de mer. Les bactéries, dans un milieu oligotrophe : eau de mer, dégradent certaines protéines pour pouvoir maintenir un certain métabolisme cellulaire et synthétiser d'autres protéines plus indispensables à sa survie (Kjelleberg *et al.*, 1987 ; Gauthier *et al.*, 1993). Par contre, l'exposition à la lumière visible ne conduit pas à une plus grande diminution du taux de protéines (observable par cette mesure globale).

III-2-2-2 Comparaison des profils protéiques par électrophorèse 1D entre exposition à la lumière visible et incubation à l'obscurité

Les premiers essais n'ont pas permis de mettre en évidence une perte ou une augmentation de certaines protéines lors de l'exposition à la lumière visible de *E. coli* dans l'eau de mer.

III-2-2-3 Rôle de la synthèse protéique

Afin d'étudier si les bactéries exposées à la lumière visible synthétisent des protéines pour lutter contre le stress lumineux, du chloramphénicol à la concentration de 100 µg.ml⁻¹ a été apporté dans l'eau de mer. A l'obscurité, le chloramphénicol ne modifie pas la survie des bactéries (fig. 45 et 46). Par contre, la perte de cultivabilité est plus importante à la lumière en présence de cet antibiotique aussi bien pour une bactérie possédant le facteur KatF, souche

parentale (MP180) que pour le mutant *katF* (UM122) (fig. 46 et 47). De plus, la perte de cultivabilité reste plus faible pour la souche sauvage même en présence de chloramphénicol que pour la bactérie *katF*.

La survie de *E. coli* au stress lumineux dépend donc de son état avant l'exposition à la lumière visible (présence ou absence du facteur KatF ; ceci confirme les résultats précédents (cf. II-1. rôle de l'état physiologique de la bactérie avant illumination)) et de la capacité à synthétiser des protéines (sensibilité accrue à la lumière visible des deux types de bactéries en présence de chloramphénicol). Une synthèse protéique semble donc indispensable pour lutter contre le stress lumineux mais les protéines dont la synthèse dépend du facteur sigma KatF ne sont pas les seules à être formées. L'action du chloramphénicol sur la synthèse protéique pourrait être confirmée en renouvelant ces expériences avec cette fois la rifampicine qui inhibe la transcription.

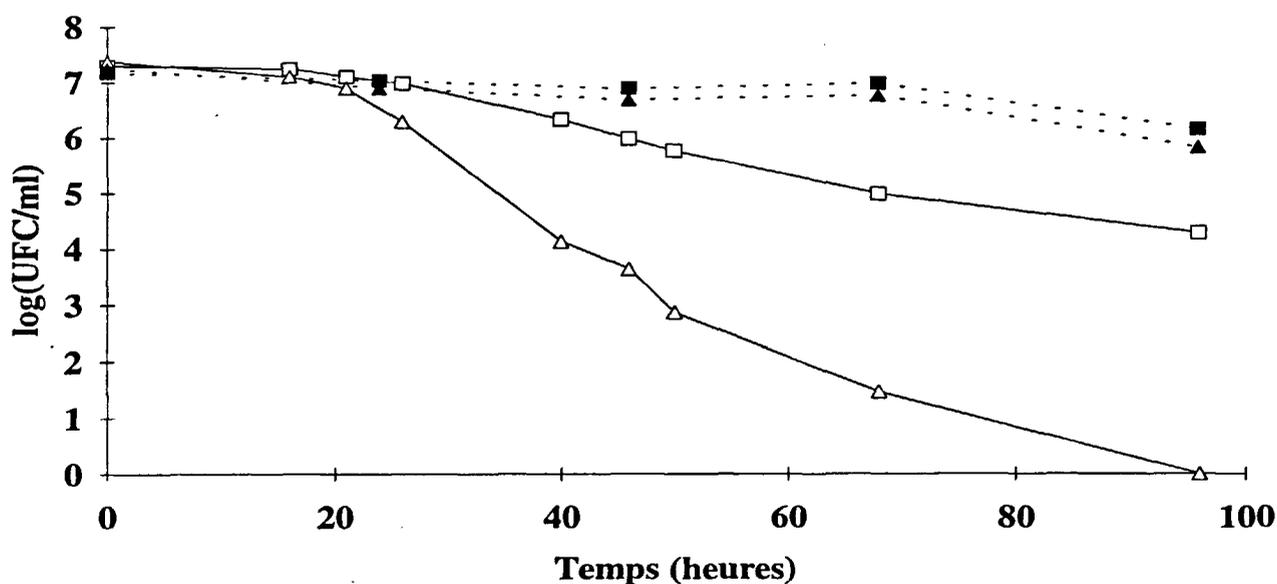


Figure 45 : Influence de la synthèse protéique sur la survie à la lumière visible de *E. coli* MP180 dans l'eau de mer par utilisation de chloramphénicol. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports (□, ■) ; apport de chloramphénicol à la concentration de $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Δ , \blacktriangle) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

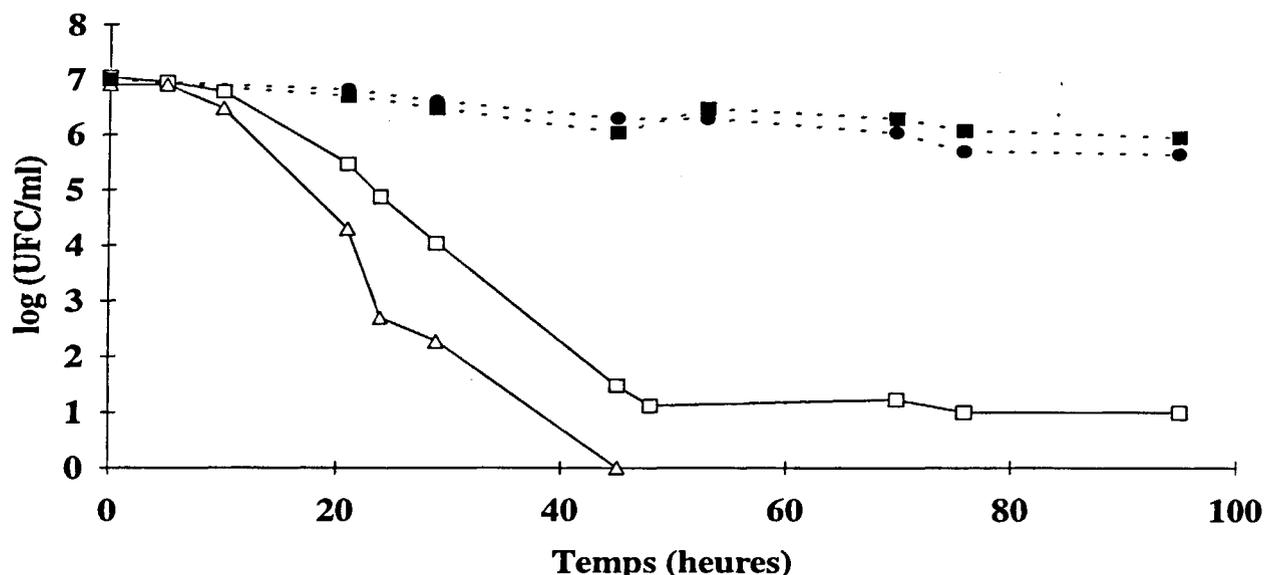


Figure 46 : Influence de la synthèse protéique sur la survie à la lumière visible de *E. coli katF* UM122 dans l'eau de mer par utilisation de chloramphénicol. Lumière (traits pleins et sigles vides) ; obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports (□, ■) ; apport de chloramphénicol à la concentration de $100 \mu\text{g.ml}^{-1}$ (Δ, ▲) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ environ).

III-2-2-4 Les protéines de défense : SOD et catalase

Après 1, 24, 72 heures ou 4 jours d'exposition à la lumière visible, les activités SOD et catalase sont du même ordre que celles retrouvées dans les bactéries incubées à l'obscurité (photo 5 et 6). La lumière visible ne semble donc pas altérer ces protéines.

III-2-2-5 Etude de l'activité métabolique en utilisant la ^3H méthyl-thymidine

Afin d'étudier l'activité métabolique des bactéries après exposition à la lumière visible, nous avons incubé les bactéries, après exposition 24 h ou 48 h à la lumière visible, avec de la ^3H méthyl-thymidine (étude effectuée au cours du DEA ; Gourmelon, 1991).

Une diminution importante de l'assimilation totale, de la synthèse de l'ADN ou des protéines est observée au cours du temps par les bactéries qu'elles soient en eau douce ou en eau de mer (fig. 47).

Les résultats obtenus par cette technique semblent montrer un effet différent de la lumière visible sur les bactéries selon le milieu (eau de mer ou eau douce) dans lequel elles sont immergées. En effet, dans l'eau de mer, la lumière visible ne semble pas accentuer la

perte de l'incorporation de la ^3H méthyl-thymidine dans les bactéries, au niveau de l'ADN ou des protéines. Dans l'eau douce, il existe un plus faible marquage de ces composés lors de l'apport de ^3H méthyl-thymidine dans les suspensions bactériennes après exposition à la lumière visible qu'après une incubation à l'obscurité.

Cette différence peut s'expliquer par le fait que, dans l'eau de mer, l'incorporation dans les bactéries est très faible et se rapproche du seuil de détection de cette technique et ne permet donc pas d'observer des variations faibles dues à l'exposition à la lumière visible. Par contre, dans l'eau douce, l'incorporation est plus importante et permet de mettre en évidence un effet de la lumière sur l'activité métabolique bactérienne.

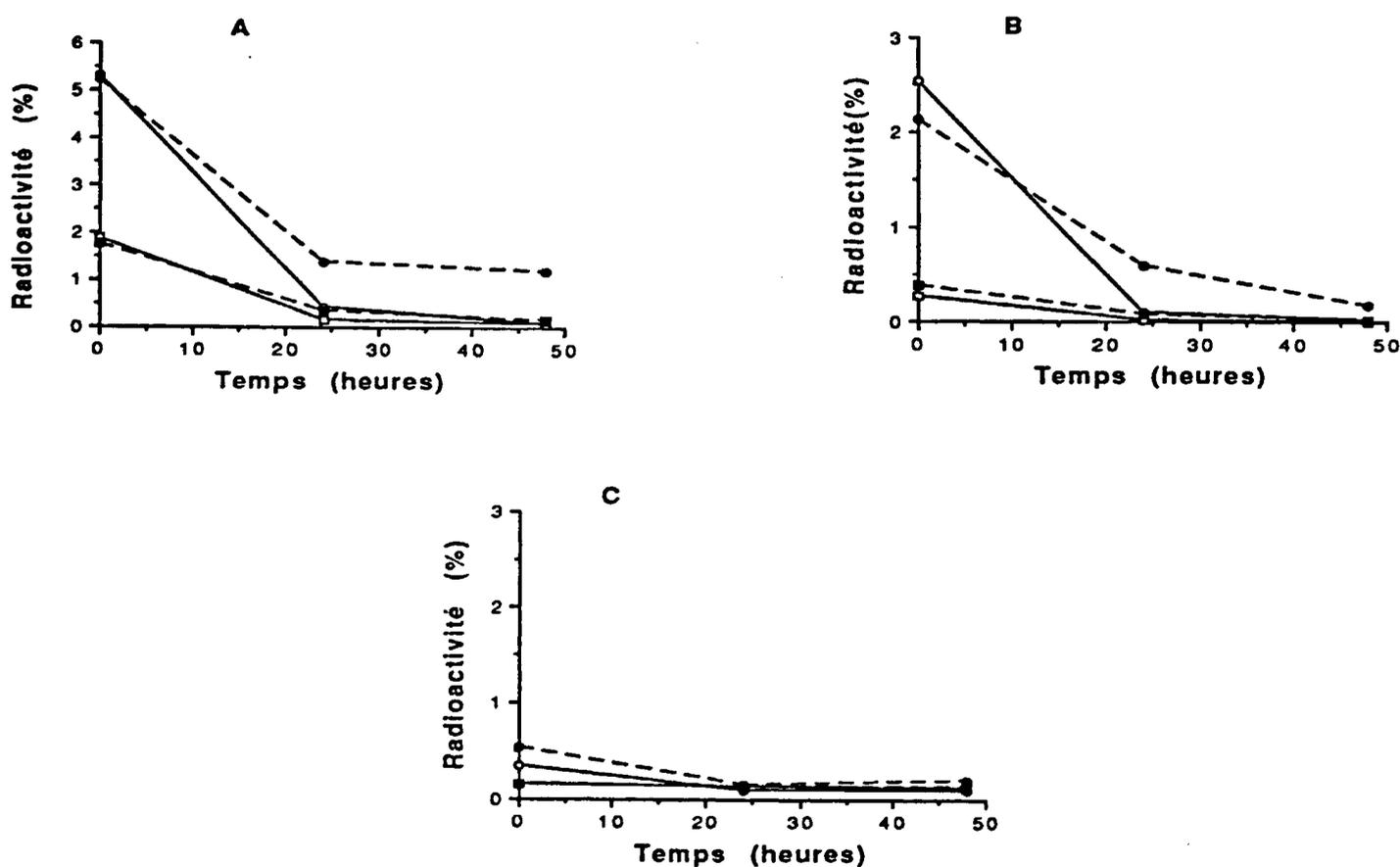


Figure 47 : Influence de la lumière visible sur l'assimilation totale (A), sur la synthèse de l'ADN (B), sur la synthèse des protéines (C) après incubation des bactéries avec la ^3H méthyl-thymidine (Gourmelon, 1991). Eau de mer - lumière (□) ; eau de mer - obscurité (■) ; eau douce - lumière (○) ; eau douce - obscurité (●) (intensité lumineuse : $500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ). Les résultats sont exprimés en % de radioactivité (désintégrations/mn) retrouvée dans 3 compartiments (bactéries totales, ADN et protéines) par rapport à la radioactivité de la ^3H méthyl-thymidine apportée initialement.

Barcina *et al.* (1990) observent que l'exposition à la lumière visible provoque en 48 heures une chute très importante de l'assimilation du glucose marqué dans l'eau de mer et dans l'eau douce alors qu'à l'obscurité, cette assimilation reste constante et est 20 fois supérieure dans l'eau douce par rapport à l'eau de mer. De plus, la lumière visible agit également au niveau d'autres systèmes de transports (de la glycine, du méthylthio- β -galactoside...) (Barran *et al.*, 1974 ; D'Aoust *et al.*, 1974 ; D'Aoust *et al.*, 1980).

La lumière visible conduirait donc à une diminution de l'activité métabolique bactérienne et à une atteinte des systèmes de transports membranaires, mis en évidence dans nos expériences en eau douce. L'eau de mer, en raison du stress osmotique qui modifie de façon importante les capacités de transports (Gauthier *et al.*, 1992a), masque des variations plus faibles dues à la lumière visible.

III-2-3 LA MEMBRANE ET LES ACIDES GRAS

L'effet de la lumière visible sur certains systèmes de transports a été abordé dans le paragraphe précédent (étude de l'activité métabolique en utilisant la ^3H méthylthymidine). Une autre cible potentielle de la lumière visible au niveau membranaire serait les acides gras.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM), des esters méthyliques des acides gras permet d'identifier les acides gras analysés par CPG couplée à une détection à ionisation de flamme (fig. 48). Cette étude a été effectuée au cours du DEA (Gourmelon, 1991).

Les principaux acides gras membranaires de *E. coli* retrouvés au cours de nos expériences sont également retrouvés dans d'autres souches de *E. coli* (Wilkinson, 1988) : les acides gras saturés (l'acide laurique $\text{C}_{12} : 0$, l'acide myristique $\text{C}_{14} : 0$, l'acide palmitique $\text{C}_{16} : 0$, l'acide stéarique $\text{C}_{18} : 0$), les acides gras mono-insaturés (l'acide palmitoléique $\text{C}_{16} : 1\text{w}7$, l'acide cis-vaccénique $\text{C}_{18} : 1\text{w}7$) et les acides gras cyclopropanoïques (l'acide cis 9-10 méthylène hexadécanoïque $\text{C}_{17} : 0\Delta$, l'acide cis 11-12 méthylène octadécanoïque ($\text{C}_{19} : 0^\circ\Delta$)).

Lors du passage des bactéries d'un milieu riche (BTS) où elles sont en phase de croissance à 37°C à un milieu pauvre, eau de mer, à 20°C , une augmentation de la proportion des acides gras cyclopropanoïques est observée. Parallèlement, une diminution de la proportion des acides gras mono-insaturés correspondants est constatée ; en effet, les acides gras cyclopropanoïques sont formés par une fixation du groupement méthylène provenant de

la S-adénosyl-méthionine au niveau de la double liaison de ces acides gras mono-insaturés surtout lors de l'entrée en phase stationnaire (Cronan, 1968 ; Cronan *et al.*, 1974) ; cette réaction est catalysée par la CFA synthétase (cyclopropane fatty acids synthetase). La synthèse de cette enzyme est, en partie, dépendante du facteur KatF (Wang et Cronan, 1994). Le taux d'acides gras cyclopropanoïques est plus important au cours de la phase stationnaire, lors d'une croissance à haute température, en milieu acide ou lorsque la quantité d'oxygène est faible dans le milieu (Knivett et Cullen, 1965 ; Cronan, 1968). L'augmentation du taux d'acides gras cyclopropanoïques lors du passage dans l'eau de mer peut s'expliquer par le fait que les bactéries passent en phase stationnaire et qu'elles subissent des stress par l'immersion en eau de mer : salinité, oligotrophie.

L'exposition à la lumière visible ne provoque pas de modification significative du profil des acides gras membranaires de *E. coli* et donc pas de diminution des acides gras mono-insaturés (tab. IV). Ces derniers auraient pu être modifiés préférentiellement par l'exposition à la lumière visible. En effet, ils sont plus facilement oxydables que les acides gras saturés.

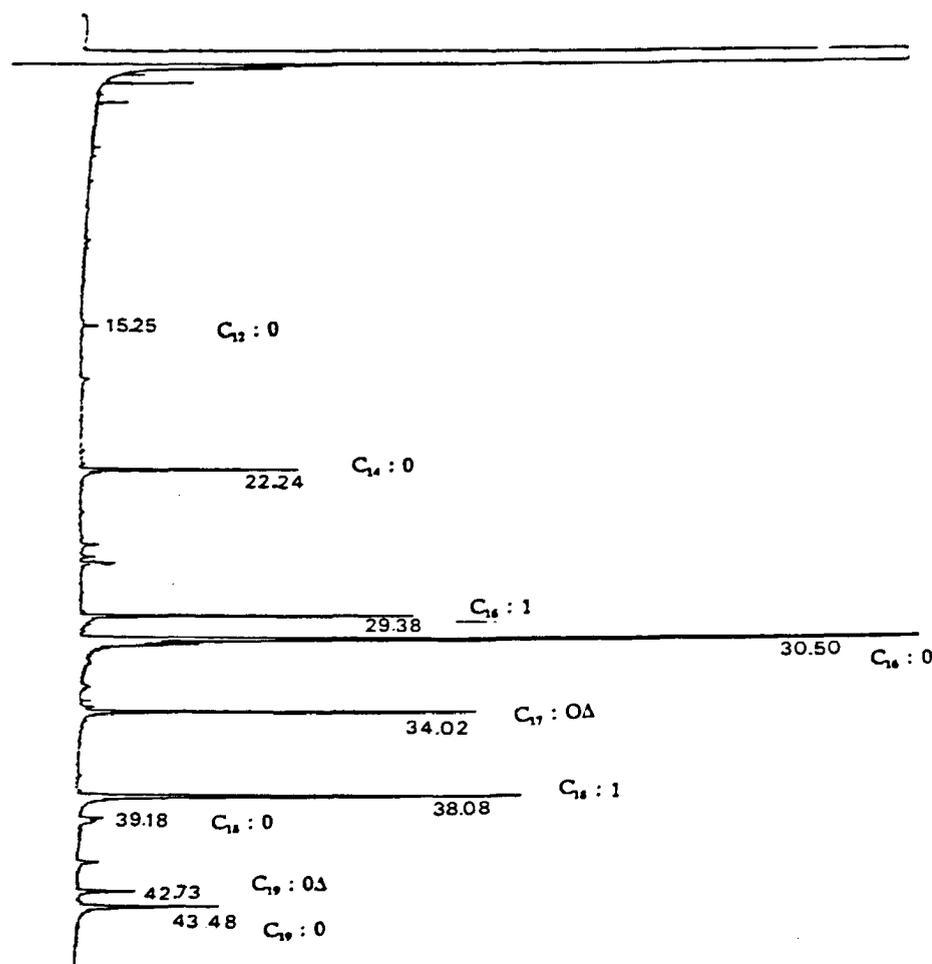


Figure 48 : Profil chromatographique des esters méthyliques des acides gras membranaires de *E. coli* H10407 (Gourmelon, 1991).

Tableau IV : Distribution des principaux acides gras membranaires de *E. coli* en phase de croissance dans un milieu riche (BTS), après 72 heures de survie dans l'eau de mer exposé à la lumière visible (EM Lum.), ou incubé à l'obscurité (EM Obs.) (intensité lumineuse : $500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ ; Gourmelon, 1991). Moyenne de 3 essais + 1 écart-type.

	Acides gras saturés				Acides gras mono-insaturés		Acides cyclopropanoïques	
	C ₁₂ : 0	C ₁₄ : 0	C ₁₆ : 0	C ₁₈ : 0	C ₁₆ : 1	C ₁₈ : 1	C ₁₇ : 0Δ	C ₁₉ : 0Δ
BTS	0,2 ± 0,05	4,9 ± 0,3	56,7 ± 2,6	0,6 ± 0,1	7,6 ± 0,6	16,4 ± 0,6	11,6 ± 1,6	1,9 ± 0,6
EM Lum	0,1 ± 0,05	5,4 ± 1,3	57,8 ± 2,8	0,7 ± 0	4,7 ± 1,	12,8 ± 2,1	14,7 ± 1,3	3,8 ± 1
EM Obs	0,1 ± 0,05	4,9 ± 1,4	58,1 ± 1,1	0,9 ± 0,1	5,1 ± 1,3	13,4 ± 2,1	13,9 ± 0,9	3,9 ± 0,6

En résumé, la lumière visible ne semble pas altérer les principaux acides gras membranaires de *E. coli* H10407. Toutefois, des modifications lipidiques plus subtiles peuvent exister.

CONCLUSION

Le but de ce travail était d'étudier l'action de la lumière visible, facteur important de la réduction de la survie des bactéries entériques en milieu marin.

Les entérobactéries dont *E. coli*, avant d'être exposées à la lumière solaire en milieu marin vont séjourner un certain temps dans les eaux usées. Au cours de ce séjour, elles vont pouvoir s'adapter à des conditions de vie différentes : diminution de la température, présence de polluants chimiques, apport de nutriments moins assimilables... (Dupray et Derrien, sous presse). Les bactéries vont évoluer progressivement vers un état stationnaire.

Nous avons mis en évidence dans nos expériences que les bactéries survivaient beaucoup mieux à la lumière visible lorsqu'elles étaient en phase stationnaire. Cette meilleure survie est due en partie au facteur KatF qui est un facteur sigma alternatif de la phase stationnaire qui contrôle la synthèse de nombreuses protéines. Nous avons tenté de déterminer quelle protéine régulée par ce facteur était responsable de cette protection. Pour cela, nous avons retenu les catalases HPI et HPII qui détruisent le peroxyde d'hydrogène, l'exonucléase III qui répare les dommages au niveau de l'ADN, la protéine Dps qui protège l'ADN par recouvrement et les enzymes de synthèse du tréhalose. Les catalases et la protéine Dps sont impliquées dans la protection par le facteur KatF. La suppression des autres protéines ne rend pas plus sensibles les bactéries à l'effet de la lumière visible dans l'eau de mer. La protection par KatF n'étant pas seulement due aux catalases et à la protéine Dps, le rôle protecteur vis-à-vis de la phototoxicité d'autres protéines connues ou non pour être régulées par ce facteur nécessiterait d'être étudié.

Nos résultats ont montré une implication de l'oxygène et des espèces oxygénées réactives (ROS) notamment l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène dans la phototoxicité. Les espèces oxygénées réactives seraient produites par un phénomène de photosensibilisation endogène. En effet, l'eau de mer utilisée dans nos expériences, est très pauvre en matière organique susceptible de contenir des photosensibilisateurs et certains piègeurs apportés, restant à l'extérieur des cellules, n'ont pas protégé les bactéries de la phototoxicité. De plus, la bactérie possède plusieurs composés susceptibles d'être des photosensibilisateurs endogènes : cytochromes, protéines de synthèse de l'hème... (Chamberlin et Mitchell, 1978 ; Whitlam et Codd, 1986). Dans certaines conditions, des composés photosensibilisateurs pourraient être accumulés dans les bactéries suite à une modification du métabolisme cellulaire. Par exemple, une accumulation de protoporphyrine ou d'intermédiaires de synthèse de l'ubiquinone explique la plus grande sensibilité à la lumière visible de certaines bactéries (mutants *visA* ou *visB*) (Miyamoto *et al.*, 1991 ; Nakahigashi *et al.*, 1992). Nous avons ainsi mis en évidence une meilleure survie des bactéries à la lumière visible dans l'eau de mer lorsque celles-ci étaient incapables de synthétiser l'acide

aminolévulinique, précurseur des intermédiaires de synthèse de l'hème (mutation *hemA*) tels que la protoporphyrine, par exemple.

Dans nos expériences, nous avons obtenu une potentialisation de la phototoxicité par la salinité : en effet, les bactéries sont beaucoup plus sensibles à la lumière visible dans une eau de mer que dans une eau douce. Cette plus grande toxicité de la lumière visible lorsque les bactéries sont en suspension dans l'eau de mer pourrait s'expliquer par une modification de certaines étapes cellulaires par le stress osmotique (et peut être également par le stress oligotrophique). Ce changement métabolique pourrait conduire à une accumulation de photosensibilisateurs dans les cellules qui seraient ainsi plus sensibles à la lumière visible.

Dans la bactérie elle même, des espèces oxygénées réactives peuvent donc être formées lors de l'exposition à la lumière visible. Cette formation pourrait être complétée par une production externe quand l'eau de mer naturelle contient des photosensibilisateurs tels que les substances humiques. En effet, en milieu naturel, une formation d' H_2O_2 , en absence de bactéries, a été mis en évidence (Cooper et Zika, 1983).

En plus de son action photosensibilisatrice dans le cas d'une eau naturelle et non filtrée, l'eau de mer augmente la sensibilité de *E. coli* à la lumière visible du fait du stress osmotique et du stress oligotrophique.

- La salinité pourrait conduire à une plus grande photosensibilisation suite à une modification du métabolisme cellulaire comme nous l'avons suggéré précédemment.

- Le manque de nutriments ne permet pas à la bactérie de mettre en place des systèmes de défense spécifiques contre la lumière visible. L'apport de composés assimilables par la bactérie, en faible quantité, dans l'eau de mer lui permet de mieux supporter le stress lumineux et de limiter la perte de cultivabilité ; cette protection est d'autant plus importante que les nutriments, sont apportés dès l'immersion des bactéries dans l'eau de mer. Quand l'apport est retardé de quelques heures, même sans qu'une perte de cultivabilité des bactéries soit observée, la survie est moins bonne lors du stress lumineux. Il semblerait que la lumière visible ait endommagé les cellules et que l'addition de nutriments en faible quantité ne permette pas de réparer totalement ces dommages.

- enfin, l'association des trois stress : lumineux, osmotique et oligotrophique fragilise la bactérie. Il semblerait que la bactérie, placée dans l'eau de mer, s'y adapte et supporte mieux ensuite le stress lumineux. En effet, nous avons mis en évidence une meilleure survie des bactéries à la lumière visible après un séjour de 48 heures dans l'eau de mer en absence de lumière.

Lorsque les bactéries sont exposées dans l'eau de mer à la lumière visible, elles évoluent, dans un premier temps, vers un état viable non cultivable. Bien qu'elles ne soient plus retrouvées par technique classique, elles possèdent encore une certaine activité métabolique. Puis, dans un deuxième temps, elles perdent cette capacité à assimiler des nutriments et à synthétiser des constituants membranaires. De plus, les bactéries perdent progressivement la capacité à réduire le CTC (au niveau des premières étapes de la chaîne respiratoire) lors de l'exposition à la lumière visible tandis que cette propriété se maintient à l'obscurité. D'après ces résultats, la lumière visible, par l'intermédiaire de la formation d'espèces oxygénées réactives pourrait donc endommager la chaîne respiratoire. De plus, la lumière visible conduirait également à une modification des transports membranaires mais d'une façon moins drastique que celle obtenue par le stress osmotique.

Parmi les cibles cellulaires atteintes par la lumière visible et les ROS, nous avons mis en évidence les ADN plasmidiques qui présentent un intérêt sanitaire. En effet, les *Escherichia coli* peuvent transférer des plasmides à d'autres bactéries dans les eaux côtières (Arturo-Loureiro, 1993). D'après nos résultats, la lumière visible conduirait à une diminution du nombre de copies de plasmides codant pour des résistances aux antibiotiques (et ceci surtout dans les bactéries non cultivables) tandis que les plasmides se maintiendraient en eau de mer à l'obscurité.

Enfin, des études *in situ*, en chambre à diffusion, dans des eaux littorales et dans des conditions différentes (température, salinité, éclairage), utilisant des mutants et les techniques mises en place dans cette thèse seraient une suite intéressante de ce travail et pourraient contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes liés à la photo-oxydation.

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE RENNES I

NOM et Prénom: GOURMELON Michèle

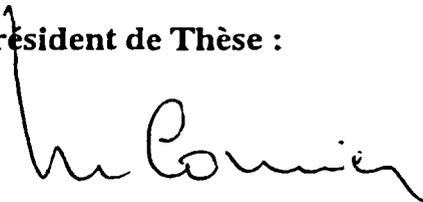
TITRE DE LA THESE

Etude de la lumière visible comme facteur limitant de la survie de *Escherichia coli* en milieu marin.

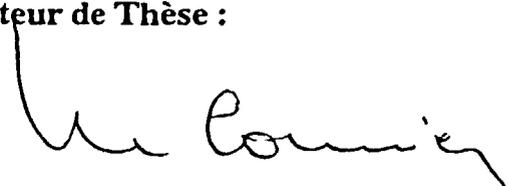
Rennes, le

Vu et permis d'imprimer

Le Président de Thèse :



Le Directeur de Thèse :



DE 195/Phie/4050

10 AVR. 1995

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie

Le Président de l'Université de RENNES I



M. CORMIER



J. LENFANT

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Al-Nabulsi I. et Gutierrez P.L., 1992. Photosensitization of MCF-7 cells with diaziquone using visible light : correlation with DNA strand breaks et free radical production. *Photochem. Photobiol.*, **56**, 201-209.

Aldea M., Garrido T., Hernández-Chico C., Vicente M. et Kushner S.R., 1989. Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *EMBO J.*, **8**, 3923-3931.

Alexander D.M. et St John A.C., 1994. Characterization of the carbon starvation-inducible and stationary phase-inducible gene *slp* encoding an outer membrane lipoprotein in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **11**, 1059-1071.

Almiron M., Link A., Furlong D. et Kolter R., 1992. A novel DNA binding protein with regulatory et protective roles in starved *E. coli*. *Genes & Dev.*, **6**, 2646-2654.

Altuvia S., Almiron M., Huisman G., Kolter R. et Storz G., 1994. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and σ^S in stationary phase. *Mol. Microbiol.*, **13**, 265-272.

Anderson I.C., Rhodes M. et Kator H., 1979. Sublethal stress in *Escherichia coli* : a function of salinity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 1147-1157.

Arana I., Muela A., Iriberry J., Egea L. et Barcina I., 1992. Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3903-3907.

Archer A.J. et Juven B.J., 1977. Destruction of coliforms in water and sewage by dye sensitized photo-oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1019-1022.

Archer A.J., Fischer E. et Manor I., 1994. Sunlight disinfection of domestic effluents for agricultural use. *Wat. Res.*, **28**, 1153-1160.

Arturo-Loureiro M., 1993. Contenu plasmidique chez *Escherichia coli* en station d'épuration et en milieu littoral. Thèse de Doctorat de l'Université de Bretagne Occidentale, 138 p.

Atlung T., Nielson A. et Hansen F.G., 1989. Isolation, characterization et nucleotide sequence of *appY*, a regulatory gene for growth phase dependent gene expression in *E. coli*. *J. bacteriol.*, **171**, 1683-1691.

Ayres P.A., 1977. Coliphages in sewage and the marine environment. Dans *Aquatic microbiology*, édité par Skinner F.A. et Shewan J.M., Academic Press, New York, 275-298.

Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J. et Egea L., 1989. Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 246-251.

Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J. et Egea L., 1990. Survival strategy of *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh et marine systems. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 189-198.

Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J. et Egea L., 1991. Role of protozoa in the regulation populations in seawater. *Marine Microbial Food Webs*, **5**, 179-187.

Barran L.R., D'Aoust J.Y., Labelle J.L., Martin W.G. et Schneider H., 1974. Differential effects of visible light on active transport in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **56**, 522-528.

Bellair J.T., Parr-Smith G.A. et Wallis I.G., 1977. Significance of diurnal variations in fecal coliform die-off rates in the design of ocean outfalls. *J. Water Poll. Control. Fed.*, **49**, 2022-2030.

Benov L.T. et Fridovich I., 1994. *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **269**, 25310-25314.

Birnboim H.L. et Doly J., 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513-1523.

Bligh E.G. et Dyer W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 912-917.

Bonnefont J.L., Martin Y.P. et Guiennet B., 1990. Etude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin. Quantification, facteurs impliqués. *Wat. Res.*, **24**, 267-273.

Bonnefont J.L., Martin Y., Troussellier M. et Cahet G., 1994. Modélisation du devenir des bactéries entériques en mer. Programme National d'Océanographie Côtière, Volet "Microbiologie sanitaire", 28 p.

Boos W., Ehmann U., Bremer E., Klein W., Middendorf A. et Posta P., 1987. Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high osmolarity growth conditions. *J. Biol. Chem.*, **262**, 13212-13218.

Boos W., Ehmann U., Forki H., Klein W., Rimnele M. et Posta P., 1990. Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**, 3450-3461.

Bravo J.M. et DeVicente A., 1992. Bacterial die-off from sewage discharged through submarine outfalls. *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 9-16.

Byrd J.J. et Colwell R.R., 1990. Maintenance of plasmids pBR322 and pUC8 in nonculturable *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2104-2107.

Cahet G., 1990. Rôle du compartiment bactérien dans la décomposition du matériel d'origine détritique au sein des écosystèmes côtiers. Rapport d'activité IFREMER.

Carlucci, A.F. et Pramer D., 1960. An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. II salinity, pH and nutrients. *Appl. Microbiol.*, **8**, 247-250.

- Carlioz A. et Touati D., 1986.** Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli* is superoxide dismutase necessary for aerobic life ? *EMBO J.*, **3**, 623-630.
- Chamberlin C.E. et Mitchell R., 1978.** A decay model for enteric bacteria in natural waters. Dans *Waters Pollution Microbiology*, édité par Mitchell R., Wiley-Interscience, New York, 325-348.
- Chang Y.Y., Wang A.Y. et Cronan J.E.Jr., 1994.** Expression of *Escherichia coli* pyruvate oxidase (PoxB) depends on the sigma factor encoded by the *katF* (*rpoS*) gene. *Mol. Microbiol.*, **11**, 1019-1028.
- Christman M.F., Morgan R.W., Jacobson S. et Ames B.N., 1985.** Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins on *Salmonella typhimurium*. *Cell*, **41**, 753-762.
- Clare D.A., Duong M.N., Darr F.A. et Fridovich I., 1984.** Effects of molecular oxygen on detection of superoxide radical with nitroblue tetrazolium et on activity strains for catalase. *Analyt. Biochem.*, **140**, 532-537.
- Cohen G.N. et Rickenberg H.V., 1956.** Concentration spécifique réversible des amino-acides chez *E. coli*. *Ann. Inst. Pasteur*, **91**, 693-720.
- Cooper W.J. et Zika R.G., 1983.** Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface et ground waters exposed to sunlight. *Science*, **220**, 711-712.
- Cooper W.J., Zika R.G., Petasne R.G. et Plane J.M.C., 1988.** Photochemical formation of H₂O₂ in natural waters exposed to sunlight. *Environ. Sci. Technol.*, **22**, 1156-1160.
- Cronan J.E.Jr., 1968.** Phospholipid alterations during growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **95**, 2054-2061.
- Cronan J.E.Jr., Nunn W.D. et Batchelor J.G., 1974.** Studies on the biosynthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **348**, 63-75.
- Csonka L.N., 1989.** Physiological et genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, **53**, 121-147.
- Curtis T.P., Mara D.D. et Silva S.A., 1992a.** Influence of pH, oxygen et humic substances on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1335-1343.
- Curtis T.P., Mara D.D. et Silva S.A., 1992b.** The effect of sunlight on faecal coliforms in ponds : implications for research et design. *Wat. Sci. Tech.*, **26**, 1729-1738.
- Curtis T.P. et Mara D.D., 1994.** The effect of sunlight on mechanisms for the die-off of faecal coliform bacteria in waste stabilization ponds. *Research Monographs in Tropical Public Health Engineering*, **1**, 1-94.
- D'Aoust J.Y., Giroux J., Barran L.R., Schneider H. et Martin W.G., 1974.** Some effects of visible light on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **120**, 799-804.

D'Aoust J.Y., Martin W.G., Giroux J. et Schneider H., 1980. Protection from visible light damage to enzymes and transport in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.*, **31**, 471-474.

Dassa J., Fsihi H., Marck C., Dion M., Kieffer-Bontemps M. et Boquet P.L., 1992. A new oxygen-regulated operon in *Escherichia coli* comprises the genes for a putative third cytochrome oxidase et for pH 2.5 acid phosphatase (*appA*). *Molec. Gen. Genet.*, **229**, 341-352.

Davies C.M. et Evinson L.M., 1991. Sunlight et the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 265-274.

Davies-Colley R.J., Bell R.G. et Donnison A.M., 1994. Sunlight inactivation of enterococci and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2049-2058.

Davies K.J.A. et Lin S.W., 1988. Degradation of oxidatively denaturated proteins in *Escherichia coli*. *Free Rad. Biol. Med.*, **5**, 215-223.

Deby C., 1991. La biochimie de l'oxygène. *La Recherche*, **22**, 56-64.

Demple B. et Harrison L., 1994. Repair of oxidative damage to DNA : enzymology an biology. *Ann. Rev. Biochem.*, **63**, 915-948.

Derrien A., Dupray E. et Pichon R., 1993. Halotolérance en milieux naturels : mécanismes et osmoprotecteurs accumulés par *Salmonella spp.* Programme National d'Océanographie Côtière, Volet "Microbiologie sanitaire", 36 p.

Díaz-Guerra L., Moreno F. et San Millán J.L., 1989. *appR* gene product activates transcription of microcin C7 plasmid genes. *J. Bacteriol.*, **171**, 2906-2908.

Dodet B., 1991. La chasse aux radicaux libres oxygénés. *Biofutur*, **5**, 23-32.

Dupray E., Baleux B., Bonnefont J.L., Guichaoua C., Pommepey M. et Derrien A., 1991. Apports en bactéries par les stations d'épuration. Dans *Le devenir des bactéries en zone littorale*. IFREMER. Actes de Colloques 11, "La mer et les rejets urbains". Bendor, 13-15 juin 1990, 81-88.

Dupray E. et Derrien A., 1992. Impact d'une station d'épuration sur la flore bactérienne (2ème partie). Contrat Lyonnaise des Eaux, 24 p.

Dupray E. et Derrien A. Influence du passage de *Salmonella spp.* et *E. coli* en eaux usées sur leur survie ultérieure en eau de mer. *Wat. Res.* (sous presse).

Dupray E., Derrien A. et Pichon, R., 1992. Etude des mécanismes d'halotolérance de *E. coli* et *Salmonella* en milieux naturels. Programme National d'Océanographie Côtière, Volet "Microbiologie sanitaire".

Eisenstark A., 1971. Mutagenic and lethal effects of visible and near-ultraviolet light on bacterial cells. *Adv. Genet.*, **16**, 167-198.

- Eisenstark A., Leven S. et Sak B.D., 1991. The role of KatF sigma factor [?] in recovery from near UV et other oxidative damages in *Escherichia coli*. Dans *Oxidative damage et repair*, édité par Davies K.J.A., Pergamon Press, Oxford, 25-30.
- Epstein J.H., 1976. The pathological effects of light on the skin. Dans *Free Radicals in Biology*, édité par Pryor W.A., Academic Press, New York, Vol. 2, 219-249.
- Evans D.G., Silver R.P., Evans D.J. (Jr), Chase D.J. et Gorbach S.L., 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infection and Immunity*, 12, 656-667.
- Fang F.C., Libby S.J., Buchmeier N.A., Loewen P.C., Swidata J., Harwood J. et Guiney D.G., 1992. The alternative a factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11978-11982.
- Farr S.B. et Kogoma K., 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, 55, 561-585.
- Farr S. B., Touati D. et Kogoma K., 1988. Effects of oxygen stress on membrane functions in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 170, 1837-1842.
- Faust M.A., Aotaky A.E. et Hargadon M.T., 1975. Effect of physical parameters on the *in situ* survival of *Escherichia coli* MC-6 in an estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 30, 800-806.
- Fee J.A., 1982. Is superoxide important in oxygen poisoning? *Trends in Biochemical Sciences*, 7, 84-86.
- Flohé L. et Ötting F., 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods in Enzymology*, 105, 93-104.
- Foote C.S., 1976. Photosensitized oxidation et singlet oxygen : consequences in Biological systems. Dans *Free Radicals in Biology*, édité par Pryor W.A., Academic Press, New York, Vol. 2, 85-134.
- Foote C.S., Shook F.C. et Aberkeli R.B. 1984. Characterization of singlet oxygen. *Methods in Enzymology*, 105, 36-47.
- Foote C.S., 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 54, 659.
- Fridovich I., 1975. Superoxide dismutase. *Annual review of Biochemistry*, 44, 147-159.
- Frustaci J.M. et O'Brian M.R., 1993. The *Escherichia coli* *visA* gene encodes ferrochelatase, the final enzyme of the heme biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.*, 175, 2154-2156.
- Fujioka R.S., Hashimoto H.M., Siwak E.B. et Young R.H.F., 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 690-696.

Gauthier M.J., Flatau G.N. et Clément R.L., 1992a. Mécanismes de l'halotolérance : transports des substrats nutritifs par *Escherichia coli* dans les conditions marines. Programme National d'Océanographie Côtière, volet "Microbiologie sanitaire", Rapport final 1992, 25 p.

Gauthier M.J., Flatau G.N., Clément R.L. et Munro P.M., 1992b. Sensitivity of *Escherichia coli* cells to seawater closely depends on their growth stage. *J. Appl. Bacteriol.*, **73**, 257-262.

Gauthier M.J., Munro P.M., Flatau G.N., Clément R.L. et Breittmayer V.A., 1993. Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries dans le milieu marin. *Mar. Life*, **3**, 1-18.

Gauthier M.J., Thomas P. et Munro P.M., 1989. Modifications de la structure des enveloppes et du contenu en protéines d'*Escherichia coli* en survie dans l'eau de mer. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 843-849.

Ghoul M., Bernard T. et Cormier M., 1990. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 551-554.

Giaever H.M., Styrvold O.B., Kaasen I. et Strøm A.R., 1988. Biochemical et genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 2841-2849.

González J.M., Iriberry J., Egea L. et Barcina I., 1990. Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1851-1857.

Gottschalk G., 1986. Biosynthesis of *Escherichia coli* cells from glucose. Dans *Bacterial Metabolism*, Springer-Verlag Ed., New York, 37-39.

Gougeon A., 1994. Evolution de l'entérotoxinogénèse chez les *Escherichia coli* en milieu marin. Thèse de doctorat de l'Université de Rennes I, 155 p.

Gourmelon M., 1991. Etude de la toxicité de la lumière visible sur *E. coli* en eau de mer : rôle des espèces réactives de l'oxygène. Rapport de DEA, Université de Rennes I, 39 p.

Gourmelon M., Cillard J. et Pommepuy M., 1994. Visible light damage on *Escherichia coli* in seawater : oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 105-112.

Grimes D.J., Atwell R.W., Brayton P.R., Palmer L.M., Rollins D.M., Roszak D.B., Singleton F.L., Tamplin M.L. et Colwell R.R., 1986. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiological sciences*, **3**, 11, 324-329.

Groat R.G., Schultz J.E., Zychlinsky E., Bookman A. et Matin A., 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli* : kinetics of synthesis et role in starvation survival. *J. Bacteriol.*, **168**, 486-493.

Guezennec J., 1986. La colonisation bactérienne des surfaces métalliques exposées en milieu marin : utilisation des lipides bactériens. Thèse de Doctorat de Paris.

Guillaud J.F., Pommepey M., Dupray E., Salomon J.C. et Thouvenin B., 1993. Urban wastewater discharge and bacteriological quality of receiving coastal waters : processes and modelling. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 223-226.

Halliwell B., 1994. Free radicals and antioxidants : a personal view. *Nutrition Reviews*, **52**, 253-265.

Halliwell B. et Gutteridge J.M.C., 1989. Protection against oxidants in biological systems. Dans *Free radicals in Biology and Medecine*, Clarenton Press, Oxford, 168.

Hanson R.S. et Phillips J.A., 1984. Chemical composition. Dans *Manual of methods for general bacteriology*. American Society for Microbiology Ed., U.S.A., 328-364.

Hassan H.M. et Fridovich I., 1979. Paraquat and *Escherichia coli*, mecanism of production of extra cellular superoxide radical. *J. Biol. Chem.*, **254**, 10846-10852.

Heimberger A. et Eisenstark A., 1988. Compartmentalization of catalases in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 392-397.

Hengge-Aronis R., 1993a. The role of *rpos* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli* K12. Dans *Starvation in bacteria*, édité par Kjelleberg S., Plenum Press, New York, 171-200.

Hengge-Aronis R., 1993b. Survival or hunger and stress : the role of *rpoS* in stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell*, **72**, 165-168.

Hengge-Aronis R., Klein W, Lange R., Rimmel M. et Boos W., 1991. Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* et are involved in stationary phase thermotolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **173**, 7918-7924.

Hobbie J. E., Daley R.J. et Jasper S., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228.

Hollander, 1943. Effects of long ultraviolet and short visible radiations (3500-4900 Å) on *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **46**, 531-541.

Houssin C., Eynard E., Schechter E. et Ghazi A., 1990. Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta*, **1056**, 76-84.

Imlay J.A. et Linn S., 1988. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, **240**, 1302-1309.

Iriberry J., Ayo B., Unanue M., Barcina I. et Egea L., 1993. Channeling of bacterioplanktonic production toward phagotrophic flagellates and ciliates under different seasonal conditions in a river. *Microb. Ecol.*, **26**, 111-124.

Ish-Horowicz D. et Burke J.F., 1981. Rapid and efficient cosmid vector cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2989-2993.

Ivanoff A., 1975. Propriétés optiques des eaux de mer. Dans *Introduction à l'océanographie : propriétés physiques et chimiques des eaux de mer*, Librairie Vuibert, Paris, 113-191.

Ivanova A., Miller C., Glinsky G. et Einsenstark A., 1994. Role of *rpoS* (*katF*) in *oxy-R*-independent regulation of hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **12**, 571-578.

Jenkins D.E., Chaisson S.A. et Matin A., 1990. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **172**, 2779-2781.

Jenkins D.E., Schultz J.E. et Matin A., 1988. Starvation induced cross-protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3910-3914.

Johnson F.S, Tsan M. et Grun A.E.S., 1976. Average latitudinal variation in ultra-violet radiation at the earth's surface. *Photochem. Photobiol.*, **23**, 178-188.

Kaplan J.C. et Delpesch M., 1989. Constance et variation du DNA. Dans *Biologie moléculaire et médecine*. Flammarion Médecine - Sciences Ed., Paris, 40-60.

Kapuscinski R.B. et Mitchell R., 1981. Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 670-674.

Kjelleberg S., Hermansson M., Mårdén P. et Jones G.W., 1987. The transient phase between growth et non growth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Ann. Rev. Microbiol.*, **41**, 25-49.

Knivett V.A. et Cullen J., 1965. Some factors affecting cyclopropane acid in *Escherichia coli*. *Biochem. J.*, **96**, 771-776.

Kogure K., Simidu V. et Taga N., 1979. A tentative direct microscopie method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420.

Kolter R., 1992. Life et death in stationary phase. *ASM News*, **58**, 75-79.

Kolter R., Siegele D.A. et Tormo A., 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. *Ann. Rev. Microbiol.*, **6**, 2443-2452.

Lange R. et Hengge-Aronis R., 1991a. Growth phase-regulated expression of *bolA* et morphology of stationary phase *Escherichia coli* cells is controlled by the novel sigma factor σ^S (RpoS). *J. Bacteriol.*, **173**, 4474-4481.

Lange R. et Hengge-Aronis R., 1991b. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 49-59.

Le Guyader F., Pommepuy M. et Cormier M., 1991. Implantation d'*Escherichia coli* en pilote expérimental et influence des compétitions de flore. *Can. J. Microbiol.*, **37**, 116-121.

Le Rudulier D. et Brouillard L., 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 152-159.

- Loewen P.C. et Triggs B.L., 1984.** Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **160**, 668-675.
- Loewen P.C., Switala J. et Triggs-Raine B.L., 1985.** Catalase HPI et HPII in *E. coli* are induced independently. *Arch. Biochem. Biophys.*, **243**, 144-149.
- Loewen P.C., Triggs B.L., George C.S. et Hrabarchuk B.E., 1985.** Genetic mapping of *katG*, a locus that affects synthesis of the bifunctional catalase-peroxidase hydroperoxidase I in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **162**, 661-667.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. et Randall R.J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- Mac Garrity J.T. et Armstrong J.B., 1981.** The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 835-840.
- Martin J.P., Burch J. et Burch P.E., 1988.** Oxygen radicals are generated by dye-mediated intracellular photooxydations. Dans *Oxy-radicals in Molecular Biology and Pathology*, édité par Liss A. R., 393-404
- Martin J.P. et Logsdon N., 1987.** Oxygen radicals are generated by dye-mediated intracellular photooxydations : a role for superoxide in photodynamic effects. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **256**, 39-49.
- Matin A., 1991.** The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5**, 3-10.
- Mc Cann M.P., Kidwell J.P. et Matin A., 1991.** The putative factor Kat F has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **173**, 4188-4194.
- McCord J.M. et Fridovich I., 1969.** Superoxide dismutase : an enzymatic function of erythrocyte. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049-6055.
- Measures J.C., 1975.** Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature*, **257**, 398-400.
- Mechsner K.I., Fleischmann T., Mason C.A. et Hamer G., 1991.** UV disinfection : short term inactivation and revival. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 339-342.
- Mesplé F., Troussellier M., Martin Y., Bonnefont J.L., 1994.** Effet de la prédation sur le devenir des bactéries entériques en mer. Modélisation. Programme National d'Océanographie Côtière, Volet "Microbiologie sanitaire", 51 p.
- Mitchell R.L. et Anderson I.C., 1965.** Photoinactivation of catalase in carotenoidless tissues. *Crop sciences*, **5**, 588-591.
- Mitchell R. et Chamberlin C., 1975.** Factors influencing the survival of enteric microorganisms in the sea : an overview. Dans *Proc. Int. Symp. on Discharge of Sewage from Oceans Outfalls*, Pergamon Press, Londres, 237-248.

Miyamoto K., Nakahigashi K., Nishimura K. et Inokuchi H., 1991. Isolation and characterization of visible light-sensitive mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.*, **219**, 393-398.

Miyamoto K., Nishimura K., Masuda T., Tsuji H. et Inokuchi H., 1992. Accumulation of protoporphyrin IX in light-sensitive mutants of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, **3**, 246-248.

Mopper K. et Zhou X., 1990. Hydroxyl radical photoproduction in the sea and its potential impact on marine processes. *Science*, **250**, 661-664.

Mopper K. et Zika R.G., 1987. Natural photosensitizers in sea water : riboflavin and its breakdown products. Dans *Photochemistry of environmental aquatic systems*, édité par Zika R.G. et Cooper W.J., American Chemical Society, Washington, 174-190.

Morel I., Lescoat G., Cillard J., Padeloup N., Brissot P. et Cillard P., 1990. Kinetic evaluation of free malondialdehyde and enzyme leakage as indexes of iron damage in rat hepatocyte cultures ; involvement of free radicals. *Biochem. Pharmacol.*, **39**, 1647-1655.

Moriarty D.J.W., 1986. Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. *Adv. Microb. Ecol.*, **9**, 245-292.

Mukhopadhyay S. et Schellohorn E.H., 1994. *J. Bacteriol.*, **176**, 2300-2307.

Mulvey M.R. et Loewen P.C., 1989. Nucleotide sequence of KatF of *Escherichia coli* suggest KatF protein is a novel σ transcription factor. *Nucl. Acids Res.*, **17**, 9979-9991.

Munro P. 1988. Modifications somatiques et adaptation d'*E. coli* en milieu marin. Thèse de Doctorat de l'Université d' Aix-Marseille II.

Munro P.M., Gauthier M.J., Breittmayer V.A. et Bongiovanni J., 1989. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2017-2024.

Nakahigashi K., Miyamoto K., Nishimura K. et Inokuchi H., 1992. Isolation and characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for biosynthesis of ubiquinone. *J. Bacteriol.*, **174**, 7352-7359.

Nakahigashi K., Nishimura K., Miyamoto K. et Inokuchi H., 1991. Photosensitivity of a protoporphyrin-accumulating light-sensitive mutant (*visA*) of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 10520-10524.

Neidhart F.C., 1987. Chemical composition of *Escherichia coli*. Dans *Escherichia coli and Salmonella typhimurium*, American society for microbiology Ed., Washington, 1, 3-6.

Nishimura K., Nakayashiki T. et Inokuchi H., 1993. Cloning and sequencing of the *hemE* gene encoding uroporphyrinogen III decarboxylase (UDP) from *Escherichia coli* K-12. *Gene*, **133**, 109-113.

Nyström T. et Neidhart F.C., 1994. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Mol. Microbiol.*, **11**, 537-544.

Olsén A., Arnqvist A., Hammar M., Sukupolvi S. et Normark S., 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **7**, 523-536.

Ouannes C. et Wilson T., 1968. *J. Am. Chem. Soc.*, **90**, 6257-6258.

Pearson J.L., 1972. The role of adenosine -3'-5'- cyclic monophosphate in the growth of bacteriophage lambda. *Virology*, **49**, 605-609.

Perroud B. et Le Rudulier D., 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli* : osmotic modulation. *J. Bacteriol.*, **161**, 393-401.

Petasne R.G. et Zika R.G., 1987. Fate of superoxide in coastal sea water. *Nature*, **325**, 516-518.

Pommeuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Cormier M. et Colwell R.R. Maintenance of enteropathogenicity by viable but non cultivable *E. coli* in seawater. Soumis à *Appl. Environ. Microbiol.*

Pommeuy M., Guillaud J.F., Dupray E., Derrien A., Le Guyader F. et Cormier M., 1992. Enteric bacteria survival factors. *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 93-103.

Pommeuy M., Guillaud J.F., Martin Y., Dupray E., Derrien A., L'Yavanc J. et Cormier M., 1991. Dans *Le devenir des bactéries en zone littorale*. IFREMER. Actes de Colloques 11, "La mer et les rejets urbains". Bendor, 13-15 juin 1990, pp. 89-100.

Pommeuy M., Derrien A., Le Guyader F., Menard D., Caprais M.P., Dubois E., Dupray E. et Gourmelon M. Microbial water quality on a Carribbean Island (Martinique). Dans *Coastal and Estuarine Studies, American Geophysical Union's* (sous presse).

Porter K.G. et Feig Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.

Raina S., Missiakas D., Baird L., Kumar S. et Georgopoulos C., 1993. Identification and transcriptional analysis of the *Escherichia coli* *htrE* operon which is homologous to *pap* and related pili operons. *J. Bacteriol.*, **175**, 5009-5021.

Reeve C.A., Amy P.S. et Matin A., 1984a. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, **160**, 1041-1046.

Reeve C.A., Bockman A.T. et Matin A., 1984b. Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **157**, 758-763.

Rhodes M.W. et Kator H.I., 1988. Survival of *Escherichia coli* et *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 2902-2907.

Rhodes M.W. et Kator H.I., 1990. Effects of sunlight and autochthonous microbiota on *Escherichia coli* survival in an estuarine environment. *Current Microbiology*, **21**, 65-73.

Robarts R.D., Wicks R.J. et Septon L.M., 1986. Spatial and temporal variations in bacterial macromolecule labeling with (methyl-³H) thymidine in a hypertrophic lake. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 1368-1373.

Robarts R.D. et Wicks R.J., 1989. (Methyl-³H) thymidine macromolecular incorporation and lipid labeling. Their significance to DNA labeling during measurements of aquatic bacterial growth rate. *Limnol. Oceanogr.*, **1**, 213-222.

Rod M.L., Alam K.Y., Cunningham P.R. et Clark D.P., 1988. Accumulation of trehalose by *Escherichia coli* K-12 at high osmotic pressure depends on the presence of amber suppressors. *J. Bacteriol.*, **170**, 3601-3610.

Rodriguez G.G., Phipps D. et Ishiguro K., 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. *Appl. Environ. Microb.*, **58**, 1801-1808.

Roper M.M. et Marshall K.C., 1978. Biological control agents of sewage bacteria in marine habitats. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **29**, 335-343.

Roszak D.B. et Colwell R.R., 1987a. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51**, 365-379.

Roszak D.B. et Colwell R.R., 1987b. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2889-2893.

Saito I. et Matsuura T., 1984. Formation of superoxyde ion via one-electron transfer from organic electron donors to singlet oxygen. Dans *Oxygen Radicals in Chemistry and Biology*, édité par De Gruyter W. *et al.*, Berlin, 535-538.

Salomon J.C. et Pommepuy M., 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). *Wat. Res.*, **24**, 983-994.

Sammartano L.J., Tuveson R.W. et Davenport R., 1986. Control of sensitivity to inactivation by H₂O₂ and broad-spectrum near-UV radiation by the *Escherichia coli* *katF* locus. *J. Bacteriol.*, **168**, 13-21.

Sandmann G., Woods W.S. et Tuveson R.W., 1990. Identification of carotenoids in *Erwinia herbicola* and in a transformed *Escherichia coli* strain. *FEMS Microbiol. Lett.*, **71**, 77-82.

Sak B.D., Eisenstark A. et Touati D., 1989. Exonuclease III et the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 3271-3275.

Schultz J.E., Latter G.I. et Martin A., 1988. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **170**, 3903-3909.

Siegele D.A. et Kolter R., 1992. Life after log. *J. Bacteriol.*, **174**, 345-348.

Sinaceur J., Ribiere C., Nordmann J. et Nordmann R., 1984. Desferrioxamine : a scavenger of superoxide radicals. *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1693-1694.

Sinton L.W., Davies-Colley R.J. et Bell R.G., 1994. Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2040-2048.

Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Jujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J. et Klenk D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85.

Sokal R.R. et Rohlf F.J., 1969. Biometry : San Francisco W.H. Fremand.

Solíc M. et Krstulovic N., 1992. Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Mar. Pollut. Bull.*, **24**, 411-416.

Sørensen S.J., 1991. Survival of *Escherichia coli* K12 in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **85**, 161-168.

Spence J., Cegielska A. et Georgopoulos C., 1990. *J. Bacteriol.*, **172**, 12, 7157-7166.

Spikes J.D., 1977. Photosensitization. *Photobiology*, **8**, 87-112.

Sprott G.D., Martin W.G. et Schneider J., 1976. Differential effects of near-UV and visible light on active transport and other membrane processes in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.*, **24**, 21-27.

Storz, G., Tartaglia L.A. , Farr S.B. et Ames B.N. , 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *TIG*, **6**, 363-368.

Sverdrup H.U., Johnson M.W. et Fleming R.H., 1970. Physical properties of sea water. Dans *The oceans : their physics, chemistry, and general biology*, édité par , Prentice-Hall inc.,

Szymczak R. et Waite T.D., 1988. Generation and decay of hydrogen peroxide in estuarine waters. *Aust. J. Freshwater Res.*, **39**, 289-299.

Tanaka K., Takayanasi Y., Jukita N., Ishihama A. et Takahashi H., 1993. Heterogeneity of principal sigma factor in *E. coli* : the *rpos* gene product, σ^{38} , is a principal sigma factor of RNA polymerase in stationary phase *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3511-3515.

Touati D., 1983. Cloning et mapping of the manganese superoxide dismutase gene (*sod A*) of *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.*, **155**, 1078-1087.

Touati D., 1989. The molecular genetics of superoxide dismutase in *E. coli*. An approach to understanding the biological role et regulation of SODs in relation to other elements of the defense system against oxygen toxicity. *Free Rad. Res. Comms.*, **8**, 1-9.

Touati E., Dassa E., Dassa J., Boquet P.L. et Touati D., 1991. Are *appR* et *katF* the same *Escherichia coli* gene encoding a new sigma transcription initiation factor ? *Res. Microbiol.*, **142**, 29-36.

Troussellier M., LeBaron P., Joux F. et Courties C., 1994. Caractérisation des états cellulaires au cours de la survie des entérobactéries dans le milieu marin. Programme National d'Océanographie Côtière, volet "Microbiologie sanitaire", 32 p.

Tuveson R.W., 1980. Genetic control of near UV sensitivity independent of excision deficiency (*uvrA6*) in *Escherichia coli* K12. *Photochem. Photobiol.*, **32**, 703-705.

Utsumi R., Kusafuta S., Nakayama T., Tanaka K., Takayanagi Y., Takahashi H., Noda M. et Kawamukai M., 1993. Stationary phase-specific expression of the *fic* gene in *Escherichia coli* K-12 is controlled by the *rpoS* gene product (σ^{38}). *FEMS Lett.*, **113**, 273-278.

Vidoczy T., 1992. Type I et type II photosensitized reactions : reasons for dispute. *J. Photochemistry and Photobiology. B : Biology*, **14**, 139-150.

Wang A.Y. et Cronan J.E.Jr., 1994. The growth phase-dependant synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS (KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Mol. Microbiol.*, **11**, 1009-1017.

Webb R.B. et Brown M.S., 1976. Sensitivity of strains of *Escherichia coli* differing in repair capacity to far UV, near UV and visible radiations. *Photochem. Photobiol.*, **24**, 425-432.

Webb R.B. et Brown M.S., 1979. Action spectra for oxygen dependent and independent inactivation of *Escherichia coli* WP2 from 254 to 460 nm. *Photochem. Photobiol.*, **29**, 407-409.

Webb R.B. et Malina M.M., 1970. Mutagenic effects of near ultraviolet and visible radiant energy on continuous cultures of *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.*, **12**, 457-468.

Whitelam G.C et Codd G.A., 1986. Damaging effects of light on microorganisms. Dans *Microbes in extreme environments*, édité par Herbert R.A. et Codd G.A., Academic Press, Londres, 129-169.

Wilkinson S.G. 1988. Dans *Microbiol. Lipids* , édité par Rattedge C. et Wilkinson S.G., Academic Press, Londres, Vol. 1, 307-322.

Williams M.D., Ouyang T.X. et Flickinger M.C., 1994. Starvation-induced expression of SspA and SspB : the effects of a null mutation in *sspA* on *Escherichia coli* protein synthesis and survival during growth and prolonged starvation. *Mol. Microbiol.*, **11**, 1029-1043.

Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Atwell R.W., Grimes D.J. et Colwell R.R., 1982. Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, **8**, 313-323.

ABBREVIATIONS UTILISEES

ADN :	Acide desoxyribonucléique
AODC :	Acridine Orange Direct Count
ARN :	Acide ribonucléique
BCA :	Acide bicinchoninique
BET :	Bromure d'éthydiuim
BSA :	Sérum albumine bovine
BTS :	Bouillon Trypticase Soja
CAT :	Catalase
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
COD :	Carbone organique dissous
CPG/SM :	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse
CPG :	Chromatographie en phase gazeuse
CTC :	Cyanoditolyt tétrazolium
DAPI :	Diamidinophénylindole
DMDS :	Diméthyl disulfure
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPS :	DNA binding protein from starved cells
DVC :	Direct Viable Count
E :	Einstein
EDTA :	Ethylene-diamine-tetra-acetic acid
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FLB :	Fluorescence-labeled bacteria
FMN :	Flavine mononucléotide
FPG :	Formamido-pyrimidine DNA glycosylase
GB :	Glycine bétaine
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
LB :	Luria Bertani
M63 :	Milieu minimum
NAD :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH :	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBT :	Nitrobleu de tétrazolium
O ₂ ⁻ :	Anion superoxyde
¹ O ₂ :	Oxygène singulet
OH° :	Radical hydroxyle
ROS :	Reactive oxygen species
Sens :	Photosensibilisateur
¹ sens :	Sensibilisateur à l'état singulet

³sens :	Sensibilisateur à l'état triplet
RMN :	Resonance magnétique nucléaire
SOD :	Superoxyde dismutase
SDS :	Sodium lauryl sulfate
TCA :	Acide trichloro-acétique
T90 :	Temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus cultivables
UFC :	Unité Formant Colonie
UV :	Ultra-violet
UV-A :	320-400 nm
UV-B :	290-320 nm
UV-C :	200-290 nm

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Variation du coefficient d'atténuation de l'eau pure (courbe 1), d'une eau du large filtrée (courbe 2) et d'une eau côtière filtrée (courbe 3). D'après Clarke et James (1939) repris par Ivanoff (1975).

Figure 2 : Spectre lumineux des néons fluorescents utilisés dans l'armoire thermostatée : Lumière de jour (Claude).

Figure 3 : Spectre lumineux des néons fluorescents utilisés dans l'incubateur New Brunswick : Lumilux de luxe 32 (Osram).

Figure 4 : Protocole expérimental appliqué à l'incorporation de ^3H méthyl-thymidine dans les bactéries.

Figure 5 : Protocole d'extraction des acides gras membranaires de *E. coli* (d'après Guezennec, 1986).

Figure 6 : Survie de *E. coli* H10407, en phase exponentielle, dans l'eau de mer artificielle avec exposition à la lumière visible (A) et incubation à l'obscurité (B) par quatre techniques de numérations différentes.

Figure 7 : Survie de *E. coli* MP180, dans l'eau de mer, exposé à la lumière visible, selon la phase de croissance.

Figure 8 : Effet de la mutation *katF* sur la survie de *E. coli* en début de phase stationnaire, dans l'eau de mer, exposé à la lumière visible.

Figure 9 : Effet de la mutation *katF* sur la survie de *E. coli* en phase exponentielle, dans l'eau de mer, exposé à la lumière visible.

Figure 10 : Effet de la mutation *katE* (catalase HP_{II}) sur la sensibilité à la lumière visible de *E. coli* en début de phase stationnaire dans l'eau de mer.

Figure 11 : Effet de la mutation *katE* (catalase HP_{II}) et *katG* (catalase HP_I) sur la sensibilité à la lumière visible de *E. coli* en début de phase stationnaire dans l'eau de mer.

Figure 12 : Effet de la mutation *xthA* (exonucléase III) sur la sensibilité à la lumière visible de *E. coli* dans l'eau de mer.

Figure 13 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau de mer de *E. coli* déficient en protéine Dps.

Figure 14 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau de mer de *E. coli* incapable de synthétiser du tréhalose.

Figure 15 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau douce de *E. coli* incapable de synthétiser du tréhalose.

Figure 16 : Effet de l'apport de nutriments sur la survie de *E. coli* H10407 exposé à la lumière visible dans l'eau de mer.

Figure 17 : Effet de l'apport de nutriments sur la survie en mer de *E. coli* MP180 (A) et *E. coli* UM122 *katF* (B) exposés à la lumière visible.

Figure 18 : Effet de l'apport de nutriments (milieu M63 glucosé à la concentration de 1%) à différents temps sur la survie de *E. coli* MP180 dans l'eau de mer exposé à la lumière visible.

Figure 19 : Effet de la salinité de l'eau sur la survie de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible.

Figure 20 : Effet du milieu (eau de mer ou eau douce) sur la survie de *E. coli* MC4100 (A) et *E. coli* RH90 *katF* (B) exposés à la lumière visible.

Figure 21 : Effet du milieu (eau de mer et eau douce) sur l'assimilation totale de ^3H méthylthymidine, la synthèse d'ADN et la synthèse de protéines.

Figure 22 : Effet de l'apport de glycine bêtaïne sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer exposé à la lumière visible (A) ou incubé à l'obscurité (B).

Figure 23 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 (possédant le facteur KatF) exposé à la lumière visible pendant 4 jours dans l'eau de mer avec apport de milieu trypticase soja (à 10 %) à 48 heures.

Figure 24 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 après 4 jours dans l'eau de mer à l'obscurité avec apport de milieu trypticase soja (à 10 %) à 48 heures.

Figure 25 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 exposé à la lumière visible pendant 4 jours dans l'eau de mer avec apport de glucose ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) à 48 heures.

Figure 26 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 après 4 jours dans l'eau de mer à l'obscurité avec apport de glucose ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) à 48 heures.

Figure 27 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer avec apport de milieu trypticase soja à 24 heures.

Figure 28 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* UM122 *katF* incubé à l'obscurité dans l'eau de mer avec apport de milieu trypticase soja à 24 heures.

Figure 29 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible pendant 4 jours dans l'eau de mer avec apport de glucose ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) à 24 heures.

Figure 30 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* UM122 *katF* après 4 jours dans l'eau de mer à l'obscurité avec apport de glucose ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) à 24 heures.

Figure 31 : Effet d'une pré-incubation dans l'eau de mer artificielle à l'obscurité sur la survie de *E. coli* H10407 (en phase exponentielle) exposé à la lumière visible en eau de mer.

Figure 32 : Effet d'une exposition de l'eau de mer naturelle à la lumière visible avant apport de bactéries sur la survie ultérieure de *E. coli* H10407.

Figure 33 : Influence de l'oxygène sur la survie de *E. coli* H10407 exposé à la lumière visible dans l'eau de mer naturelle.

Figure 34 : Influence des piègeurs de l'oxygène singulet sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible.

Figure 35 : Effet de la lumière sur *E. coli fpg uvrA* sensible à l'oxygène singulet dans l'eau de mer (en phase stationnaire).

Figure 36 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en superoxyde dismutase dans l'eau de mer.

Figure 37 : Influence de la superoxyde dismutase (SOD) et de la catalase (CAT) sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible.

Figure 38 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en catalase dans l'eau de mer.

Figure 39 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* déficient en catalases HPI et HPII en phase exponentielle dans l'eau de mer.

Figure 40 : Influence des piègeurs du radical hydroxyle sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible.

Figure 41 : Influence de la desferrioxamine B (Desferal[®]) sur la survie de *E. coli* H10407 dans l'eau de mer naturelle exposé à la lumière visible.

Figure 42 : Effet de la mutation *hemA* (absence de synthèse d'acide aminolévulinique) sur la sensibilité de *E. coli* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer artificielle.

Figure 43 : Effet de la lumière visible sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101 dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité.

Figure 44 : Effet du séjour dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101.

Figure 45 : Influence de la synthèse protéique sur la survie à la lumière visible de *E. coli* MP180 dans l'eau de mer par utilisation de chloramphénicol.

Figure 46 : Influence de la synthèse protéique sur la survie à la lumière visible de *E. coli* UM122 *katF* dans l'eau de mer par utilisation de chloramphénicol.

Figure 47 : Influence de la lumière visible sur l'assimilation totale (A), sur la synthèse de l'ADN (B), sur la synthèse des protéines (C) après incubation des bactéries avec la ³H méthylthymidine.

Figure 48 : Profil chromatographique des esters méthyliques des acides gras membranaires de *E. coli* H10407.

en annexe :

Figure 49 : Effet du milieu (eau de mer naturelle et eau douce) sur la survie de *E. coli* H10407 exposé à la lumière visible.

Figure 50 : Effet de l'apport de nutriments après 48 heures sur la survie de *E. coli* MP180 exposé à la lumière visible dans l'eau de mer artificielle.

Figure 51 : Effet de l'apport de nutriments après 24 heures sur la survie de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer artificielle.

Figure 52 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *E. coli* MP180 exposé à la lumière visible pendant 4 jours dans l'eau de mer sans apport de nutriments.

Figure 53 : Spectre RMN-¹H d'un extrait de *E. coli* MP180 incubé à l'obscurité pendant 4 jours dans l'eau de mer sans apport de nutriments.

Figure 54 : Spectre RMN-¹H du tréhalose utilisé comme standard (Derrien *et al.*, 1993).

Figure 55 : Spectre RMN-¹H de l'acide glutamique utilisé comme standard (Derrien *et al.*, 1993).

Figure 56 : Spectre RMN-¹H de la glycine bêtaïne utilisée comme standard (Derrien *et al.*, 1993).

Figure 57 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau de mer de *E. coli* déficient en protéine RecA.

Figure 58 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* HB101 possédant trois plasmides dans l'eau de mer artificielle à 20 ‰ ou 34 ‰ de salinité.

Figure 59 : Effet de la lumière visible sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101 dans l'eau de mer artificielle à 20 ‰ de salinité.

Figure 60 : Effet du séjour dans l'eau de mer artificielle à 20 ‰ de salinité à l'obscurité sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101.

Figure 61 : Effet de la lumière visible sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101 dans l'eau de mer naturelle.

Figure 62 : Effet du séjour dans l'eau de mer naturelle à l'obscurité sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101.

Tableau I : Souches bactériennes utilisées.

Tableau II : Programmation de la température du four et du détecteur.

Tableau III : Sensibilité à la lumière visible de *E. coli* déficient en un système de protection de l'ADN chromosomique (Dps) ou de réparation des lésions au niveau de l'ADN chromosomique (RecA, Fpg UvrA ou exonucléase III) par rapport à celle de leur souche parentale respective.

Tableau IV : Distribution des principaux acides gras membranaires de *E. coli* en phase de croissance dans un milieu riche (BTS), après 72 heures de survie dans l'eau de mer exposé à la lumière visible (EM Lum.), ou incubé à l'obscurité (EM Obs.).

Photo 1 : Visualisation des bactéries par coloration à l'acridine orange au microscope à épifluorescence.

Photo 2 : Visualisation des bactéries viables par la technique du direct viable count (DVC) après coloration à l'acridine orange au microscope à épifluorescence.

Photo 3 : Visualisation des bactéries ayant une activité respiratoire par réduction du CTC en critaux rouges de CTC-formazan et des bactéries totales par coloration au DAPI au microscope à épifluorescence.

Photo 4 : Aspect des colonies bactériennes sur gélose LB obtenues après exposition à la lumière visible de *E. coli* dans l'eau de mer. A : après exposition à la lumière visible ; B : après incubation à l'obscurité.

Photo 5 : Activité SOD chez *E. coli* MP180 dans l'eau de mer artificielle exposé à la lumière visible durant 1 heure (a), 24 heures (c), 3 jours (e) ou incubé à l'obscurité durant 1 heure (b), 24 heures (d), 3 jours (f). MP180 dans le milieu LB (g), UM122 *katF* dans le milieu LB (h).

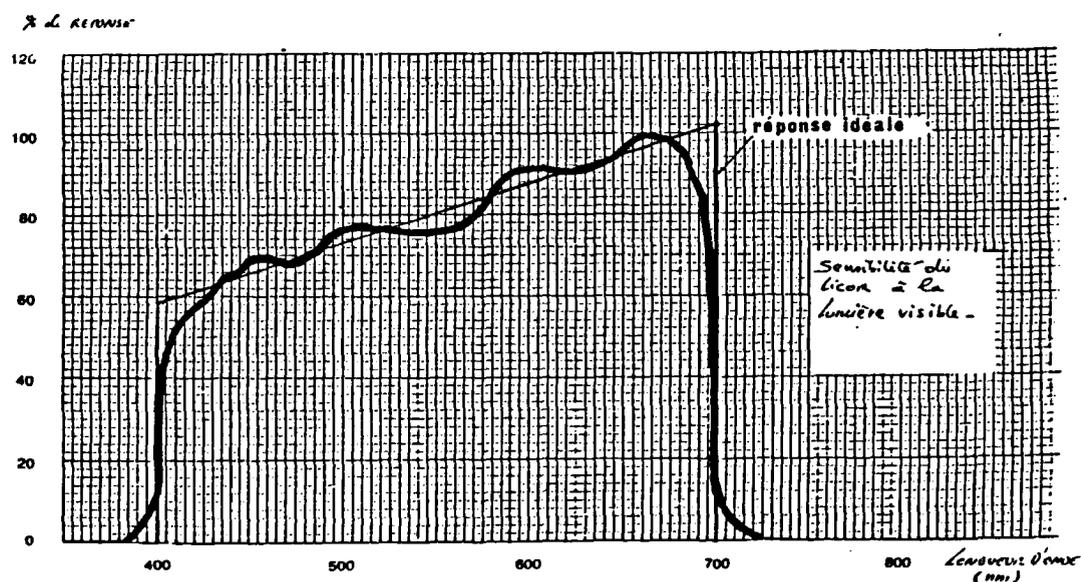
Photo 6 : Activité catalase chez *E. coli* MP180 dans l'eau de mer artificielle exposé à la lumière visible durant 1 heure (a), 24 heures (c), 3 jours (e) ou incubé à l'obscurité durant 1 heure (b), 24 heures (d), 3 jours (f). MP180 dans le milieu LB (g), UM122 *katF* dans le milieu LB (h).

Photo 7 : Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides RP1, R388, pUB824 contenus dans la souche HB101 après exposition à la lumière visible dans l'eau de mer à 20 ‰ de salinité.

Photo 8 : Electrophorèse en gel d'agarose des plasmides RP1, R388, pUB824 contenus dans la souche HB101 après exposition à la lumière visible dans l'eau de mer à 34 ‰ de salinité.

ANNEXES

Annexe 1 : Sensibilité du Licor à la lumière visible.



Annexe 2 : Composition des milieux de culture.

Bouillon trypticase soja doux :

- Hydrolysât tryptique de caséine	17	g.l ⁻¹
- Peptone papainique de soja	5	g.l ⁻¹
- NaCl	5	g.l ⁻¹
- Phosphate bipotassique	2,5	g.l ⁻¹
- Glucose	5	g.l ⁻¹

Bouillon Luria Bertani :

- tryptone	10	g.l ⁻¹
- NaCl	10	g.l ⁻¹
- extrait de levure	5	g.l ⁻¹

Annexe 3 :

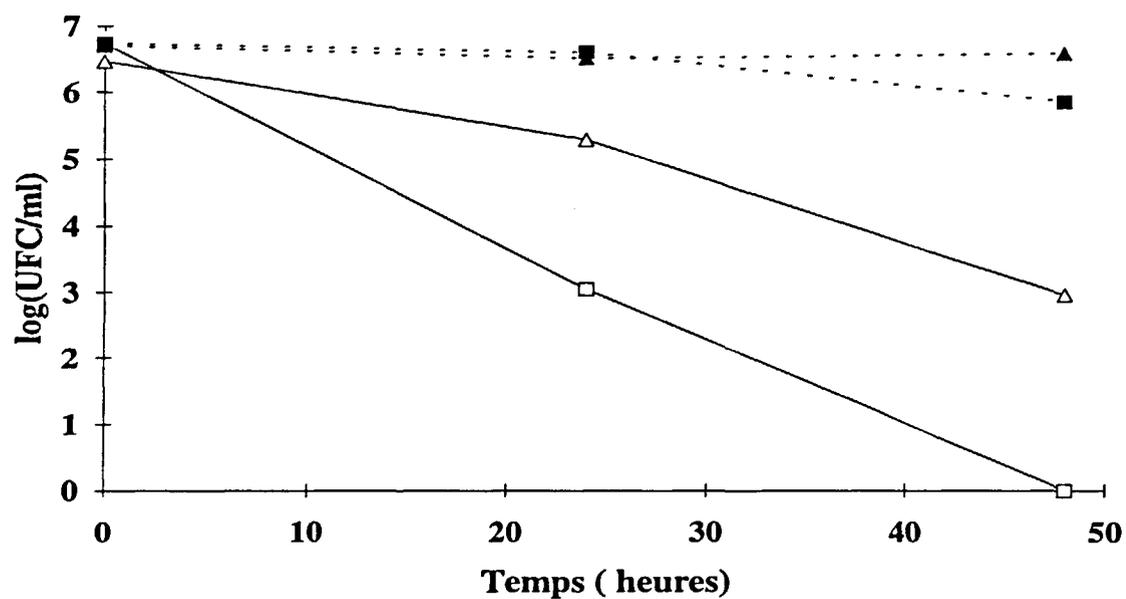


Figure 49 : Effet du milieu (eau de mer naturelle et eau douce) sur la survie de *E. coli* H10407 exposé à la lumière visible. Lumière (traits pleins et sigles vides). obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Eau de mer (\square , \blacksquare), eau douce (Δ , \blacktriangle) (intensité lumineuse : $500 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

Annexe 4 :

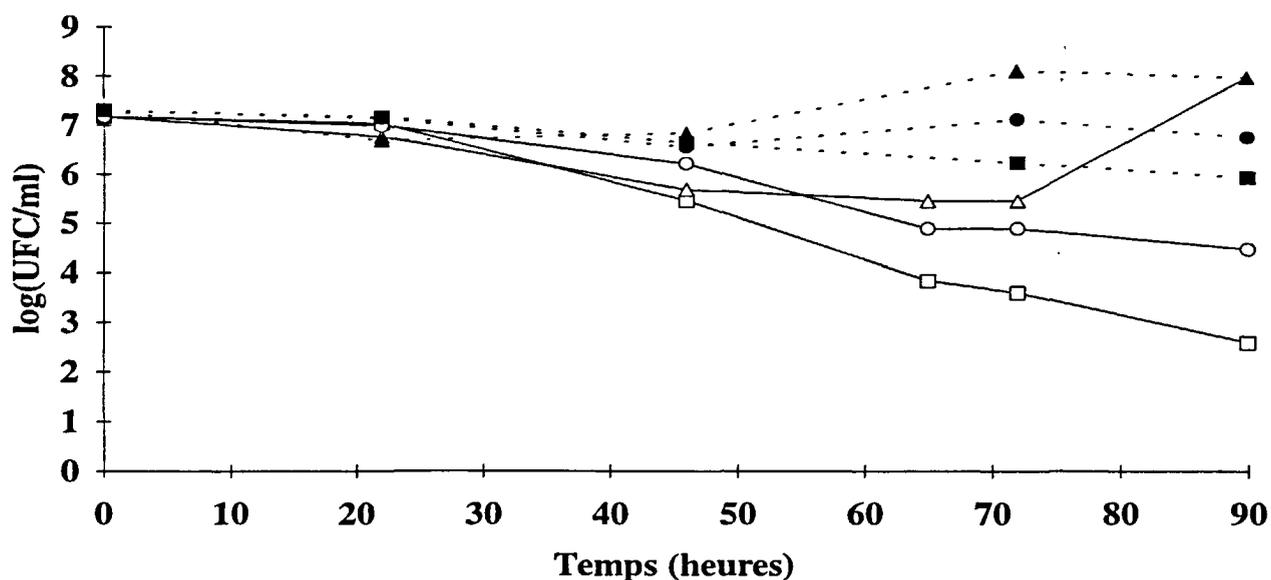


Figure 50 : Effet de l'apport de nutriments après 48 heures sur la survie de *E. coli* MP180 exposé à la lumière visible dans l'eau de mer artificielle. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports (□, ■); apport de glucose ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) (○, ●); apport de bouillon trypticase soja à 10 % (Δ, ▲) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ).

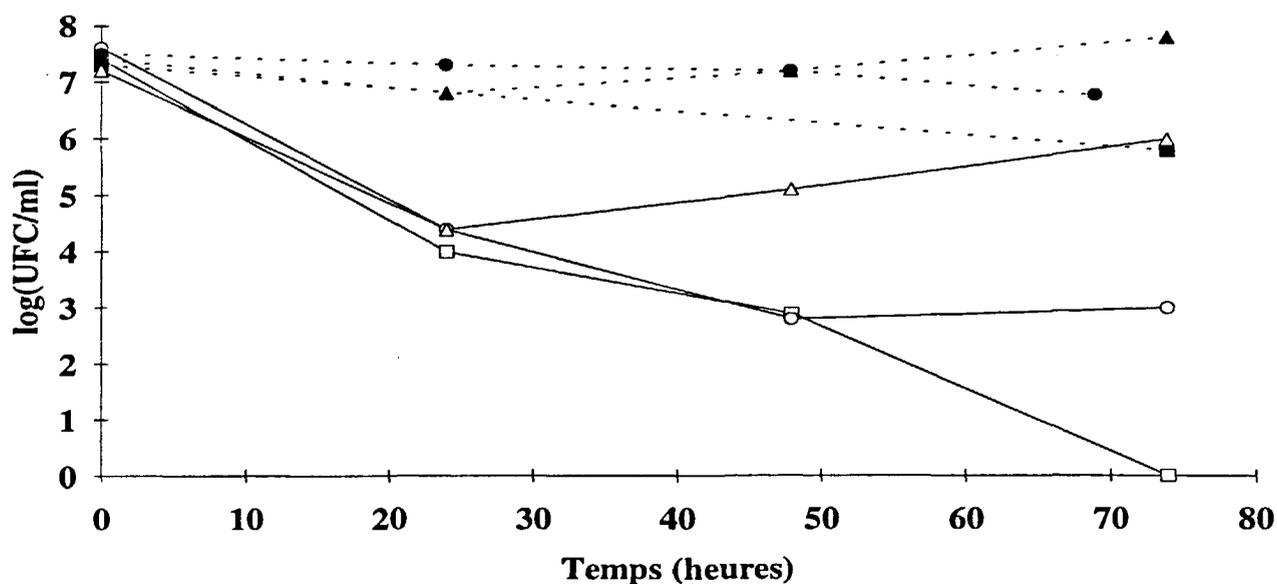


Figure 51 : Effet de l'apport de nutriments après 24 heures sur la survie de *E. coli* UM122 *katF* exposé à la lumière visible dans l'eau de mer artificielle. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Sans apports (□, ■); apport de glucose ($0,2 \text{ g.l}^{-1}$) (○, ●); apport de bouillon trypticase soja à 10 % (Δ, ▲) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ environ).

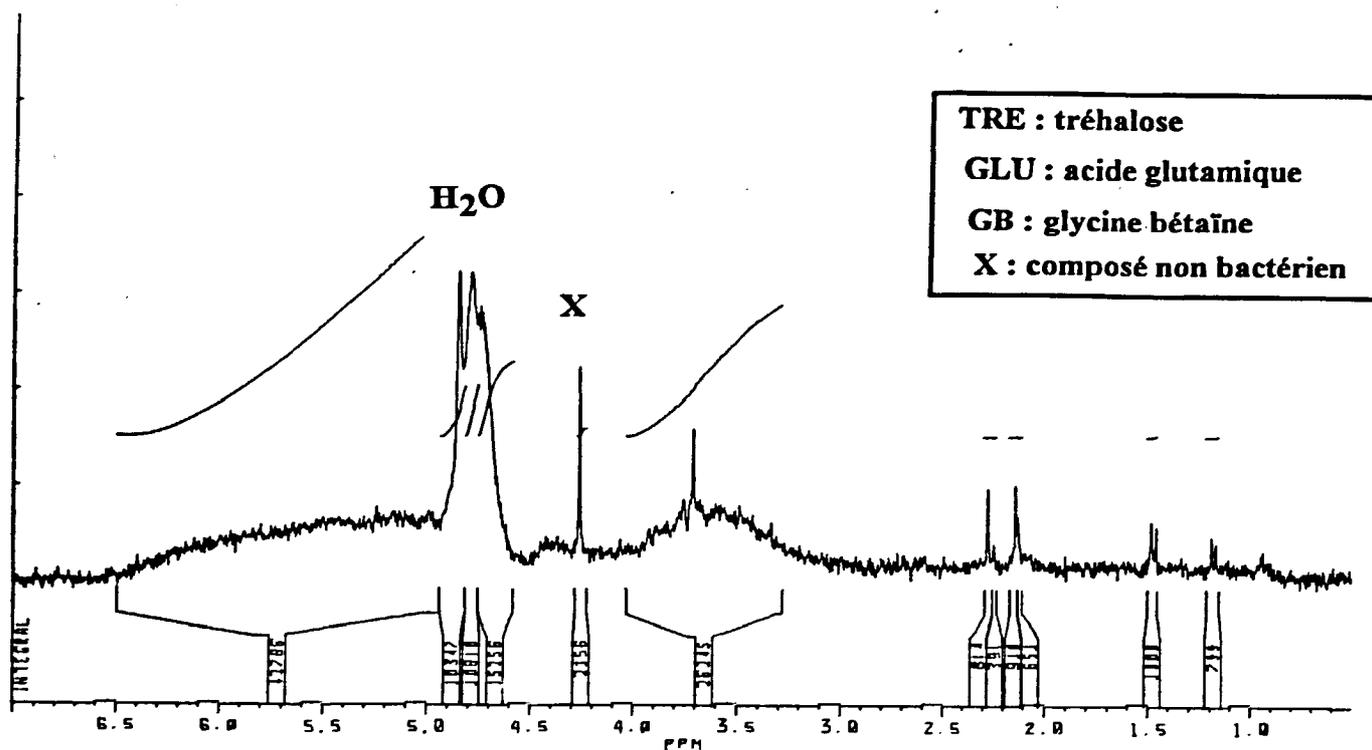


Figure 52 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 exposé à la lumière visible pendant 4 jours dans l'eau de mer artificielle sans apport de nutriments.

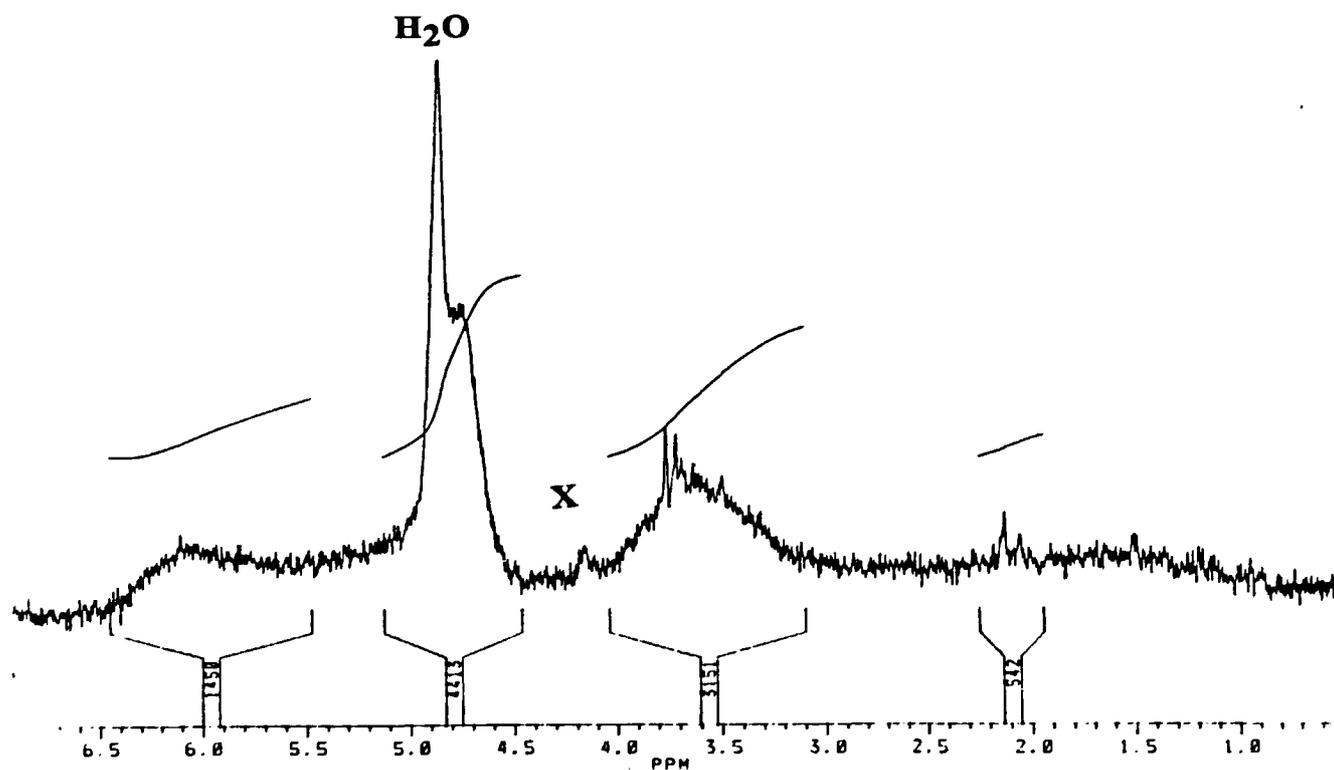


Figure 53 : Spectre RMN- ^1H d'un extrait de *E. coli* MP180 incubé à l'obscurité pendant 4 jours dans l'eau de mer artificielle sans apport de nutriments.

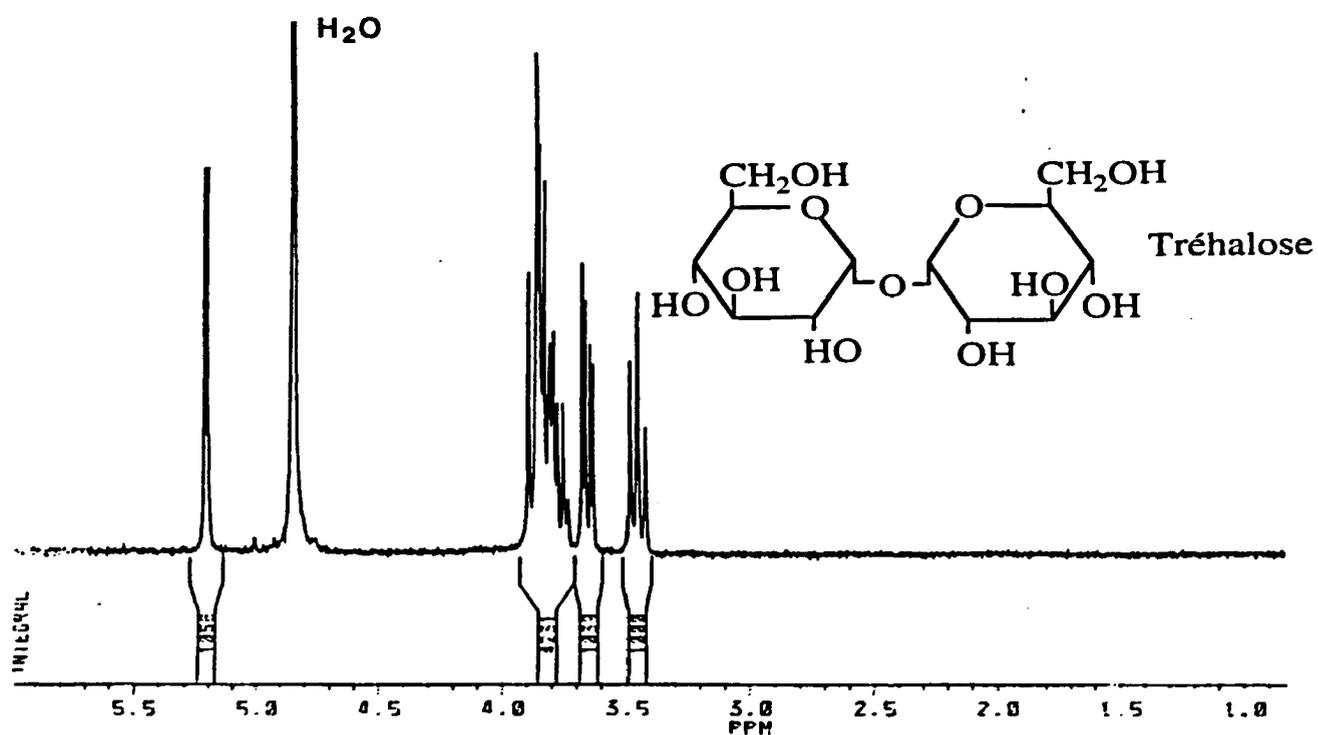


Figure 54 : Spectre RMN- ^1H du tréhalose utilisé comme standard (Derrien *et al.*, 1993).

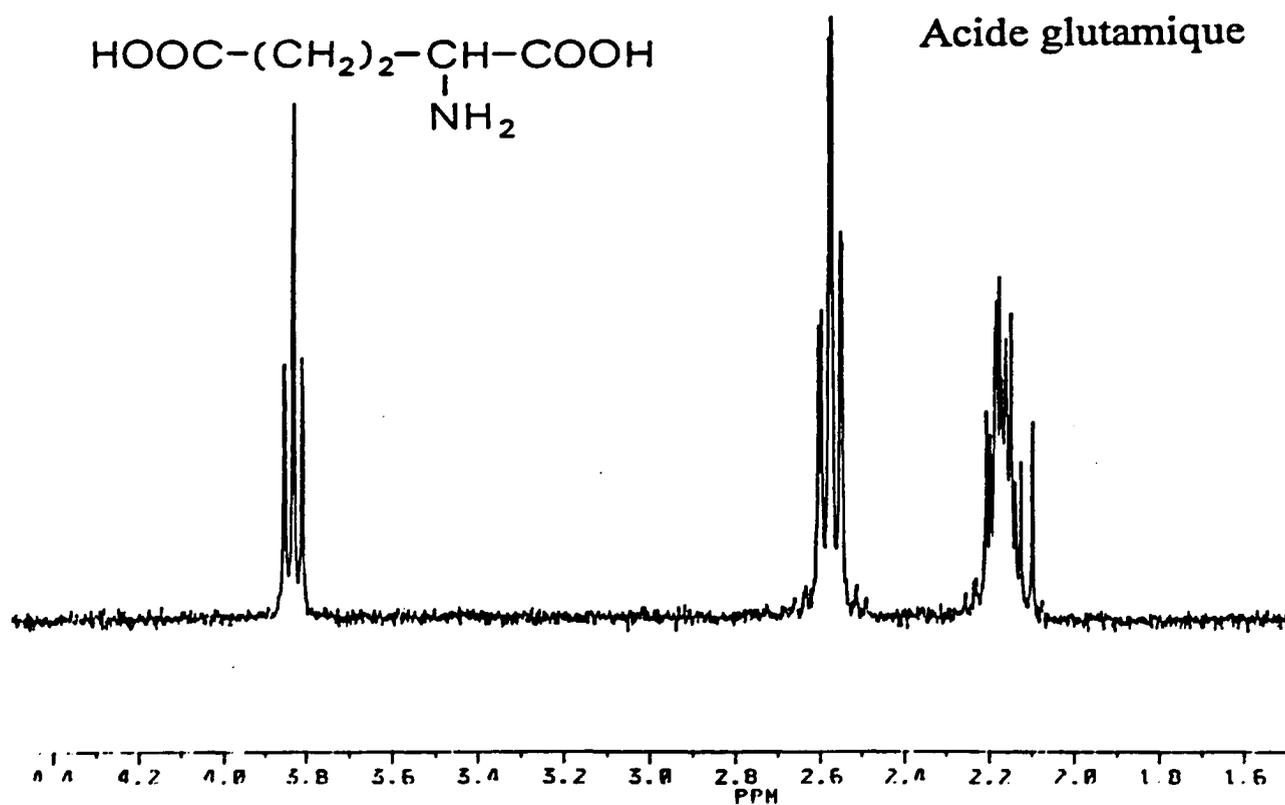


Figure 55 : Spectre RMN- ^1H de l'acide glutamique utilisé comme standard (Derrien *et al.*, 1993).

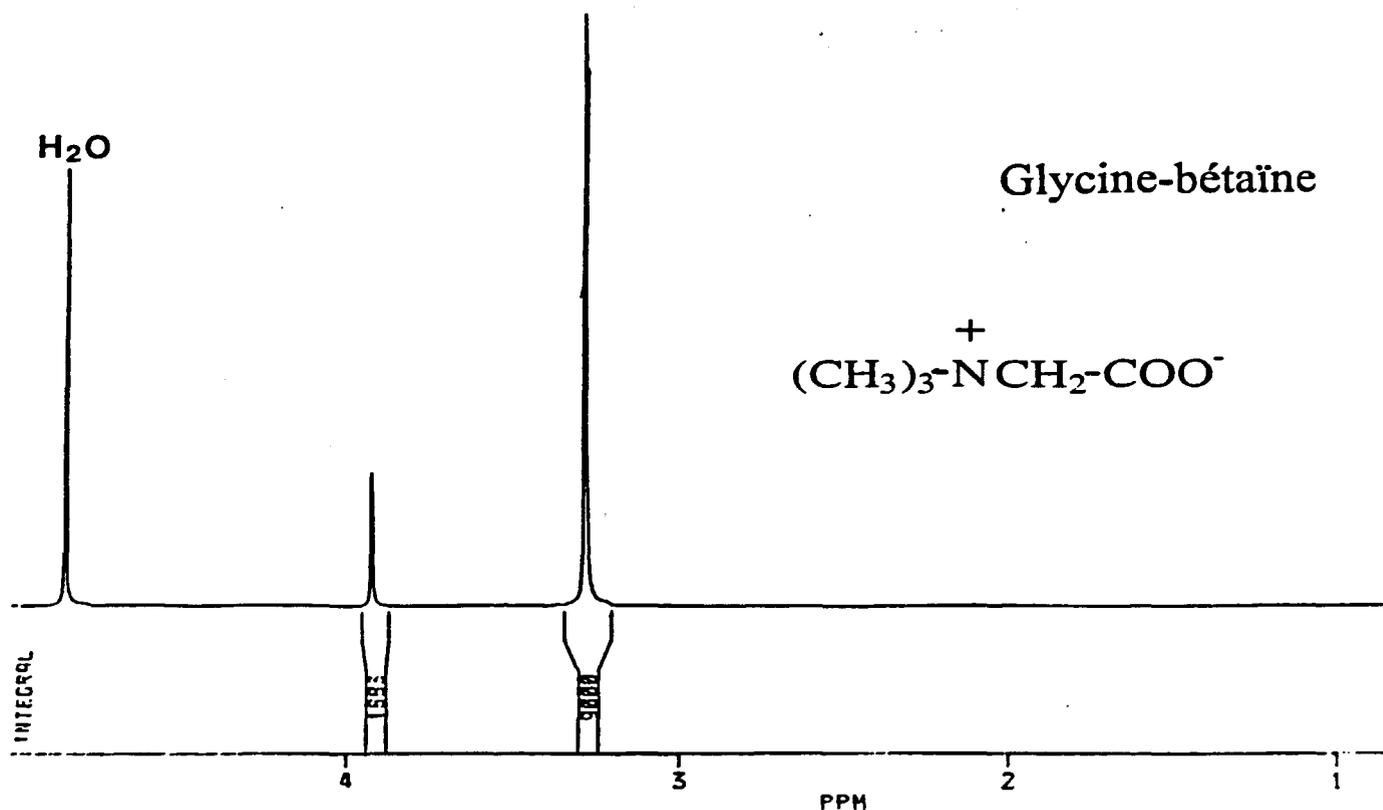


Figure 56 : Spectre RMN- ^1H de la glycine bétaine utilisée comme standard (Derrien *et al.*, 1993).

Annexe 5 :

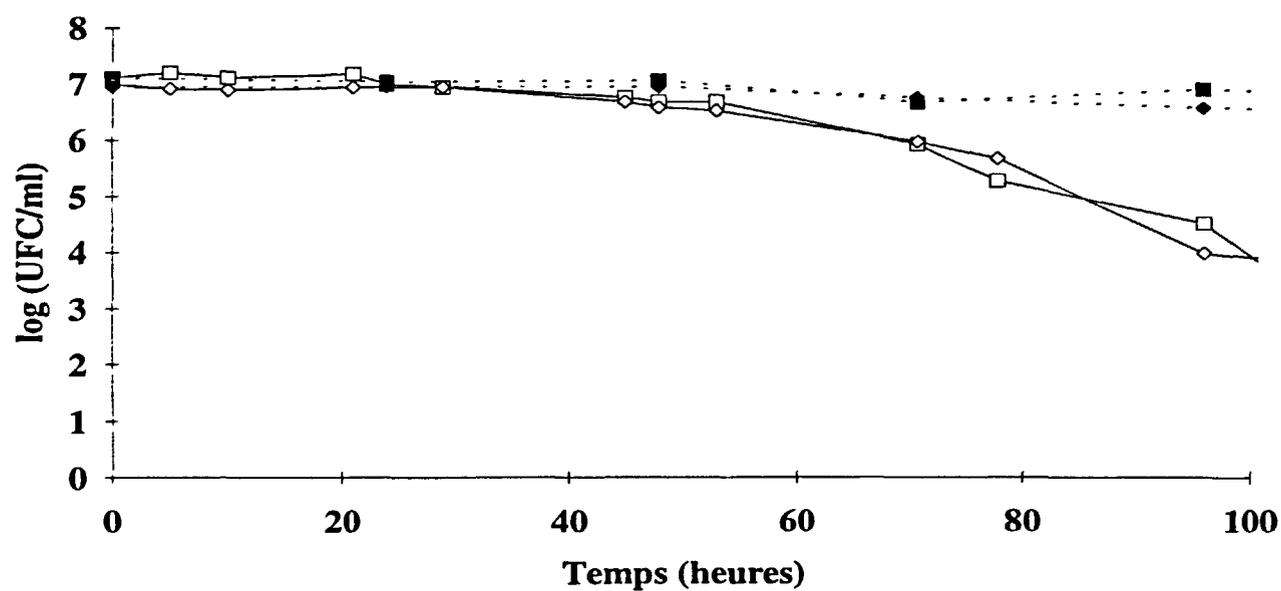


Figure 57 : Effet de la lumière visible sur la survie en eau de mer de *E. coli* déficient en protéine RecA. Lumière (traits pleins et sigles vides), obscurité (traits pointillés et sigles pleins). GC4468 (□, ■) ; QC2095 *recA* (◇, ◆) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

Annexe 6 : Effet de la lumière visible sur les plasmides

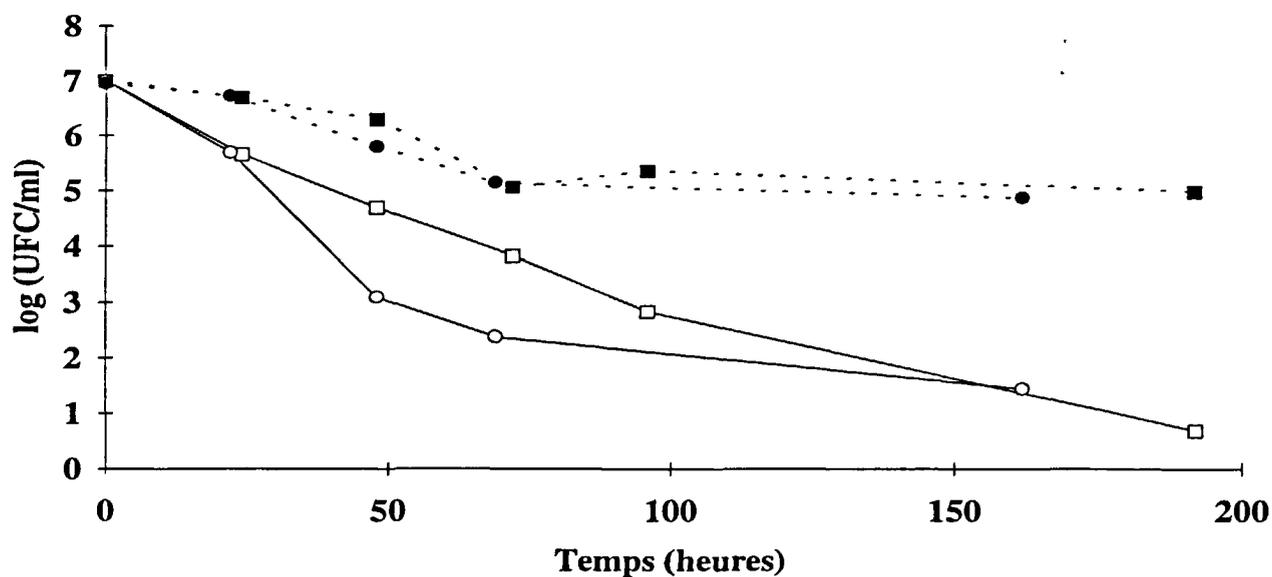


Figure 58 : Effet de la lumière visible sur *E. coli* HB101 possédant trois plasmides dans l'eau de mer artificielle à 20 ‰ ou 34 ‰ de salinité. Lumière (traits pleins et sigles vides). obscurité (traits pointillés et sigles pleins). Eau de mer à 20 ‰ de salinité (□, ■) ; eau de mer à 34 ‰ de salinité (○, ●) (intensité lumineuse : 900 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

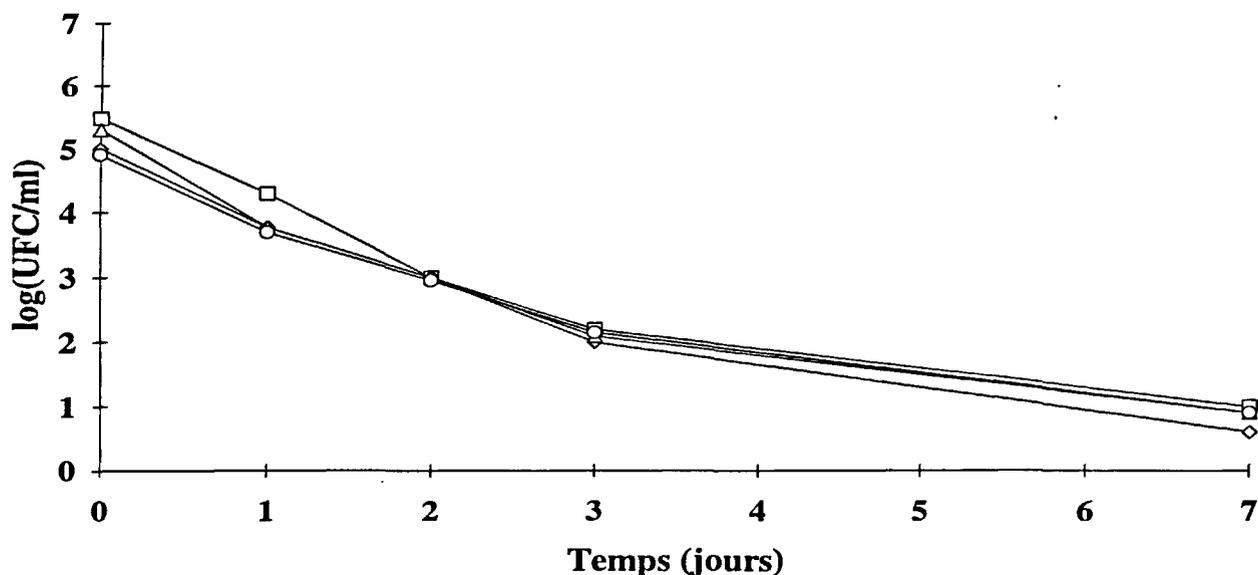


Figure 59 : Effet de la lumière visible sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101 dans l'eau de mer artificielle à 20 ‰ de salinité. Bactéries cultivables sur gélose Mueller Hinton (MH) (□), bactéries cultivables sur gélose MH + kanamycine (Δ), bactéries cultivables sur gélose MH + chloramphénicol (◇), bactéries cultivables sur gélose MH + triméthoprime (○) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ environ).

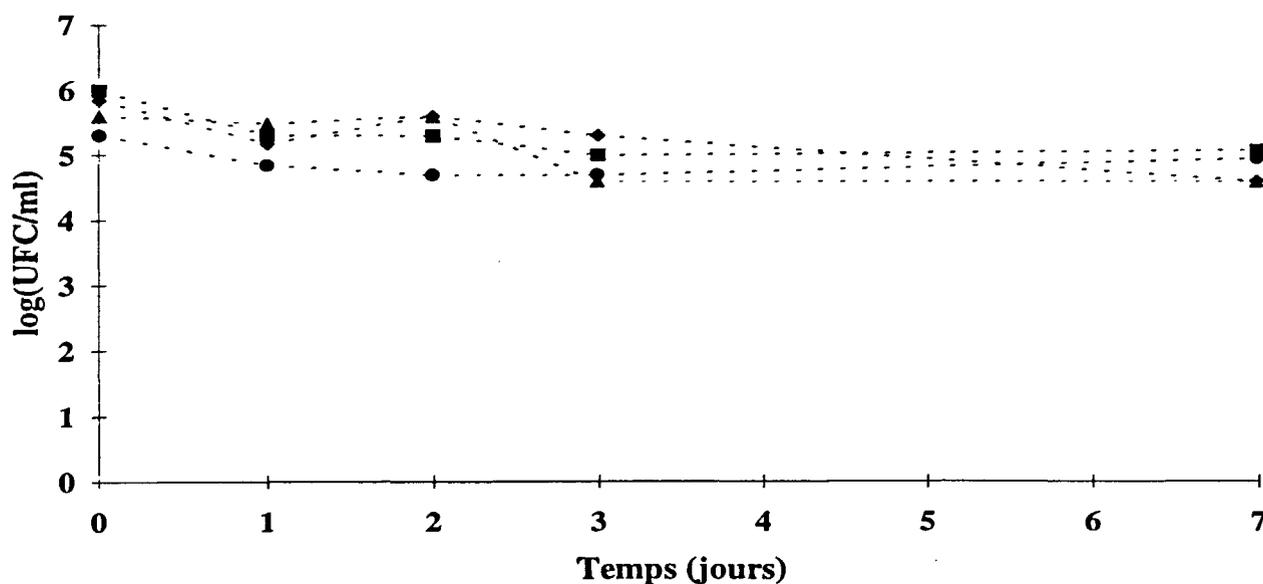


Figure 60 : Effet du séjour dans l'eau de mer artificielle à 20 ‰ de salinité à l'obscurité sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101. Bactéries cultivables sur gélose MH (■), bactéries cultivables sur gélose MH + kanamycine (▲), bactéries cultivables sur gélose MH + chloramphénicol (◆), bactéries cultivables sur gélose MH + triméthoprime (●).

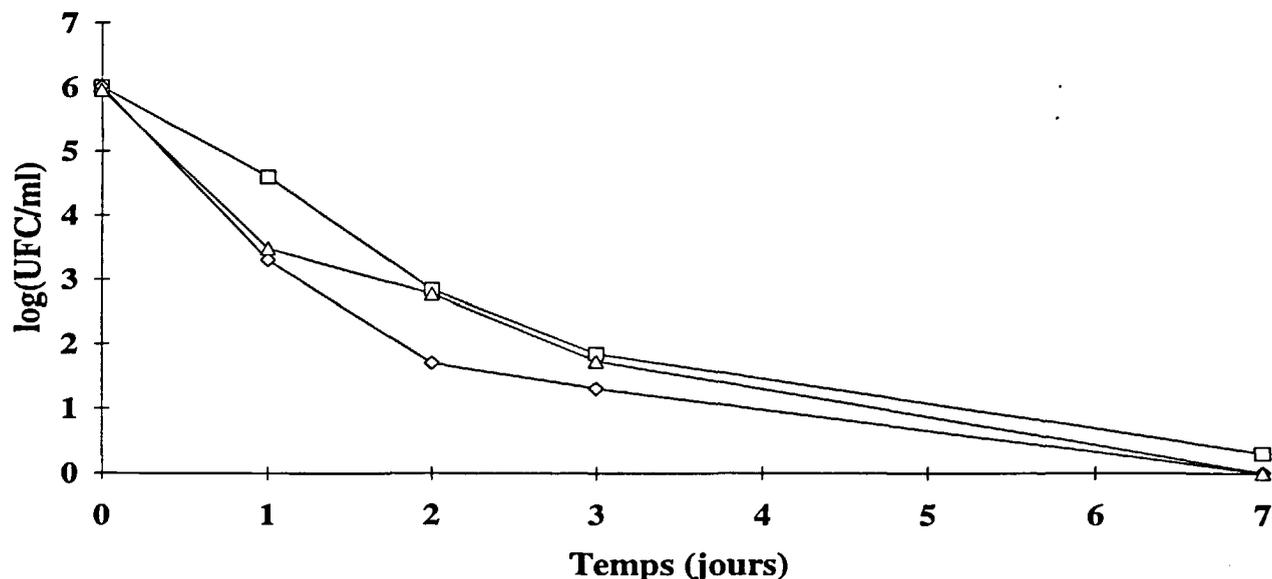


Figure 61 : Effet de la lumière visible sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101 dans l'eau de mer naturelle. Bactéries cultivables sur gélose Mueller Hinton (MH) (□), bactéries cultivables sur gélose MH + kanamycine (Δ), bactéries cultivables sur gélose MH + chloramphénicol (◇), bactéries cultivables sur gélose MH + triméthoprime (○) (intensité lumineuse : $900 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ environ).

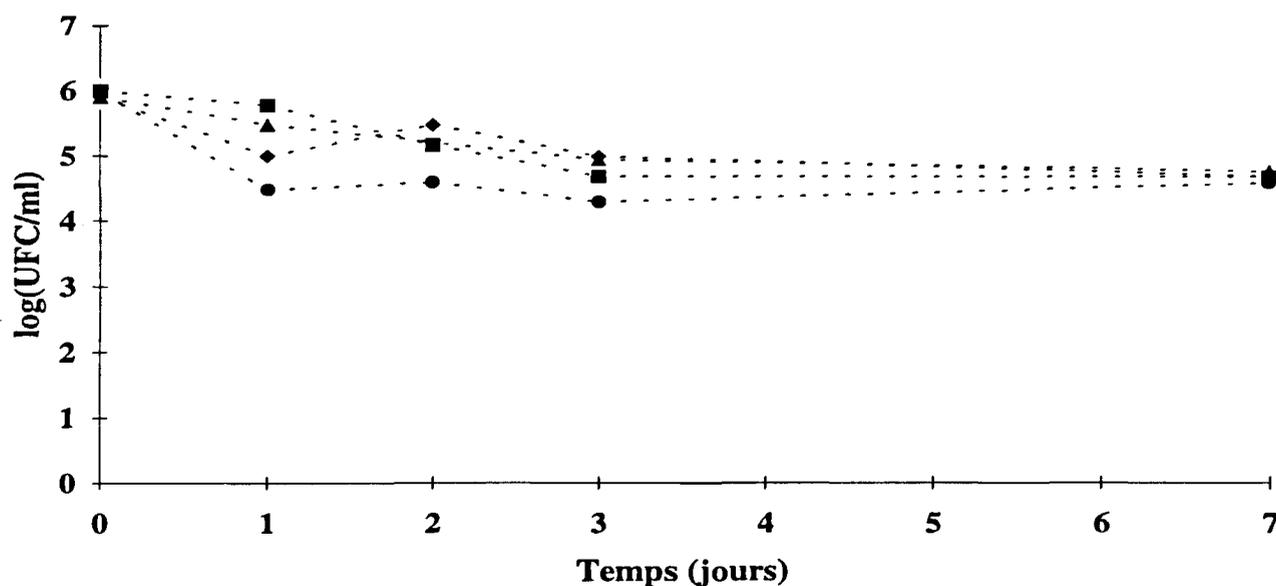


Figure 62 : Effet du séjour dans l'eau de mer naturelle à l'obscurité sur la résistance à différents antibiotiques codée par les plasmides (RP1, R388, pUB824) contenus dans la souche *E. coli* HB101. Bactéries cultivables sur gélose MH (■), bactéries cultivables sur gélose MH + kanamycine (▲), bactéries cultivables sur gélose MH + chloramphénicol (◆), bactéries cultivables sur gélose MH + triméthoprime (●).

Publications

Gourmelon M., Cillard J. et Pommepuy M., 1994. Visible light damage on *Escherichia coli* in seawater : oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 105-112..

Gourmelon M., Pommepuy M., Ferrand F. et Cormier M. Role of bacterial defense enzymes and nutrients to protect *E. coli* from visible light effect in seawater. Soumis à *Wat. Sci. Tech.*

Pommepuy M., Butin M., Derrien A., Gourmelon M., Colwell R.R et Cormier M. Retention of enteropathogenicity by viable but non-cultivable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. Soumis à *Appl. Environ. Microbiol.*

Pommepuy M., Fiksdal L., Gourmelon M., Melikechi H., Caprais M.P., Cormier M. et Colwell R.R. Effect of seawater on *Escherichia coli* β -galactosidase activity. Soumis à *Appl. Environ. Microbiol.*

Pommepuy M., Derrien A., Le Guyader F., Menard D., Caprais M.P., Dubois E., Dupray E. et Gourmelon M. Microbial water quality on a Carribean Island (Martinique). Dans *Coastal and Estuarine Studies, American Geophysical Union's* (sous presse).

Résumé

L'étude de *Escherichia coli* en microcosmes d'eau de mer à 34 ‰ de salinité, exposé à la lumière visible montre que cette bactérie évolue rapidement (en quelques heures) vers un état viable non cultivable tandis qu'à l'obscurité, la capacité à cultiver se maintient plus longtemps.

Deux facteurs principaux semblent déterminer la survie de *Escherichia coli* dans l'eau de mer lors de l'exposition à la lumière visible : l'état de la bactérie au moment du rejet et la qualité du milieu récepteur.

L'état de la bactérie avant exposition à la lumière visible joue un rôle important dans sa survie : en effet, quand il est en début de phase stationnaire avant son séjour dans l'eau de mer, *Escherichia coli* résiste mieux au stress lumineux que lorsqu'il est en phase exponentielle de croissance. Cette meilleure survie en phase stationnaire lors de l'exposition à la lumière visible est due, au moins en partie, au facteur KatF. Nos résultats ont montré que cet effet protecteur du facteur KatF est dû, en partie, à une synthèse des catalases HPI et HPII et de la protéine Dps. Par contre, l'exonucléase III ou les enzymes de synthèse du tréhalose ne sont pas impliquées dans cette protection par le facteur KatF.

L'eau de mer, par sa haute teneur en sels et son caractère oligotrophique, joue un rôle non négligeable dans la sensibilité de la bactérie à la phototoxicité. En effet, quand la salinité est abaissée à 20‰ ou mieux à 10 ‰, l'entérobactérie survit beaucoup mieux au stress lumineux. De même, l'apport d'une faible quantité de nutriments (glucose à 18 mg.l⁻¹ par exemple) dès l'immersion dans l'eau de mer permet à *Escherichia coli* de mieux résister à la phototoxicité. Lorsque l'addition est retardée de 24 ou 48 heures, la protection est beaucoup plus faible, la bactérie ayant déjà subi des dommages. De plus, quand les bactéries sont placées 24 ou 48 heures à l'obscurité dans l'eau de mer, elles survivent mieux ensuite à l'exposition à la lumière visible dans l'eau de mer.

Enfin, nos résultats ont montré que la lumière visible agit sur les bactéries immergées dans l'eau de mer, en présence d'oxygène, par un phénomène de photosensibilisation endogène : en effet, des espèces oxygénées réactives notamment l'anion superoxyde et le peroxyde d'hydrogène ont été mises en évidence dans les cellules (par des techniques indirectes). Ces composés peuvent ensuite endommager des composés cellulaires tels que les ADNs plasmidiques par exemple. Par contre, l'exposition à la lumière visible ne conduit pas à une modification importante du profil des acides gras membranaires.

Mots clés : *Escherichia coli* ; lumière visible ; eau de mer ; espèces oxygénées réactives (ROS) ; facteur KatF ; phase stationnaire ; stress osmotique.