

Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries dans le milieu marin

New prospects on adaptation of enteric bacteria in marine environments

par Michel J. Gauthier, Patrick M. Munro, Gilles N. Flatau, René L. Clément et Violette A. Breittmayer
I.N.S.E.R.M., Unité 303 ; 1, avenue Jean Lorrain, 06300 Nice (France)

Mots clés : milieux marins, entérobactéries, survie, adaptation, réponses aux stress

Key-words: marine environments, Enterobacteriaceae, survival, adaptation, stress responses

RÉSUMÉ

Gauthier Michel J., P.M. Munro, G.N. Flatau, R.L. Clément et V. A. Breittmayer, 1993 - Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries dans le milieu marin. *Mar. Life*, **3** (1-2) : 1 - 18.

Le devenir en mer des bactéries intestinales humaines préoccupe les microbiologistes depuis plus d'un siècle. Le concept de mortalité de ces bactéries, quasi dogmatique jusqu'aux années 1970, a profondément changé avec le développement des techniques permettant le dénombrement direct des bactéries vivantes. On a alors pu montrer que ces germes évoluent dans l'eau de mer vers un état stressé éventuellement revivable, puis vers un état dormant viable mais non cultivable sous lequel elles conserveraient leur pouvoir pathogène. L'existence de ces formes dormantes pose un problème sanitaire non encore résolu car les recherches sont rendues difficiles par le défaut de culture des cellules. La question a été abordée par notre groupe INSERM a contrario, en cherchant à identifier les mécanismes qui permettent à ces bactéries de ne pas évoluer vers la dormance et de s'adapter activement aux conditions marines. Cet article passe en revue ces mécanismes, mis en évidence au niveau cellulaire puis moléculaire. Il semble que la résistance des entérobactéries à l'eau de mer dépende étroitement de leur état de croissance préalable et des conditions dans lesquelles elles ont vécu du milieu entérique à la mer. La phase de transit dans les eaux usées pourrait être déterminante de ce point de vue. Deux ensembles de processus jouent un rôle très important dans ce sens : la régulation osmotique et l'adaptation à la carence alimentaire. Celle-ci génère un état de résistance à l'eau de mer dont on commence à soupçonner le déterminisme génétique. Diverses hypothèses de travail sont évoquées pour de futures investigations dans ce domaine.

ABSTRACT

Gauthier Michel J., P.M. Munro, G.N. Flatau, R.L. Clément et V. A. Breittmayer, 1993 [New prospects on adaptation of enteric bacteria in marine environments]. *Mar. Life*, **3** (1-2) : 1 - 18.

The behavior in seawater of enteric bacteria of human origin has been investigated by microbiologists for more than a century. The concept of mortality virtually a dogma up to the 1970's has changed radically with the development of new techniques allowing direct and specific counting of bacterial cells. It has now been shown that these bacteria progress in seawater towards a stressed state from which they might be reactivated, then towards a viable but non-culturable dormant state under which they could retain pathogenicity. The existence of these dormant cells poses a serious health problem that is as yet unsolved, since research is made more

difficult by the impossibility of culturing the cells. Our INSERM group has approached the question a contrario, by trying to identify the main mechanisms preventing cells from developing towards dormancy and allowing them to actively adapt to marine conditions. This review describes these mechanisms at both cellular and molecular levels. Resistance of Enterobacteriaceae to seawater seems to depend closely on their growth stage and on growth conditions. Under natural conditions, their transit in sewage could be highly significant and influential. Two major processes play an important role here : osmoregulation and adaptation to nutrient starvation. The latter generates a seawater-resistance state under the direct influence of sigma factors. Several working hypotheses are proposed for further investigations in this field.

INTRODUCTION

Le devenir en mer des bactéries entériques humaines, et plus spécialement celui des espèces pathogènes, est un vieux problème, posé il ya plus de cent ans sous l'impulsion des hygiénistes (De Giaxa, 1889). L'intérêt de la communauté scientifique pour cette question apparaît clairement à l'examen des très nombreux travaux publiés dans ce domaine au cours du siècle écoulé, dont diverses revues ont été proposées (Paoletti, 1965a ; Mitchell, 1968 ; Aubert *et al.*, 1981 ; Roszak et Colwell, 1987).

Il est possible de distinguer deux grandes périodes dans l'acquisition des connaissances sur le comportement des entérobactéries en milieu marin. La charnière se situe vers la moitié des années 1970 et correspond au développement de nouvelles méthodes de détection et de dénombrement des bactéries dans les milieux naturels.

Selon l'ancienne conception, les entérobactéries étaient détruites plus ou moins rapidement sous l'action conjuguée de nombreux facteurs physiques (température, lumière solaire), chimiques (salinité, pH, métaux toxiques, carence alimentaire) et biologiques (micro et macroprédateurs, compétitions, substances antibiotiques) conférant au milieu marin ce que l'on a appelé son "pouvoir auto-épurateur". Ce concept de mortalité inéluctable a été fondé sur un ensemble impressionnant de résultats expérimentaux et d'observations sur le terrain. Bien qu'ayant fait l'objet de vives controverses quant à l'importance relative des divers facteurs épurateurs, il a été admis par la plupart des microbiologistes au point de devenir quasi-dogmatique. Au plan strictement écologique, il attribuait la destruction des bactéries en mer à la seule intervention de facteurs environnementaux, donc *extrinsèques* aux germes. Dès 1960, pourtant, certains investigateurs ont décrit l'existence de formes transformées des entérobactéries dans des échantillons marins, plus difficilement cultivables au laboratoire et à phénotype très atypique (Brisou, 1962). Ils suggéraient que ces bactéries pouvaient développer en eau de mer certains mécanismes *intrinsèques* capables de prolonger leur survie au prix de modifications structurales et métaboliques. Ces observations n'ont reçu aucun écho dans la discipline, vraisemblablement parce que leurs implications *écologiques* et *épidémiologiques* n'ont pas été comprises par une communau-

té de microbiologistes encore fortement inféodée à la microbiologie *médicale*.

Au cours des années 1970, d'importants progrès ont été faits dans la connaissance du comportement des bactéries à intérêt sanitaire (indicatrices et pathogènes) dans les milieux naturels hostiles. L'un des plus significatifs a suivi la mise en évidence de formes *stressées* des bactéries soumises à des facteurs agressifs (revue dans : McFeters et Singh, 1991). Ce concept de stress est apparu avec l'observation de l'amélioration du dénombrement des coliformes des eaux douces chlorées (eaux d'alimentation, piscines) en milieux liquides (MPN) (Rhodes *et al.*, 1983 ; Rhodes 1984). Des études menées dans les domaines de la microbiologie des aliments, du sol ou des eaux ont montré que certains agents physico-chimiques (froid, chaleur, rayonnements, sels, dessiccation, désinfectants...) pouvaient provoquer chez les microorganismes des perturbations structurales ou fonctionnelles telles qu'ils devenaient incapables de cultiver sur milieux sélectifs mais retrouvaient leur potentiel après revivification en milieux non inhibiteurs (Bissonnette, 1975 ; Hurst 1977 ; Busta, 1978 ; Dawe et Penrose, 1978 ; Camper et Mc Feters, 1979 ; Kapuscinski et Mitchell, 1981). De nouvelles techniques et de nouveaux milieux ont alors été élaborés pour pallier ces inconvénients et permettre le dénombrement des bactéries stressées (Speck *et al.*, 1975 ; Green *et al.*, 1977 ; Mossel et Corry, 1977 ; Tang et Jackson, 1979 ; Zaské et Dockins, 1980 ; LeChevallier et Cameron, 1983 ; McFeters *et al.*, 1982 ; Rhodes *et al.*, 1983). Les recherches se sont en outre orientées vers la mise au point de méthodes de dénombrement *direct* des bactéries au microscope, évitant l'écueil d'un éventuel défaut de culture. La méthode de dénombrement par épifluorescence, utilisant le marquage des cellules bactériennes par des fluorochromes s'intercalant dans l'ADN (acridine orange, diamidinophenyl indole ou DAPI), a connu les plus grands succès dans tous les domaines de l'écologie microbienne. Elle a cependant deux inconvénients majeurs : elle ne différencie pas les cellules mortes des cellules vivantes et elle est totalement dénuée de spécificité. Ces limites ont été repoussées grâce à l'élaboration de techniques, dérivées ou non de l'épifluorescence, permettant soit le dénombrement spécifique des cellules vivantes (Kogure *et al.*, 1979 ; Zimmerman *et al.*, 1978 ; Maki et Remsen,

1981), soit celui de certaines espèces (revue dans Roszak et Colwell, 1987 ; McKay, 1992).

En ce qui concerne le devenir des bactéries entériques en milieu marin, la possibilité de dénombrer les cellules vivantes a ouvert la voie à des investigations auparavant impossibles, aussi bien au laboratoire qu'en milieu naturel. Les résultats de ces études ont fondamentalement renouvelé les idées et les concepts dans ce domaine. Il faut citer ici le rôle de pionnier joué par le groupe de R. Colwell aux Etats-Unis (Université du Maryland). C'est essentiellement à lui que l'on doit la mise en évidence de l'évolution des bactéries entériques vers un état viable mais non cultivable (ou VNC) dans les milieux aquatiques (Grimes *et al.*, 1986, Colwell, 1987 ; etc) et, par la suite, certaines idées fondamentales concernant les stratégies d'adaptation des bactéries dans l'environnement (Roszak et Colwell, 1987). Au cours des quinze dernières années, de nombreux travaux ont été réalisés dans cette voie, concernant fréquemment l'espèce modèle *E. coli*, mais aussi les pathogènes: salmonelles (*Salmonella typhimurium*, *S. paratyphi* B, *S. enteritidis*), d'autres Entérobactéries (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia*) (Xu *et al.*, 1982 ; Roszak *et al.*, 1984 ; Grimes et Colwell, 1986) et diverses espèces entériques n'appartenant pas à cette famille : *V. cholerae* surtout, mais aussi *Campylobacter jejuni* (Rollins et Colwell, 1986; Jones *et al.*, 1991). L'ancien concept de mortalité a donc été profondément remanié, l'accent étant mis sur le potentiel adaptatif de ces bactéries par l'intermédiaire de mécanismes *intrinsèques*. A l'évidence, cette alternative ne diminue en rien le rôle épurateur des facteurs environnementaux, en particulier la prédation (Sorensen, 1991), mais rejette objectivement la notion de mortalité systématique des cellules non détruites par ces facteurs externes. Elle atténue aussi l'impact de certains d'entre eux, réputés drastiques, comme la lumière, dont on sait maintenant qu'elle ne tue pas immédiatement les bactéries dans les milieux aquatiques mais accélère leur évolution vers la dormance (Barcina *et al.*, 1989). L'existence de bactéries dormantes non cultivables revêt en outre une grande importance sanitaire et épidémiologique dans la mesure où certains résultats suggèrent fortement que les formes dormantes et éventuellement revivifiables des espèces pathogènes conservent leur potentiel infectieux (Grimes et Colwell, 1986 ; Grimes *et al.*, 1986). Ce nouveau concept n'est d'ailleurs pas restreint à l'environnement marin : l'évolution des bactéries pathogènes d'origine humaine vers la dormance a été décrite dans tous les milieux aquatiques et dans les sols (Roszak et Colwell, 1987 ; Turpin *et al.*, 1993).

Dans ce contexte, notre groupe INSERM a ouvert une voie de recherche parallèle en analysant les mécanismes cellulaires et moléculaires qui pourraient éviter (ou freiner) l'évolution de ces bactéries vers l'état VNC, donc favoriser leur implantation dans le milieu marin. Ces recherches, entre-

prises dès 1986, ont permis d'identifier certains de ces processus, dont les plus significatifs en termes de survie en mer concernent la régulation osmotique et l'adaptation à la carence alimentaire.

LA VIE EN EAU DE MER PROVOQUE UNE PROFONDE ALTÉRATION STRUCTURALE ET MÉTABOLIQUE DES ENTÉROBACTÉRIES

Pour mieux comprendre la signification écologique, sanitaire et épidémiologique de ces mécanismes, il est nécessaire d'examiner auparavant les modifications somatiques subies par les entérobactéries lors d'un séjour prolongé dans l'eau de mer.

L'évolution à long terme d'*E. coli* dans l'eau de mer oligotrophe s'accompagne d'altérations structurales importantes qui concernent l'ensemble des compartiments cellulaires : perte des flagelles, pili et fimbriae (Gauthier *et al.*, 1988a, 1988b), déformation de la paroi provoquant celle de la cellule, élargissement de l'espace périplasmique, modification de la composition en protéines de la membrane cytoplasmique, ségrégation du chromosome au centre du cytoplasme et parfois même rétraction de celui-ci dans l'enveloppe (Gauthier *et al.*, 1989a). La teneur en protéines totales décroît aussi très vite, jusqu'à environ 50 % du pool initial après 4 à 5 jours d'incubation (Hood *et al.*, 1986 ; Gauthier *et al.*, 1989a). La protéolyse s'accompagne cependant de la synthèse de nouvelles protéines qui peuvent jouer un rôle positif au cours de la survie (Reeve *et al.*, 1984). Nous développerons ce point plus loin. La croissance en eau de mer naturelle est également génératrice de modifications dans la composition protéique de la paroi d'*E. coli* (Chai, 1983 ; Munro *et al.*, 1987a).

Contrairement à ce qui a été observé chez *V. cholerae* et de nombreuses bactéries marines (Morita, 1982), ces modifications structurales ne s'accompagnent pas d'une diminution importante de la taille chez *E. coli* (Gauthier *et al.*, 1989a). Par contre, l'apparition de formes naines capables de traverser les filtres à pores de 0,45 µm a été décelée chez *Pseudomonas aeruginosa* (Bakhrouf *et al.*, 1989) et *S. paratyphi* B (Bakhrouf *et al.*, 1990) après quelques jours d'incubation en eau de mer. S'agissant d'espèces pathogènes, ces modifications pourraient avoir une incidence plus ou moins marquée aux plans épidémiologique et sanitaire. Ainsi, la perte des pili et fimbriae peut modifier la virulence des pathotypes d'*E. coli* après leur séjour dans l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1988a), certains de ces organites étant impliqués dans l'expression du pouvoir pathogène de ces bactéries (Parry et Rooke, 1985 ; Cerf, 1989). Les plasmides codant pour ces structures sont cependant préservés (Grimes et Colwell, 1986 ; Gauthier *et al.*, 1989a) malgré leur instabilité dans l'environnement, ce qui assujettit le maintien du pouvoir pathogène à la restauration des

facteurs de colonisation lors d'un transit ultérieur des cellules *in vivo* (Gauthier *et al.*, 1989a). Par ailleurs, l'existence de formes filtrables des espèces pathogènes comme les salmonelles est un écueil pour leur dénombrement en routine, puisque la recherche de ces germes nécessite la filtration préalable de grands échantillons d'eau de mer (UNEP/WHO, 1983). Enfin, l'altération de la paroi modifie les récepteurs des phages, donc le lysotype des cellules (Munro *et al.*, 1987a) et peut perturber leur sensibilité aux antibiotiques et aux métaux lourds (Munro *et al.*, 1987a ; Malouin *et al.*, 1991).

Ces altérations structurales sont sans doute responsables des perturbations physiologiques couramment observées chez les entérobactéries incubées dans l'eau de mer. Les activités enzymatiques d'*E. coli* sont modifiées au profit des activités cataboliques (estérases, lipases, phosphatases, protéases). L'activité β -galactosidase, sur laquelle est fondée la détection des coliformes sur milieux spécifiques au lactose, disparaît en quelques jours (Anderson *et al.*, 1979 ; Munro *et al.*, 1987a), alors que l'activité phosphatase alcaline augmente considérablement (Munro *et al.*, 1987a), vraisemblablement parce qu'elle est induite à haute osmolarité (Villarejo *et al.*, 1983). Ces transformations peuvent altérer le phénotype des souches d'une manière telle qu'il n'est plus identifiable par rapport aux schémas d'identification classiques. Ce biais de détection, déjà soupçonné par Brisou (1962), a été confirmé pour *E. coli* (Munro *et al.*, 1987a) et *S. paratyphi* B (Bahkrouf *et al.*, 1992).

LA SURVIE EN MER DÉPEND DE MÉCANISMES MIS EN PLACE DANS LES CELLULES AVANT LEUR REJET DANS CE MILIEU

Dans la presque totalité des études antérieures, le comportement des entérobactéries humaines dans l'eau de mer, que ce soit au laboratoire ou dans le milieu naturel, a été analysé à l'aide de cellules préalablement cultivées dans les conditions idéales du laboratoire, en milieux complexes riches en substrats nutritifs organiques, fortement tamponnés, à basse osmolarité et exempts d'éléments toxiques. Ces études n'ont donc pas tenu compte des conditions dans lesquelles ces bactéries sont produites *in vivo*. En outre, les cellules ont presque toujours été transférées directement à l'eau de mer, sans transition préalable. En fait, nos résultats démontrent qu'il s'agit là de graves biais expérimentaux. Au cours des années récentes, nous avons observé que le devenir en eau de mer de ces bactéries dépend fortement des conditions dans lesquelles elles ont été cultivées (ou simplement maintenues) avant leur suspension en eau de mer, et plus étroitement encore du stade de croissance atteint au moment de ce transfert. La raison pourrait en être que la survie nécessite le maintien (ou la restauration rapide) de l'homéostasie cellulaire dans les conditions marines et que ceci peut dépendre de mécanismes préalablement installés dans les cellules au cours des épisodes précédant leur rejet en

Tableau I - Conditions physico-chimiques^a existant dans les milieux naturels où les bactéries entériques se développent et séjournent entre l'homme et la mer et qui peuvent influencer le devenir de celles-ci dans le milieu marin. / *Physico-chemical^a conditions prevailing in natural environments in which enteric bacteria grow or stay between man and sea, and which may influence their fate in marine environments.*

Conditions :	MILIEU ENTÉRIQUE		EAU USÉE	MILIEU MARIN			
	INTESTIN (ileum, ceacum, colon)	TRACTUS URINAIRE		EAU	SÉDIMENT	ANIMAUX	SURFACES
Température (°C)	37/41	37/41	2/27	10/26	Id	Id	Id
Eh (mV)	-150/-200.	-150/-200	+150/+200	>+200	id	id	Id
Osmolarité (mOsm/kg)	250/700	x/650	30/60	>900	>900	?	>900
pH	6/7.5	5.5/7	var	8/8.3	var	?	?
Lumière	-	-	++/-	++/-	-	-	+/-
Nutrilités	++	++	+ (-)	(-)	+	+ (++)	+
Osmolytes	?	+	?	(-)	+	?	?
Surfactants	++	+	++	-	-	?	?

^a Symboles : -, absence ; +, présence ; ++, présence en grande quantité ; ?, inconnu ; les parenthèses désignent des caractéristiques probables mais non formellement démontrées. / ^a Symbols : -, absence ; +, presence ; ++ presence in high amount ; ?, unknown ; in parentheses, presence not strictly proved.

mer. En tout état de cause, cette hypothèse nous a fourni un bon fil conducteur pour analyser les mécanismes permettant l'adaptation des entérobactéries au milieu marin.

Influence des conditions de croissance ou de transit des cellules entre le milieu entérique et la mer

Dans les conditions naturelles, il est exceptionnel que les bactéries issues du milieu entérique passent directement de l'homme à la mer. Elles sont presque toujours véhiculées par les eaux usées, milieu transitoire très différent des milieux entériques et marins. *In fine*, leur adaptation aux conditions marines n'est possible que si elles réussissent à modifier progressivement leur structure et leur métabolisme au cours du cheminement depuis l'état de *croissance* en milieu entérique (milieu *producteur* initial) jusqu'à l'état de *survie* en milieu marin (milieu *récepteur* final). Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces trois milieux, ou tout au moins celles qui peuvent influencer la survie dans les conditions marines, sont présentées dans le Tableau 1.

La lumière intestinale et le chyme forment un milieu obscur, anaérobie, chaud, à haute osmolarité et forte teneur en substrats nutritifs assimilables (glucose, acides aminés, acides gras, facteurs de croissance) (Leclerc et Mossel, 1989b) qui contient en outre une forte concentration de surfactants (sels biliaires) et une importante couche muqueuse qui paraît jouer un rôle important dans le développement bactérien (Ducluzeau, 1989 ; Krivan *et al.*, 1992). Le tractus urinaire est un milieu globalement assez voisin de l'intestin, exceptée la présence de certains composants particuliers de l'urine. Ces deux milieux permettent la croissance des entérobactéries, à l'état normal dans l'intestin, et uniquement au cours d'infections dans le tractus urinaire.

L'eau de mer est un milieu à haute osmolarité (environ 1000 mOsm/kg, équivalent à 0,5M de NaCl), alternativement obscur et lumineux, généralement froid, aérobie et très pauvre en substrats nutritifs assimilables. Les sédiments, par contre, sont obscurs, aérobies ou anaérobies, et contiennent de plus fortes teneurs en matières organiques et en phosphates que l'eau elle-même. A la surface des substrats immergés, comme dans le tube digestif des animaux, il est probable que les matières organiques sont beaucoup plus abondantes, certaines d'entre elles pouvant avoir une influence protectrice sur les germes entériques. Quoi qu'il en soit, le milieu marin peut, à l'évidence, être considéré comme un *milieu extrême* pour les entérobactéries humaines.

Importance de l'état de croissance des cellules

Des études récentes ont montré que le comportement des entérobactéries en eau de mer varie

considérablement selon leur âge et la phase de leur croissance (Gauthier *et al.*, 1989b ; Gauthier *et al.*, 1992c) (Figure 1).

La sensibilité des cellules à l'eau de mer, caractérisée par la perte de leur pouvoir de culture, augmente très rapidement (de 4 à 5 ordres de grandeur) pendant la phase de latence, puis diminue au cours de la phase exponentielle et devient minimale en phase stationnaire. L'importance de ces variations tient au fait qu'elles sont toutes des fonctions logarithmiques du temps, donc très rapides au cours de la croissance. La connaissance aussi précise que possible des conditions dans lesquelles les entérobactéries se développent *in vivo* est donc déterminante, et ceci à deux titres au moins : pour éviter une trop forte variabilité expérimentale au cours des études en micro-(ou méso)cosmes, et pour établir une meilleure adéquation entre ces conditions expérimentales et les conditions naturelles. Nous verrons plus loin qu'elle pourrait également servir de base objective à l'amélioration des méthodes de traitement des eaux usées.

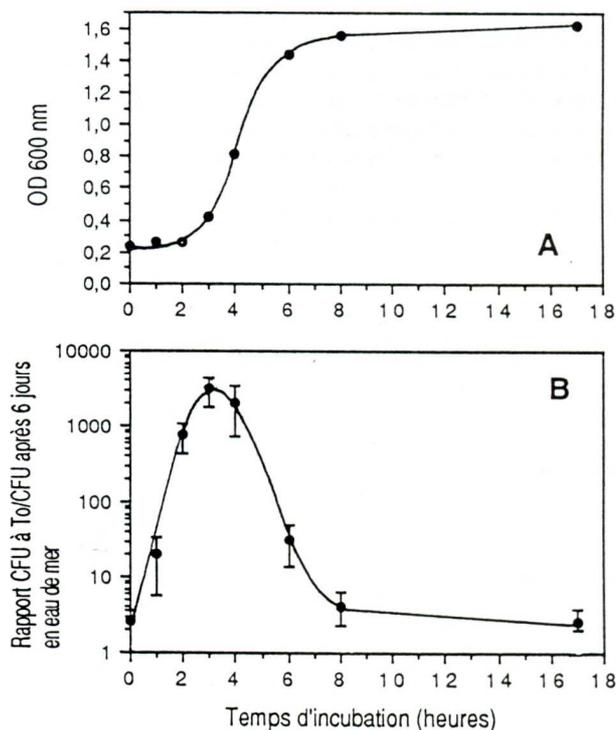


Figure 1 - Sensibilité à l'eau de mer (22/25 °C), évaluée en fonction de la perte du pouvoir de culture, des cellules d'*Escherichia coli* K-12 MC4100 selon la phase de croissance atteinte avant leur transfert à l'eau de mer. A : courbe de croissance de la bactérie en milieu minimal glucosé M9 ; B : nombre de cellules cultivables (sur milieu Nutrient Agar, Difco) obtenu à partir de chaque lot de cellules après 6 jours d'incubation en eau de mer naturelle filtrée (membranes à pores de 0,45 µm).

Figure 1 - Sensitivity to seawater (22/25°C), measured as the loss of culturability, of *Escherichia coli* K-12 MC4100 cells according to the growth phase of cells before their transfer to seawater. A : growth curve in glucose minimal medium M9; B, number of culturable cells (on Nutrient Agar medium, Difco) in each set of cells after 6 days of incubation in natural filtered seawater (membranes, pore size 0,45 µm)

La croissance des entérobactéries dans les milieux entériques est encore mal connue, surtout pour ce qui concerne le milieu intestinal, car sa flore est très complexe (Leclerc et Mossel, 1989b) et les conditions offertes aux bactéries y varient selon de nombreux facteurs dont la nature des aliments, l'effet de barrière des microorganismes, les défenses immunitaires de l'hôte et les états pathologiques (Ducluzeau et Raibaud, 1979 ; Ducluzeau, 1989). En milieu intestinal "standard" et plus particulièrement dans la portion de l'intestin où les entérobactéries se développent (ileum distal, caecum et colon), le temps de génération de *E. coli* est d'environ 16 à 20h (Ducluzeau, 1989 ; Leclerc et Mossel, 1989a, 1989b). Des valeurs analogues ont été obtenues pour la flore intestinale des animaux de laboratoire (Gibbons et Kapsimalis, 1967). Cette croissance *in vivo* est donc très lente par rapport à celle que l'on observe dans les milieux de culture (temps de génération de *E. coli* = 20 à 30 min), essentiellement du fait de l'effet de barrière qu'exerce la flore intestinale dominante, 100 à 1000 fois plus dense que celle des entérobactéries (Ducluzeau, 1989 ; Leclerc et Mossel, 1989a). Par ailleurs, le temps de transit des aliments dans le colon est en moyenne de 24 à 30h dans les conditions normales (Glass, 1984 ; Bernier, 1988). Il ne permet donc que quelques divisions des entérobactéries commensales (dont les espèces indicatrices comme les coliformes fécaux et les espèces pathogènes "silencieuses" des porteurs sains). Leur croissance est cependant stoppée dans le colon distal du fait de la rétention d'eau et de l'hyperosmolarité résultante. Il est donc possible que ces bactéries soient éliminées dans les matières fécales en phase de croissance très ralentie ou en phase stationnaire. Dans les conditions pathologiques, ce schéma est largement perturbé. La diarrhée accélère le transit des aliments (6 à 12h) (Bernier, 1988) dans le caecum et le colon mais la croissance bactérienne y est plus rapide (temps de génération de 4 à 6h pour *E. coli*, par exemple). Les entérobactéries pathogènes (salmonelles, pathotypes d'*E. coli*, shigelles, *Yersinia*, etc ...) peuvent donc se multiplier et y atteindre des concentrations élevées (en moyenne 10^7 à 10^9 /g de contenu intestinal, jusqu'à 10^{11} /g de matières fécales pour *S. typhi*) (LeMinor *et al.*, 1989 ; Leclerc et Mossel, 1989b, 1989c). Dans cette situation, les cellules pourraient être rejetées avec les matières fécales à un stade plus précoce de leur croissance. La constipation freine au contraire le transit (4 à 6 jours, voire plus) (Bernier, 1988) ce qui prolongerait la croissance, mais accroît la rétention d'eau ce qui arrête probablement la croissance des entérobactéries. Il est encore très difficile de conclure objectivement sur ce point. L'eau usée contient vraisemblablement des entérobactéries à divers stades de croissance, mais il est peu probable qu'elles aient été émises de l'intestin en phase de croissance exponentielle.

Bien qu'aseptique dans les conditions normales, le milieu urinaire est aussi très favorable au

développement des entérobactéries (Asscher *et al.*, 1966). On ne connaît pas le temps de génération des entérobactéries responsables d'affections urinaires (*E. coli*, essentiellement) dans l'urine *in vivo*. Au laboratoire, il a été évalué à environ 50 à 60 minutes pour le colibacille, à 37°C et en aérobiose (Kunin *et al.*, 1992). Dans les conditions anaérobies des voies urinaires, il est probablement plus long : les colibacilles seraient donc éliminés dans les urines en phase de croissance plus ou moins tardive, mais ceci reste à préciser.

Le stade de croissance atteint *in vivo* par les entérobactéries au moment de leur rejet dans l'environnement reste donc mal défini. Dans les conditions normales, il pourrait cependant correspondre à une phase de croissance tardive ou au stade stationnaire des cultures au laboratoire. Les cellules seraient alors dans un état intrinsèquement plus résistant à l'eau de mer. Au cours d'épisodes pathologiques, par contre, l'accélération du transit intestinal ou la fréquence accrue des mictions, pourraient conduire au rejet de cellules plus jeunes, en phase de croissance, donc sensiblement moins résistantes aux conditions marines.

**Importance des conditions de croissance des cellules et rôle de la régulation osmotique.
Cas du transit dans les eaux usées**

Les conditions physico-chimiques dans lesquelles les cellules ont été cultivées (pH, température, degré d'oxygénation, pression osmotique, nature et concentration des substrats nutritifs) modifient également le comportement de celles-ci dans l'eau de mer. Des tests de laboratoire ont montré que les entérobactéries sont plus résistantes à ce milieu lorsqu'elles sont préalablement cultivées en aérobiose, à pH voisin de la neutralité, près de leur optimum thermique, et surtout à haute osmolarité (Figure 2) (Gauthier *et al.*, 1989b). D'autre part, nous verrons plus loin que les systèmes de transport de divers substrats carbonés sont généralement plus efficaces dans l'eau de mer chez les cellules d'*E. coli* cultivées à haute osmolarité que chez celles qui sont cultivées à basse osmolarité.

Au cours des huit années écoulées, notre groupe a montré l'influence prépondérante de la régulation osmotique sur le pouvoir de survie des entérobactéries (*E. coli*, *S. paratyphi* B, *S. typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Proteus morgani*) dans l'eau de mer et leur adaptation éventuelle à ce milieu.

E. coli et *S. typhimurium* peuvent s'adapter au stress hyperosmotique grâce à divers mécanismes (Csonka, 1989 ; Csonka et Hanson, 1991) fonctionnant d'une manière intégrée (Booth *et al.*, 1987) : accumulation de potassium (Epstein, 1986), synthèse ou transport de son contre-ion le glutamate (Booth *et al.*, 1987), synthèse de tréhalose (Boos *et al.*, 1990 ; Styrvold et Strom, 1991), transport ou

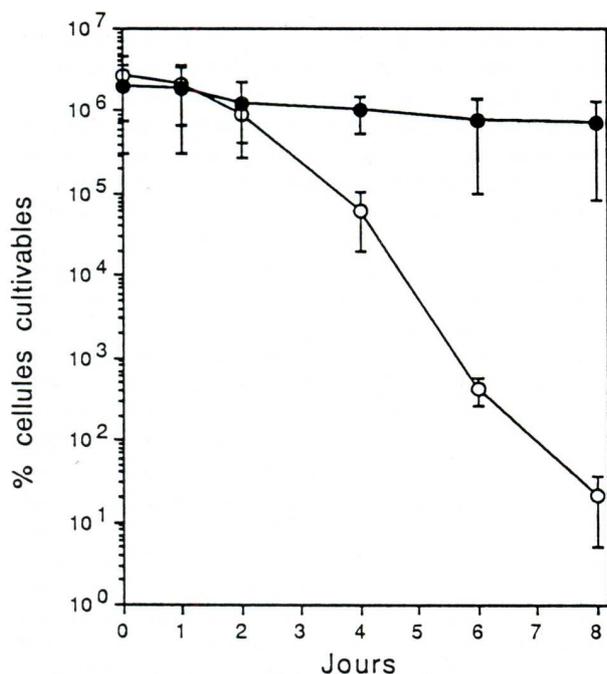


Figure 2 - Décroissance dans l'eau de mer naturelle filtrée (22/25°C) du nombre de cellules cultivables d'*Escherichia coli* K-12 MC4100 préalablement cultivées en milieu minimal glucosé M9 non salé (points blancs) ou additionné de NaCl 0,5 M (points noirs). Les barres représentent l'écart-type calculé à partir de trois expériences séparées. Des résultats tout à fait analogues ont été obtenus avec des cellules cultivées dans d'autres milieux (Luria Broth, Tryptycase Soy Broth, Nutrient Broth, etc...) et lorsque NaCl a été remplacé par LiCl ou du saccharose à osmolarité égale.

Figure 2 - Decrease in natural filtered seawater (22/25°C) of the number of culturable *Escherichia coli* K-12 MC4100 cells previously grown in glucose minimal medium M9 supplemented (black dots) or not supplemented (white dots) with NaCl 0.5M. Each bar represents standard deviation from three separate experiments. Similar results were obtained with cells grown in other media (Luria Broth, Tryptycase Soy Broth, Nutrient Broth, etc) and when NaCl was replaced by LiCl or sucrose at equal osmolarity.

synthèse de bétaines (LeRudulier *et al.*, 1984) et modification de la composition en porines de la paroi (Lugtenberg *et al.*, 1976 ; Van Alphen et Lugtenberg, 1977 ; Barron *et al.*, 1986, Nikaido et Vaara, 1987). L'étape la plus précoce réside dans le transport de potassium et la synthèse de glutamate, qui ne confèrent cependant aux cellules qu'une protection basse (300 mM NaCl au plus) car ces éléments ne sont pas compatibles avec le métabolisme à forte concentration (Booth *et al.*, 1987). La synthèse ou le transport ultérieurs d'osmolytes compatibles (tréhalose, bétaines) assurent une protection complète jusqu'à des pressions osmotiques élevées et permettent la reprise de la croissance (LeRudulier *et al.*, 1984 ; Perroud et LeRudulier, 1985).

Nous avons montré que tous ces mécanismes confèrent aux entérobactéries une forte et durable résistance à l'eau de mer (Munro *et al.*, 1989). Cette observation explique l'effet protecteur de la culture préalable en milieux salés, qui préadapte ces

germes à la vie à haute osmolarité et évite le choc hyperosmotique qu'ils subissent dans l'eau de mer. Cette propriété paraît spécifique aux entérobactéries (Munro *et al.*, 1987b). Au plan pratique, une amélioration significative du dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale (coliformes fécaux) dans les échantillons d'origine marine peut être obtenue par l'utilisation de milieux salés (Gauthier *et al.*, 1987) ou additionnés de glycine bétaine (Roth *et al.*, 1988), qui assurent une meilleure reviviscence des cellules stressées.

La réponse des entérobactéries au stress osmotique est induite ou activée dans les milieux dont l'osmolarité est supérieure à 250 mOsm/kg (Csonka et Hanson, 1991). Or les milieux entériques (contenu intestinal et urine) ont une osmolarité nettement supérieure à ce seuil. La pression osmotique du chyme est d'environ 250 à 400 mOsm/kg à la sortie de l'estomac (elle conditionne en partie l'ouverture du pylore) (Vidon *et al.*, 1979 ; Ruppin *et al.*, 1981 ; Glass, 1984) et augmente (environ 800 à 1000 mOsm/kg) dans le caecum et le colon ascendant. Elle pourrait être plus élevée encore dans le mucus qui tapisse la paroi intestinale, où les bactéries pathogènes se développent (Beachey, 1981 ; Wadolkowski *et al.*, 1988 ; Leclerc et Mossel, 1989a ; Krivan *et al.*, 1992). La pression osmotique du liquide interstitiel des selles est très élevée (selles normales : 1600 à 4500 mOsm/kg, selles diarrhéiques : 1000 à 2000 mOsm/kg). La paroi des entérobactéries issues de l'intestin contient d'ailleurs une très forte proportion (>90%) de porines OmpC (Nikaido et Vaara, 1987), dont on sait que la synthèse est activée à haute osmolarité (Hasegawa *et al.*, 1976) et haute température (Lugtenberg *et al.*, 1976). Il est aussi possible que le chyme contienne des osmolytes (bétaines ou ammoniums quaternaires), mais ceci n'a pas été démontré.

L'urine est également un milieu hypertonique (650 à 1200 mOsm/kg, équivalant à une concentration de 0,3 à 0,6M en NaCl) (Kunin *et al.*, 1992) dans lequel on a démontré la présence permanente d'osmolytes majeurs comme la glycine bétaine et la proline bétaine (Chambers et Kunin, 1985, 1987a, 1987b). Ces osmolytes sont responsables de la résistance des colibacilles des infections urinaires à divers facteurs de stress (Chambers et Kunin, 1985) et de leur osmotolérance (Robledo *et al.*, 1992 ; Kunin *et al.*, 1992).

On doit donc admettre que les entérobactéries émises par l'homme dans l'environnement aquatique par l'intermédiaire des matières fécales et des urines sont préadaptées à la vie en milieu hypertonique et qu'en conséquence, elles possèdent la machinerie nécessaire à leur résistance aux conditions salines du milieu marin. Avant leur rejet dans ce milieu, elles transitent cependant presque toujours dans les eaux usées, dont la pression osmotique est généralement faible (30 à 100 mOsm/kg environ, selon les rares mesures dispo-

nibles). Elles sont donc vraisemblablement soumises à un choc hypoosmotique avant leur rejet en mer.

On sait que le choc hypoosmotique provoque chez les entérobactéries un efflux de K⁺ (Epstein, 1986 ; Gauthier *et al.*, 1991b) et la perte passive (par diffusion) ou active (par efflux) de nombreux constituants organiques du périplasma (Furlong, 1987) et du cytoplasme, dont la glycine bêtaïne (LeRudulier D., communication personnelle ; Koo *et al.*, 1991) et la plupart des substrats nutritifs antérieurement accumulés (Gauthier *et al.*, 1992b). Dans le cas particulier d'*E. coli*, le choc subi dans l'eau usée vide les cellules de leur contenu en K⁺ et en glutamate, ce qui provoque une forte sensibilisation à l'eau de mer, réversible en présence de glutamate de potassium (Gauthier *et al.*, 1991b ; Combarro *et al.*, 1992). Cette perte d'éléments cellulaires ne concerne cependant pas toutes les structures adaptatives mises en place pendant la croissance à haute osmolarité : ainsi, la dominance des porines OmpC dans la paroi des cellules cultivées en milieu hypertonique persiste après une incubation de 24h en eau usée et favorise leur survie dans l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1992d). Il pourrait en être de même pour d'autres éléments intervenant dans l'osmorégulation (systèmes inductibles ProU, Trk, etc.). On connaît cependant très mal les variations de la pression osmotique des eaux usées selon le lieu, la saison, l'heure de la journée, la nature de leur traitement, etc. Il est donc possible que les effets de ce choc hypoosmotique soient atténués, voire négligeables, dans certaines situations. Il est aussi possible que l'osmolarité des eaux usées soit très hétérogène, avec par exemple des microniches colloïdales à pression osmotique élevée dans un fluide hypo(ou iso)tonique. Tout ceci reste à préciser.

En dehors de son influence spécifiquement liée au choc osmotique, le transit en eau usée est générateur de stress divers (hypothermique, vraisemblablement hyperoxydatif au cours de la transition anaérobie-aérobie, et peut être hyponutritionnel) dont nous verrons plus loin l'impact éventuel par l'intermédiaire de la synthèse de protéines de stress. Les eaux usées peuvent également modifier le devenir des entérobactéries en eau de mer du fait de leur forte teneur en phosphate. La résistance d'*E. coli* à l'eau de mer augmente en effet très significativement lorsque la bactérie est incubée en tampon phosphate (0,05M) avant son transfert à l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1990) ou lorsque celle-ci est additionnée de phosphate (500 µM PO₄HK₂) (Gauthier *et al.*, 1993b). L'acquisition de cette résistance est, au moins en partie, liée à l'activité de la phosphatase alcaline (Gauthier *et al.*, 1990) et dépend majoritairement de la protéine affine PhoS du système de transport du phosphate à haute affinité Pst (Gauthier *et al.*, 1993b).

En tout état de cause, il semble bien que cette incubation transitoire des entérobactéries dans les eaux usées soit décisive en ce qui concerne leur devenir futur dans le milieu marin. Elle devrait à

l'avenir faire l'objet d'investigations plus précises, d'autant plus qu'elle est modifiable dans une certaine mesure lors du traitement de ces eaux.

L'impact du choc hyperosmotique subi en mer dépend directement de l'ampleur du choc hypoosmotique subi par les cellules dans les eaux usées. Ses effets pourraient être plus facilement compensés si les cellules conservaient au moins partiellement les structures nécessaires à l'osmorégulation, donc favorables à la survie (porines C, systèmes de transport et de synthèse des osmolytes et des substrats, etc.). Divers résultats expérimentaux suggèrent que la régulation osmotique est possible dans l'eau de mer à partir de tels mécanismes importés, mais dans certaines conditions seulement. Le glutamate peut être transporté par *E. coli* en eau de mer oligotrophe ou y être synthétisé à partir de ses précurseurs (2-oxoglutarate et glutamine) (Gauthier *et al.*, 1993a). Les systèmes de transport de la glycine bêtaïne ProU (haute affinité) et ProP (basse affinité) ne fonctionnent par contre que dans l'eau ou les sédiments marins contenant de la matière organique (Gauthier et LeRudulier, 1990 ; Ghoul *et al.*, 1990 ; Gauthier *et al.*, 1991a). Ces observations posent donc la question de l'existence d'osmolytes organiques à des concentrations significatives dans les divers compartiments du milieu marin. Il est peu probable que ce soit le cas dans la colonne d'eau, si l'on excepte les zones dystrophes très chargées en algues planctoniques où leurs excréments ou lysats pourraient influencer la survie des entérobactéries (Sieburth, 1964 ; Aubert *et al.*, 1981 ; Flatau *et al.*, 1992). Les sédiments marins pourraient par contre contenir à la fois des nitriles assimilables (Valentyne, 1957 ; Lindblom, 1963 ; Stotsky, 1980) et des osmolytes puissants comme les bêtaïnes ou d'autres ammoniums quaternaires (King, 1988) en quantité suffisante pour favoriser l'osmorégulation, donc la survie, des germes d'origine intestinale humaine (Pommepuy *et al.*, 1990). D'où l'intérêt qu'il pourrait y avoir à contrôler le taux de ces éléments dans les sédiments marins côtiers, afin de déceler d'éventuelles zones à risque offrant des conditions propices à l'endémisme local de ces bactéries. Les zones conchylicoles devraient être l'objet privilégié de ce type de contrôle.

Influence de la matière organique

Nous avons insisté à plusieurs reprises sur l'importance que peut avoir la matière organique pour le maintien des bactéries entériques à l'état cultivable en mer. Son rôle protecteur a été décelé très tôt, à la fois *in vitro* et dans le milieu naturel (Vaccaro *et al.*, 1950 ; Orlob, 1956 ; Carlucci et Pramer, 1960 ; Paoletti, 1965). Elle a été considérée comme responsable, pour partie au moins (les matériaux argileux peuvent aussi protéger les bactéries) (Stotsky, 1980), de l'allongement très significatif de cette survie dans les sédiments marins (Hendricks, 1971 ; Gerba et McLeod, 1976 ; Hood et

Ness, 1982) ou dans l'eau de mer additionnée de sédiments (Bauerfeind *et al.*, 1981), sans que l'on connaisse toutefois les mécanismes mis en jeu. Elle pourrait également expliquer la plus longue survie de ces bactéries dans les eaux atlantiques, plus chargées en matières organiques que les eaux méditerranéennes (M. Pommepuy, communication personnelle), encore que la pénétration de la lumière y soit également plus réduite (Bonfont et Martin, 1991).

L'effet protecteur de la matière organique a été d'emblée attribué au rôle purement trophique de sa fraction assimilable, capable de maintenir l'état métabolique et énergétique des cellules. Considéré comme évident, ce fait n'a cependant jamais été formellement vérifié. L'adsorption des nutrilites de l'eau sur les particules au cours de leur sédimentation a été suggérée dès 1938 par Waksman et Vartiavaar. Les sédiments marins (comme d'ailleurs la surface des substrats immergés, les téguments des organismes et le tube digestif des animaux) contiennent de nombreux substrats organiques qui peuvent servir de source de carbone, d'azote, de soufre et de phosphore pour les bactéries entériques (voir références plus haut). Leur concentration dans ces sédiments (jusqu'à 100 mg/kg), généralement plus élevée que dans l'eau de mer (du μg au mg/l, plus forte en Atlantique qu'en Méditerranée), est cependant très faible par rapport à celle des milieux de culture (quelques g/l) ou des milieux entériques (voir plus haut). La question est donc de savoir si la présence de substrats nutritifs à faible concentration peut effectivement maintenir les entérobactéries à l'état actif dans un milieu par ailleurs froid, hypertonique et contenant une microflore autochtone très compétitive. Cette question demeure globalement non résolue, bien que quelques éléments de réponse aient été apportés expérimentalement, dont certains ont été évoqués plus haut.

L'une des conditions de survie les plus fondamentales est le maintien du niveau énergétique des cellules, surtout dans le cas de germes allochtones (Kjelleberg *et al.*, 1987 ; Morita, 1988). Ceci dépend autant de la présence de substrats nutritifs dans le milieu que de leur biodisponibilité. De nombreux microbiologistes écologistes assimilent faussement le contenu du milieu en carbone organique à la quantité d'énergie disponible pour les microorganismes. En fait, le degré de disponibilité d'un élément nutritif pour une bactérie est lié à la fois à l'efficacité des systèmes de transport de celle-ci vis-à-vis de l'élément et à la compétition trophique exercée par les autres bactéries de la communauté (Morita, 1988). La carence alimentaire peut résulter aussi bien de la rareté des substrats dans le milieu que de l'incapacité des bactéries à les absorber dans des conditions de stress. Une étude générale du transport actif des glucides et des acides aminés par les principales voies transmembranaires a été récemment effectuée dans notre

équipe par G. Flatau sur l'espèce modèle *E. coli* soumise à des chocs osmotiques simples (hypo ou hyper) ou successifs (hypo puis hyper, ou l'inverse). Le choc hyperosmotique subi lors du contact avec l'eau de mer provoque une forte diminution de l'efficacité des systèmes de transport, que ce soit la translocation de groupe, les symports proton- ou sodium- substrat, ou les protéines affines (Gauthier *et al.*, 1992b) (Fig. 3). Toutefois, l'inhibition est variable et il semblerait que le transport par protéine affine soit le plus touché. Ainsi, chez *E. coli*, le transport de la glycine bêtaïne par le système à haute affinité ProU ne fonctionne que très faiblement en eau de mer oligotrophe (Gauthier et LeRudulier, 1990). Lorsque les cellules sont préalablement adaptées à la vie haute osmolarité, le choc hyperosmotique n'inhibe par contre que le transport par proton- ou sodium- symport. Des résultats expérimentaux préliminaires suggèrent que le transport de certains acides aminés comme la proline et l'histidine, est plus fortement inhibé chez les cellules d'*E. coli* ayant subi deux chocs successifs, hypo puis hyperosmotique, ce qui pourrait être le cas, nous l'avons vu, dans les conditions naturelles. Ici encore on retrouve donc l'influence des différentes étapes de la vie des cellules sur le devenir en mer. Outre le choc hyperosmotique, le pH alcalin (8,2) de l'eau de mer (Ivanoff, 1972) pourrait aussi diminuer l'efficacité des symports sodium-substrat, comme c'est le cas pour le mélibiose.

La relation entre la perturbation des échanges et l'altération de l'énergie cellulaire n'est pourtant pas évidente : bien que les transports soient dépendants de l'énergie, il semblerait que leur inhibition soit plutôt provoquée par des modifications de la conformation des membranes dues au choc hyperosmotique (Houssin *et al.*, 1990). Quoi qu'il en soit, et sous réserve d'une confirmation expérimentale, il est probable que la dégradation plus ou moins rapide de l'énergie des bactéries demeure cruciale pour leur survie en mer. La teneur en ATP diminue très rapidement dans les cellules d'*E. coli* incubées dans l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1990). Cette déplétion peut fortement défavoriser la survie des entérobactéries dans ce milieu, surtout lorsqu'elles proviennent d'un environnement anaérobie (intestin ou tractus urinaire) où la synthèse d'ATP est beaucoup plus faible qu'en aérobiose (Senez, 1968). Ces bactéries possèdent cependant d'autres sources d'énergie (force proton motrice par exemple), dont il faudra analyser le maintien et le rôle dans ce contexte.

Selon les données développées plus haut, il apparaît maintenant que les effets de la matière organique sur le potentiel de survie et d'adaptation des entérobactéries en mer *ne peuvent être réduits aux seuls aspects trophiques*. Ils peuvent aussi résulter de l'activité régulatrice (non trophique) des osmolytes, encore que, nous l'avons vu, ces deux influences sont probablement liées et complémentaires. En fait, le rôle de la matière organique pour-

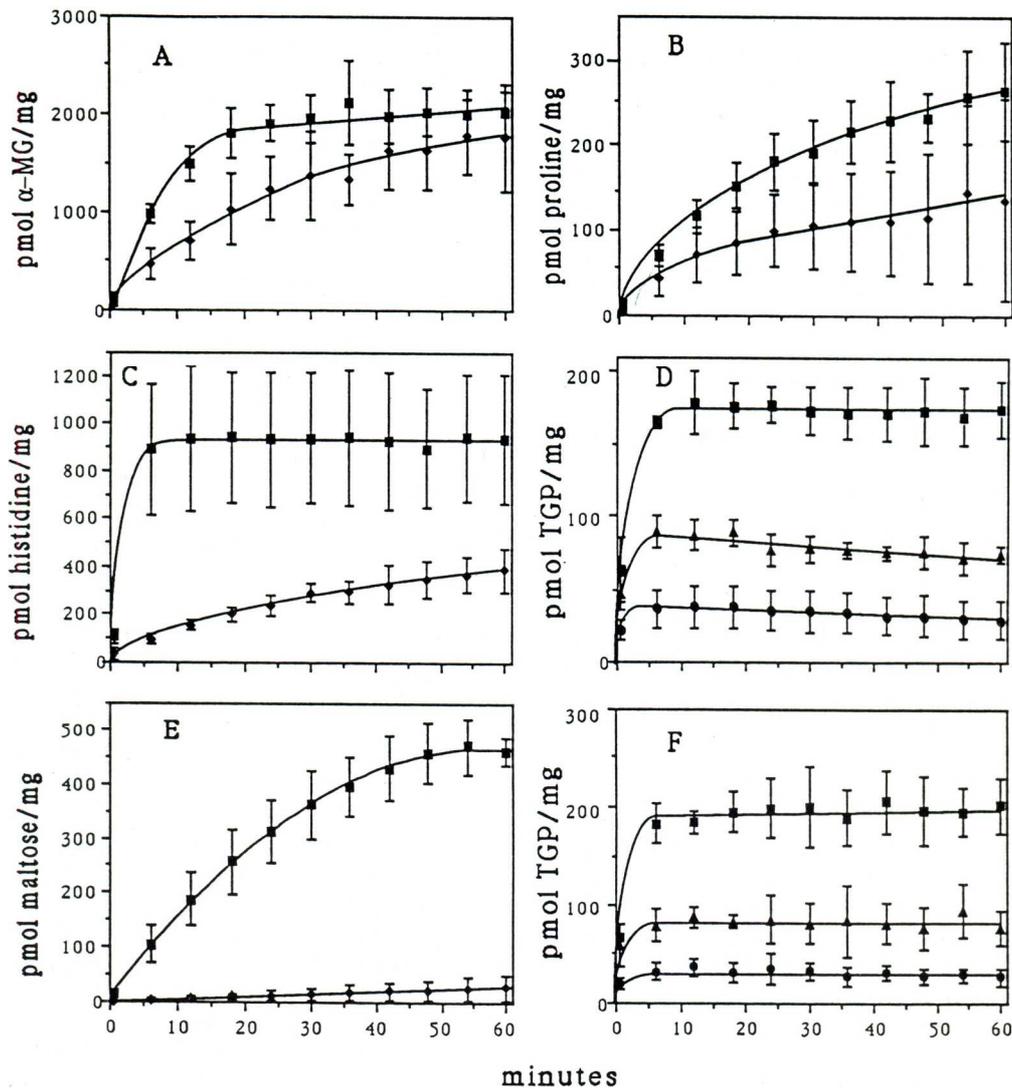


Figure 3 - Accumulation (pmol/mg) au cours du temps (minutes) du méthyl-(α -D-[14 C] glucopyranoside (α -MG) par les cellules d'*Escherichia coli* MC4100 (A) ; de la L-[14 C] proline par *E. coli* CGSC 5757 (B) ; de la L-[14 C] histidine par *E. coli* MC4100 ; (C) ; du [β -D-méthyl- 14 C] thiogalactopyranoside (TGP) par *E. coli* ATCC 25922 (préalablement cultivé en présence de mélibiose) (D) ; du [14 C] maltose par *E. coli* CGSC6153 (E) ; et du [β -D-méthyl- 14 C] thiogalactopyranoside (TGP) par *E. coli* ATCC 25922 (préalablement cultivées en présence de lactose) (F), rincées puis suspendues en milieu tamponné non salé (carrés) (situation de référence sans choc hyperosmotique), en milieu tamponné salé (triangles) ou en eau de mer naturelle (ronds) (situations de choc hyperosmotique). Lorsque les effets de l'eau de mer n'étaient pas significativement différents de ceux du tampon salé, l'accumulation moyenne a été représentée par des losanges (courbes B, C et E).

Figure 3 - Accumulation (μ mol/mg) with time (minutes) of méthyl-(α -D-[14 C] glucopyranoside (α -MG) by *Escherichia coli* K-12 MC4100 (A) ; of L-[14 C] proline by *E. coli* CGSC 5757 (B) ; of L-[14 C] histidine by *E. coli* MC4100 (C) ; of [β -D-méthyl- 14 C] thiogalactopyranoside (Tep) by *E. coli* ATCC 25922 (previously grown in the presence of melibiose) (D) ; of [14 C] maltose by *E. coli* CGSC 6153 (E) and of [β -D-méthyl- 14 C] thioactopyranoside (Tep) by *E. coli* ATCC 25922 (previously grown in the presence of lactose) (F). Cells were washed and suspended in unsalted buffer (squares) (reference situation without osmotic shock), and in salted buffer (triangles) or in natural seawater (circles) (osmotic shock). When the effects of seawater were significantly different from those of the salted buffer, the mean accumulation has been represented with diamonds (graphs B, C and E).

rait être plus subtil et fondamental. Il a été récemment montré que l'ajout de peptone (50 mg/l) à l'eau de mer modifie l'état de surenroulement négatif de l'ADN dans les cellules d'*E. coli*, ce qui augmente leur potentiel d'expression génique dans ce milieu (Gauthier *et al.*, 1992a). Nous verrons plus loin quelle peut être l'incidence de cette expression

sur l'adaptation de ces bactéries en mer. Par ailleurs, les données les plus récentes concernant la réponse des bactéries aux situations de stress montrent que la carence alimentaire, quelle qu'en soit la cause (épuisement du milieu, rareté initiale des substrats, inhibition de leur transport transmembranaire), génère une réponse complexe dont l'important

ce essentielle en matière de survie est qu'elle confère aux cellules d'*E. coli* et de *S. typhimurium* une forte résistance à d'autres facteurs de stress. L'oligotrophie même pourrait donc intervenir comme un élément régulateur de la survie par rétroaction positive. Enfin, certains composés organiques pourraient protéger les cellules bactériennes du rayonnement solaire par leur capacité à absorber une partie de l'énergie lumineuse (M. Pommepuy, communication personnelle)

Influence des mécanismes anti-stress

Les entérobactéries sont soumises à des stress multiples dès leur sortie du milieu entérique (peut-être déjà dans le milieu intestinal, où leur croissance est inhibée par les sécrétions des germes dominants), dans l'eau usée puis dans l'eau de mer. De nombreux travaux de laboratoire ont montré que ces bactéries sont capables de s'adapter aux stress grâce à des mécanismes induits, généralement spécifiques et intégrés. C'est le cas pour l'habituation à la carence en acides aminés et en sources de carbone (Cashel et Rudd, 1987 ; Matin, 1990, 1991 ; McCann *et al.*, 1991), à l'acidité (Foster et Hall, 1991), à l'hypertonie (Booth *et al.*, 1987 ; Csonka, 1989), et aux chocs thermique (Neidhardt et Van Bogelen, 1987), oxydatif (Farr et Kogoma, 1991) et radiatif (Walker, 1987).

Nous avons évoqué plus haut les effets protecteurs dus à la réponse osmotique. La réponse à la carence alimentaire semble avoir dans ce sens une grande importance, d'autant plus que cet état correspond à une étape prépondérante de la vie bactérienne dans les milieux naturels, ce que Hengge-Aronis et ses collaborateurs (1993) qualifient d'existence dans des conditions de "*feast and famine*". Chez *E. coli* au moins, il a été montré récemment (Matin, 1991 ; Schultz et Matin, 1991) que l'épuisement des sources de carbone dans le milieu induit une réponse spécifique intégrée à travers l'expression ordonnée de deux classes de gènes de carence ("*starvation genes*") : les gènes *cst* (dont l'expression dépend de l'adénosine monophosphate cyclique, ou AMPc) qui permettent ou facilitent la sortie de carence par extension du profil catabolique des cellules, et les gènes *pex* (expression non AMPc dépendante) qui instaurent un état de résistance à la carence alimentaire.

Un pas supplémentaire dans l'analyse de cet état de carence alimentaire a été franchi par l'étude des mécanismes mis en place par les bactéries pour survivre en phase stationnaire (Siegele et Kolter, 1992). Il est en effet connu depuis longtemps que les cellules bactériennes peuvent persister sous une forme cultivable ou facilement revivifiable pendant un an et plus dans les vieilles cultures. Ce type d'étude a conduit à la découverte de gènes de survie ("*survival genes*") essentiels à vie d'*E. coli* en phase stationnaire : des souches de cette espèce mutées sur l'un de ces gènes, *surA*, meurent précipi-

tement 4 à 5 jours après le début de la phase stationnaire des cultures (Tormo *et al.*, 1990 ; Kolter, 1992). Le problème de la régulation de l'expression génique en phase stationnaire, donc sous carence alimentaire, était alors posé. Il débouchait sur la mise en évidence de promoteurs dont l'expression est commandée par le passage des cellules d'une phase de croissance exponentielle à une phase post-exponentielle. Ces promoteurs, dont le niveau de transcription est inversement proportionnel au taux de croissance, ont été appelés des promoteurs "*boîte de vitesse*" ("*gearbox promoters*") (Aldea *et al.*, 1990). L'isolement de mutations affectant l'expression de certains de ces promoteurs a ensuite permis l'identification d'un gène, *katF* (décrit dans différents contextes sous les appellations *nur*, *appR*, *csi-2*, et désormais *rpoS*) qui joue un rôle majeur dans la régulation de la physiologie de la phase stationnaire. La séquence en acides aminés du produit de ce gène indique qu'il s'agit d'un nouveau facteur sigma (σ^s) (Lange et Hengge-Aronis, 1991) contrôlant l'expression d'un grand nombre de gènes codant pour des fonctions adaptatives diverses : résistance à H₂O₂, réparation et protection de l'ADN sous irradiation, synthèse de tréhalose, de glycogène, osmoprotection, thermotolérance, etc. (voir revue dans Hengge-Aronis, 1993).

Bien que l'organisation et le fonctionnement de ces gènes ne soient pas encore bien connus, il est extrêmement probable qu'ils influencent plus ou moins directement les capacités d'adaptation des bactéries entériques aux environnements carencés en éléments nutritifs, dont le milieu marin. En effet, leur induction confère aux bactéries une multi-résistance aux états de stress (osmotique, thermique, oxydatif nutritionnel, acide, etc.) généralement liée au facteur RpoS (Jenkins *et al.*, 1990 ; Joper-Jaan *et al.*, 1992 ; McCann *et al.*, 1991 ; Eisenstark *et al.*, 1992). L'augmentation de la résistance à l'eau de mer des cellules d'*E. coli* en phase stationnaire décrite plus haut pourrait être due, au moins partiellement, à des mécanismes résultant de l'expression de gènes de carence ou de survie, dans une phase où la synthèse et l'activité de l'AMPc est maximale (Botsford et Harman, 1992). Très récemment, nous avons observé que tout stress appliqué aux cellules d'*E. coli* avant transfert à l'eau de mer favorise leur maintien à l'état cultivable dans ce milieu. A l'exception du stress osmotique, l'induction de cette résistance dépend du gène *katF* (Figure 4). Il est possible que cette résistance soit liée à la synthèse *de novo* de protéines de stress, directement ou indirectement responsables de l'amélioration du potentiel de survie des cellules dans l'eau de mer. Des investigations sont en cours sur ce point. Dans les conditions naturelles, cette synthèse pourrait avoir lieu soit dans l'eau usée (si le temps de transit est suffisamment long), soit en mer (à partir de la matière organique naturelle, si elle est transportée, ou à la faveur de la protéolyse partielle observée dans les cellules soumises à ces conditions). Dans les deux

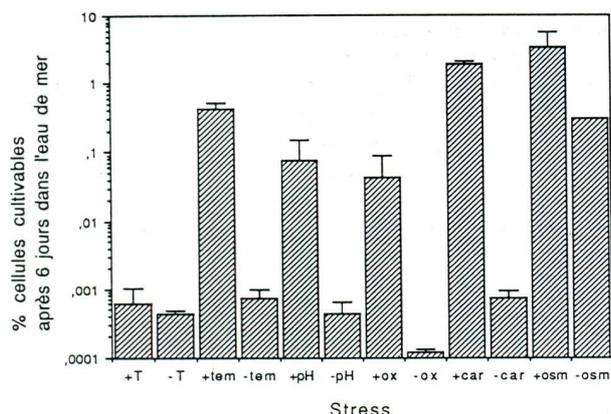


Figure 4 - Pourcentage de cellules cultivables d'*Escherichia coli* K-12 MC4100 (*rpoS*+) et RH90 (*rpoS*-), préalablement soumises ou non à divers stress, après incubation dans l'eau de mer naturelle filtrée pendant 6 jours (22/25°C), T, cellules non stressées (référence); tem, stress thermique (2h à 48°C); pH, stress acide (2h à pH 4,5); ox, stress oxydatif (2h en présence de H₂O₂ 1 mM); car, stress alimentaire (2h en milieu sans source de C, N et P); osm, stress osmotique (2h en solution NaCl 0,5M); +, cellules *rpoS* +; -, cellules *rpoS* -.

Figure 4 - Percentage of culturable *Escherichia coli* K-12 MC4100 (*rpoS*+) and RH90 (*rpoS*-) cells, previously subjected or not subjected to various stresses, after incubation in natural filtered seawater for 6 days (22/25°C). T, unstressed cells (reference); tem, thermal stress (2h at 48°C); pH, acidic stress (2h at pH 4.5); ox, oxidative stress (2h in H₂O₂ 1 mM); car, nutritional stress (2h under C, N and P starvation); osm, osmotic stress (2h in NaCl 0.5M); +, *rpoS*+ cells; -, *rpoS*- cells.

cas, mais d'une manière probablement plus cruciale en mer, elle est sans doute conditionnée par le taux d'expression des gènes qui codent pour ces protéines. Cette expression semble possible, bien qu'assez limitée, au moins dans l'eau de mer.

LA SURVIE PEUT AUSSI DÉPENDRE DE MÉCANISMES INDUITS EN MER

Les entérobactéries ne peuvent éventuellement s'adapter à plus long terme aux conditions marines que dans la mesure où elles sont capables de modifier leurs structures et leurs fonctions de manière à maintenir leur métabolisme au-dessus d'un niveau minimal indispensable à la survie. Ceci nécessite la mise en place de nouveaux mécanismes, induite *in situ* sous la pression des facteurs de l'environnement marin et, peut-être, en réponse à des signaux internes secondaires tels que l'on en connaît dans le cadre de la régulation osmotique (Booth *et al.*, 1987). Il paraît alors indispensable que ces bactéries soient capables de synthétiser de nouvelles protéines, structurales ou métaboliques, donc d'exprimer certains de leurs gènes, en particulier ceux qui permettent la restauration rapide de l'homéostasie cellulaire à haute osmolarité et basse teneur en nutrilites.

Nous avons montré, grâce à l'utilisation de souches à fusions de gènes (gène rapporteur *lacZ*)

que les trois gènes ou opérons osmorégulés *proU*, *proP* et *ompC* (codant respectivement pour les systèmes de transport de la glycine bêtaïne ProU et ProP, et pour la synthèse des porines OmpC) sont induits directement ou indirectement par la perte de turgescence et leur expression augmente avec l'osmolarité (Gauthier *et al.*, 1993c). Ils présentent un maximum d'expression pour une osmolarité proche de celle de l'eau de mer naturelle et pour une température voisine de l'optimum thermique de la bactérie testée. D'autre part, si la matière organique assimilable dans l'eau de mer n'a aucun rôle dans l'induction de *ompC* et de *proP*, elle active fortement l'expression de l'opéron *proU* (Figure 5). Celle-ci est d'ailleurs beaucoup plus forte dans les sédiments contenant une importante charge en matière organique (Gauthier et LeRudulier, 1990). Le gène non osmorégulé *cstA*, qui intervient dans l'adaptation à la carence en source de carbone, est très faiblement exprimé dans l'eau de mer oligotrophe à son osmolarité normale.

Les données concernant l'expression génique chez les entérobactéries en milieu marin sont encore très insuffisantes pour tirer des conclusions significatives quant aux possibilités de vie à long terme de ces germes dans de telles conditions. Pour les quelques gènes étudiés, il semble que cette expression soit relativement faible (bien que non négligeable à long terme) dans l'eau de mer oligotrophe, mais qu'elle augmente fortement lorsque le milieu contient des substrats organiques assimilables. En outre, le taux d'expression du génôme est beaucoup plus élevé lorsque les cellules sont préadaptées à la haute osmolarité (croissance ou séjour préalable en milieu salé), ce qui montre à nouveau l'importance de l'histoire des cellules avant leur transfert en mer.

L'importance de l'expression génique au cours de la survie est en fait décelable jusqu'au niveau transcriptionnel. Ces quatre dernières années, il a été démontré que l'état topologique de l'ADN influence l'adaptabilité des entérobactéries (*E. coli*, *S. typhimurium*) aux stress environnementaux (température, salinité, anaérobiose) en facilitant l'expression de leurs gènes dans les situations anormales ou extrêmes (Higgins *et al.*, 1990). Cet état d'enroulement réglerait aussi dans l'environnement l'expression de gènes responsables du pouvoir pathogène des bactéries (Dorman *et al.*, 1990; Dorman, 1991). Le maintien du surenroulement négatif de l'ADN est, de fait, indispensable à l'expression génique car il aide à la linéarisation locale de l'ADN, facilitant ainsi la fixation de l'ARN polymérase et la transcription. Nous avons récemment montré qu'il existe une relation positive significative entre le niveau de surenroulement négatif de l'ADN de cellules d'*E. coli* et leur niveau de résistance à l'eau de mer, évalué par la perte de leur pouvoir de culture sur milieu bactériologique (Gauthier *et al.*, 1992a). Ces résultats nous ont conduits à proposer l'idée selon laquelle la capacité qu'ont les cellules d'*E. coli* à survivre dans l'eau de mer et à maintenir

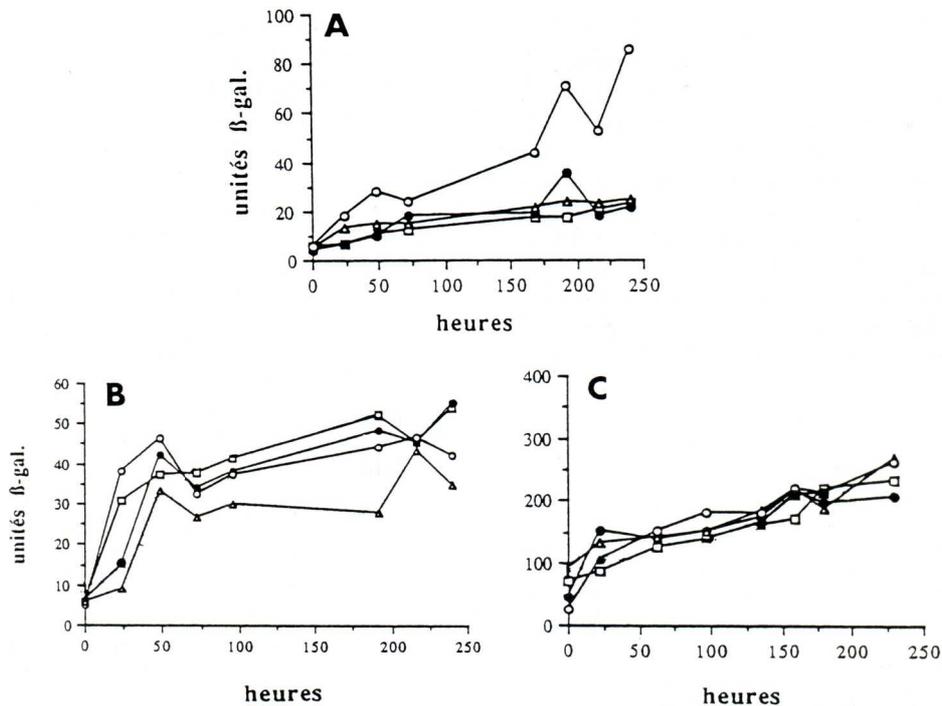


Figure 5 - Expression de trois gènes ou opérons osmorégulés, *proU* (A), *proP* (B) et *ompC* (C) dans l'eau de mer naturelle filtrée (1075 mOsm/kg, à 23 °C) additionnée ou non de peptone bactériologique à différentes concentrations : 0 (carrés blancs), 1 (ronds noirs), 10 (triangles blancs) et 50 (ronds blancs) mg/litre d'eau de mer. L'expression de ces gènes a été étudiée à l'aide de souches d'*E. coli* K-12 MC4100 portant les fusions *proU-lacZ*, *proP-lacZ* et *ompC-lacZ*, respectivement.
 Figure 5 - Expression in natural filtered seawater (1075 mosM/kg, at 23°C) of three osmoregulated genes, *proU* (A), *proP* (B) and *ompC* (C), in the absence or presence of bacto-peptone at different concentrations : 0 (white squares), 1 (black circles), 10 (white triangles), and 50 (white circles) mg per litre of seawater. Gene expression was measured using *E. coli* K-12 MC4100 cells harboring *proU-lacZ*, *proP-lacZ*, and *ompC-lacZ* fusions, respectively.

leur pouvoir de culture dans ces conditions peut être, au moins en partie, liée à l'état topologique de leur ADN et plus précisément à son degré de surenroulement négatif. Cet état pourrait gouverner l'expression des gènes dont les produits permettent l'amélioration du métabolisme cellulaire dans les conditions marines, ou celui de gènes régulateurs comme *katF* qui modulent l'expression des précédents.

Une connaissance plus large des possibilités d'expression génique devrait permettre de mieux évaluer le potentiel adaptatif des entérobactéries en mer. Pour ce faire, il sera nécessaire de rechercher plus spécifiquement les gènes ou groupes de gènes exprimés dans ce milieu, puis d'analyser la modification de leur expression par les facteurs physico-chimiques. Cela paraît envisageable, bien qu'a priori délicat et assez aléatoire, par la méthode d'insertion de fusions *lacZ* au hasard dans le chromosome. Une autre alternative serait d'analyser les protéines néosynthétisées par ces bactéries dans ces conditions. Si certaines d'entre elles sont spécifiques de l'état de survie dans l'eau de mer, il sera possible de les purifier, d'en déterminer la séquence et de remonter ainsi, par la voie d'une génétique réverse,

à la structure des gènes qui les codent. La réalisation de sondes moléculaires spécifiques de ces gènes permettra alors de les repérer dans les cellules, de les caractériser et d'analyser leur expression et leur rôle adaptatif. Cette voie d'investigation a déjà fait ses preuves pour l'analyse de la réponse bactérienne à diverses situations de stress : elle devrait se révéler tout aussi porteuse dans le domaine de la survie bactérienne en milieu marin.

CONCLUSION

La question de l'adaptation des entérobactéries pathogènes au milieu marin émerge sur trois grands domaines des recherches microbiologiques actuelles : l'adaptation des bactéries aux environnements extrêmes, leurs réponses aux situations de stress et la modulation de leur éventuel pouvoir pathogène par les facteurs environnementaux.

En ce qui concerne les deux premiers aspects, plus écologiques, on commence à avoir quelques indications plus précises sur ce qui se passe aux niveaux cellulaire et moléculaire, au moins en ce qui concerne l'espèce modèle *E. coli* et quelques espèces voisines à haut intérêt sanitaire

(*Salmonella*). L'idée se dégage de plus en plus clairement selon laquelle ces bactéries sont intrinsèquement capables de s'adapter aux conditions marines si elles peuvent rapidement restaurer leur équilibre osmotique et si elles parviennent à maintenir une certaine activité métabolique, en particulier dans les compartiments de ce milieu riches en substrats nutritifs assimilables (sédiments et, peut-être, organismes). Il est important, et très porteur en termes de recherche, de reconnaître que cette adaptation est au moins partiellement liée à la mise en place de certaines structures ou fonctions dans les cellules avant leur rejet en mer, donc dépendant de toutes les situations rencontrées par ces bactéries en amont de ce milieu. De ce point de vue, le transit dans les eaux usées pourrait être particulièrement significatif et faire l'objet d'investigations appliquées intéressantes.

Indépendamment des facteurs épurateurs environnementaux, la capacité ou l'incapacité qu'ont intrinsèquement ces bactéries de restaurer leur homéostasie en mer peut donc orienter leur devenir dans ce milieu, soit vers une forme viable adaptée (mais pas nécessairement identique à celle que l'on reconnaît au laboratoire) qui peut s'implanter localement, soit vers l'état dormant non cultivable. La question est alors de savoir si cette adaptation résulte d'un processus *stochastique*, qui concerne de manière identique toutes les cellules rejetées en mer, ou d'un processus *déterministe*, qui n'intéresse qu'une partie de la population prédisposée à la survie dès l'origine. Nous n'avons pas encore de réponse à cette question, fondamentale aux plans théorique (élucidation des mécanismes de la survie) et appliqué (par exemple, orientation du mode de traitement des eaux usées). Dans le cadre du Programme National d'Océanographie Côtière français, elle est en cours d'évaluation par cytométrie de flux, qui permet en principe l'analyse et l'isolement par tri de sous-populations cellulaires au comportement distinct. A terme, cette approche devrait déboucher sur la modélisation des processus de survie dans l'eau de mer de deux espèces types : *E. coli* et *S. typhimurium*.

On ne peut clore ce chapitre sans évoquer l'absence presque totale d'information sur l'évolution de ces mêmes bactéries dans les organismes marins, plus particulièrement sur leurs téguments ou dans leur tube digestif. Ces milieux sont très spécifiques et il est possible qu'ils offrent aux entérobactéries pathogènes d'origine humaine des conditions d'existence et d'adaptation très particulières. Leur rôle dans le cycle vital de *V. cholerae* en est un exemple bien connu (Colwell, 1984). S'agissant d'un point particulièrement significatif au plan sanitaire, il paraît urgent de prendre conscience de ce vide dans nos connaissances et d'y remédier au plus tôt.

En ce qui concerne la modification éventuelle du pouvoir pathogène des bactéries entériques en mer, on ne dispose que d'un nombre assez réduit

de données, les plus significatives étant issues du groupe de R. Colwell et restreintes à certains pathotypes d'*E. coli*, à *V. cholerae* et à quelques autres germes entériques. Selon ces auteurs, les formes VNC de ces bactéries conserveraient leur virulence *in vivo* (génération de la maladie chez l'animal et l'homme) (Grimes et Colwell, 1986 ; Grimes *et al.*, 1986 ; Colwell *et al.*, 1987) et *in vitro* (toxino-génèse) (Grimes et Colwell, 1986 ; Grimes *et al.*, 1986 ; Gauthier *et al.*, 1988a ; Byrd *et al.*, 1992). Il s'agit là d'une question cruciale en termes d'hygiène publique et d'épidémiologie des maladies infectieuses dans l'environnement, dont l'intérêt resurgit au plan fondamental puisqu'il a été montré récemment que la virulence des *Salmonella* est régulée par le gène *rpoS* (Fang *et al.*, 1992). C'est pourtant un vieux problème, évoqué il y a plus de soixante ans par certains auteurs dont les résultats suggéraient la conservation, voire l'augmentation de la virulence des salmonelles dans les coquillages (revue dans: Paoletti, 1965a, 1965b). Le faible intérêt que la communauté scientifique a montré par la suite pour cette question est assez paradoxal. Sans doute les difficultés expérimentales expliquent-elles cela. Le développement des outils moléculaires et les possibilités d'exploration offertes par les cultures cellulaires et les animaux axéniques ou gnotoxéniques, devraient permettre de réactiver ces recherches tout à fait indispensables. Mais c'est là une toute autre question....

BIBLIOGRAPHIE

- Aldea M., T. Garrido, J. Pla, M. Vicente, 1990 - Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoter. *EMBO J.*, **9** : 3787-3794.
- Anderson I. M., M. Rhodes, H. Kator, 1979 - Sublethal stress in *Escherichia coli* : function of salinity. *Appl. environ. Microbiol.*, **38** : 1147-1152.
- Asscher A. W., M. Sussman, W.E. Waters, R.H. Davis, S. Chick, 1966 - Urine as a medium for bacterial growth. *Lancet*, **2** : 1037-1041.
- Aubert M., J. Aubert, M.J. Gauthier, P. Bernard, 1981 - Les systèmes d'information des microorganismes marins. *Rev. int. Océanogr. méd.*, **60-61** : 37-91.
- Bakhrouf A., M. Jeddi, A. Bouddabous, M.J. Gauthier, 1989 - Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* cells towards a filterable stage in seawater. *FEMS Microbiol. Letts*, **59** : 187-190.
- Bakhrouf A., M. Jeddi, A. Bouddabous, M.J. Gauthier, 1990 - Production of filterable minicells by *Salmonella paratyphi B* in seawater. *Microbios*, **43** : 123-129.
- Bakhrouf A., M. Jeddi, M.J. Gauthier, 1992 - Modification des caractères culturels et biochimiques du *Salmonella paratyphi B* après incubation dans l'eau de mer. *Can. J. Microbiol.*, **38** : 871-874.
- Barcina I., M. Gonzalez, J. Iriberry, L. Egea, 1989 - Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural freshwater. *Appl. environ. Microbiol.*, **55** : 246-251.
- Barron A., G. May, E. Bremer, M. Villarejo, 1986 - Regulation of envelope protein composition during adaptation to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **167** : 433-438.
- Bauerfeind S., G.G. Gerhardt, G. Rheinheimer, 1981 - Investigations on the survival of fecal bacteria in experiments with and without sediment addition. *Zentbl. Bakt. Parasitkde Infekt. Hyg. (1 Orig. Reihe B)*, **174** : 364-374.

- Beachey E.H., 1981 - Bacterial adherence : adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.*, **143** : 325-345.
- Bernier, J.J. - 1988 - *Physiologie de la digestion chez l'homme normal et l'opéré du tube digestif*. Doin, Paris, pp. 107-108.
- Bissonnette G.K., 1975 - Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Appl. Microbiol.*, **29** : 186-194.
- Bonnefont J.L., Y.P. Martin, 1990 - Etude du devenir des bactéries test de contamination fécale dans l'eau de mer. Recherche de modèles de simulation. *Sci. Tech. Technol.*, **18** : 16-21.
- Boos W., U. Ehmann, H. Forkl, W. Klein, M. Rimmele, P. Postma, 1990 - Trehalose transport and metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **172** : 3450-3461.
- Booth I.R., J. Cairney, L. Sutherland, C.F. Higgins, 1987 - Enteric bacteria and osmotic stress : an integrated homeostatic system. *J. appl. Bact.*, Symposium Supplement, 355-495.
- Botsford J.L., J.G. Harman, 1992 - Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, **56** : 100-122.
- Brisou J., 1962 - Problèmes de la vie et de la survie des bactéries pathogènes dans le milieu marin. *Rev. Corps Santé Armées*, **3** : 501-525.
- Busta F.F., 1978 - Injury and repair of microbial cells. *Adv. appl. Microbiol.*, **23** : 195-201.
- Byrd J.J., J.G. Leahy, R.R. Colwell, 1992 - Determination of plasmid DNA concentration maintained by nonculturable *Escherichia coli* in marine microcosms. *Appl. environ. Microbiol.*, **58** : 2266-2270.
- Camper A.K., G.A. McFeters, 1979 - Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. *Appl. environ. Microbiol.*, **37** : 633-641.
- Carlucci A.F., D. Pramer, 1960 - A evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. II. Salinity, pH and nutrients. *Appl. Microbiol.*, **8** : 243-247.
- Cashel M., K.E. Rudd, 1987 - The stringent response. In : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks, B. Magasanik, M. Schaechter, E. Umbarger (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp : 1410-1438.
- Cerf M., 1989 - Aspects of bacterial adhesion in normal and diseased gastrointestinal tract. In : *Microbial ecology and intestinal infections*. E. Bergogne-Bezerin (ed.), Springer-Verlag, Paris, pp : 24-48.
- Chai T.J., 1983 - Characteristics of *Escherichia coli* grown in bay water as compared with rich medium. *Can. J. Microbiol.*, **45** : 1316-1323.
- Chambers S.T., C.M. Kunin, 1985 - The osmoprotective properties of urine for bacteria: the protective effect of betaine and human urine against low pH and high concentrations of electrolytes, sugars, and urea. *J. Infect. Dis.*, **152** : 1308-1315.
- Chambers S.T., C.M. Kunin, 1987a - Isolation of glycine betaine and proline betaine from human urine. Assessment of their role as osmoprotective agents for bacteria and the kidney. *J. clin. Invest.*, **79** : 73 1-737.
- Chambers S.T., C.M. Kunin, 1987b - Osmoprotective activity for *Escherichia coli* in mammalian renal inner medulla and urine : correlation of glycine and proline betaines and sorbitol with response to osmotic stress. *J. clin. Invest.*, **80** : 1255-1260.
- Colwell, R.R. (ed.), 1984 - *Vibrios in the environment*. John Wiley and Sons, New York, pp.
- Colwell R.R., 1987 - From counts to clones. *J. Appl. Bacteriol.*, Symposium Supplement, **63** : 15-65.
- Colwell R.R., M.L. Tamplin, P.R. Brayton, A.L. Gauzens, B.D. Tall, D. Herrington, M.M. Levine, S. Hall, A. Huq, D.A. Sack, 1987 - *Environmental aspects of Vibrio cholerae in transmission of cholerae*. Proc. 23rd Joint Conference on cholera, Williamsburg, VA, November 1987, 13pp.
- Combarro M.-P., M.J. Gauthier, G.N. Flatau, R.L. Clément, 1992 - Effect of a transient incubation in wastewater on the sensitivity to seawater of *Escherichia coli* cells grown under intestinal-like conditions. *Biomed. Letts*, **47** : 185-190.
- Csonka L.N., 1989 - Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, **53** : 212-147.
- Csonka L.N., A.D. Hanson, 1991 - Prokaryotic osmoregulation : genetics and physiology. *A. Rev. Microbiol.*, **45** : 569-606.
- Dawe L.L., W.R. Penrose, 1978 - 'Bactericidal' property of seawater : death or debilitation. *Appl. environ. Microbiol.*, **35** : 828-833.
- De Giaxa V., 1889 - Uber das verhalten einiger pathogener mikroorganismen im meerwasser. *Z. Hyg. Infektionkr.*, **6** : 162-224.
- Dorman C.J. 1991 - DNA supercoiling and environmental regulation of gene expression in pathogenic bacteria. *Infect. Immun.*, **59** : 745-749.
- Dorman C.J., N. Ni Bhriain, C.F. Higgins, 1990 - DNA supercoiling and environmental virulence gene expression in *Shigella flexneri*. *Nature (London)*, **344** : 789-792.
- Ducluzeau R., 1989 - Role of experimental microbial ecology in gastroenterology. In : *Microbial ecology and intestinal infections*; E. Bergogne-Bezerin (ed.), Springer-Verlag, Paris, pp : 8-26.
- Ducluzeau R., P. Raibaud, 1979 - *Ecologie microbienne du tube digestif*. Collection INRA "Actualités Scientifiques et agronomiques", 104 pp.
- Eisenstark A., C Miller, J. Jones, S. Leven, 1992 - *Escherichia coli* genes involved in cell survival during dormancy : role of oxidative stress. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **188** : 1054-1059.
- Epstein W., 1986 - Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letts*, **39** : 73-78.
- Fang F.C., S.J. Libby, N.A. Buchmeier, P.C. Loewen, J. Switala, J. Harwood, D.G. Guiney, 1992 - The alternative s factor KatF (RpoS) regulates *Salmonella* virulence. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, **89** : 11978-11982.
- Farr S.B., T. Kogoma, 1991 - Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.*, **55** : 561-585.
- Flatau G.N., R.L. Clément, M.J. Gauthier D.C Puel, 1992 - Effect of incubation of *Escherichia coli* cells with halophyte extracts on their subsequent survival in seawater. *Can. J. Microbiol.*, **38** : 838-842.
- Foster J.W., H.K. Hall, 1991 - Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Bact.*, **173** : 5129-5135.
- Furlong C.E., 1987 - Osmotic-shock-sensitive transport systems. In : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks, B. Magasanik, M. Schaechter, E. Umbarger (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp : 768-796.
- Gauthier M.J., P.M. Munro, S. Mohadjer, 1987 - Influence of salt and sodium chloride on the recovery of *Escherichia coli* from seawater. *Curr. Microbiol.*, **15** : 5-10.
- Gauthier M.J., P.M. Munro, V.A. Breittmayer, 1988a - Damage to surface colonization factors of enteroadhesive *Escherichia coli* during starvation survival in seawater. *Microbios*, **38** : 37-45.
- Gauthier M.J., V. Breittmayer, P.M. Munro, 1988b - Loss of fimbrial adhesins by *Escherichia coli* cells grown in marine sediments. *Microbios*, **39** : 123-129.
- Gauthier M.J., P. Thomas, P.M. Munro, 1989a - Modification 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.
- Gauthier M.J., P.M. Munro, V.A. Breittmayer, 1989b - Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater. *Can. J. Microbiol.*, **35** : 379-383.
- Gauthier M.J., D. LeRudulier, 1990 - Survival in seawater of *Escherichia coli* cells grown in marine sediments containing glycine betaine. *Appl. environ. Microbiol.*, **56** : 2915-2918.
- 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, V.A. Breittmayer, 1991a - Protective effect of glycine betaine on survival of *Escherichia coli* in marine environments. *Water Sci. Technol.*, **24** : 129-132.

- Gauthier M.J., G.N. Flatau, D. LeRudulier, R.L. Clément, M.P. Combarro-Combarro, 1991b - Intracellular accumulation of potassium and glutamate specifically enhances survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. environ. Microbiol.*, **57** : 272-276.
- Gauthier M.J., B. Labedan, V.A. Breittmayer, 1992a - Influence of DNA supercoiling on the loss of culturability of *Escherichia coli* cells incubated in seawater. *Mol. Ecol.*, **1** : 183-190.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, R.L. Clément, 1992b - 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 pp.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, R.L. Clément, P.M. Munro, 1992c - Sensitivity of *Escherichia coli* cells to seawater closely depends on their growth stage. *J. appl. Bact.*, **73** : 257-262.
- Gauthier M.J., S.A. Benson, G.N. Flatau, R.L. Clément, V.A. Breittmayer, P.M. Munro, 1992d - OmpC and OmpF porins influence viability and culturability of *Escherichia coli* cells incubated in seawater. *Microb. Release*, **1** : 47-50.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, P.M. Munro, R.L. Clément, 1993a - Glutamate uptake and synthesis by *Escherichia coli* cells in seawater: effects on culturability loss and glycine betaine transport. *Microb. Release*, sous presse.
- Gauthier M.J., G.N. Flatau, R.L. Clément, P.M. Munro, 1993b - The loss of culturability by *Escherichia coli* cells in seawater depends on availability of phosphate ions and phosphate transport systems. *Microb. Ecol.*, sous presse.
- Gauthier M.J., V.A. Breittmayer, A.-S. Braux, 1993c. Expression génique chez les bactéries entériques dans les conditions marines. MEDPOL Phase II Recherche, Contrat FRA 50(IV), Rapport final 1992, 44 pp.
- Gerba C.P., J.S. McLeod, 1976 - Effect of sediments on the survival of *Escherichia 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.
- Gibbons R.J., B. Kapsimalis, 1967 - Estimates of the overall rate of growth of the intestinal microflora of hamsters, guinea pigs, and mice. *J. Bact.*, **93** : 510-512.
- Glass G.B.J., 1984 - *Principes de physiologie gastro-intestinale*. Coll. Méthodes, Doin, Paris, pp. 76-77.
- Green B.L., E.M. Clausen, W. Litzky, 1977 - Two-temperature membrane filter method for enumerating fecal coliform bacteria from chlorinated effluents. *Appl. environ. Microbiol.*, **33** : 1259-1264.
- Grimes D.J., R.R. Colwell, 1986 - Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Letts*, **34** : 161-165.
- Grimes D.J., R.W. Atwell, P.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 environments. *Microbiol. Sci.*, **3** : 324-329.
- Hasegawa Y., H. Yamada, S. Mizushima, 1976 - Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycan sacculus of *Escherichia coli* K-12. *J. Biochem, Tokyo*, **80** : 1401-1409.
- Hendricks C.W., 1971 - Increase recovery rate of *Salmonella* from stream bottom sediments versus surface waters. *Appl. Microbiol.*, **21** : 379-380.
- Hengge-Aronis R., 1993 - Survival of hunger and stress : the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli*. *Cell*, **72** : 165-168.
- Hengge-Aronis R., R. Lange, N. Henneberg, D. Fischer, 1993 - Osmotic regulation of rpoS-dependent genes in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **175** : 259-265.
- Higgins C.F., C.J. Dorman, N. Ni Bhriain, 1990 - Environmental influences on DNA supercoiling : a novel mechanism for the regulation of gene expression. In : *The bacterial chromosome*, K. Drlica, M. Riley (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp : 421-432.
- Hood M.A., G.E. Ness, 1982 - Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. environ. Microbiol.*, **43** : 578-584.
- Houssin C., N. Eynard, E. Schechter, A. Ghazi, 1990 - Effect of osmotic pressure on membrane energy-linked functions in *Escherichia coli*. *Biochem. biophys. Acta*, **1056** : 76-84.
- Hurst A., 1977 - Bacterial injury. A review. *Can. J. Microbiol.*, **23** : 936-944.
- Ivanoff A., 1972 - *Introduction à l'océanographie. Propriétés physiques et chimiques des eaux de mer*. Vuibert, Paris, 208 pp.
- Jenkins D.E., S.A. Chaisson, A. Matin, 1990 - Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **172** : 2779-2781.
- Jones D.M., E.M. Sutcliffe, A. Curry, 1991 - Recovery of viable but non-culturable *Campylobacter jejuni*. *J. gen. Microbiol.*, **137** : 2477-2482.
- Jouper-Jaan A., A. E. Goodman, S. Kjelleberg, 1992 - Bacteria starved for prolonged periods develop increased protection against lethal temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **101** : 229-236.
- Kapuscinski R.B., R. Mitchell, 1981 - Solar radiation induces sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41** : 670-674.
- King G.M., 1988 - Distribution and metabolism of quaternary amines in marine sediments. In : *Nitrogen cycling in coastal marine environments*. T.H. Blackburn, J. Sorensen (eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 143-173.
- Kjelleberg S., M. Hermanson, P. Marden, 1987 - The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria with emphasis of the marine environment. *A. Rev. Microbiol.*, **41** : 25-49.
- Kogure K., U. Simidu, N. Taga, 1979 - A tentative direct microscope method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25** : 415-420.
- Kolter R., 1992 - Life and death in stationary phase. *ASM News*, **58** : 75-79.
- Koo S.-P., C.F. Higgins, I.R. Booth, 1991 - Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium* : evidence for a glycine betaine efflux system. *J. gen. Microbiol.*, **137** : 2617-2625.
- Krivan H.C., D.P. Franklin, W. Wang, D.C. Laux, P.S. Cohen, 1992 - Phosphatidylserine found in intestinal mucus serves as sole source of carbon and nitrogen for salmonellae and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **60** : 3943-3946.
- Kunin C.M., T.H. Hua, L. van Arsdale, M. Villarejo, 1992 - Growth of *Escherichia coli* in human urine : role of salt tolerance and accumulation of glycine betaine. *J. Infect. Dis.*, **166** : 1311-1315.
- Lange R., R. Hengge-Aronis, 1991 - Growth phase-regulated expression of bolA and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel factor s^S (rpoS). *J. Bact.*, **173** : 4474-4481.
- LeChevallier M.W., S.C. Cameron, G.A. Mc Feters, 1982 - New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. *Appl. environ. Microbiol.*, **45** : 484-492.
- Leclerc H., D.A.A. Mossel, 1989a - Le tube digestif. In : *Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments*, Doin, Paris, pp : 141-162.
- Leclerc H., D.A.A. Mossel, 1989b - La microflore du tube digestif. In : *Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments*, Doin, Paris, pp : 164-173.
- Leclerc H., D.A.A. Mossel, 1989c - Les infections bactériennes. In : *Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments*, Doin, Paris, pp : 205-242.
- LeMinor, L., 1989 - *Salmonella*. In : *Bactériologie Médicale*, L. LeMinor, M. Véron (eds.), Médecine-Sciences Flammarion, Paris, pp : 411-427.
- LeRudulier D., A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith, R.C. Valentine, 1984 - Molecular biology of osmoregulation. *Science*, **224** : 1064-1068.
- Lindblom G.P., 1963 - The distribution of major organic nutrients in marine sediments. In : *Symposium on marine microbiology*, CH. Oppenheimer (ed.), Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, pp : 205-212.

- Lugtenberg B., R. Peters, A. Bernheimer, W. Benendson, 1976 - Influence of cultural conditioners and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **147** : 251-262.
- Maki J.S., C.C. Remsen, 1981 - Comparison of two direct-count methods for determining metabolizing bacteria in freshwater. *Appl. environ. Microbiol.*, **41** : 1132-1138.
- Malouin F., S. Chamberland, N. Brochu, T.R. Parr Jr., 1991 - Influence of growth media on *Escherichia coli* cell composition and ceftazidime susceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35** : 477-483.
- Matin A., 1990 - Molecular analysis of the starvation stress in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **74** : 185-196.
- Matin A., 1991 - The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, **5** : 3-10.
- McCann M.P., J.P. Kidwell, A. Matin, 1991 - The putative s factor KatF has a central role in development of starvation-mediated general resistance in *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **173** : 4188-4194.
- McFeters G.A., A. Singh, 1991 - Effects of aquatic environmental stress on enteric bacterial pathogens. *J. Appl. Bact.*, Symposium Supplement, **70** : 1155-1205.
- McFeters G.A., S.C. Cameron, M.W. LeChevallier, 1982 - Influence of diluents, media and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. environ. Microbiol.*, **43** : 97-103.
- McKay A.M., 1992 - Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Lett. appl. Microbiol.*, **14** : 129-135.
- Mitchell R., 1968 - Factors affecting the decline of non-marine microorganisms in seawater. *Water Res.*, **2** : 535-543.
- Morita R.Y., 1982 - Starvation-survival of heterotrophs in the marine environment. In : *Advances in microbial ecology*, K.C. Marshall (ed.), Plenum Press, New York, pp : 171-198.
- Morita R.Y., 1988 - Bioavailability of energy and its relationship to growth and starvation survival in nature. *Can. J. Microbiol.*, **34** : 436-441.
- Mossel D.A.A., Corry J.E., 1977 - Detection and enumeration of sublethally injured pathogenic and index bacteria in foods and water processed for safety. *Alimenta*, **16** : 19-34.
- Munro P.M., M.J. Gauthier, F. Laumond, 1987a - Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. environ. Microbiol.*, **53** : 1476-1481.
- Munro P.M., Laumond F., M.J. Gauthier, 1987b - A previous growth of enteric bacteria on a salted medium increases their survival in seawater. *Lett. appl. Microbiol.*, **4** : 121-124.
- Munro P.M., M.J. Gauthier, V.A. Breittmayer, J. Bongiovanni, 1989 - Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. environ. Microbiol.*, **55** : 2017-2024.
- Neidhardt F.C., R.A. Van Bogelen, 1987 - Heat shock response. In : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks, B. Magasanik, M. Schaechter, E. Umbarger (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp : 1334-1345.
- Nikaido H., M. Vaara, 1987 - Outer membrane. In : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks, B. Magasanik, M. Schaechter, E. Umbarger (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp : 7-22.
- Orlob G.T., 1956 - Viability of sewage bacteria in seawater. *Sewage Ind. Wastes*, **28** : 1147-1167.
- Paoletti A., 1965a - Microorganismes pathogènes dans le milieu marin. In : *Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers*. C.I.E.S.M.M. (ed.) Comptes-Rendus du Symposium de Monaco, Avril 1984, pp : 133-184.
- Paoletti A., 1965b - Les problèmes hygiéniques des coquillages. In *Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers*. C.I.E.S.M.M. (ed.) Comptes-Rendus du Symposium de Monaco, Avril 1984, pp. 251-264.
- Parry S.H., D.M. Rooke, 1985 - Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In : *The virulence of Escherichia coli. Reviews and methods*, M. Sussan (ed.), Academic Press, London, pp : 79-156.
- Perroud B., D. LeRudulier, 1985 - Glycine betaine transport in *Escherichia coli* : osmotic modulation. *J. Bact.*, **161** : 393-401.
- Pommepeuy M., J.F. Guillaud, Y.P. Martin, E. Dupray, A. Derrien, J. L'Yavanc, M. Cormier, 1990 - Le devenir des bactéries en zone littorale. In : *La mer et les rejets urbains*. IFREMER, Actes de Colloques 11, pp : 89-100.
- Reeve C.A., P.S. Amy, A. Matin, 1984 - Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.*, **160** : 1041-1046.
- Rhodes M.W., I.C. Anderson, H.I. Kator, 1983 - *In situ* development of sublethal stress in *Escherichia coli*. Effects on enumeration. *Appl. environ. Microbiol.*, **45** : 1870-1876.
- Rhodes P., 1984 - Recovery of *Salmonellae* sublethally damaged by storage in sewage sludge. In : *The revival of injured bacteria*. M.H.E. Andrew, A.D. Russell (eds.), Laety Applied Microbiology, Academic Press, London, pp : 378-381.
- Robledo J.A., A. Serrano, G.L. Domingue, 1990 - Outer membrane proteins of *Escherichia coli* in the host-pathogen interaction in urinary tract infection. *J. Urol.*, **143** : 386-391.
- Rollins D.M., R.R. Colwell, 1986 - Viable but non-culturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment. *Appl. environ. Microbiol.*, **52** : 531-538.
- Rozsak D.B., D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1984 - Viable but unculturable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.*, **30** : 334-338.
- Rozsak D.B., R.R. Colwell, 1987 - Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51** : 365-379.
- Roth W.G., M.P. Leckie, D.N. Dietzler, 1988 - Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. *Appl. environ. Microbiol.*, **54** : 3142-3146.
- Rupin H., S. Bar Meir, K.H. Soergel, C.M. Wood, 1981 - Effects of liquid formula on proximal gastrointestinal function. *Dig. Dis. Sci.*, **26** : 202-207.
- Schultz J.E., A. Matin, 1991 - Molecular and functional characterization of a carbon starvation gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **218** : 129-140.
- Senez J.C., 1968 - Métabolisme des glucides. In : *Microbiologie générale*, Doin, Paris, pp : 283-348.
- Sieburth, J. McN., 1964 - Antibacterial substances produced by marine algae. *Dev. Ind. Microbiol.*, **5** : 123-134.
- Siegele D.A., R. Kolter, 1992 - Life after log. *J. Bact.*, **174** : 345-348.
- Sorensen S.J., 1991 - Survival of *Escherichia coli* K-12 in seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **85** : 161-168.
- Speck M.L., B. Ray, R.B. Read, 1975 - Repair and enumeration of injured coliforms by plating procedure. *Appl. Microbiol.*, **29** : 549-550.
- Stotsky C., 1980 - Surface interaction of microorganisms, virus and organics with clay minerals and the probable importance of these interactions in microbial ecology and in migration of clay-organic complexes. *Colloques C.N.R.S.*, **303** : 279-284.
- Styvold O.B., A.R. Strom, 1991 - Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains : influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase. *J. Bact.*, **173** : 1187-1192.
- Tang C.C., H. Jackson, 1979 - Minimal medium recovery of chilled *Salmonella* Heidelberg. *J. appl. Bact.*, **46** : 143-146.
- Tormo A., M. Almiron, R. Kolter, 1990 - surA, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J. Bact.*, **172** : 4339-4347.
- Turpin P.E., K.A. Maycroft, C.L. Rowlands, E.M.H. Wellington, 1993 - Viable but non-culturable salmonellas in soil. *J. appl. Bact.*, **74** : 421-427.
- UNEP/WHO, 1983 - *Methods for monitoring selected pollutants in sewage effluents and coastal recreational waters*. WHO, Copenhagen, 211 pp.
- Vaccaro R.F., M.P. Briggs, L. Carey, B.H. Ketchum, 1950 - Viability of *Escherichia coli* in seawater. *Am. J. publ. Hlth*, **33** : 1257-1266.

- Vallentyne J.R., 1957 - The molecular nature of the organic matter in lakes and oceans, with lesser reference to sewage and terrestrial soils. *J. Fish. Res. Bd Can.*, **14** : 33-82.
- Van Alphen W.V., B. Lugtenberg, 1977 - Influence of osmolarity of the growth medium on the outer membrane protein pattern of *Escherichia coli*. *J. Bact.*, **131** : 623-630.
- Villarejo M., J.L. Davis, S. Granett, 1983 - Osmoregulation of alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J. Bact.*, **156** : 975-978.
- Vidon N., P. Hecketsweiler, A. Cortot, J.J. Bernier, 1979 - Influence du débit et de la concentration sur les mouvements hydroelectrolytiques. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, **3** : 51-58.
- Wadolowski E.A., D.C. Laux, P.S. Cohen, 1988 - Colonization of the streptomycin-treated mouse large intestine by a human fecal *Escherichia coli* strain: role of growth in mucus. *Infect. Immun.*, **56** : 1030-1035.
- Waksman A.S., A.V. Vartiovarr, 1938 - The adsorption of bacteria to marine bottoms. *Biol. Bull.*, **74** : 56-69.
- Walker G.C., 1987 The SOS response. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cellular and molecular biology*. F.C Neidhardt, J.L. Ingraham, K. Brooks, B. Magasanik, M. Schaechter, E. Umberger (eds.), American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp : 1346-1357.
- Xu H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Atwell, D.J. Grimes, R.R. Colwell, 1982 - Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* **8** : 313-323.
- Zaske S.K., W.S. Dockins, 1980 - New methods to assess bacterial injury in water. *Appl. environ. Microbiol.*, **39** : 656-658.
- Zimmermann R., R. Iturriaga, J. Becker-Birk, 1978 - Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number thereof involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36** : 926-935.

Reçu en juin 1993 ; accepté en août 1993. / Received June 1993 ; accepted August 1993.

