

Influence de certains acides aminés sur la survie d'*Escherichia coli* en eau de mer

Effect of certain aminoacids on survival of Escherichia coli cells in seawater

Benaissa Attarassi*, Mohamed Saghi**, Abdelmajid Belabed***, Gilles Flatau****

*Faculté des sciences, département de biologie, Oujda, Maroc

**Faculté des sciences, département de biologie, Fès, Maroc

***Faculté des sciences, laboratoire de la production et de l'amélioration végétale, Oujda, Maroc

****Institut national de la santé et de la recherche médicale, INSERM, Unité 452, laboratoire de gastro-entérologie, UFR Médecine, avenue de Valombrose, 06107 Nice Cedex, 2, France

Mots clés : *E. coli*, acides aminés, pHi, survie, eau de mer, osmoprotection

Key-words: *E. coli*, aminoacids, pHi, survival, seawater, osmoprotection

RÉSUMÉ

Attarassi Benaissa, M. Saghi, A. Belabed, G. Flatau, 1994 - Influence de certains acides aminés sur la survie d'*Escherichia coli* en eau de mer. Mar. Life 4 (2) : 69-75.

Les modifications de la survie en eau de mer d'*Escherichia coli* consécutives au changement de son environnement trophique ont été décrites ici. Alors que la culture des cellules dans un milieu enrichi en acides aminés diminuait leur viabilité dans l'eau de mer, au contraire, la présence de ces mêmes substances dans cette eau favorisait leur survie. Dans ce dernier cas, une relation linéaire entre l'efficacité des acides aminés ajoutés à l'eau de mer et leurs pH isoélectriques a été mise en évidence. L'augmentation de la viabilité des cellules en milieu à haute osmolarité était corrélée, entre autres, à l'accumulation de certains acides aminés.

ABSTRACT

Attarassi Benaissa, M. Saghi, A. Belabed, G. Flatau, 1994 - [Effect of certain aminoacids on survival of *Escherichia coli* in seawater] . Mar. Life 4 (2) : 69-75.

Modifications of the survival pattern in seawater of *Escherichia coli* cells following an environmental nutritional change are described here. Survival rate of bacterial cells in seawater decreased when they were previously grown in a medium supplemented with certain aminoacids, whereas it increased when cells were suspended in seawater containing these aminoacids. The protective efficiency of aminoacids added to seawater followed a linear relationship with isoelectric pH of these compounds. Increase of cell survival in seawater was related to the accumulation of some aminoacids added to this medium.

INTRODUCTION

Les bactéries entériques ont un taux de perte de viabilité prononcé quand elles sont exposées aux conditions des milieux aquatiques naturels, en particulier celles du milieu marin. Ce phénomène a été plusieurs fois mis en évidence chez *E. coli* (Carlucci et Pramer, 1960 ; Booth *et al.*, 1988 ; Booth et Higgins, 1990). En effet, les entérobactéries soumises à des milieux salés carencés en nutrilites présentent des modifications structurales et métaboliques plus ou moins sévères (Gauthier *et al.*, 1988 ; Gauthier *et al.*, 1993). Les cellules stressées évoluent

ainsi vers un état viable mais non cultivable mis en évidence initialement chez *E. coli* (Xu *et al.*, 1982), puis chez d'autres germes entériques pathogènes présents dans les eaux (Colwell *et al.*, 1985 ; Oliver, 1993).

La matière organique joue un rôle important dans la survie des bactéries allochtones en mer. L'évolution des cellules vers l'état viable non cultivable peut être ralentie (Grimes *et al.*, 1986) par la présence de matière organique dans les eaux de ruissellement, dans les eaux usées (Carlucci et Pramer, 1960) ou les sédiments (Gerba et Mac Leod, 1976). L'adaptation physiologique d'*E. coli* aux

milieux hostiles pourrait être la conséquence du développement d'un ou de plusieurs mécanismes d'osmorégulation induits par les sels, essentiellement ceux du potassium (Leirimo *et al.*, 1987 ; Bossemeyer *et al.*, 1989 ; Booth et Higgins, 1990) ou la synthèse et l'accumulation de composés organiques osmoprotecteurs comme le tréhalose (Larsen *et al.*, 1987 ; Rod *et al.*, 1988 ; Guttierrez *et al.*, 1989 ; Styrvold et Strom, 1991) ou la glycine bêtaïne (Ghoul *et al.*, 1990).

Cairney *et al.*, 1985 ; May *et al.*, 1986 ; Barron *et al.*, 1987 ; Higgins *et al.*, 1987 et Lucht et Bremer (1991) ont montré que la glycine bêtaïne, osmolyte compatible accumulé sous condition d'hyperosmolarité, peut lever l'inhibition du développement. De même, le transport intracellulaire de la glycine bêtaïne est proportionnel à l'osmolarité du milieu (Perroud et Le Rudulier, 1985). La survie des bactéries entériques dans le milieu marin dépend également étroitement des conditions de leur parcours dans le milieu naturel, depuis le tractus digestif de l'homme ou des animaux jusqu'à l'eau de mer, en passant par les eaux usées où elles séjournent longtemps.

Dans le présent travail, nous avons étudié l'effet protecteur des acides aminés sur les entérobactéries selon l'histoire préalable de leur croissance. La capacité d'une souche test d'*E. coli* à se développer dans l'eau de mer, après un passage éventuel par un milieu de culture enrichi en acides aminés, a été étudiée par numération sur milieu solide. Ce paramètre a été suivi en fonction du temps de séjour des bactéries dans l'eau de mer. Les acides aminés ont été ajoutés, soit en milieu de culture, soit directement dans l'eau de mer.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Souche bactérienne

La souche *E. coli* MC 4100 (Casadaban, 1976), utilisée antérieurement dans d'autres laboratoires pour des expériences de survie (Gauthier *et al.*, 1987 ; Flatau *et al.*, 1992), a été utilisée au cours de ce travail.

Tests de survie

Rôle des acides aminés en milieu de culture

Les cellules ont été cultivées en milieu Luria-Bertani (LB) (Maniatis *et al.*, 1982) enrichi en sels biliaires (désoxycholate de sodium, 5 g. l⁻¹). Les acides aminés (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA) glycine (gly), acide aspartique (asp), méthionine (met), sérine (ser), lysine (lys), arginine (arg), asparagine (asn), leucine (leu), tryptophane (trp) et proline (pro) ont été ajoutés séparément à la concentration de 1 g l⁻¹ correspondant à la plus faible concentration à laquelle des effets protecteurs

ont été observés. Les cellules ont été récoltées par centrifugation (10 000 x g, 10 min, 20°C) quand l'absorbance a atteint 0,2 à 600 nm. A cette absorbance correspond une culture dans laquelle les cellules, au début de la phase exponentielle, étaient particulièrement sensibles à l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1992). Le culot cellulaire rincé trois fois dans 20 ml d'eau de mer (littoral de Saïdia, Maroc) stérilisée par filtration sur membrane à pores de 0,22 µm (Millipore, Corp., MA) (EMS) puis suspendu dans 10 ml d'EMS, a servi à inoculer des flacons contenant 100 ml d'EMS à une concentration finale de 10⁶ unités formant colonies (UFC).ml⁻¹. Les microcosmes ont été placés à 20°C à l'obscurité. Les témoins ont été réalisés dans les mêmes conditions mais avec un milieu de culture non enrichi en acides aminés.

Rôle des acides aminés en milieu de survie

Les cellules d'*E. coli* ont été cultivées en milieu LB jusqu'à une absorbance de 0,2 à 600 nm. Après centrifugation (10 000 x g, 10 min, 20°C), le culot cellulaire a été rincé trois fois dans 20 ml d'EMS et suspendu dans 10 ml d'EMS. Cette suspension bactérienne a servi à inoculer des microcosmes d'EMS enrichis (ou non pour le témoin) avec les mêmes concentrations d'acides aminés que dans les milieux de culture.

Les pHi des acides aminés testés sont présentés dans le Tableau I.

Tableau I - pHi des acides aminés testés pour leur effet protecteur chez *E. coli* dans l'eau de mer. / *pHi of aminoacids tested for their protective effect on survival of E. coli in seawater.*

Acides aminés	pHi
Acide aspartique	2,98
Asparagine	5,41
Sérine	5,68
Méthionine	5,75
Proline	5,88
Tryptophane	5,94
Glycine	5,97
Leucine	5,98
Lysine	9,74
Arginine	10,76

Dénombrement des cellules cultivables

Il a été réalisé à partir d'un volume connu d'EMS prélevé après 0, 2 et 6 jours d'incubation, éventuellement dilué en eau de mer autoclavée ou filtrée sur membrane (Millipore, pores de 0,45 µm).

L'inoculum de 0,1 ml ou les filtres ont été déposés sur Nutrient Agar (Difco) et incubés 48 h à 37°C avant dénombrement. Les comptages ont été effectués en triple exemplaire.

Extraction des acides aminés accumulés par les cellules en survie

Les cellules en survie en EMS additionnés d'acides aminés ont été récoltées par centrifugation

(10 000 x g, 10 min, 20°C) après 6 jours d'incubation. Après trois lavages en EMS, elles ont été suspendues en EMS à une absorbance de 0,2, à 600 nm (10^9 UFC, ml⁻¹).

Le contenu cellulaire en acides aminés de 5 ml de cette suspension bactérienne a été extrait par 5 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 25 % pendant 24 h à 4°C.

1 ml du surnageant issu d'une centrifugation (10 000 x g, 30 min, 4°C) a été neutralisé par un volume équivalent de tampon pH 8,5 (borate de sodium 0,1 M, NaOH 1 N), et l'extraction a été conduite par addition de 4 ml de butanol-chloroforme (1:1) pendant 15 min à température ambiante. L'extrait cellulaire a été ensuite évaporé à sec puis dissous dans 1 ml d'eau distillée.

Détermination des acides aminés accumulés

5 µl de la solution d'extrait cellulaire ont été déposés en bas d'une plaque de chromatographie sur couche mince de gel de silice (60-Kieselgel F254, épaisseur 0,2 mm, Merck AG, Darmstadt, Allemagne) et séparés par un mélange méthanol-eau-pyridine 40 : 10 : 2. Les plaques séchées ont été révélées par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1 % dans un mélange butanol-acétone (99 : 1) (Chapeville et Clauser, 1974). Les taches d'acides aminés ont été développées après séchage. 10 acides aminés standards (gly, asp, met, ser, lys, arg, asn, leu, trp et pro) ont été employés comme références.

Traitement mathématique des résultats

Toutes les expériences ont été répétées trois fois, chacune en trois exemplaires, et en présence à chaque fois d'un témoin.

Comme il a été observé précédemment par Munro *et al.*, 1987, puis par Flatau *et al.*, 1992, la survie d'*E. coli* en eau de mer passe par deux phases successives :

- au cours de la première phase d'incubation (24 à 48 h), plus de 90 % de la population bactérienne évolue vers l'état non cultivable ;
- au cours de la deuxième période de contact avec l'eau de mer (plusieurs jours à quelques semaines), l'évolution est plus lente.

L'effet protecteur des acides aminés sur la survie d'*E. coli* en mer a donc été exprimé en utilisant trois indices :

- leur efficacité à court terme ; x (définie comme le rapport du nombre de cellules viables (UFC) au jour 2 à celui du jour 0 ;
- leur efficacité à long terme ; y (rapport du nombre de cellules viables au jour 6 à celui du jour 2). Dans ces conditions, chaque acide aminé a été caractérisé par ses coordonnées (x,y) ;
- leur efficacité globale (norme euclidienne) en milieu de survie (Es) et en milieu de culture (Ec) a été calculée selon la relation : $Es = (x^2 + y^2)^{1/2}$ et $Ec = (x^2 + y^2)^{1/2}$

Une régression linéaire de Es et Ec en fonction des pHi des acides aminés a été effectuée. Un test t a été calculé pour chaque régression.

RÉSULTATS

Effet de la préculture des cellules en présence d'acides aminés sur leur survie en eau de mer

L'addition d'acides aminés au milieu de culture LB n'a généralement pas induit d'effet protecteur (Figure 1a). En effet, à l'exception de asp, leu, gly et met, les acides aminés provoquaient une perte de viabilité plus ou moins importante à court et à long terme.

L'efficacité à court terme x, était toujours inférieure ou égale au témoin (x compris entre 2×10^{-2} et 10^{-1}) et l'efficacité à long terme était généralement inférieure au témoin sauf pour met, asp, leu et gly.

Ces résultats traduisent l'importance des événements antérieurs au rejet dans l'eau de mer sur le comportement des cellules dans ce milieu.

Effet des acides aminés en milieu de survie

La plupart des acides aminés ajoutés au milieu de survie ont conféré aux cellules bactériennes une viabilité supérieure à celle du témoin (Figure 1b). En effet, les efficacités à court terme x, étaient supérieures à celles du témoin (8×10^{-2}) et situées entre 10^{-1} pour tous les acides aminés. Par contre, les efficacités à long terme y, étaient étendues entre 2×10^{-2} (inférieure au témoin (8×10^{-2})) et 3×10^{-1} . Ces résultats soulignent l'effet protecteur des acides aminés, dans le milieu de survie, généralement à court terme, assorti d'un effet à long terme dans le cas de leu, met, asp et asn. Les acides aminés pro, gly, trp, ser et arg forment, par contre, un groupe protecteur à court terme sans efficacité à long terme.

Corrélation efficacité-pHi

L'analyse, par la méthode de régression, de l'efficacité globale des acides aminés ajoutés au milieu de survie (Es) en fonction de leur pH isoélectrique a montré que la relation était linéaire et que Es était positivement corrélée au pHi ($p < 0,05$) (Figure 2). L'équation de régression, calculée selon les méthodes de la régression multiple dans laquelle la valeur du pHi d'acide aminé est la variable, est représentée par :

$$Es = 10^{-2} (-3,759 + 5,619 \times pHi) \quad (r^2 = 0,485)$$

Par contre, l'efficacité Ec n'était pas corrélée aux pHi ($p > 0,05$).

Ces données montrent que l'efficacité des acides aminés à protéger les cellules d'*E. coli* dans l'eau de mer est supérieure lorsqu'ils sont présents

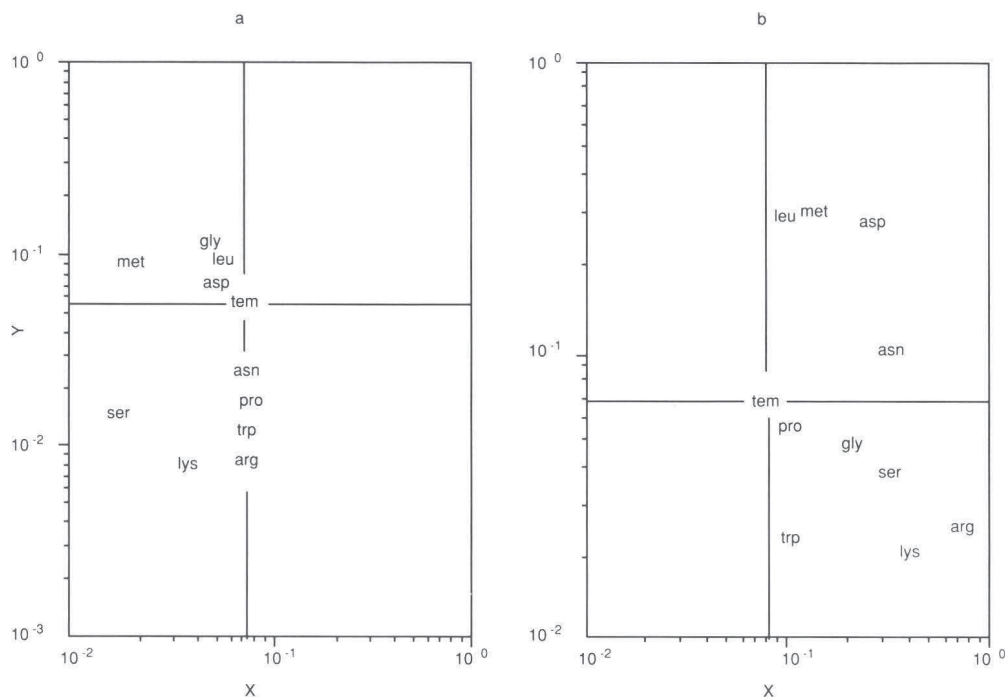


Figure 1 - Répartition des acides aminés selon leur effet protecteur à court terme (x) et à long terme (y) sur la survie d'*E. coli* en eau de mer stérile. Les cellules d'*E. coli* ont été incubées en milieu de culture LB puis suspendues en EMS au nombre de 10^6 UFC. ml^{-1} . Les acides aminés ont été ajoutés à la concentration de 1 g. l^{-1} au milieu de culture LB (a) et aux microcosmes d'eau de mer (b). tem : témoin ; leu : leucine ; met : méthionine ; asp : aspartate ; asn : asparagine ; pro : proline ; gly : glycine ; ser : sérine ; trp : tryptophane ; arg : arginine ; lys : lysine. / *Repartition of tested aminoacids according to their short-term (x) on their long-term (y) protective effect on the survival of E. coli in sterilized seawater. E. coli cells was incubated in LB medium and suspended in filtered seawater at a density of 10^6 CFU. ml^{-1} . The aminoacids were added at the concentration of 1 g. l^{-1} to LB medium (a) and to seawater microcosms (b). tem: control; leu: leucine; met: methionine; asp: aspartate; asn: asparagine; pro: proline; gly: glycine; ser: serine; trp: tryptophane; arg: arginine; lys: lysine.*

dans cette eau que lorsqu'ils sont fournis lors de leur culture préalable. Ce sont les acides aminés à pHi élevé qui protègent mieux les cellules contre les stress subis dans l'eau de mer

Ces résultats suggèrent que l'efficacité des acides aminés est une fonction de leur propriété à rétablir la turgescence cellulaire au cours de la survie des bactéries en mer, ou bien que ces acides aminés peuvent être utilisés alternativement comme source de carbone et d'azote dans le milieu de culture et comme osmolytes ou précurseur d'osmolytes en eau de mer.

DISCUSSION

Dans ce travail, la réponse d'*E. coli* aux stress subis en eau de mer a été influencée essentiellement par deux facteurs :

- 1 - la nature du milieu de culture des cellules avant leur incubation dans l'eau de mer ;
- 2 - la nature chimique du milieu récepteur.

La résistance à l'eau de mer des bactéries entériques est définie par leur capacité à rétablir la pression de turgescence et à maintenir une certaine activité métabolique. Un tel phénomène n'est possible qu'en présence de molécules osmoprotectrices (Kennedy, 1982).

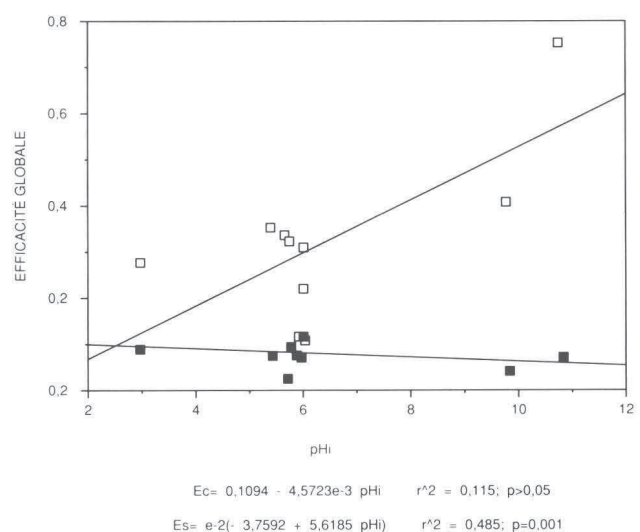


Figure 2 - Corrélation entre la capacité des cellules d'*E. coli* à survivre dans l'eau de mer et l'efficacité protectrice globale des acides aminés fournis dans le milieu de culture préalable (E_c) ou directement dans l'eau de mer (E_s), en fonction des pHi. / *Correlation between the ability of E. coli cells to survive in seawater and the global protecting effect of aminoacids added to previous culture medium (E_c) or directly into seawater (E_s), according to the pHi.*

En effet, les cellules bactériennes répondent initialement au stress hyperosmotique par accumulation de K^+ (Christian et Waltho, 1961 ; Epstein et Shultz, 1965 ; Reed et Stewart, 1985 ; Walderhaug *et al.*, 1987 ; Booth et Higgins, 1990 ; Prince et Villarejo, 1990 ; Welsh *et al.*, 1991) puis par l'accumulation de composés organiques compatibles avec le métabolisme, essentiellement le tréhalose, le glutamate et les bêtaïnes (Le Rudulier *et al.* 1984 ; Boos *et al.*, 1990 ; Welsh *et al.*, 1991).

Dans notre étude, les acides aminés ajoutés au milieu de survie carencé en nutrilites ont permis d'augmenter la résistance des cellules à l'eau de mer. Du point de vue de leur efficacité dans ce sens, nous avons pu définir deux groupes d'acides aminés suivant leur pHi. Les acides aminés au pHi supérieur au pH biologique avaient une charge nette positive et ont conféré aux cellules en survie une meilleure protection à court terme : l'efficacité était de 0,7 et 0,4 (supérieure au témoin : 0,085) pour l'arginine (pHi $\approx$ 11) et la lysine (pHi $\approx$ 10) respectivement.

La ségrégation des acides aminés par groupe de protection pourrait être liée à leur capacité à rétablir plus ou moins vite la turgescence cellulaire sans toutefois déséquilibrer la balance électronique dans le cytoplasme (Castle *et al.*, 1986).

Le degré de protection, plus élevé, obtenu à long terme, avec les acides aminés anioniques (pHi inférieur au pH cellulaire) suggèrent qu'à long terme, une partie des cations accumulées pourrait être remplacée par des substances anioniques, sinon, leur persistance en grande concentration dans la cellule pouvait modifier l'équilibre ionique (Castle *et al.*, 1986) et le pH cellulaire (Tempest *et al.*, 1970).

Ainsi, l'effet osmoprotecteur le plus important a été obtenu avec l'aspartate ($\gamma = 0,3$, supérieur au témoin $\gamma = 0,07$), dont le pHi est le plus bas (pHi $\approx$ 3). Par ailleurs, une corrélation de l'efficacité globale avec le pHi a été établie ($p < 0,05$) et fait ressortir l'importance vitale du PHi de chaque acide aminé.

Il semblerait que les lois physico-chimiques qui régissent l'action des acides aminés lors de la survie d'E. coli en eau de mer correspondent bien à une fonction d'équilibre électronique et du maintien du potentiel membranaire à sa valeur normale au cours des échanges entre le cytoplasme cellulaire et le milieu extérieur. En fait, la membrane externe des entérobactéries est le siège d'échanges de cations et d'anions dont l'amplitude est fonction de l'osmolarité du milieu (Nikaïdo et Rosenberg, 1983 ; Castle *et al.*, 1986 ; Muzuno *et al.*, 1990).

Les résultats de la chromatographie sur couche mince (Tableau II) mettent en évidence une accumulation des acides aminés asp, leu, lys, ser, met, gly et trp par les cellules d'E. coli en survie dans l'eau de mer pendant 6 jours. Cette accumulation, observée sous condition de carence nutritionnelle, peut être l'une des causes de l'augmentation de la viabilité des cellules. D'autres substances, non encore identifiées ($R_f = 0,42$; 0,1 et 0,63) peuvent aussi avoir joué un rôle protecteur.

En effet, dans l'eau de mer méditerranéenne, très oligotrophe surtout vis-à-vis d'une espèce copiotrophe comme E. coli, l'une des conditions de survie les plus fondamentales est le maintien du niveau énergétique des cellules (Gauthier *et al.*, 1993). En absence de sources de carbone, l'effet protecteur des acides aminés est probablement double : régulation

Tableau II - Analyse qualitative des acides aminés accumulés par E. coli au cours de son incubation dans l'eau de mer (6 jours à 20°C) en présence d'aspartate, leucine, lysine, sérine, méthionine, glycine ou tryptophane (1 g. l⁻¹). / Qualitative analysis of aminoacids accumulated by E. coli during incubation in seawater (6 days at 20°C) in the presence of aspartate, leucine, lysine, serine, methionine, glycine or tryptophane (1 g. l⁻¹).

Acides aminés ajoutés à l'eau de mer	Non	Asp	Trp	Met	Leu	Ser	Gly	Lys
F*	-	0,70	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45	0,05
Nombre de produits détectés dans les extraits cellulaires	1	2	2	2	2	4	2	2
F** (produits identifiés)	0,63 (?)	0,63 (?)	0,63 (?)	0,63 (?)	0,63 (?)	0,63 (?)	0,63 (?)	0,63 (?)
		0,72 (Asp)	0,65 (Trp)	0,60 (Met)	0,55 (Leu)	0,50 (Ser)	0,45 (Gly)	0,05 (Lys)
						0,42 (?)		
						0,1 (?)		

F* = Rapport des fronts de migration des acides aminés témoins et du solvant. / Ratio of the migration fronts of control aminoacids and the solvent. F** = Rapport des fronts de migration des acides aminés dans les extraits cellulaires et du solvant. / Ratio of the migration fronts of control aminoacids in cellular extracts and the solvent. ? : Produits non identifiés. / Products not identified.

de la pression de turgescence et rôle trophique capable de maintenir une activité métabolique des cellules, d'autant plus que la réponse des cellules à la carence alimentaire correspond à une étape prépondérante de la vie des bactéries dans les milieux naturels (Schultz et Matin, 1991).

En revanche, les bactéries préalablement incubées en milieu de culture non salé enrichi en acides aminés étaient plus sensibles à l'eau de mer. Cette chute de viabilité des cellules exposées en eau de mer oligotrophe pourrait s'expliquer par une inhibition de la synthèse des macromolécules et en particulier de l'ARN et des protéines de la réponse d'austérité (stringent response) comme il a été montré lors d'un transfert des cellules d'un milieu de culture riche en acides aminés à un milieu qui en est dépourvu (Glass, 1982). De même, la teneur en ATP diminue très rapidement dans les cellules d'*E. coli* incubées dans l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1990). Dans ces conditions, les porines membranaires (système inductible), à travers lesquelles des osmolytes diffusent pour équilibrer la pression osmotique intracytoplasmique (Coyer *et al.*, 1990) ne sont probablement pas synthétisées.

Selon ces données, il apparaît que les effets de l'eau de mer méditerranéenne sur le potentiel de survie et d'adaptation des entérobactéries résultent à la fois du stress hyperosmotique et hyponutritionnel.

BIBLIOGRAPHIE

- Barron A., J.U. Jung, M. Villarejo, 1987 - Purification and characterization of a glycine betaine binding protein from *E. coli*. *J. biol. Chem.*, **262** : 11841-11846.
- Boos W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, P. Postama, 1990 - Trehalose transport and metabolism in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **172** : 3450-3461.
- Booth I.R., J. Cairney, K.L. Sutherland, C.F. Higgins, 1988 - Enteric bacteria and osmotic stress : an integrated homeostatic system. *J. appl. Bact. Symposium supplement*, **17** : 35S-49S.
- Booth I.R., C.F. Higgins, 1990 - Enteric bacteria and osmotic stress : intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress. *FEMS Microbiol. Rev.*, **75** : 239-246.
- Bossemeyer D., A. Schlosser, E.P. Bakker, 1989 - Specific caesium uptake via the *E. coli* kup (Trk D) K^+ uptake syst. *J. Bacte.*, **171** : 2219-2221.
- Cairney J., I.R. Booth, C.F. Higgins, 1985 - *Salmonella typhimurium* pro P. gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J. Bact.*, **164** : 1218-1223.
- Carlucci A.F., D. Pramer, 1960 - An evaluation of factors affecting the survival of *E. coli* in seawater. *Appl. Microbiol.*, **8** : 243-256.
- Casadaban M.J., 1976 - Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *E. coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. mol. Biol.*, **104** : 541-555.
- Castle A.M., R.M. Macnab and R.M. Shulman, 1986 - Coupling between the sodium and proton gradients in respiring *E. coli* cells measured by ^{23}Na and ^{31}P nuclear magnetic resonance. *J. biol. Chem.*, **261** : 7797-7806.
- Chapeville F., H. Clauser, 1974 - *Biochimie - Techniques séparatives des acides aminés*. Herman (ed), pp : 142-144.
- Christian J.H.B., J. Walto, 1961 - The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *J. gen. Microbiol.*, **25** : 97-102.
- Colwell R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq, L.M. Palmer, 1985 - Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment : implications for release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnol.*, **3** : 817-820.
- Coyer J., J. Andersen, S.A. Forest, M. Inouye, 1990 - micF RNA in ompB mutants of *E. coli* : different pathways regulate micF RNA levels in response to osmolarity and temperature change. *J. Bact.*, **172** : 4143-4150.
- Dosch D.C., G.L. Helme, S.H. Sutton, F.F. Salvacion, W. Epstein, 1991 - Genetic analysis of potassium transport loci in *E. coli* : Evidence for three constitutive systems mediating uptake of potassium. *J. Bact.*, **173** : 687-696.
- Epstein W., S.G. Schultz, 1965 - Cation transport in *E. coli*. V. Regulation of cation content. *J. gen. Physiol.*, **49** : 221-234.
- Flatau G.N., R.L. Clément, M.J. Gauthier, D.C. Puel, 1992 - Effect of incubation of *E. coli* cells with halophyte extracts on their subsequent survival in seawater. *Can. J. Microbiol.*, **38** : 838-842.
- Gauthier M.J., P.M. Munro, S. Mohajer, 1987 - Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *E. coli* from seawater. *Curr. Microbiol.*, **15** : 5-10.
- Gauthier M.J., P.M. Munro, V.A. Breittmayer, 1988 - Damage to surface colonization factors of enteroadhesive *E. coli* during starvation survival in seawater. *Microbios Lettr.*, **38** : 37-45.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, R.L. Clément, 1990 - Influence of phosphate ions and alkaline phosphatase activity of cells on survival of *Escherichia coli* in seawater. *Microb. Ecol.*, **20** : 245-251.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, R.L. Clément, P.M. Munro, 1992 - Sensitivity of *Escherichia coli* cells to seawater closely depends on their growth stage. *J. appl. Bact.*, **73** : 257-262.
- Gauthier M.J., P.M. Munro, G.N. Flatau, R.L. Clément, V.A. Breittmayer, 1993 - Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries dans le milieu marin. *Mar. Life*, **3** : 1-18.
- Gerba C.P., J.S. MacLeod, 1976 - Effect of sediments on the survival of *E. coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32** : 114-120.
- Ghoul M., T. Bernard, M. Cormier, 1990 - Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediments. *Appl. environ. Microbiol.*, **56** : 551-554.
- Glass R.E., 1982 - Control of bacterial gene expression. In : *Gene function E. coli and its heritable elements*. Croom (ed), Helm, London, pp. 390-423.
- Grimes D.J., R.W. Atwell, R.R. Brayton, L.M. Palmer, D.M. Rollins, D.B. Roszak, F.L. Singleton, M.L. Tamplin, R.R. Colwell, 1986 - The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environment. *Microbiol. Sci.*, **3** : 324-329.
- Gutierrez C., M. Arduorel, E. Bremer, A. Middendorf, W. Boos, U. Ehman, 1989 - Analysis and DNA sequence of the osmoregulated treA gene encoding the periplasmic trehalase of *E. coli* K12. *Mol. gen. Genet.*, **217** : 347-354.
- Higgins C.F., J. Cairney, D.A. Stirling, L. Sutherland, I.R. Booth, 1987 - Osmotic regulation of gene expression

- ionic strength as an intracellular signal ? *Biochem. Sci.*, **12** : 339-344.
- Kennedy E.P., 1982 - Osmotic regulation and the biosynthesis of membrane derived oligosaccharides in *E. coli*. *Proc. natn Acad. Sci. USA*, **79** : 1092-1095.
- Larsen P.I., L.K. Sydnès, B. Landfald, A.R. Strom, 1987 - Osmoregulation in *E. coli* by accumulation of organic osmolytes : betaines, glutamic acid, and trehalose. *Archs. Microbiol.*, **147** : 1-7.
- Leirimo S., C. Harrison, D.S. Cayley, R.R. Burgess, J. Record, 1987 - Replacement of KCl by K⁺ glutamate dramatically enhances protein-DNA interactions in vitro. *Biochemistry*, **26** : 7157-7164.
- Le Rudulier D., A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith, R.C., Valentine, 1984 - Molecular biology of osmoregulation. *Science*, **224** : 1064-1068.
- Lucht J.M., E. Bremer, 1991 - Characterization of mutations affecting the osmoregulated pro U promoter of *E. coli* and identification of 5' sequences required for high level expression. *J. Bact.*, **173** : 801-809.
- Maniatis T., E.F. Fritsch, J. Sambrook, 1982 - *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, pp : 440-441.
- May G., E. Faatz, M. Villarejo, E. Bremer, 1986 - Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *E. coli* K12. *Mol. gen. Genet.*, **205** : 225-233.
- Munro P.M., M.J. Gauthier, F. Laumond, 1987 - A previous growth of enteric bacteria on a salted medium increases their survival in seawater. *Lett. appl. Microbiol.*, **4** : 121-124.
- Muzuno T., A. Shinkai, K. Matsui, A. Mizushima, 1990 - Osmoregulatory expression of porin genes in *E. coli* : a comparative study on strains B and K12. *FEMS Microbiol. Lett.*, **68** : 289-294.
- Nikaïdo H., E.Y. Rosenberg, 1983 - Porin channels in *E. coli* : Studies with Liposomes reconstituted from purified proteins. *J. Bact.*, **153** : 241-252.
- Oliver J.D., 1993 - Formation of viable but non culturable cells. In: *Starvation in bacteria*. S. Kjelleberg (ed), Plenum Press, New York, pp. 239-272.
- Perroud B., D. Le Rudulier, 1985 - Glycine betaine transport in *E. coli* : osmotic modulation. *J. Bact.*, **161** : 393-401.
- Prince W.S., M.R. Villarreal, 1990 - Osmotic control of pro U transmission is mediated through direct action of potassium glutamate on the transcription complex. *J. biol. Chem.*, **265** : 17673-17679.
- Reed R.H., W.D.P. Stewart, 1985 - Evidence for turgor-sensitive K⁺ influx in the *Cyanobacterium anabena variabilis* ATCC 29413 and *Synechocystis* PCC 6714. *Biochim. Acta*, **812** : 155-162.
- Rod M.L., K.Y. Alam, P.R. Cunningham, D.P. Clark, 1988 - Accumulation of trehalose by *E. coli* K12 at high osmotic pressure depends on the presence of amber suppressors. *J. Bact.*, **170** : 3601-3610.
- Schultz J.E., A. Martin, 1991 - Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *E. coli*. *J. mol. Biol.*, **218** : 129-140.
- Styrvold O.B., A.R. Strom, 1991 - Synthesis, accumulation and excretion of trehalose in osmotically stressed *E. coli* K12 strains : influence of amber suppressor and function of the periplasmic trehalase. *J. Bact.*, **173** : 1187-1192.
- Tempest D.W., J.L. Meers, C.M. Brown, 1970 - Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acid pools. *J. gen. Microbiol.*, **64** : 171-185.
- Walderhaug M.O., D.C. Dosch, W. Epstein, 1987 - Potassium transport in bacteria. In : B.P. Rosen, S. Silver, (eds), *Ion transport in prokaryotes*. Academic Press, San Diego, pp: 85-130.
- Welsh D.T., R.H. Reed and R.A. Herbert, 1991 - The role of trehalose in the osmoadaptation of *E. coli* NCIB 9484 : interaction of trehalose, K⁺ and glutamate during osmoadaptation in continuous culture. *J. gen. Microbiol.*, **137** : 745-750.
- Xu H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1982 - Survival and viability of non culturable *E. coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, **8** : 313-323.

Reçu en octobre 1994 ; accepté en juillet 1995.
Received October 1994; accepted July 1995.