



**MEDITERRANEAN ACTION PLAN
MED POL**

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME



WORLD HEALTH ORGANIZATION

**BIOGEOCHEMICAL CYCLES OF SPECIFIC POLLUTANTS (ACTIVITY K)
Survival of Pathogens**

**CYCLES BIOGEOCHIMIQUES DE POLLUANTS SPECIFIQUES (ACTIVITE K)
Survie des Pathogènes**

Final Reports on Research Projects (1989-1991)
Rapports finals sur les projets de recherche (1989-1991)

MAP Technical Reports Series No. 63

Note: The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO and UNEP concerning the legal status of any State, Territory, city or area, or of its authorities, or concerning the delimitation of their frontiers or boundaries. The views expressed in this volume are those of the authors and do not necessarily represent the views of either WHO or UNEP.

Note: Les appellations employées dans ce document et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS et du PNUE aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les vues exprimées dans ce volume sont celles de leurs auteurs et ne représentent pas forcément les vues de l'OMS ou du PNUE.

For bibliographic purposes this volume may be cited as:

UNEP/WHO: Biogeochemical Cycles of Specific pollutants (Activity K): Survival of pathogens. Final Reports on Research Projects (1989-1991). MAP Technical Reports Series No. 63. UNEP, Athens, 1992.

Pour des fins bibliographiques, citer le présent volume comme suit:

PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche (1989-1991). MAP Technical Reports Series No. 63. UNEP, Athens, 1992.

This volume is the sixty third issue of the Mediterranean Action Plan Technical Report Series.

This Series will collect and disseminate selected scientific reports obtained through the implementation of the various MAP components: Pollution Monitoring and Research Programme (MED POL), Blue Plan, Priority Actions Programme, Specially Protected Areas and Regional Marine Pollution Emergency Response Centre.

Ce volume constitue le soixante troisième numéro de la série des Rapports techniques du Plan d'action pour la Méditerranée.

Cette série permettra de rassembler et de diffuser certains des rapports scientifiques établis dans le cadre de la mise en oeuvre des diverses composantes du PAM: Programme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL), Plan Bleu, Programme d'actions prioritaires, Aires spécialement protégées et Centre régional pour l'intervention d'urgence contre la pollution marine accidentelle.

GENERAL INTRODUCTION

The United Nations Environment Programme (UNEP) convened an Intergovernmental Meeting on the Protection of the Mediterranean (Barcelona), 28 January - 4 February 1975), which was attended by representatives of 16 States bordering on the Mediterranean Sea. The meeting discussed the various measures necessary for the prevention and control of pollution of the Mediterranean Sea, and concluded by adopting an Action Plan consisting of three substantive components:

- Integrated planning of the development and management of the resources of the Mediterranean Basin (management component);
- Co-ordinated programme for research, monitoring and exchange of information and assessment of the state of pollution and of protection measures (assessment component);
- Framework convention and related protocols with their technical annexes for the protection of the Mediterranean environment (legal component).

All components of the Action Plan are interdependent and provide a framework for comprehensive action to promote both the protection and the continued development of the Mediterranean ecoregion. No component is an end in itself. The Action Plan is intended to assist the Mediterranean Governments in formulating their national policies related to the continuous development and protection of the Mediterranean area and to improve their ability to identify various options for alternative patterns of development and to make choices and appropriate allocations of resources.

MED POL - Phase I (1976-1980)

The Co-ordinated Mediterranean Research and Monitoring Programme (MED POL) was approved as the assessment (scientific/technical component of the Action Plan).

The general objectives of its pilot phase (MED POL - Phase I), which evolved through a series of expert and intergovernmental meetings, were:

- to formulate and carry out a co-ordinated pollution monitoring and research programme taking into account the goals of the Mediterranean Action Plan and the capabilities of the Mediterranean research centres to participate in it;
- to assist national research centres in developing their capabilities to participate in the programme;
- to analyse the sources, amounts, levels, pathways, trends and effects of pollutants relevant to the Mediterranean Sea;
- to provide the scientific/technical information needed by the Governments of the Mediterranean States and the EEC for the negotiation and implementation of the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its related protocols;
- to build up consistent time-series of data on the sources, pathways, levels and effects of pollutants in the Mediterranean Sea and thus to contribute to the scientific knowledge of the Mediterranean Sea.

MED POL - Phase I was implemented in the period from 1975 to 1980. The large number of national research centres designated by their Governments to participate in MED POL (83 research centres) from 15 Mediterranean States and the EEC), the diversity of the programme and

its geographic coverage, the impressive number of Mediterranean scientists and technicians (about 200) and the number of co-operating agencies and supporting organizations involved in it, qualifies MED POL as certainly one of the largest and most complex co-operative scientific programmes with a specific and well-defined aim ever undertaken in the Mediterranean Basin.

MED POL - Phase II (1981-1990)

The Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States and First Meeting of the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution, and its related protocols (Geneva, 5-10 February 1989), having examined the status of MED POL - Phase I, recommended that during the 1979/80 biennium a Long-term pollution monitoring and research programme should be formulated.

Based on the recommendations made at various expert and intergovernmental meetings, a draft Long-term (1981-1990) Programme for pollution monitoring and Research in the Mediterranean (MED POL-Phase II) was formulated by the Secretariat of the Barcelona Convention (UNEP), in co-operation with the United Nations Agencies which were responsible for the technical implementation of MED POL-Phase I, and it was formally approved by the Second Meeting of the Contracting Parties of the Mediterranean Sea against pollution and its related protocols and Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States of the Action Plan held in Cannes, 2-7 March 1981.

The general long-term objectives of MED POL-Phase II were to further the goals of the Barcelona Convention by assisting the Parties to prevent, abate and combat pollution of the Mediterranean Sea area and to protect and enhance the marine environment of the area. The specific objectives were designed to provide, on a continuous basis, the Parties to the Barcelona Convention and its related protocols with:

- information required for the implementation of the Convention and the protocols;
- indicators and evaluation of the effectiveness of the pollution prevention measures taken under the Convention and the protocols;
- scientific information which may lead to eventual revisions and amendments of the relevant provisions of the Convention and the protocols and for the formulation of additional protocols;
- information which could be used in formulating environmentally sound national, bilateral and multilateral management decisions essential for the continuous socio-economic development of the Mediterranean region on a sustainable basis;
- periodic assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea.

The monitoring of, and research on, pollutants affecting the Mediterranean marine environment reflects primarily the immediate and long-term requirements of the Barcelona Convention and its protocols, but also takes into account factors needed for the understanding of the relationship between the socio-economic development of the region and the pollution of the Mediterranean Sea.

As in MED POL-Phase I, the overall co-ordination and guidance for MED POL-Phase II is provided by UNEP as the secretariat of the Mediterranean Action Plan (MAP). Co-operating specialized United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC) are responsible for the technical implementation and day-to-day co-ordination of the work of national centres participating in monitoring and research.

The first eight volumes of the MAP Technical Reports Series present the collection of final reports of the principal Investigators who participated in the relevant pilot projects (MED POL I - MED POL VIII). The ninth volume of the MAP Technical Reports Series is the final report on the implementation of MED POL-Phase I, prepared, primarily, on the basis of individual final reports of the principal investigators with the co-operation of relevant United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC).

From the tenth volume onwards, the MAP Technical Report Series contains final reports on research projects, assessment documents, and other reports on activities performed within the framework of MED POL-Phase II, as well as documentation originating from other components of the Mediterranean Action Plan.

This sixty third volume of the MAP Technical Reports Series contains the final reports of four research projects on survival of pathogens completed within the framework of MED POL in Activity K - "Biogeochemical cycles of specific pollutants".

INTRODUCTION GENERALE

Le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) a convoqué une réunion intergouvernementale sur la protection de la Méditerranée (Barcelone, 28 janvier - 4 février 1975) à laquelle ont pris part des représentants de 16 Etats riverains de la mer Méditerranée. La réunion a examiné les diverses mesures nécessaires à la prévention et à la lutte antipollution en mer Méditerranée, et elle s'est conclue sur l'adoption d'un Plan d'action comportant trois éléments fondamentaux:

- Planification intégrée du développement et de la gestion des ressources du bassin méditerranéen (élément "gestion");
- Programme coordonné de surveillance continue, de recherche, d'échange de renseignements et d'évaluation de l'état de la pollution et des mesures de protection (élément "évaluation");
- Convention cadre et protocoles y relatifs avec leurs annexes techniques pour la protection du milieu méditerranéen (élément juridique).

Tous les éléments du Plan d'action étaient interdépendants et fournissaient le cadre d'une action d'ensemble en vue de promouvoir, tant la protection que le développement continu de l'écorégion méditerranéenne. Aucun élément ne constituait une fin à lui seul. Le Plan d'action était destiné à aider les gouvernements méditerranéens à formuler leurs politiques nationales en matière de développement continu et de protection de zone de la Méditerranée et à accroître leur faculté d'identifier les diverses options s'offrant pour les schémas de développement, d'arrêter leurs choix et d'y affecter les ressources appropriées.

MED POL - Phase I (1976-1980)

Le programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la Méditerranée (MED POL) a été approuvé au titre de l'élément "évaluation" (scientifique/technique) du Plan d'action.

Sa phase pilote (MED POL-Phase I) avait les objectifs généraux ci-dessous, élaborés au cours d'une série de réunions d'experts et de réunions intergouvernementales:

- formuler et exécuter un programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution en tenant compte des buts du Plan d'action pour la Méditerranée et de l'aptitude des centres de recherche méditerranéens à y participer;
- aider les centres de recherche nationaux à se rendre plus aptes à cette participation;
- étudier les sources, l'étendue, le degré, les parcours, les tendances et les effets des polluants affectant la mer Méditerranée;
- fournir l'information scientifique et technique nécessaire aux gouvernements des pays méditerranéens et à la Communauté économique européenne pour négocier et mettre en oeuvre la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et les protocoles y relatifs;
- constituer des séries chronologiques cohérentes de données sur les sources, les cheminements, les degrés et les effets des polluants de la mer Méditerranée et contribuer par là à la connaissance scientifique de cette mer.

La Phase I du MED POL a été mise en oeuvre au cours de la période 1975-1980. Le grand nombre de centres de recherche nationaux désignés par leurs gouvernements pour participer au MED POL (83 centres de recherche de 15 Etats méditerranéens et de la CEE), la diversité du programme et sa couverture géographique, l'effectif impressionnant de scientifiques et techniciens méditerranéens (environ 200) ainsi que la quantité d'organismes coopérants et d'organisations d'appui qui y étaient engagés permettent sans conteste de caractériser le MED POL comme l'un des programmes de coopération scientifique les plus vastes et les plus complexes, comportant un objectif spécifique et bien défini, qui ait jamais été entrepris dans le bassin méditerranéen.

MED POL-Phase II (1981-1990)

La réunion intergouvernementale des Etats riverains de la Méditerranée chargés d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action et première réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs (Genève, 5-10 février 1979), ayant examiné la situation de la Phase I du MED POL, a recommandé que, durant la période biennale 1979- 80, soit formulé un programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution.

Sur la base des recommandations énoncées lors des diverses réunions d'experts et réunions intergouvernementales, un projet de programme à long terme (1981-1990) de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL - Phase II) a été formulé par le secrétariat de la Convention de Barcelone (PNUE), en coopération avec les organismes des Nations Unies chargés de l'exécution technique de MED POL - Phase I, et il a été officiellement approuvé lors de la deuxième réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs et réunion intergouvernementale des Etats riverains de la mer Méditerranée chargée d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action, qui s'est tenue à Cannes du 2 au 7 mars 1981.

L'objectif général à long terme de la Phase II du MED POL était de concourir à la réalisation des objectifs de la Convention de Barcelone en aidant les parties contractantes à prévenir, réduire et combattre la pollution dans la zone de la mer Méditerranée ainsi qu'à protéger et améliorer le milieu marin dans cette zone. Les objectifs particuliers étaient de fournir constamment aux Parties contractantes à la Convention de Barcelone et aux Protocoles y relatifs:

- les renseignements dont elles avaient besoin pour appliquer la Convention et les protocoles;
- des indications et une évaluation de l'efficacité des mesures prises pour prévenir la pollution en application de la Convention et des protocoles;
- des renseignements scientifiques qui pourraient servir à réviser et modifier les dispositions pertinentes de la Convention et des protocoles et à rédiger des protocoles additionnels;
- des informations qui pourraient servir à formuler sur les plans national, bilatéral et multilatéral, les décisions de gestion, respectueuses de l'environnement, qui seraient indispensables à la poursuite du développement socio- économique de la région méditerranéenne;
- une évaluation périodique de l'état de pollution de la mer Méditerranée.

La surveillance continue des polluants affectant le milieu marin de la Méditerranée ainsi que la recherche menée à leur sujet répondent en premier lieu aux prescriptions immédiates et à long terme de la Convention de Barcelone et des protocoles y relatifs, mais elles tiennent également compte des facteurs requis pour la compréhension des relations existant entre le développement socio-économique de la région et la pollution de la mer Méditerranée.

Comme lors de la Phase I du MED POL, la coordination et la direction générales de la Phase II étaient assurées par le PNUE, par l'intermédiaire du secrétariat du Plan d'action pour la Méditerranée (PAM). Les organismes spécialisés coopérants des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI) étaient chargés de l'exécution technique et de la coordination quotidienne des travaux des centres de recherche nationaux participant au programme de surveillance continue et de recherche.

Les huit premiers volumes de la Série des rapports techniques du PAM rassemblent les rapports finaux de chercheurs responsables qui ont participé aux projets pilotes correspondants (MED POL I -MED POL VIII). Le neuvième volume de cette même Série se compose du rapport final sur la mise en oeuvre de la Phase I du programme MED POL, établi essentiellement sur la base des rapports finaux individuels des chercheurs responsables avec la coopération des organismes compétents des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI).

A partir du dixième volume, la Série des rapports techniques du PAM, comprend des rapports finaux sur les projets de "recherche", des documents d'évaluation et d'autres rapports d'activités effectués dans le cadre de MED POL-Phase II, ainsi que de la documentation prise dans d'autres domaines du Plan d'action pour la Méditerranée.

Ce soixante troisième volume de la Série des rapports techniques du PAM comprend quatre rapports finaux sur la survie des pathogènes exécutés dans le cadre de la Phase II du MED POL, dans l'Activité K - "Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques".

TABLE OF CONTENTS/TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Influence des systèmes d'osmorégulation sur la survie et l'adaptation des bactéries entériques dans l'environnement marin	
par M. J. Gauthier	1
Influence des mécanismes d'osmorégulation sur la survie et l'adaptation des bactéries entériques dans l'environnement marin	
par M. J. Gauthier	17
Etude expérimentale du transfert de gènes plasmidiques entre entérobactéries dans l'eau de mer; les sédiments et le tractus digestif des invertébrés marins	
par M. J. Gauthier, Y. Martin et V. Torregrossa	29
Etude expérimentale du transfert de gènes plasmidiques entre les entérobactéries dans l'environnement marin	
par M. J. Gauthier	61

INFLUENCE DES SYSTEMES D'OSMOREGULATION SUR LA SURVIE ET L'ADAPTATION DES BACTERIES ENTERIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

par

Michel J. Gauthier
I.N.S.E.R.M. Unité 303 "Mer et Santé"

1. INTRODUCTION

La "survie" ou, plus généralement, le comportement des bactéries entériques pathogènes dans l'environnement marin est un phénomène qui a suscité un grand intérêt chez les microbiologistes depuis plus d'un siècle. A juste titre, il faut bien l'avouer, car il recouvre des domaines très divers dans leur discipline: santé publique, épidémiologie, écologie, physiologie, biochimie et, plus récemment, génétique et biologie moléculaires.

Jusqu'au milieu des années 70, il semblait bien établi que ces bactéries étaient vouées à une disparition plus ou moins rapide sous l'influence de nombreux facteurs environnementaux antagonistes plus ou moins spécifiques du milieu marin: température basse, salinité élevée, irradiation solaire intense, carence nutritionnelle, présence de substances toxiques des eaux usées (détergents, métaux lourds), activité bactérienne de nombreux micro-et macro-prédateurs, inhibition ou lyse par des substances antibiotiques produites par les microorganismes marins (algues, champignons, bactéries), pour ne citer que les plus importants (voir Revue dans: Aubert et coll., 1981). Bien qu'aucun consensus ne se soit jamais dégagé quant à l'ordre d'importance de ces facteurs, on reconnaissait assez généralement un fort pouvoir "auto-épurateur" au milieu marin vis à vis des contaminants microbiens d'origine terrestre.

Ce concept de "mortalité" bactérienne a rapidement évolué au cours des quinze dernières années, d'abord par la reconnaissance du "stress" des bactéries telluriques, et plus particulièrement celles d'origine fécale, dans certains milieux particulièrement agressifs (eaux chlorées, eaux froides ou chaudes, eaux salées, etc...), éventuellement réversible par l'utilisation de techniques de dénombrement dites de "reviviscence" (Ref).

Une nouvelle étape dans la compréhension du devenir des bactéries allochtones en mer a été franchie lorsqu'on a pris conscience, vers 1975-1980, que leur cas différait assez peu de celui des bactéries marines autochtones placées dans les mêmes conditions de carence alimentaire. On sait depuis longtemps que la présence de matières nutritives influence la survie des germes entériques dans l'eau de mer et qu'un faible ajout de substrats protéiques ou glucidiques (20 à 50 mg/l) suffit pour prolonger leur viabilité dans ce milieu (Vaccaro *et al.*, 1950). Or l'eau de mer est généralement pauvre en substances organiques assimilables par les microorganismes. Les bactéries marines elles mêmes se trouvent fréquemment en état de carence alimentaire et s'y adaptent, passant ainsi par ce qui paraît être une étape normale de leur cycle vital. Cette conception, développée par Y. Morita (1982) pour les bactéries autochtones marines, s'intègre dans le cadre plus général d'une théorie sur la dormance bactérienne établie par Postgate (1976) puis par Stevenson (1978) pour expliquer l'inactivité de nombreuses bactéries dans les milieux hydriques naturels carencés en nutrilites. Ces auteurs ont parlé d'une véritable adaptation au "stress nutritionnel", qui se traduit par un ensemble de modifications structurales et métaboliques: diminution de la taille des cellules, ralentissement des échanges avec le milieu et du métabolisme énergétique, arrêt des synthèses macromoléculaires, etc... Ce concept de dormance a reçu, depuis, de nombreuses confirmations expérimentales. On peut donc admettre, en un certain sens, que les bactéries allochtones d'origine entérique se comportent dans l'eau de mer comme les bactéries autochtones, tout au moins vis à vis du stress alimentaire.

Dans le même temps, le développement de techniques permettant de dénombrer, par un examen microscopique direct, les cellules bactériennes **vivantes** dans les échantillons naturels (marins ou non) (Kogure *et al.*, 1978;) a permis de tester objectivement la létalité des conditions marines vis à vis des principales espèces pathogènes pour l'homme. Pour l'essentiel, ce travail a été réalisé par le groupe de R. Colwell (Université du Maryland, USA). En appliquant ces méthodes, ce groupe a pu décrire le passage progressif des bactéries à un état viable mais non cultivable (VNC) qui peut être irréversible *in vitro* (Xu *et al.*, 1982). Cette évolution a été retrouvée, avec quelques variations de détail, chez *E. coli* (diverses souches entérotoxiques), *Shigella Flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* et *Vibrio cholerae* (Grimes *et al.*, 1986). Nous l'avons constatée pour d'autres entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*). Décrit et analysé d'abord en microcosmes au laboratoire, ce phénomène a été retrouvé *in situ*, avec des suspensions bactériennes mises en contact avec le milieu naturel dans des chambres à diffusion. Il semble donc de portée générale et se superpose à l'ensemble des facteurs d'épuration décrits antérieurement. Il est en quelque sorte la résultante de l'activité "stressante" du milieu et peut être considéré comme une mise en dormance des germes entériques dans les compartiments marins carencés en nutrilités.

Des données complémentaires sur l'évolution structurale et métabolique des bactéries entériques en voie de dormance ont été acquises au cours des dernières années, essentiellement pour l'espèce *E. coli*, généralement prise comme modèle car mieux connue dans de nombreux domaines (structure, physiologie, génétique, biologie moléculaire, etc...). Les possibilités de récupération de cette bactérie par reviviscence sont hautement corrélées à son état de stress (Rhodes *et al.*, 1983). Nous avons récemment montré que cette récupération est partiellement possible par l'utilisation de milieux à salinité moyenne (15g NaCl/l) qui aident la bactérie à se réadapter aux conditions de culture du laboratoire (Gauthier *et al.*, 1987). Aucun procédé ne permet cependant la récupération des cellules au-delà d'un temps de contact avec l'eau de mer supérieur à 2 à 5 jours selon les souches utilisées. Nous avons en outre montré que la survie de la bactérie dans le milieu marin, outre le fait qu'elle dépend des facteurs épurateurs du milieu, **varie très largement selon les conditions dans lesquelles les cellules ont séjourné avant leur transfert en mer, aussi bien lors de leur croissance (milieu intestinal) que pendant leur transit dans les eaux usées ou les premiers instants de contact avec l'eau de mer (gradient de salinité)**. Ainsi, les cellules cultivées sur des milieux alcalins (pH>7.5), en anaérobiose et à haute température (40°C), c'est à dire dans des conditions vraisemblablement voisines de celles qu'elles rencontrent dans l'intestin, sont beaucoup plus sensibles à l'eau de mer et évoluent plus rapidement à l'état dormant.

L'effet protecteur le plus significatif a cependant été obtenu après culture des cellules dans un milieu à forte salinité (NaCl 0.5M). Dans ce cas, l'évolution vers le stade de dormance était très ralentie: le T90 (ou temps nécessaire pour observer le passage à l'état VNC de 90% de la population mise en expérience) a varié de 2 à 3 jours pour les cellules cultivées normalement en milieu doux, à plusieurs semaines (parfois plusieurs mois) pour les cellules cultivées en milieu salé. L'hypothèse a donc été faite que le **devenir des bactéries entériques dans l'eau de mer pouvait dépendre, au moins en partie, de leur capacité à surmonter le choc osmotique lors de leur arrivée dans ce milieu, puis d'y rétablir leur homéostasie**. Il était donc intéressant d'analyser le rôle protecteur des mécanismes cellulaires impliqués dans la régulation osmotique (voir revues dans: Booth et Higgins, 1987; Czonka, 1989) et de décrire leur influence sur le comportement d'*E. coli* (pris comme modèle) dans les conditions marines. C'est ce qui a été réalisé au cours de ce travail. Les mécanismes osmorégulateurs étudiés étaient les suivants: transport et accumulation du potassium, transport ou synthèse de proline et de glycine bêtaïne, synthèse de tréhalose. Les résultats de ces investigations sont présentés dans la suite de ce rapport. La plupart d'entre eux ont fait l'objet d'une publication dans le *Journal of Applied and Environmental Microbiology* (U.S.A.) qui figure en annexe (Annexe 1): les données publiées, ainsi que les techniques qui ont permis de les obtenir, sont présentées d'une manière plus condensée, faisant référence à l'article ci-dessus.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Principe des expériences

Tous les tests effectués au cours de ce travail ont été réalisés au laboratoire, en microcosmes d'eau de mer constitués de flacons erlenmeyer de 250 ml, contenant 100 ml d'eau de mer naturelle stérilisée par filtration sur membranes (Millipore, pores de 0,45 µm puis de 0,22 µm). L'eau de mer provenait d'une zone marine rocheuse propre, voisine du laboratoire (Cap de Nice). Ces microcosmes ont étéensemencés par diverses souches (voir para. 2.2.1.), cultivées dans des conditions variées (voir para. 2.2.2.) puis rincées dans l'eau de mer stérile à trois reprises par centrifugation (10000xg, 4E C, 20 minutes) et inoculées à une densité initiale d'environ 2 à 5.10⁶ unités formant colonie (UFC) par millilitre d'eau. Les flacons ont ensuite été placés en incubation à l'obscurité, à la température du laboratoire (20E à 25E C), sous agitation magnétique légère. Le nombre de cellules viables et cultivables (ou UFC) a été évalué dans chacun d'eux après des périodes croissantes de contact avec l'eau de mer (voir para. 2.2.3). L'influence sur la survie de chacun des systèmes d'osmorégulation étudiés a été ainsi évaluée par l'usage d'un (ou plusieurs) mutant(s) privé du (ou des) gène(s) codant pour ce système, par rapport au comportement de la souche parentale qui le(s) possède.

2.2 Méthodes

2.2.1 Souches bactériennes

Toutes les souches utilisées appartenait à l'espèce *E. coli*. La plupart d'entre elles étaient dérivées de la souche *E. coli* MC4100 de Casadaban (1976). La liste complète de ces souches figure dans l'Annexe 1. Quelques test ont été effectués à l'aide d'une souche sauvage pathogène (*E. coli* 12) provenant du Bangladesh, qui produit une entérotoxine thermolabile.

2.2.2 Conditions de culture

Toutes les souches ont été conservées dans l'azote liquide et régénérées sur milieu nutritif agar (NA) (Difco) à 37E C pendant 24h, au moment des expériences.

La survie de chacune de ces bactéries dans l'eau de mer a été analysée après culture en milieux minéraux M9 (Maniatis *et al.*, 1982), M63 (Miller, 1972) ou MMA (May *et al.*, 1986), non salés ou additionnés de NaCl (0,5 M), de LiCl (0,4 M) ou de saccharose (0,8M) pour en augmenter l'osmolarité. Quelques autres conditions de préculture ont également été testées, détaillées dans l'Annexe 1.

2.2.3 Dénombrement des cellules viables et cultivables

Il a été effectué après des périodes croissantes de contact avec l'eau de mer, généralement 1, 2, 3, 4, 7 et 9 jours, par la méthode de filtration sur membranes (Millipore, pores de 0,45 µm), sur milieu NA. Les résultats ont été notés après 48h d'incubation à 37E C; ils ont été exprimés en nombre de CFU/ml d'eau de mer.

2.2.4 Evaluation de l'expression de gènes d'osmorégulation

L'expression dans l'eau de mer des gènes *proP* et *proU* impliqués dans l'osmorégulation par les bêtaïnes (Le Rudulier *et al.*, 1983) a été mesurée par l'utilisation de souches dérivées de *E. coli* MC4100 portant une fusion entre le gènes *proP* ou l'opéron *proU* et le gène *lacZ*. L'utilisation de telles fusions permet l'analyse de l'expression des gènes d'osmorégulation par la simple évaluation des variations de l'activité β-galactosidase des cellules, le gène *lac* dépendant du promoteur du gène osmorégulé.

2.2.4.1 Souches d'*E. coli*

MC4100	F-araD 139 Δ (argF-lac) U169 rpsL 150 relA1 deoC1 ptsF25 rbsR flbB5301 (Casadaban, 1976) Origine: M. Villarejo, University of California, Davis U.S.A.
GM37	MC4100 Δ (proU-lacZ) hyb2 (Δ plac Mu15) (May <i>et al.</i> , 1986) Origine: M. Villarejo
EFO63	MC4100 Δ (putPA) 101 Δ (proU) 600 Δ (proP-lacZ) 1 (Δ plac Mu55) Origine: E. Bremer, Université de Constance, R.F.A.

2.2.4.2 Mesure de l'activité β -galactosidase

L'activité β -galactosidase (β -gal) des cellules a été déterminée par la méthode colorimétrique de Miller (1972), les résultats étant exprimés en micromoles de substrat (orthonitrophényl β -D-galactopyrannoside = ONPG) hydrolysé pendant 10 minutes (=unités) par milligramme de protéines cellulaires.

2.2.4.3 Dosage des protéines

Le contenu en protéines totales des cellules a été évalué par la méthode de Lowry *et al.* (1951), en utilisant l'albumine de boeuf comme standard.

2.2.5 Mesure du transport et de l'accumulation de la GB dans les cellules

Ce transport a été analysé à la fois dans l'eau de mer (sans ajout de substances nutritives) et dans des sédiments à différentes teneurs en carbone organique total (COT).

2.2.5.1 Transport de la GB

La [*methyl*- ^{14}C] GB a été préparée à partir de son précurseur, la [*methyl*- ^{14}C] choline. Cet analogue radioactif (58 mCi . mmol $^{-1}$) provenait du Centre de Radiochimie Amersham (U.K.). Il a été oxydé enzymatiquement par la choline oxydase d'*Alcaligenes* sp. (Sigma Chem. Corp., St. Louis, MO). Les tests de transport de la GB ont été réalisés en aérobose, selon la méthode mise au point par Perroud et LeRudulier (1985), sur 1 ml de suspension bactérienne à DO (420nm) de 0,5 à 0,8. Chaque essai individuel contenait 10 μ l de ^{14}C -GB (124000 dpm par essai) et 10 μ l de GB non radioactive pour obtenir la radioactivité spécifique appropriée. Chaque essai a été réalisé au moins à trois reprises. Les valeurs de l'accumulation de GB étaient concordantes dans une limite de 10%.

2.2.5.2 Incubation dans les sédiments

Les cellules (*E. coli* MC4100) cultivées en milieu M9 ont été récoltées en phase de croissance exponentielle par centrifugation (4E C, 20 min; 10000xg). Elles ont été rincées en eau de mer stérile (EMS) à trois reprises, puis suspendues dans 10ml d'EMS. 5 ml de chaque suspension ont été introduits dans un sac à dialyse (diamètre intérieur 1cm) préalablement bouilli dans l'eau distillée, contenant 5 billes de verre (diamètre 1 mm) permettant le maintien en suspension des cellules. Ces sacs ont été scellés, puis étendus à la surface du sédiment non stérilisé étalé dans un large récipient de verre. Ils ont été recouverts d'une couche de 2cm du même sédiment, puis incubés à 24E C (\pm 2E C) sur une table basculante. Après chaque période d'incubation (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 jours), un sac a été sorti du sédiment, rincé à l'EMS et ouvert aseptiquement. La suspension cellulaire a été collectée à l'aide d'une seringue stérile. Sa DO (600 nm) a été contrôlée et les mesures d'accumulation de GB ou d'activité β -gal effectuées.

2.2.5.3 Dosage du carbone organique total

La teneur en COT des sédiments utilisés a été mesurée à l'aide de la méthode titrimétrique de Gaudette *et al.* (1974), et exprimée en mg COT/kg de sédiment.

2.2.5.4 Sédiments utilisés

Trois sédiments d'origine différente ont été utilisés au cours de ce travail. Leurs caractéristiques macroscopiques et leur teneur en COT étaient les suivants:

Sédiment 1:	Origine: Port de Nice Nature: sable vaseux à débris coquillers COT: 48 mg/kg
Sédiment 2:	Origine: Cap de Nice Nature: sable vaseux fin COT: 1,5 mg/kg
Sédiment 3:	Origine: Baie de Villefranche/sur/mer Nature: boue à fragments de posidonies COT: 21,3 mg/kg

2.2.6 Reproductibilité des résultats

A l'exception des tests effectués sur les sédiments (un test pour chaque), tous les essais ont été réalisés à deux ou trois reprises. Les données présentées sont les moyennes des réplicats. Dans certains cas, une analyse de variance a été effectuée pour préciser le degré de signification des différences expérimentales observées (Schwartz, 1980).

3. RESULTATS - DISCUSSION

3.1 Protection des cellules d'E. coli par préadaptation à la haute osmolarité et rôle des mécanismes d'osmorégulation

La première partie du travail concernait l'analyse de la protection apportée aux cellules d'*E. coli* par différents mécanismes de régulation osmotique. Nous résumerons ci-dessous les principaux résultats obtenus dans ce domaine, ainsi que les commentaires qui peuvent être faits sur ces données. Le détail des données expérimentales (tableaux, figures) peuvent être trouvés dans l'Annexe 1.

Pour l'essentiel, les données expérimentales recueillies montrent que:

- a. La croissance préalable des cellules d'*E. coli* dans un milieu salé (NaCl, 0,5 M) leur permet de mieux survivre dans l'eau de mer. Cet effet "protecteur" peut aussi être obtenu par croissance en présence de LiCl (0,4 M) ou de saccharose (0,8M): il est donc une conséquence de l'adaptation à un milieu à haute osmolarité, sans spécificité pour l'élément qui augmente celle-ci dans ce milieu.
- b. L'effet "protecteur" est rémanent: une protection partielle demeure chez les cellules d'abord cultivées à haute osmolarité puis testées après une nouvelle culture à basse osmolarité. Cette persistance de la protection ne peut être due à l'apparition de mutant résistants, le phénomène concernant l'ensemble de la population testée.
- c. L'addition d'osmolytes organiques (choline, proline, GB) au milieu de préculture peut aussi influencer la survie des cellules dans l'eau de mer. La choline et la proline n'ont aucune

activité dans ce sens, alors que la GB a un fort effet protecteur, même lorsqu'elle est fournie dans un milieu à faible osmolarité.

- d. Tous les systèmes d'osmorégulation testés, à savoir:
- le transport de la GB exogène par les systèmes ProP (basse affinité) ou ProU (haute affinité),
 - la synthèse intracellulaire de GB à partir de la choline,
 - le transport de potassium par les systèmes TrK (basse affinité) ou Kdp (haute affinité),
 - la synthèse *in vivo* de tréhalose;

concourent à l'établissement de l'état de protection des cellules lorsqu'ils interviennent pendant la culture de celles-ci avant leur transfert dans l'eau de mer.

e. L'état de protection peut être établi dans les cellules **à l'état non proliférant**, au cours d'une incubation intermédiaire entre la culture et la mise en suspension dans l'eau de mer. C'est le cas pour la GB, qui peut conférer la protection aux cellules cultivées à basse osmolarité puis suspendues en tampon phosphate (0,1M) à haute osmolarité (NaCl 0,5M) pendant 1h avant transfert à l'eau de mer.

f. La GB n'a apparemment aucune activité protectrice importante sur les cellules d'*E. coli* lorsqu'elle est fournie directement dans l'eau de mer.

Ces résultats montrent donc à nouveau que la survie d'*E. coli* dans l'eau de mer peut dépendre, parfois étroitement, de l'histoire des cellules avant leur transfert dans ce milieu. La préadaptation à la haute osmolarité instaure dans ces cellules un état de protection très efficace car il permet leur maintien à l'état viable et cultivable pendant une période beaucoup plus longue. Il est important de noter que **cette protection peut être conférée soit au cours de la croissance, soit au cours d'une période de stabulation des cellules avant ou pendant leur transfert vers le milieu marin.**

3.2 Protection par la glycine bêtaïne

La protection par la GB (et vraisemblablement d'autre bêtaïnes) est un processus très intéressant au plan écologique et sanitaire. On sait en effet que cet osmolyte, ainsi que d'autres substances analogues à effet osmoprotecteur (ammoniums, sulphoniums, phosphoniums) sont produits par de nombreux animaux et végétaux marins (voir revue dans: King, 1987). L'influence protectrice exercée par ces substances implique cependant le maintien dans les cellules bactériennes entériques, de divers mécanismes permettant la régulation osmotique et leur fonctionnement normal dans les conditions marines. C'est en particulier le cas pour les systèmes de transport de GB exogène et, à un niveau plus fondamental, pour l'expression des gènes codant pour ces systèmes. On peut a priori penser que le maintien de ces mécanismes nécessite celui de l'homéostasie cellulaire, donc d'un métabolisme normalement alimenté par l'apport de substrats nutritifs. Or le milieu marin se caractérise par une très grande disparité des concentrations en matières organiques utilisables par les bactéries. L'eau de mer est généralement oligotrophe, si l'on excepte les eaux eutrophisées qui contiennent une forte population microbienne (algues, cyanophycées, bactéries). Par contre les sédiments, la surface des substrats immergés et la microcouche de surface sont des biotopes beaucoup plus riches en éléments organiques éventuellement utilisables comme nutriment par les bactéries allochtones. Il était donc important d'évaluer les possibilités d'accumulation de la GB et l'expression des gènes correspondants chez les cellules d'*E. coli* placées dans ces différentes conditions.

3.2.1 Transport de la GB dans l'eau et les sédiments marins

Le transport de la GB par les cellules d'*E. coli* MC4100 préalablement cultivées à basse osmolarité, était **très faible dans l'eau de mer oligotrophe** (Table 1). On notera cependant qu'il augmentait avec le temps d'incubation des cellules dans ce milieu: après 2 et 8 jours, il était respectivement 10 et 100 fois plus élevé qu'au début des expériences.

Table 1

Transport et accumulation de [*methyl*-¹⁴C]GB par les cellules de *E. coli*/MC4100, cultivées à basse osmolarité puis incubées dans l'eau de mer et des sédiments marins. Les résultats sont exprimés en nmol GB accumulée/10 min/mg protéines.

Incubation en	Nombre de jours en eau de mer ou dans les sédiments						
	0	1	2	3	4	6	8
eau de mer	0,01	ND ^a	0,14	ND	ND	ND	1,46
sédiment 1	0,01	ND	0,28	ND	0,33	ND	ND
sédiment 2	0,04	ND	0,96	ND	0,31	ND	ND
sédiment 3	0,02	868	641	384	ND	399	ND

^a ND: non déterminé

3.2.2 Expression des gènes proP et proU

Dans l'eau de mer, les deux fusions proP-lacZ et proU-lacZ étaient très faiblement exprimées (Fig. 1). L'activité β-gal des cellules portant une fusion proP-lacZ était très basse, quelle que soit la salinité de l'eau de 10 à 37‰ et n'a pas varié significativement pendant les 10 jours de l'expérience. Elle était indépendante de la concentration en phosphates de l'eau de mer et légèrement augmentée par l'addition de glucose (500 mg/l) (Fig. 2). L'expression de *lac* dans les cellules portant une fusion *proU-lacZ* était aussi faible, mais significativement ($p < 0,01$) augmentée par l'élévation de salinité durant les sept premiers jours (Fig. 1). Cette augmentation d'expression était accélérée en présence de glucose (10 ou 100 mg/l) (Fig. 3). On notera cependant que la plus forte concentration en glucose (500 mg/l) a inhibé l'expression de *proU-lacZ*.

Dans les sédiments 1 et 3, les cellules ont exprimé très faiblement le gène *proP* (Fig. 4). Par contre, la fusion *proU-lacZ* n'était pas exprimée dans le sédiment 1 mais l'était significativement dans le sédiment 3 (Fig. 4). L'activité β-gal des cellules a augmenté 4 fois pendant le premier jour, l'expression de *lacZ* demeurant maximale (à 5 fois sa valeur initiale) jusqu'à la fin des expériences.

En résumé, ces résultats montrent donc que:

*** dans l'eau de mer:**

- le transport de la GB est très faible, quel que soit le mécanisme mis en jeu;

- l'expression des gènes *proP* et *proU* est aussi très faible, même si l'opéron *proU* est transitoirement exprimé à un bas niveau dans l'eau de mer non diluée;

- cette expression, bien que faible, est maintenue à son niveau maximal quand l'eau de mer contient des ions phosphates et du glucose (10 ou 100 mg/l) comme source de C et d'énergie.

Ceci est en accord avec les observations précédentes, et pourrait expliquer l'absence de protection efficace des cellules par la GB dans l'eau de mer.

* dans les sédiments: transport et expression peuvent être élevés lorsque le milieu contient des substrats organiques.

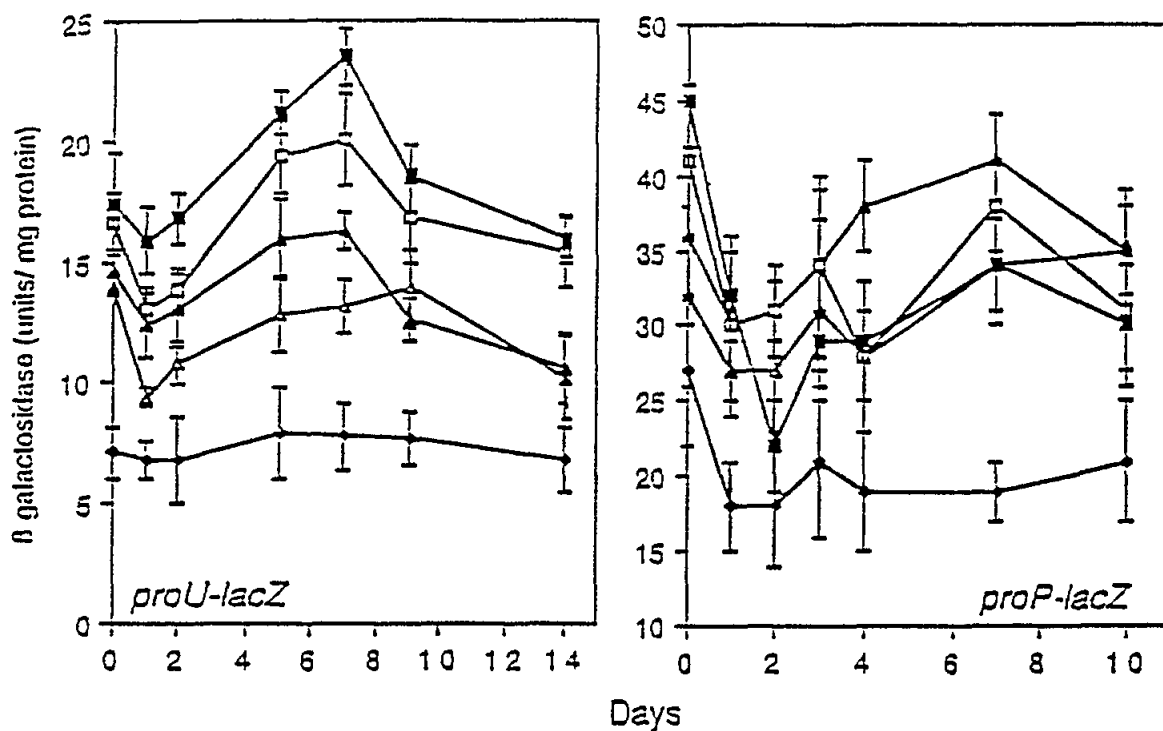


Figure 1 : Expression des fusions *proU-lacZ* et *proP-lacZ* dans les cellules d'*Escherichia coli* MC4100 cultivées en milieu M9 puis suspendues dans l'eau distillée (♦), l'eau de mer (37‰, ■) et des mélanges à salinité croissante: 10 (Δ), 20 (▲) et 30 ‰ (□)

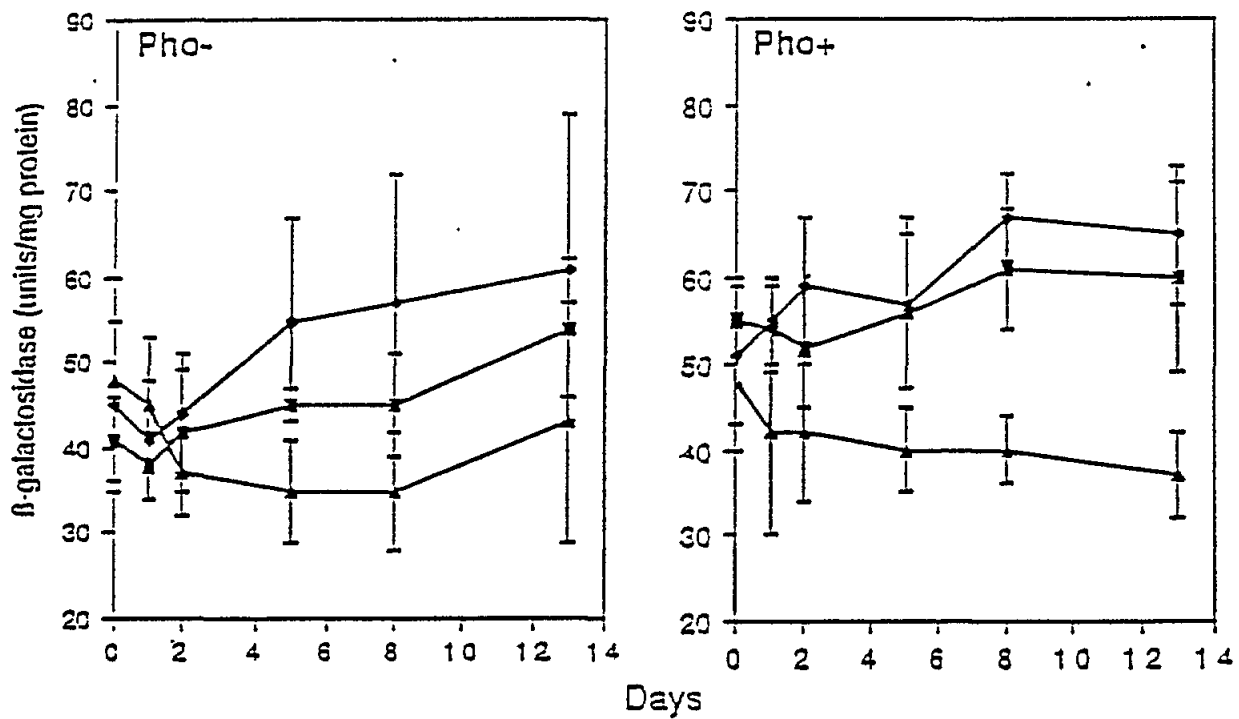


Figure 2 : Expression de la fusion *proP-lacZ* dans les cellules d'*Escherichia coli* GM37 cultivées dans le milieu M9 puis suspendues dans l'eau de mer additionnée (Pho+) ou non (Pho-) de K-phosphate (500 μ M), contenant 10 (■), 100 (◆) ou 500 (▲) mg de D-glucose/litre

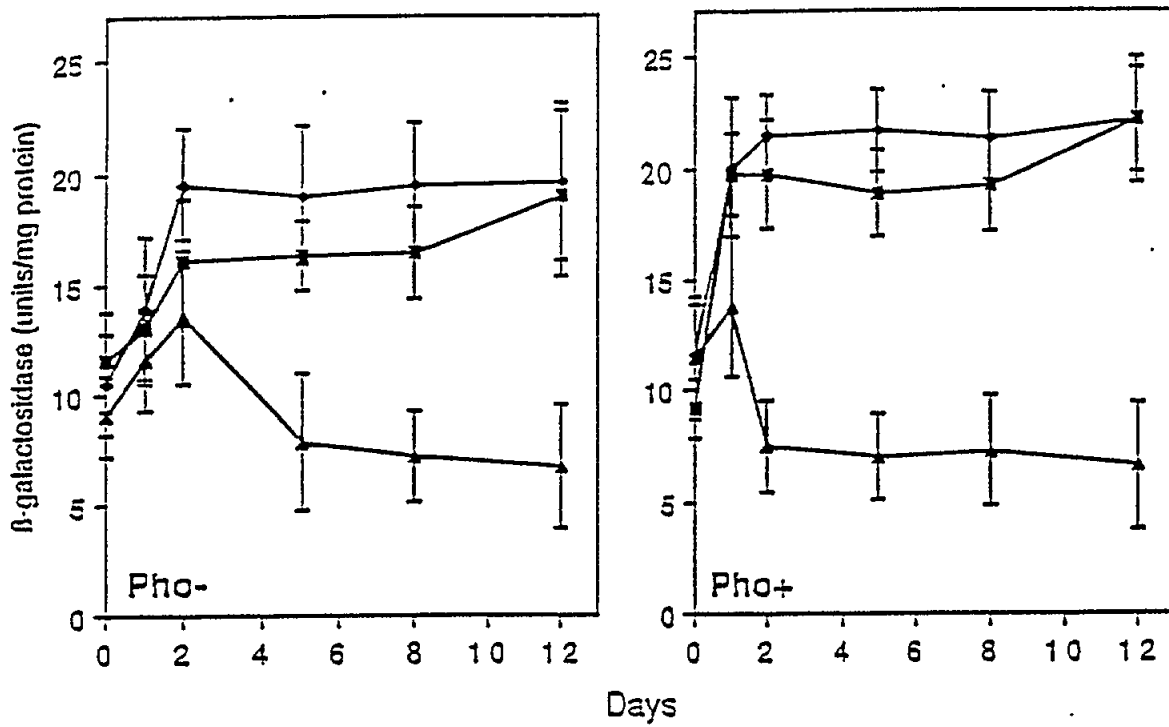


Figure 3 : Expression de la fusion *proU-lacZ* dans les cellules d'*Escherichia coli* EF063 cultivées dans le milieu M9 puis suspendues dans l'eau de mer additionnée (Pho+) ou non (Pho-) de K-phosphate (500 μ M), contenant 10 (■), 100 (◆) ou 500 (▲) mg de D-glucose/litre

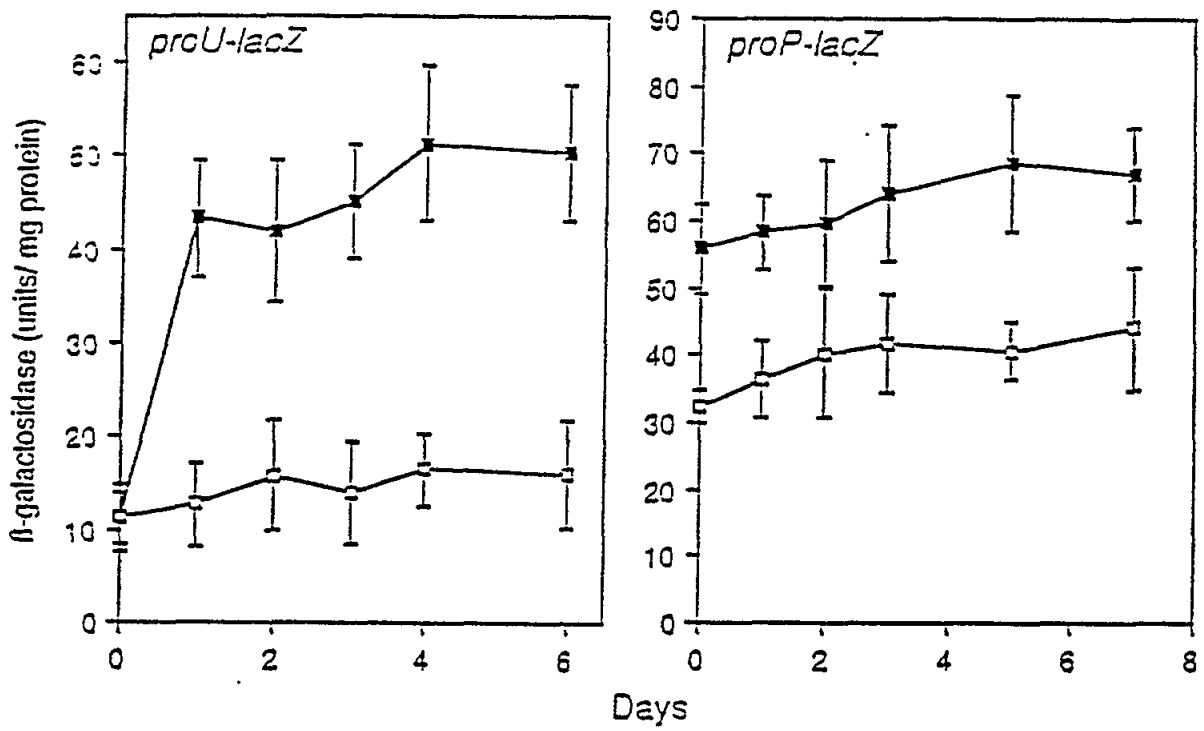


Figure 4 : Expression des fusions *proU-lacZ* et *proP-lacZ* dans les cellules d'*Escherichia coli* GM37 et EF063 cultivées en milieu M9 puis incubées dans les sédiments marins naturels 1 (□) et 3 (■)

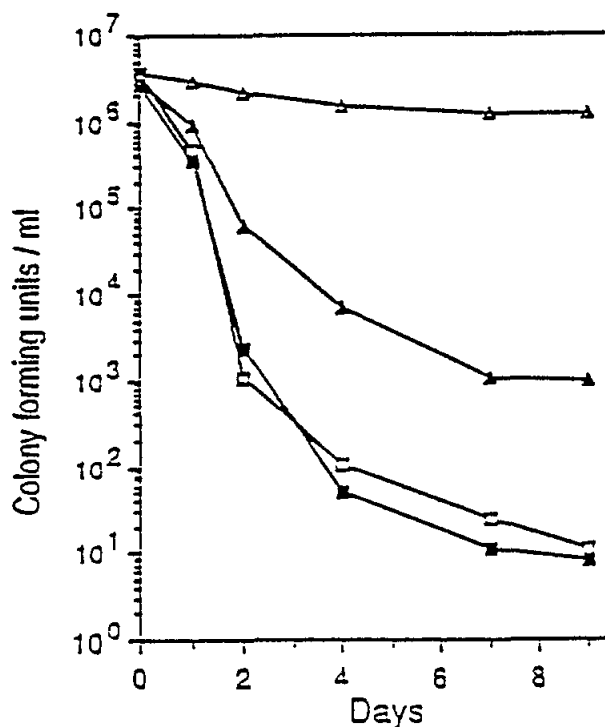


Figure 5 : Survie dans l'eau de mer sans nutrilités des cellules d'*Escherichia coli* MC4100 préalablement cultivées en milieu M9 puis incubées pendant 24h dans les sédiments marins 1 (■ ▲) et 3 (□ △), additionnés (▲ △) ou non (■ □) de glycine bêtaïne (500 μ M)

Les deux observations mettent en évidence le fait que l'expression des gènes codant pour les systèmes de transport de la GB, et le fonctionnement de ces systèmes dans l'eau de mer oligotrophe dépendent étroitement de la présence de substrats nutritifs et d'ions phosphates permettant aux cellules de se développer et de maintenir leur niveau d'énergie. Ceci explique vraisemblablement le haut niveau d'expression de *proU* et l'important transport de GB observé dans le sédiment 3, qui contenait une forte quantité de matière organique et, probablement, une plus importante quantité de substrats assimilables que les sédiments 1 et 2.

En ce qui concerne la protection des cellules de bactéries entériques dans le milieu marin, le système ProP paraît beaucoup moins efficace que le système ProU, du fait de sa plus faible affinité pour la GB et la très faible expression de son gène dans l'eau de mer et les sédiments; dans les conditions marines, la situation est à l'évidence différente que dans un milieu de culture, où la transcription de *proP* augmente à haute osmolarité (Cairney *et al.*, 1985). Les résultats ci-dessus suggèrent fortement qu'en mer, les cellules d'*E. coli* (et probablement celles d'autres Entérobactéries) peuvent accumuler la GB essentiellement grâce au système ProU, et peuvent être ainsi protégées des effets défavorables exercés par le milieu dans la mesure où ils peuvent trouver des nutrilités organiques et des ions phosphates.

3.2.3 Effet de l'accumulation de GB dans les sédiments sur la survie dans l'eau

Les cellules préalablement incubées pendant 24h à 24E C dans les sédiments 1 et 3 additionnés de GB (500 µM) (méthode des sacs à dialyse décrite plus haut), ont été remises en suspension dans de l'eau de mer filtrée (microcosmes, voir préparation en M&M, para. 2.1). Leur comportement est présenté dans la fig. 5. La survie de ces cellules était considérablement augmentée, le niveau de protection étant environ 1000 fois plus élevé après incubation dans le sédiment 3.

Il apparait donc clairement que le passage des cellules d'*E. coli* dans des sédiments marins contenant de la GB est une étape très importante pour leur survie future dans la colonne d'eau, dans l'éventualité de leur remise en suspension par les vagues ou les courants. La bactérie y acquiert un haut niveau de résistance et la capacité de se maintenir à l'état cultivable dans l'eau de mer pour des périodes beaucoup plus longues.

4. CONCLUSIONS

Les résultats des travaux exposés ci-dessus ont progressivement conduit aux conclusions suivantes:

- La survie des cellules d'*E. coli* en mer dépend, au moins en partie, des événements qui précèdent leur arrivée dans l'eau de mer.
- Cette survie dépend étroitement de la possibilité qu'ont ces cellules de compenser le choc osmotique à leur arrivée en mer, grâce à tous les mécanismes d'osmoprotection dont elles disposent.
- Les bétaïnes jouent de ce point de vue un rôle très intéressant. Leur importance est d'autant plus grande qu'elles sont universellement produites par les organismes vivants adaptés aux milieux salés et que les entérobactéries possèdent un système de transport de ces substances à très haute affinité.
- Le transport par les cellules de l'une de ces bétaïnes, la glycine bétaïne, est presque impossible dans l'eau de mer oligotrophe, mais peut être très actif dans les sédiments marins à haute teneur en matières organiques. Le système à haute affinité ProU joue alors un rôle primordial.
- Dans ces sédiments, il est même possible que les cellules expriment les gènes codant pour ce système de transport, permettant donc leur adaptation *in situ* à la haute osmolarité du milieu et une reprise du métabolisme dans ces conditions naturelles.
- Les cellules ayant transité par ces sédiments acquièrent une grande résistance à l'eau de mer; remises en suspension dans l'eau oligotrophe, elles peuvent y survivre beaucoup plus longtemps.

A ce stade de notre connaissance, il paraît donc justifié de mettre l'accent sur l'importance sanitaire que peuvent avoir certains sédiments marins. Il semble maintenant à peu près établi que ces milieux peuvent exercer sur les bactéries entériques, pathogènes ou non, une influence qui favorise leur adaptation aux conditions marines et augmente considérablement leur résistance future à l'eau de mer. On sait en effet que, outre la protection qu'ils assurent aux bactéries vis à vis de la lumière, certains sédiments marins (1) contiennent de grandes quantités de matières organiques favorables à la croissance bactérienne, (2) peuvent contenir de la GB, de nombreux autres ammoniums quaternaires (King, 1984, 1987, 1988) et d'autres osmolytes produits par des plantes ou des animaux marins qui pourraient aussi être accumulés par les

bactéries. Dans certains zones côtières au moins, les sédiments marins pourraient donc jouer le rôle de réservoirs pour les bactéries entériques et assurer leur maintien *in situ* à l'état actif. Par voie de conséquence, il nous paraît important d'envisager un contrôle de la teneur en osmolytes (GB et autres) des sédiments marins côtiers, surtout dans les zones soumises à une contamination bactérienne chronique d'origine urbaine, afin de détecter d'éventuelles zones "à risque" où la survie et l'adaptation des germes entériques serait facilitée par ces osmolytes protecteurs.

5. REFERENCES

- AUBERT, M., M.J. GAUTHIER, J. AUBERT et P. BERNARD, 1981. Les systèmes d'information des microorganismes marins. Leur rôle dans l'équilibre biologique océanique. *Rev. Int. Océanogr. Méd.* **60-61** : 37-106.
- BOOTH, I.R., J. CAIRNEY, L. SUTHERLAND, and C.F. HIGGINS, 1987. Enteric bacteria and osmotic stress : an integrated homeostatic system. *J. Appl. Bacteriol.*, Symp. Suppl. p. 35S-49S.
- CAIRNEY, J., I.R. BOOTH, and C.F. HIGGINS, 1985. *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J. Bacteriol.* **164** : 1218-1223.
- CASADABAN, M.J., 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J.Mol.Biol.* **104** : 541-555.
- CZONKA, L., 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53** : 121-147.
- GAUDETTE, H.E., W.R. FLIGHT, L. TONER and D.W. FOLGER, 1974. An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *J.Sed.Petrol.* **44** : 249-253.
- GAUTHIER, M.J., P.M. MUNRO and S. MOHADJER, 1987. Influence of salts and sodium chloride on the recovery of *Escherichia coli* from seawater. *Curr.Microbiol.* **15** : 5-10.
- GRIMES, D.J., and R.R. COLWELL, 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* **34** : 161-165.
- KING, G.M., 1984. Metabolism of trimethylamine, choline, and glycine betaine by sulfate-reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. *Appl.Environ.Microbiol.* **48** : 719-725.
- KING, G.M., 1987. An enzymatic synthesis of specifically radiolabelled derivatives of the common osmolyte, glycine betaine. *J.Exp.Mar.Biol.Ecol.* **107** : 145-154.
- KING, G.M., 1988. Distribution and metabolism of quaternary amines in marine sediments. p. 143-173. In: *Nitrogen Cycling in Coastal Marine Environments*, T.H. Blackburn and J. Sorensen, Eds., John Wiley & Sons, Inc., N.Y.
- KOGURE, K., U. SIMIDU and N. TAGA, 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can.J.Microbiol.* **25** : 415-420.
- LERUDULIER, D., A.R. STROM, A.M. DANDEKAR, L.T. SMITH and R.C. VALENTINE, 1983. Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224** : 1064-1068.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, **193** : 265-275.

- MANIATIS, T., E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK, 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. p. 86-95. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MAY, G., E. FAATS, M. VILLAREJO and E. BREMER, 1986. Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol.Gen.Genet.* **205** : 225-233.
- MILLER, J.H., 1972. *Experiments in molecular genetics*. p. 431. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MORITA, Y., 1982. Starvation survival of heterotrophs in the marine environment. pp. 171-198. In: *Advances in Microbial Ecology*, K.C. Marshall Ed., Plenum Press, N.Y.
- PERROUD, B., and D. LERUDULIER, 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli* : osmotic modulation. *J.Bacteriol.* **161** : 393-401.
- POSTGATE, J.R., 1976. Death in macrobes and microbes. *Symp.Soc.Gen.Microbiol.* **26** : 1-18.
- RHODES, M.W., I.C. ANDERSON, and H.I. KATOR, 1983. *In situ* development of sublethal stress in *Escherichia coli* : effects on enumeration. *Appl.Environ.Microbiol.*, **45** : 1870-1876.
- SCHWARTS, D., 1980. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et biologistes*. p. 173-187. Flammarion, Paris.
- STEVENSON, L.H., 1978. A case for bacterial dormancy in aquatic systems. *Microbial Ecol.* **4** : 127-133.
- VACCARO, R.F., M.P. BRIGGS, C.L. CAREY and B.H. KETCHUM, 1950. Viability of *Escherichia coli* in seawater. *Am.J.Publ.Health* **40** : 1257-1266.
- XU, H.-S., N. ROBERTS, F.L. SINGLETON, R.W. ATWELL, D.J. GRIMES and R.R. COLWELL, 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecol.* **8** : 313-323.

INFLUENCE DES MECANISMES D'OSMOREGULATION SUR LA SURVIE ET L'ADAPTATION DES BACTERIES ENTERIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

par

Michel J. Gauthier
I.N.S.E.R.M. Unité 303 "Mer et Santé"

1. INTRODUCTION - CADRE GENERAL DU TRAVAIL

La survie des bactéries entériques dans l'environnement marin était, antérieurement aux années 1975-1980, considérée comme de courte durée: ces bactéries étaient supposées détruites assez rapidement par un ensemble de **facteurs antagonistes physiques** (température, radiations solaires), **chimiques** (salinité, métaux lourds, pH, xénobiotiques) ou **biologiques** (micro et macroprédateurs, substances lytiques ou antibiotiques produites par les bactéries, les champignons ou les algues marines) qui représentait ce que l'on nommait le "**pouvoir auto-épurateur**" du milieu marin (voir revue dans: Aubert *et al.*, Rev. Int. Océanogr. Méd., 1981, **60-61**).

Vers la moitié des années 70, il a été progressivement reconnu que ces bactéries pouvaient ne pas être détruites, mais être fortement stressées dans les milieux hostiles (Ref), en particulier dans les conditions du milieu marin (essentiellement: basse température, haute salinité, et carence alimentaire). On a montré qu'elles évoluaient alors vers un état viable mais non cultivable (Xu *et al.*, Microb. Ecol., 1982, **8** : 312-32) qui pouvait être irréversible, ce qui éclairait d'un jour tout à fait nouveau l'ancien concept de mortalité bactérienne en mer. Au cours de cette évolution vers la dormance, les cellules subissent de très importantes modifications structurales et métaboliques qui les rendent progressivement inertes, et qui ont été essentiellement attribuées à la carence alimentaire. Il existe en effet une analogie très frappante entre cette évolution et celle des bactéries marines autochtones dans les eaux oligotrophes.

Dès 1987 (Gauthier *et al.*, 1987, Curr. Microbiol., **15** : 5-10; Munro *et al.*, 1989, Appl. Environ. Microbiol., **55** : 2017-2024), nous avons montré que les capacités de survie des entérobactéries dans l'environnement marin étaient **initialement** liées à leur pouvoir de résister au choc osmotique et à la possibilité qu'elles ont de restaurer leur homéostasie dès leur arrivée en mer. Il s'agit là d'un processus qui **intervient à très court terme, mais qui détermine le devenir des cellules à très long terme**, soit vers la dormance, soit vers l'adaptation sous une forme active qui demeure cultivable.

2. RESULTATS ACQUIS RECEMMENT A L'UNITE INSERM U303

Au cours de l'année 1989, nous avons effectué un ensemble de recherches visant à mettre en évidence l'influence des processus de régulation osmotique sur la survie à court, moyen et long terme dans l'eau de mer. Ce travail a été partiellement financé par l'OMS-PNUE, et ses résultats exposés dans un rapport établi pour cet Organisme en fin 1989 [M. Gauthier, Rapport Contrat FRA46(K), 1989].

Ces résultats ont montré que la survie d'*E. coli* (et celle d'autres entérobactéries comme *Salmonella paratyphi* B, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*) dans l'eau de mer dépend bien des possibilités qu'ont ces bactéries à résister au choc osmotique qu'elles subissent au moment de leur rejet dans ce milieu. Il est clairement apparu que ces germes peuvent acquérir une grande résistance à l'eau de mer, donc **un fort pouvoir adaptatif vis à vis de ce milieu**, lorsqu'elles possèdent les gènes qui codent pour divers mécanismes de régulation de l'équilibre

osmotique (transport de potassium, transport et/ou synthèse de bêtaïnes, synthèse de glutamate, de tréhalose et d'amines variées) et qu'elles peuvent les exprimer dans les conditions marines.

Nous avons plus particulièrement étudié le cas des gènes dont dépendent la synthèse (intracellulaire) ou le transport (à partir du milieu) d'osmolytes organiques comme les bêtaïnes. Il s'agit en effet de substances universellement utilisées par les organismes vivants (procaryotes et eucaryotes) pour leur adaptation aux milieux salés, dont on sait qu'elles peuvent se trouver en quantité non négligeable dans divers compartiments du milieu marin.

Chez ces bactéries entériques, cette synthèse (ou ce transport) dépendent étroitement de l'état métabolique et énergétique des cellules. Dans l'état actuel de nos recherches, on peut dire que cet état n'est pas favorable dans l'eau de mer oligotrophe, où la carence en substrats nutritifs est trop importante pour le maintien des processus cellulaires qui permettent la restauration de l'équilibre ionique et osmotique. Ceci explique sans doute l'inefficacité de la glycine bêtaïne (GB) à assurer la protection des cellules lorsqu'elle leur est fournie directement dans l'eau de mer non nutritive (Munro *et al.*, 1989, Appl.Environ.Microbiol., **55** : 2017-2024). Par contre, nous avons montré que le transport de la GB par *E. coli* est très efficace dans les sédiments marins qui contiennent une importante quantité de matière organique assimilable, essentiellement grâce au système ProU (inductible, à haute affinité pour la GB) (Gauthier et LeRudulier, 1990, Appl.Environ.Microbiol., **56** : 2915-2918). Cette observation confère à certains sédiments marins une grande importance sanitaire, dans la mesure où ils pourraient jouer le rôle de **réservoir de germes entériques** (éventuellement pathogènes) **où ces bactéries pourraient acquérir une résistance accrue aux conditions marines**.

3. BUTS DE L'ETUDE COMPLEMENTAIRE

Les derniers développements de nos recherches à la fin de l'année 1989 montraient que la réactivité d'*E. coli* et sa survie dans l'eau de mer oligotrophe dépendaient plus ou moins directement du maintien du métabolisme, donc de l'**énergisation des cellules**, ce qui mettait l'accent sur l'importance vraisemblablement très grande de la matière organique comme source de nutriment et d'osmolytes. Ces observations suggéraient aussi une **influence des ions phosphate**, dont on connaît l'importance dans l'énergétique cellulaire. Quelle que soit la nature des éléments nécessaires à la survie, il semblait cependant fondamental de savoir si ceux-ci pouvaient être utilisés par les cellules, en d'autres termes si celles-ci restaient en effet l'intégrité structurale de systèmes situés dans les enveloppes (membrane externe, espace périplasmique, membrane cytoplasmique) et leur fonctionnement dans les conditions marines.

Les buts de ce travail complémentaire étaient donc:

- d'élucider les mécanismes permettant aux cellules d'*E. coli* de surmonter le choc osmotique lors de leur rejet en mer, surtout dans les phases initiales de ce choc, mécanismes qui pourraient conditionner le sort des cellules à plus long terme et intervenir dans l'établissement de l'état de résistance observé chez les cellules préadaptées à la haute osmolarité; c'est en particulier le cas pour l'accumulation de potassium et la synthèse de glutamate;
- d'étudier l'influence sur la survie de ces cellules des canaux ioniques présents dans l'enveloppe externe (porines C et F);
- d'analyser l'incidence des ions phosphate et de l'activité phosphatase alcaline sur la survie des cellules dans l'eau de mer.

4. RESULTATS DE L'ETUDE COMPLEMENTAIRE

4.1 Recherches sur l'état de résistance à l'eau de mer des cellule d'E. coli précultivées à haute osmolarité

Cette partie du travail a consisté à rechercher la cause essentielle de la résistance élevée à l'eau de mer que présentent les cellules d'*E. coli* après leur culture dans un milieu à haute osmolarité (M9 additionné de NaCl 0.5M).

Ce problème a été résolu par l'étude des variations de la résistance de ces cellules soumises à un choc hypoosmotique (eau distillée). Au cours de ce choc, les cellules perdent en effet de nombreux constituants cellulaires, et en particulier ceux qui concourent à maintenir la pression de turgescence nécessaire au métabolisme en milieu à haute osmolarité.

Cette partie du travail a fait l'objet d'une publication dans la revue "**Applied and Environmental Microbiology**" en 1991. Elle figure en Annexe 1, G la fin de ce rapport. Nous ne donnerons ici qu'un résumé des conclusions qui en ont été tirées.

La haute résistance d'*E. coli* cultivé en milieu salé et supprimée par incubation en eau distillée, traitement qui conduit à la perte par les cellules de la majeure partie du potassium et du glutamate intracellulaires. L'incubation des cellules "sensibilisées" par choc hypoosmotique dans une solution contenant du K⁺ (80mM) et du glutamate (50mM) à pH 7.4 restaure cette résistance jusqu'à un niveau voisin de celle des cellules non soumises à ce choc. L'effet protecteur est d'abord dû au transport rapide de potassium, que l'on trouve en quantité importante dans l'eau de mer (20mM environ): une relation exponentielle significative a été observée entre la concentration intracellulaire en K⁺ et la résistance des cellules à l'eau de mer. Le glutamate est par contre accumulé plus lentement et complète progressivement l'action protectrice du K⁺. Ces données confirment l'influence spécifique du glutamate de potassium sur les cellules d'*E. coli* soumises au stress osmotique dans l'eau de mer. Les fluctuations de l'osmolarité des eaux qui transportent les bactéries entériques de l'intestin à la mer (eaux usées), ainsi que leur contenu en K⁺ et en certains acides aminés, pourraient donc modifier leur capacité à survivre dans l'environnement marin. Ces résultats montrent en outre la stricte nécessité de contrôler les conditions dans lesquelles les bactéries sont rincées avant leur transfert dans des microcosmes d'eau de mer, et en particulier la teneur en K⁺ et la température (qui ne doit pas être inférieure à 15°C) des milieux de rinçage. Ils suggèrent en outre que le contenu en K⁺ et en glutamate des milieux dans lesquels les bactéries entériques sont transportées vers la mer (eaux fluviales ou eaux usées) peut influencer leur survie future dans ce milieu.

4.2 Recherches sur le rôle des phosphates et de l'activité phosphatase alcaline sur la survie d'E. coli en mer

Ce travail a été réalisé à l'aide de sets isogènes de souches d'*E. coli* possédant ou non le gène *phoA* codant pour la synthèse de la phosphatase alcaline, enzyme située dans l'espace périplasmique dont la synthèse est osmorégulée et dépend de la teneur en ions PO₄ du milieu. Nous avons ainsi comparé la survie de ces souches en microcosmes d'eau de mer dans des conditions rigoureusement standardisées. Nous avons également analysé l'évolution de la teneur en ATP de ces bactéries en fonction du temps de contact avec l'eau de mer.

Les résultats de ce travail ont fait l'objet d'une publication dans la revue "**Microbial Ecology**" en 1990. Elle figure en Annexe no 2, à la fin de ce rapport. Nous ne donnerons ici aussi qu'un résumé des conclusions qui ont été tirées des expériences réalisées dans ce cadre.

Les résultats obtenus ont montré que les cellules d'*E. coli* MC4100 cultivées dans un milieu minéral minimum (M9) puis suspendues pendant 2h dans l'eau distillée, l'eau de mer, un tampon phosphate (pH 7,5) et une solution de polyphosphate avant leur transfert dans l'eau de mer, survivaient d'autant mieux qu'elles avaient une activité phosphatase alcaline élevée et/ou que

le milieu d'incubation intermédiaire contenait des phosphates. Cependant, les mutants totalement dépourvus de cette activité ont montré une survie au moins aussi importante que les cellules possédant l'enzyme lorsqu'elles étaient préincubées dans un tampon phosphate avant leur transfert à l'eau de mer. Ceci indique donc que l'activité phosphatase alcaline n'était pas le seul facteur influençant la survie dans ces conditions expérimentales. Le taux d'ATP des cellules ne paraît pas jouer de rôle dans ces processus: il décroissait en effet de la même manière pour la souche sauvage et pour le mutant.

Il est aussi intéressant de noter que l'activité phosphatase alcaline a significativement augmenté la protection des cellules par la glycine bêtaïne. Par ailleurs, il est apparu que les polyphosphates jouaient un rôle protecteur tout à fait analogue à celui des phosphates. **Le transit des cellules dans l'eau d'égout pourrait donc avoir une influence sur leur survie future dans l'eau de mer.**

4.3 Recherches sur la stabilité et le rôle des porines (OmpC, OmpF) dans la survie d'E. coli en mer

Le passage des ions et des petites molécules à travers la membrane externe se fait par l'intermédiaire de trois porines majeures, OmpF, OmpC et PhoE. Les deux premières permettent la pénétration non spécifique de toutes les petites molécules (PM<900 environ). La porine PhoE est plus spécifique du passage des ions phosphates. Sur le plan de l'expression de ces porines, il faut savoir, qu'**OmpF est normalement produite à basse osmolarité**, alors qu'**OmpC est induite à haute osmolarité** et que **PhoE l'est en milieu carencé en phosphates** (voir revue dans: Stocket *al.*, 1989).

L'influence de ces trois types de pores protéiques de l'enveloppe externe sur la survie des cellules en eau de mer peut être étudiée spécifiquement par l'utilisation de mutants ayant perdu les trois porines, ou l'une d'entre elles, ou deux d'entre elles, par rapport à la souche parentale les possédant toutes. Ce travail a été réalisé pour les porines C et F. Il est en cours pour PhoE.

4.3.1 Matériels et méthodes

4.3.1.1 Milieux, souches et tests de survie

L'influence des porines C et F sur la survie des cellules en eau de mer a été évaluée en utilisant un jeu de souches isogènes dérivées de *E. coli* MC4100 (OmpF+, OmpC+)(souches MC4100 et MCR106), mutées sur *ompF*(OmpF-, OmpC+)(souche PLB3260), sur *ompC* (OmpC-, OmpF+)(souche PLB 3261) ou sur les deux gènes (OmpF- OmpC-)(souche SBM26). Ces souches nous ont été fournies par S. Benson (Université du Maryland, USA), avec qui nous avons collaboré sur ce point. Pour chaque souche, la survie dans l'eau de mer a été "classiquement" étudiée dans des microcosmes d'eau de mer, sur des cellules préalablement cultivées à basse(M9 sans NaCl) ou à haute(M9 +0,5M NaCl) osmolarité (voir protocoles détaillés dans: Munro *et al.*, 1989).

4.3.1.2 Examen des porines

La stabilité des porines dans l'enveloppe des cellules incubées dans l'eau de mer a été évaluée par extraction spécifique de ces protéines et leur électrophorèse en gel de polyacrylamide.

4.3.1.3 Mesure de l'activité β -galactosidase

L'activité β -galactosidase de souches portant une fusion *ompC-lacZ* ou *ompF-lacZ* a été mesurée à l'aide de la méthode décrite par Miller (1972).

4.3.2 Résultats - Discussion

La présence des porines OmpF et OmpC dans la membrane externe (ou enveloppe externe) d'*E. coli* influence très significativement la survie de cette bactérie dans l'eau de mer, à la fois par leur absence ou leur présence, et par leur nature même. Les cellules qui possédaient à la fois OmpF et OmpC (MC4100 et MCR106) ont mieux survécu que celles qui ne possédaient que l'une de ces deux porines (Table 1). Ceci a été confirmé après 4 et 7 jours d'incubation dans l'eau de mer, et que la souche ait été ou non préadaptée à la haute osmolarité par culture préalable en milieu salé. Parmi les souches non préadaptées, qui expriment essentiellement OmpF, celles qui possédaient OmpF ont mieux survécu que celles qui étaient mutées sur *OmpF* et ne possédaient pas cette porine. De manière analogue, quand les souches ont été préadaptées à la haute osmolarité et exprimaient donc seulement OmpC, les souches OmpC+ ont mieux survécu que les souches OmpC-. La préadaptation des cellules dans un milieu à haute osmolarité avant leur transfert à l'eau de mer a, dans tous les cas, augmenté la survie de 100 à 14300 fois (Table 1). Les cellules PLB 3260, qui n'expriment que la porine OmpC, ont montré la perte de viabilité la plus forte dans l'eau de mer, surtout après 7 jours d'incubation dans ce milieu. Les souches qui ne possédaient pas OmpC n'étaient pas aussi bien protégées, mais l'étaient clairement mieux que les cellules qui n'étaient pas préadaptées. La souche SBM 26, qui ne possède ni OmpC ni OmpF, a montré la perte de viabilité la plus élevée après 7 jours d'incubation en eau de mer, mais présentait la même sensibilité à l'eau de mer que la souche OmpF-OmpC+ après seulement 4 jours d'incubation.

Ces résultats montrent que, en ce qui concerne l'influence des porines sur la survie, la condition d'homéostasie dans laquelle les cellules se trouvent avant leur transfert à l'eau de mer a une haute signification en ce qui concerne leur survie future dans ce milieu. L'effet de la perte d'une porine sur cette survie peut être exprimée à partir des données de la Table 1, en calculant les rapports entre les index de perte de viabilité des souches ne possédant pas OmpF, OmpC, ou les deux porines simultanément, et ceux de la souche parentale OmpF+ OmpC+ (MCR 106) (Table 2). Les souches qui pouvaient exprimer la porine correspondant à la condition d'osmolarité appliquée pendant la croissance préalable des cellules paraissaient survivre mieux dans l'eau de mer. Pour les souches cultivées en l'absence de NaCl (expression de OmpF favorisée), OmpF semblait être la porine la plus importante pour la survie, alors que dans le cas des souches cultivées à haute osmolarité (NaCl 0.5M)(expression de OmpC favorisée), OmpC est apparue comme plus propice à la survie.

Comme on peut le voir dans les Figures 1 et 2, les porines OmpF et OmpC étaient stables dans les cellules incubées en eau de mer pendant au moins 8 jours d'incubation. La synthèse de OmpF étant réprimée à haute osmolarité (Hasegawa *et al.*, 1976) et à haute température (Lugtenberg *et al.*, 1976), il a été suggéré que les cellules d'*E. coli* qui se sont développées dans l'intestin (1% NaCl P/V, 40°C) sont pratiquement privées de porines OmpF (Nikaido et Vaara, 1987). Elles pourraient donc être rejetées dans l'environnement sous une forme plutôt résistante, ceci étant en partie dû à la présence de porines OmpC, à moins que la faible osmolarité et la basse température des eaux de rivières ou des eaux usées n'induisent fortement la synthèse de porines OmpF et efface ainsi la résistance issue de la préadaptation *in vivo*. Il est maintenant admis que les porines OmpF (dont le diamètre de pore est plus large que celui des porines OmpC) et les porines PhoE permettent un meilleur transport des nutrilites et des ions inorganiques dans les environnements aquatiques dilués.

Table 1

Effet de la préadaptation à la haute osmolarité des souches d' *E. coli* dépourvues d'OmpF, d'OmpC ou des deux porines, sur leur viabilité en eau de mer naturelle oligotrophe

Souche (profil des porines) ^a	Jour 4 ^b			Jour 7 ^b		
	Indice de perte de viabilité ^c		Rapport non préadapté/ préadapté ^f	Indice de perte de viabilité ^c		Rapport non préadapté/ préadapté ^f
	sans préadaptation ^d	avec préadaptation ^e		sans préadaptation ^d	avec préadaptation ^e	
MC4100(F+C+)	267	1.2	222	2909	8.6	338
MCR106(F+C+)	306	1.1	278	18205	7.6	2395
PLB3260(F-C+)	23967	4.1	5846	224923	15.7	14326
PLB3261(F+C-)	989	9.3	106	47882	319	150
SBM26(F-C-)	15947	3.4	1749	446000	3148	142

^a F+/-, présence/absence d'OmpF; C+/-, présence/absence d'OmpC

^b période d'incubation dans l'eau de mer

^c rapport UFC début expérience / UFC après 4 ou 7 jours

^d rapport [indice de perte de viabilité pour cellules non préadaptées/indice de perte de viabilité pour cellules préadaptées]

^e cellules cultivées en milieu M9

^f cellules cultivées en milieu M9 + 30 g NaCl/l

Table 2

Effet de la perte des porines OmpC et OmpF sur la survie dans l'eau de mer naturelle oligotrophe de cellules d'*E. coli* cultivées à basse ou à haute osmolarité, exprimée par le rapport entre les indices de perte de viabilité des souches PLB3260 (OmpF-), PLB3261 (OmpC-) et SBM 26 (OmpF- OmpC-) et l'indice de perte de viabilité de la souche parentale MCR 106 (OmpF+ OmpC+).

Perte des porines	Jour 4 ^a		Jour 7 ^a	
	sans préadaptation ^b	avec préadaptation ^c	sans préadaptation ^b	avec préadaptation ^c
OmpF	x78	x2.4	x12.4	x2.1
OmpC	x3.2	x8.5	x2.6	x42
OmpF et OmpC	x52	x2	x24.5	x414.2

^a période d'incubation dans l'eau de mer

^b cellules cultivées en milieu M9

^c cellules cultivées en milieu M9 + 30g NaCl/l

Par ailleurs, le fait que la croissance préalable des cellules à haute osmolarité favorise leur survie en eau de mer quelle que soit leur composition en porines (cette préadaptation a augmenté d'un facteur de 100 ces capacités de survie, même pour les souches OmpC-) pourrait refléter l'adaptation à une condition homéostatique qui serait plus étroitement ou adéquatement alignée sur les conditions imposées aux cellules dans l'eau de mer. Quoi qu'il en soit, il est clair que les porines jouent un rôle important pour la survie d'*E. coli* en eau de mer en aidant à leur adaptation, mais elles ne sont, à l'évidence, pas seules en jeu: nos travaux antérieurs ont bien montré que d'autres aspects de la physiologie sont impliqués dans la résistance de cette bactérie à l'eau de mer.

Dans l'eau de mer non nutritive, seule la fusion *ompC-lacZ* était exprimée, et ceci seulement quand les cellules étaient préadaptées à la haute osmolarité (Fig. 3). Cette expression a augmenté pendant les deux premiers jours d'incubation, puis a légèrement décliné jusqu'à 4 jours et s'est stabilisée jusqu'à la fin des tests. Quand l'eau de mer était additionnée de matière organique (50mg peptone/l, V/V) (Fig. 4), la fusion *ompC-lacZ* était aussi exprimée par les cellules précultivées à basse osmolarité, mais l'expression de *ompC* était élevée pendant les deux ou trois premiers jours, et revenait à sa valeur initiale pour les cellules non préadaptées, ou au niveau atteint dans l'eau de mer non nutritive pour les cellules préadaptées. Ces résultats montrent que l'eau de mer déclenche bien l'expression des gènes codant pour les porines conformément à leur expression dans les conditions de croissance en milieu à haute osmolarité (c'est à dire *ompC*), même dans les cellules cultivées à basse osmolarité à la condition que celles-ci puissent trouver dans l'eau de mer des éléments nutritifs organiques assimilables. Ceci fait à nouveau ressortir, et explique en partie, le rôle favorable que joue la matière organique sur la survie des entérobactéries dans les milieux marins. Nos résultats confirment aussi l'hypothèse proposée antérieurement par notre groupe (Munro *et al.*, 1989), selon laquelle la survie dans l'eau de mer des cellules d'*E. coli* dépend, au moins partiellement, de la présence de certains gènes qui leur permet de maintenir le métabolisme et l'homéostasie dans ces conditions et de la possibilité qui demeure de stimuler leur expression avant ou après leur rejet dans le milieu marin.

Il semble maintenant clair que les entérobactéries peuvent survivre dans le milieu marin dans la mesure où elles possèdent et ont la possibilité d'exprimer un certain nombre de gènes qui sont directement impliqués dans le maintien de l'homéostasie à haute osmolarité. Et dans ce sens, la présence de substrats organiques nutritifs joue vraisemblablement un rôle tout à fait déterminant.

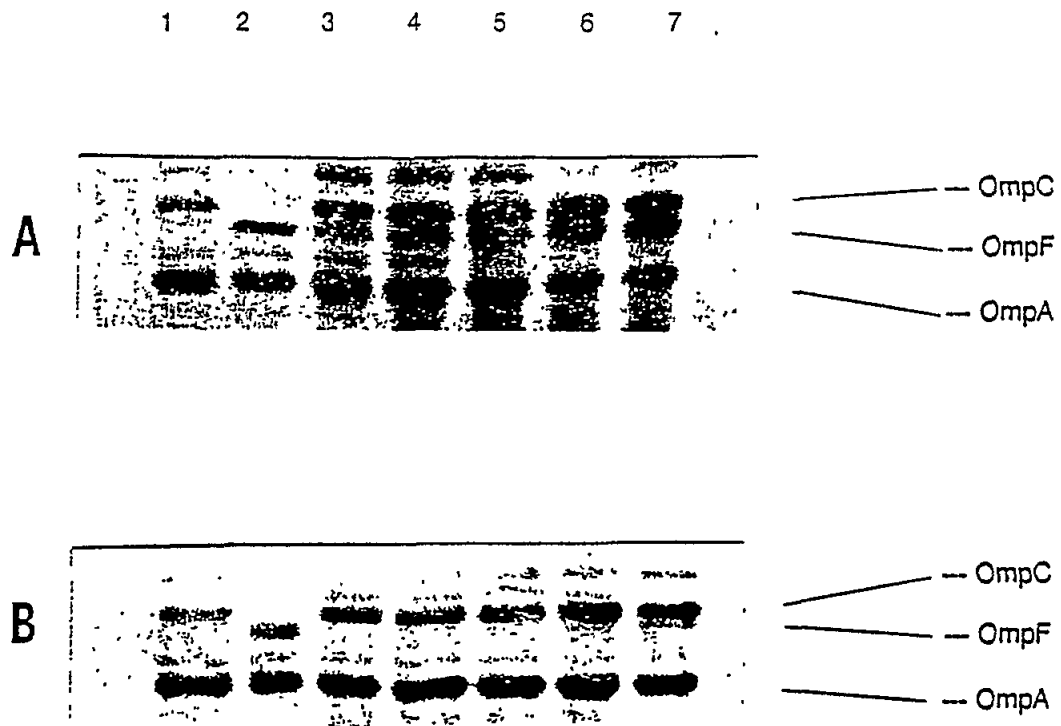


Figure 1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (en SDS) des porines OmpF et OmpC extraites des cellules d'*E. coli* MC4100 (OmpF+ OmpC+), MCR106 (OmpF+ OmpC+), PLB3260 (OmpF- OmpC-) après 0, 1, 3 et 8 jours d'incubation dans l'eau de mer naturelle oligotrophe. A: cellules cultivées en milieu M9; B: cellules cultivées en milieu M9 + NaCl (0.5M); 1,2: cellules (référence) des souches PLB3260 et PLB3261 non incubées dans l'eau de mer; 3, 4, 5, 6, 7: cellules de la souche MCR106 incubées en eau de mer pendant 30 minutes, 1, 3, 5 et 8 jours (respectivement)

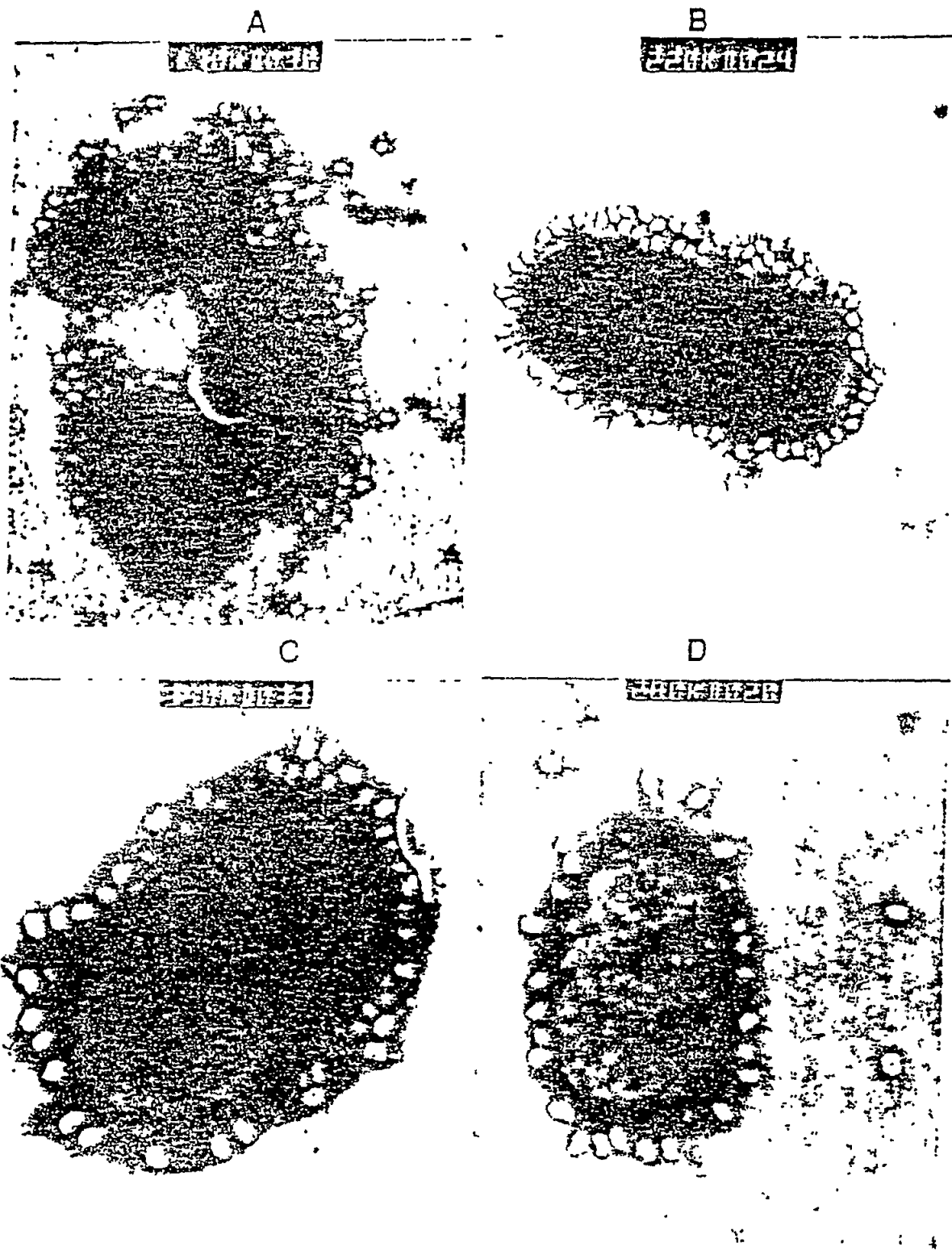


Figure 2. Microphotographie en microscopie électronique de cellules d'*E. coli* MC4100 cultivées à basse osmolarité, incubées pendant 0 (A et C) ou 8 jours (B et D) dans l'eau de mer naturelle oligotrophe, puis incubées 30 minutes avec des suspensions de bactériophages Tu1A (fixation spécifique sur OmpF)(A et B) et Tu1B (fixation spécifique sur OmpC)(C et D). Les cellules ont été colorées négativement par l'acide phosphotungstique

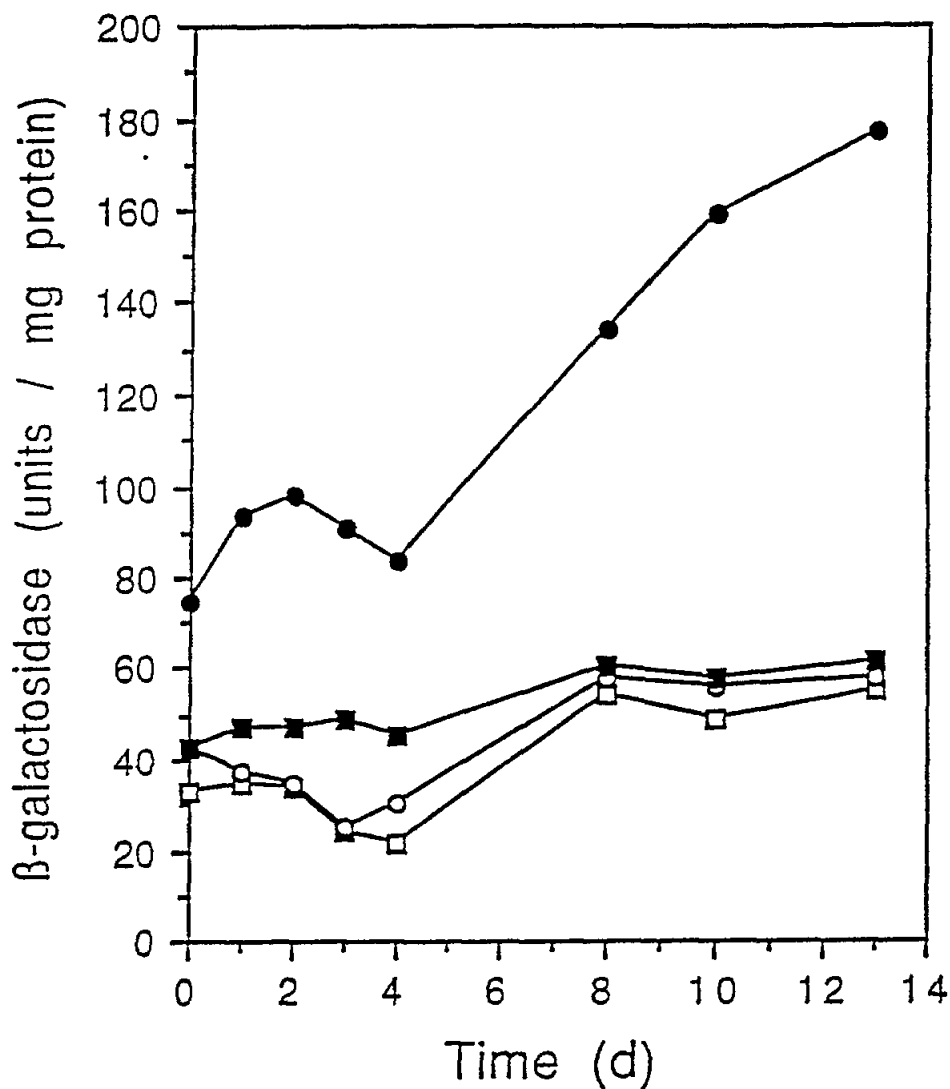


Figure 3. Expression en fonction du temps de contact avec l'eau de mer, des fusions de gènes *OmpF-lacZ* et *OmpC-lacZ* dans les cellules d'*E. coli* PLB3260 (■ □) et PLB3261 (● ○) (respectivement) cultivées en milieu M9 additionné de NaCl (0.5M) (■ ●) ou non salé (□ ○) puis incubées en eau de mer naturelle oligotrophe. Les unités β -galactosidase sont exprimées en micromoles de substrat (ONPG) clivé en 10 minutes.

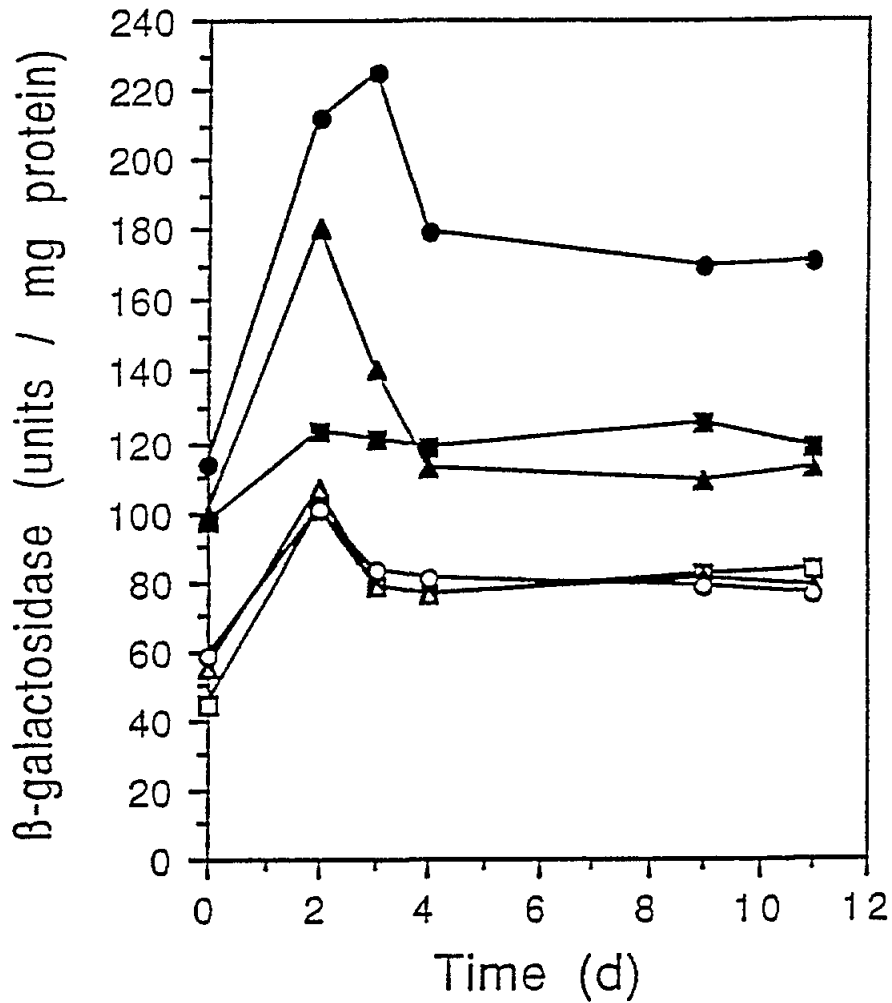


Figure 4. Expression en fonction du temps de contact avec l'eau de mer, des fusions de gènes *ompF-lacZ* et *ompC-lacZ* dans les cellules PLB3260 (□ Δ ○) et PLB3261 (■ ▲ ●) (respectivement), cultivées en milieu M9 additionné (○ ●) ou non (□ Δ ■ ▲) de NaCl (0.5M), puis incubées en eau de mer naturelle contenant (Δ ▲) ou non (□ ■ ○ ●) de la peptone (50 mg/l). Les unités β-galactosidase sont exprimées en micromoles de substrat (ONPG) clivé en 10 minutes.

5. REFERENCES

- HASEGAWA, Y., H. YAMADA, and S. MIZUSHIMA, 1976. Interactions of outer membrane proteins O-8 and O-9 with peptidoglycane sacculus of *Escherichia coli* K12. *J. Biochem. (Tokyo)* **80** : 1401-1409.
- LUGTENBERG, B., R. PETERS, H. BERNHEIMER, and W. BERENDSEN, 1976. Influence of cultural conditions and mutations on the composition of the outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Mol.Gen.Gent.* **147** : 251-262.
- MILLER, J.H., 1972. *Experiments in molecular genetics*, p. 431. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- MUNRO, P.M., M.J. GAUTHIER, V.A. BREITTMAYER, and J. BONGIVANNI, 1989. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl.Environ.Microbiol.*, **55** : 2017-2024.
- NIKAIDO, H., and M. VAARA, 1987. Outer membrane. In: *Escherichia coli and Salmonella typhimurium : Cellular and Molecular Biology*. Ed. F.C. Neidhardt, American Society for Microbiology, Washington D.C., pp.7-22.
- STOCK, J.B., A.J. NINFA, and A.M. STOCK, 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53** : 450-490.

ETUDE EXPERIMENTALE DU TRANSFERT DE GENES PLASMIDIQUES ENTRE ENTEROBACTERIES DANS L'EAU DE MER, LES SEDIMENTS ET LE TRACTUS DIGESTIF DES INVERTEBRES MARINS

par

Michel J. Gauthier*, Y. Martin** et V. Torregrossa***

1. INTRODUCTION - BUTS DU TRAVAIL

L'augmentation de la densité des populations dans les zones côtières et à proximité des cours d'eau a conduit à l'augmentation des rejets d'origine industrielle, animale et urbaine qui sont encore fréquemment éliminés sans traitement préalable. En conséquence, il y a altération de l'équilibre écologique des écosystèmes naturels et danger pour la santé publique (Clutter, 1972; Pearce, 1972; Sniesko, 1974).

Récemment, alors même que le problème de l'élimination de ces résidus n'était pas encore résolu, un nouveau type de contamination des milieux naturels est apparu: le rejet dans l'environnement de bactéries à ADN recombiné ("genetically engineered microorganisms", ou GEMs, selon la terminologie anglo-saxonne) et la dissémination des gènes qu'ils hébergent dans les populations de microorganismes autochtones.

L'essor moderne de la biologie et de la génétique moléculaires a permis, presque en routine, de modifier la structure génétique de ces microorganismes pour mieux les adapter à diverses fonctions utiles en recherche et appliquées aux biotechnologies (Haalvorson *et al.*, 1985; Milewski, 1985). Ainsi il est possible d'obtenir par génie génétique des microorganismes utilisables pour le contrôle de la contamination chimique et le traitement des eaux résiduaires (Johnston et Robinson, 1984), l'amélioration de la production agricole par inoculation de microorganismes capables de fixer l'azote atmosphérique ou d'augmenter la disponibilité d'éléments traces, la protection des cultures contre la glace, le contrôle des plaies, etc... (Millet *et al.*, 1984; Davidson, 1988).

Néanmoins, même si l'emploi de ces GEMs semblait prometteur et indubitablement utile, leur de venir dans l'environnement (Powledge, 1983; Ghosal *et al.*, 1985) a rapidement préoccupé les chercheurs comme les industriels (Cairns et Pratt, 1986; Dean-Ross, 1986; Trevors *et al.*, 1987; Tiedje *et al.*, 1989). Il est rapidement apparu nécessaire de mieux connaître, avant le rejet de ces germes dans l'environnement, leur dispersion à partir du future point de rejet, leur degré de reproduction *in situ*, la possibilité de transfert d'éléments mobiles de leur ADN (transposons ou plasmides) à des bactéries indigènes ou, fait plus grave, à des bactéries colonisatrices de l'écosystème (éventuellement pathogènes pour l'homme), la stabilité de ces éléments génétiques exportés, ainsi que les modifications possibles que leur présence peut produire dans l'environnement (Rissler, 1984; Kuenzi *et al.*, 1985; Genthner *et al.*, 1988). Au cours de la dernière décennie, des travaux de plus en plus nombreux ont été consacrés à ces problèmes, dans tous les milieux naturels. Il semble cependant que les plus nombreux d'entre eux aient concerné les

1

* I.N.S.E.R.M. Unité 303 "Mer et Santé"

** Fondation Scientifique Ricard, Observatoire de la Mer, Ile des Embiez

*** Istituto d'Igiene, Policlinico, Palermo

sols, puis les eaux douces continentales. Paradoxalement (car il est beaucoup plus vaste que les autres milieux terrestres), le milieu marin n'a fait l'objet que d'un nombre très limité d'études dans ce sens. Partie de ce manque d'information microbiologie marine, qui reste le parent pauvre de la discipline.

Depuis la fin du siècle dernier, on a pensé que les bactéries allochtones rejetées en mer disparaissaient rapidement, sous l'influence de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques responsable du "pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer": la sédimentation, la dilution, la température, le pH, la salinité, la lumière solaire, les composés organiques toxiques, les métaux lourds, et diverses substances inhibitrices biologiques (Mitchell et Chamberlin, 1975; Aubert et coll., 1981). On pensait il y a encore peu de temps que cet effet bactéricide était suffisant pour diminuer dans une grande mesure l'impact écologique de ces résidus et, en conséquence, les risques pour la santé publique. Vers la fin des années 1970, la découverte de possibilités d'adaptation et de survie prolongée des bactéries entériques dans l'environnement marin, à l'état **dormant non cultivable** (Xu *et al.*, 1982; Grimes et Colwell, 1986), état dans lequel elles peuvent maintenir leur virulence (Palmer *et al.*, 1984; Grimes et Colwell, 1986) ou à l'état **actif osmoprotégé** (Munro *et al.*, 1989; Gauthier *et al.*, 1991) a profondément modifié ce concept de "mortalité systématique" et reposé, en termes nouveaux, le problème des risques sanitaires liés au rejet de ces bactéries dans la mer.

Le devenir des bactéries dans l'eau de mer dépend en grande partie de la manière dont elles peuvent surmonter le choc osmotique, donc des processus d'osmorégulation induits par la présence de sels et résultant de l'accumulation intracellulaire de composés organiques ou inorganiques (Munro *et al.*, 1987). En outre, il a été démontré que l'adaptation de ces bactéries dans des milieux salés entraînait une augmentation de leur survie dans l'eau de mer (Gauthier *et al.*, 1987, Munro *et al.*, 1987).

La connaissance de ces capacités de survie des bactéries renouvelle l'intérêt épidémiologique et sanitaire de l'étude du transfert, dans ces conditions, des plasmides que contiennent fréquemment ces bactéries (Grabow *et al.*, 1973). La présence de plasmides a par ailleurs été détectée dans une grande variété de microorganismes isolés dans différents écosystèmes, comme les sols (Kelley et Reaney, 1984; Kraft et Bock, 1984; Pickup *et al.*, 1983; Trevors et Oddie, 1986; Weinberg et Stotzky, 1972), les eaux douces (O'Morchoe *et al.*, 1988; Gowland et Slatter, 1984) et les eaux (Hada et Sizemore, 1981) ou les sédiments marins (Sizemore et Colwell, 1977).

Les plasmides, molécules circulaires d'ADN bicatenaire extrachromosomiques, sont constitués de gènes codant pour une grande variété de fonctions (Tableau 1), dont la plus étudiée est probablement la résistance aux antibiotiques (plasmides de résistance ou plasmides R).

Le transfert spontané et naturel de ces plasmides entre bactéries a généralement lieu par **conjugaison** (Fig. 1), procédé qui requiert un contact physique entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice et qui s'établit grâce à des structures filamenteuses pariétales nommées "pilis" qui interagissent au niveau de sites spécifiques de la surface de la cellule réceptrice. Dans le domaine marin, objet de ce travail, **cette proximité physique ne peut être fréquente que dans certains compartiments privilégiés, où les densités bactériennes sont très élevées: les sédiments, les surfaces immergées (épilithon) et le tractus digestif des animaux.** C'est la raison pour laquelle nous avons tenté d'analyser les possibilités de transfert conjugatif de quelques plasmides R, d'*E. coli* à *E. coli*, dans l'eau de mer, dans des sédiments marins, puis dans le tube digestif de moules (*Mytilus galloprovincialis*).

Tableau 1

Quelques fonctions codées par des gènes portés
par des plasmides chez les bactéries

Résistance aux antibiotiques
Résistance aux métaux lourds (Cd, Hg, Zn, Cr, As, etc...)
Résistance aux colicines
Résistance au désoxycholate
Résistance aux acides gras
Résistance à la lumière UV
Inhibition de la croissance des phages
Biodégradation de composants organiques simples ou complexes
Diverses fonctions du pouvoir pathogène: synthèse hémolysines, toxines,
colicines, facteurs d'invasion tissulaire, facteurs de colonisation,
sidérophores, etc... (surtout chez *E. coli*)
Production de désoxyribonucléases extracellulaires
Nodulation des légumineuses et d'autres végétaux
Infection et formation de tumeurs chez les plantes
Altérations de l'enveloppe cellulaire
Conjugaison

Selon Trevors *et al.* (1987)

L'analyse de l'échange conjugatif de plasmides dans les milieux salés, se heurte à différents problèmes et biais expérimentaux en partie liés à l'utilisation de **milieux de sélection salés**, dans lesquels l'activité des antibiotiques est plus ou moins fortement perturbée. Cette condition est pourtant nécessaire pour l'étude comparative du transfert entre bactéries préadaptées ou non à la haute osmolarité, ou pour l'étude directe du transfert sur les milieux de conjugaison-sélection salins. D'autre part, l'évolution rapide de l'Etat physiologique de ces bactéries et leur adaptation éventuelle dans les milieux salés, oblige à tenir compte du temps de contact entre les cellules tests dans ces conditions expérimentales. Ces différents biais expérimentaux ont été analysés dans un premier temps au cours de ce travail. Les résultats obtenus pendant cette étape préliminaire ont été utilisés pour sélectionner une technique permettant d'analyser, avec le moins d'écueils possibles, le transfert d'un plasmide dans l'eau de mer, les sédiments et les invertébrés marins.

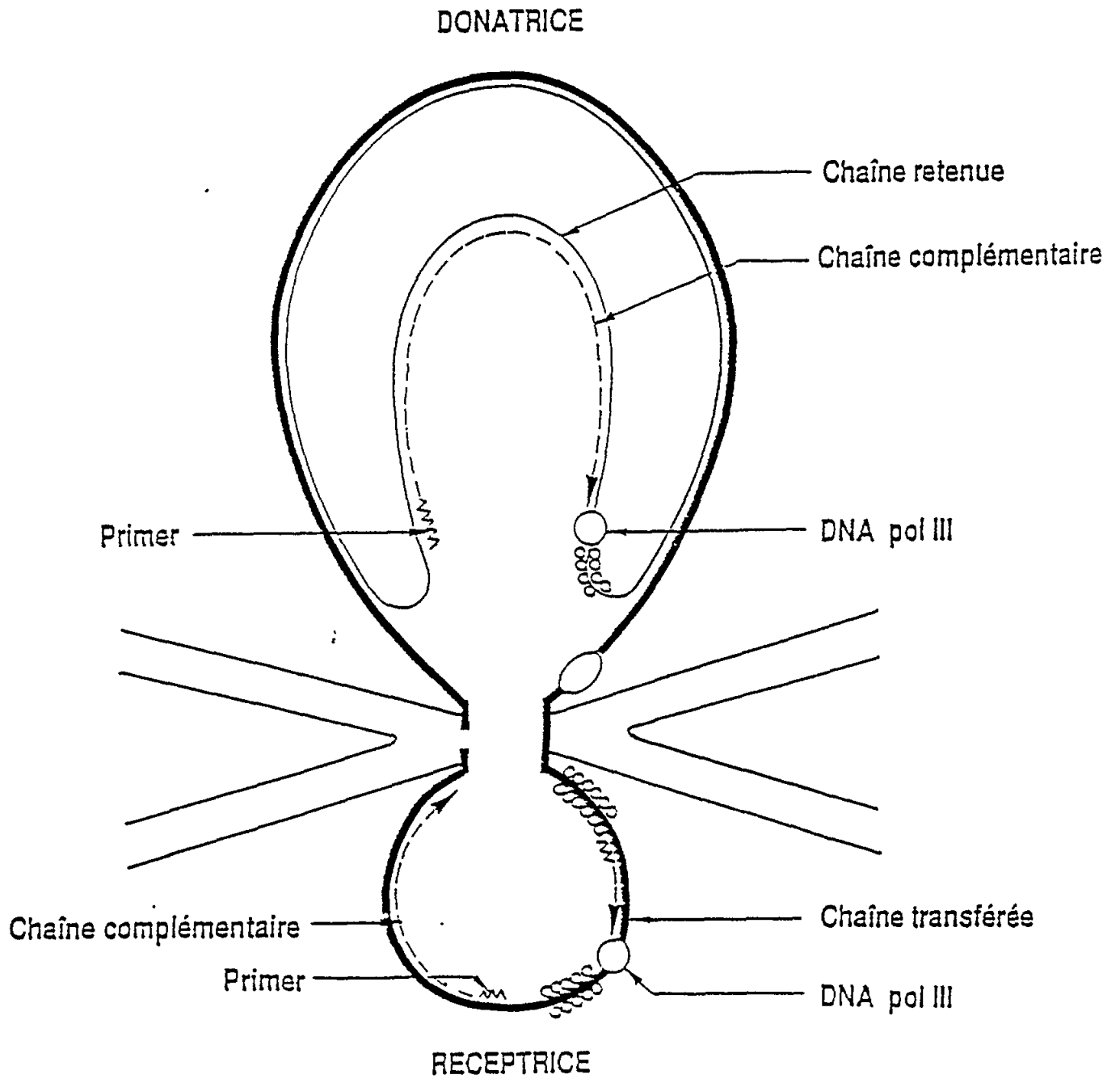


Figure 1 - Mécanisme de transfert par conjugaison
(WILLETS et WILKINS, 1984)

2. OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les recherches ont concerné successivement:

- la mise au point de la standardisation de différentes méthodes de conjugaison et leur application pour une évaluation de la fréquence de transfert des plasmides;
- l'analyse de l'influence de l'eau de mer et des milieux salés sur la fréquence du transfert des plasmides;
- les possibilités de transfert d'un plasmide R dans les **sédiments marins**;
- les possibilités de transfert de ce même plasmide dans le **tube digestif des mollusques lamellibranches marins** (moules).

3. TRANSFERT DANS LES MILIEUX DE CULTURE ET DANS L'EAU DE MER

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1 Souches bactériennes et plasmides

Trois souches ont été utilisées comme donatrices (D): *Escherichia coli* LCB69 (C600/RP4) (*thi 1, leu 6, lac Y, ton A21/RP4*) qui porte le plasmide RP4 (Datta *et al.*, 1971) conférant la résistance à l'ampicilline (Am), la kanamycine (Km) et la tétracycline (Te), et deux souches sauvages d'*Escherichia coli*, isolées dans la Ria de Ares-Betanzos (Galice, Espagne), *E. coli* 15 et *E. coli* 16, qui hébergent un plasmide, ici dénommés pRAB15 et pRAB16 respectivement, dont la masse moléculaire est supérieure à 37 Md et qui portent des marqueurs de résistance à Am, Te, chloramphénicol (Cm) et streptomycine (Sm). Deux souches ont été utilisées comme réceptrices (R): *E. coli* LCB402 (CGSC6173) [*leu::Tn9, (rrnD-rrnE)*, résistant à Cm] et *E. coli* 185 [résistant à l'acide nalidixique (Nal) et rifampicine (Rp)]. Ces souches ont été conservées à -20°C et cultivées sur milieu Tryptic Soy Agar (Difco Lab., Détroit, Mich.) (**TSA**) OU Tryptic Soy Broth (Difco) (**TSB**).

3.1.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (MIC) des antibiotiques

Des séries de tubes contenant 4 ml de milieu Mueller-Hinton (Institut Pasteur Production, France) préparé à l'eau distillée (**MH**) ou à l'eau de mer (**MHSW**) et les dilutions binaires de l'antibiotique à étudier ont été ensemencées avec 100 µl d'une dilution au 1/100e d'une culture en TSB (ou TSB additionné de 0,5 M NaCl = **TSBNa**) incubée à 37°C pendant 18 h (concentration finale: 10⁵ cellules/ml). La CMI correspondait à la première concentration d'antibiotique inhibant complètement la croissance après 18h d'incubation à 37°C.

La sensibilité à certains antibiotiques a également été déterminé par la méthode de l'antibiogramme standard (Chabbert, 1963; Courvalin *et al.*, 1985) sur milieux MH et MHSW solides (**MHA, MHASW**) (Institut Pasteur Production):

3.1.3 Tests de conjugaison

Les tests de conjugaison ont été réalisés suivant **cinq méthodes**, décrites comme suit et schématisées dans les Figures 2, 3, 4 et 5.

Les **méthodes A et B** (Figure 2) ont été utilisées pour l'étude du transfert direct sur milieux de sélection solides.

Méthode A, 2 ml de culture des cellules D et 2 ml de culture des cellules R en milieu TSB (18h à 37E C) ont été mélangés dans un erlenmeyer de 25 ml sous agitation violente, et 200 µl de ce mélange immédiatement étalés sur le milieu de sélection des transconjugants (TC).

Méthode B, 100 µl de D et 100 µl de R obtenus comme en A ont été successivement étalés directement sur le milieu de sélection.

Le milieu de conjugaison-sélection dans ces deux cas était le TSA additionné des inhibiteurs des cellules D (Rp et/ou Nal ou Cm, 100 µg/ml) et des inhibiteurs des cellules R (Km et/ou Te, 25 µg/ml)..

Méthode C, (Figure 3). Cette méthode a été appliquée à l'étude de l'influence du temps de mélange [D+R] sur le transfert entre donatrice (*E. coli* 15) et réceptrice (*E. coli* 185). 2 ml de culture de chaque souche en TSB (18 h à 37E C) ont été mélangés à 4 ml de milieu TSB dans un erlenmeyer de 25 ml. Après incubation statique à 37E C pendant 0 mn, 30 mn, 1h, 4h, 5h, 20h et 21h, 200 µl du mélange ont été étalés sur milieu sélectif TSA additionné de Nal (100) et Te (25) ou Cm (100) ou Sm (25) ou de l'ensemble des 4 antibiotiques.

Les **méthodes D et E** (Figures 4 et 5) ont été appliquées à l'étude de l'influence de la salinité sur la fréquence de transfert.

Méthode D, (Figure 4). Pour chacune des conditions expérimentales suivantes, 25 ml de culture (18h à 37E C) des souches *E. coli* 15 et *E. coli* 185 en TSB ou TSBNa ont été centrifugés et les culots rincés trois fois (10000xg, 10 mn, 20E C) puis suspendus dans les différents milieux de conjugaison (MM) utilisés: l'eau de mer (SW), les mélanges respectifs TSB:SW: 1:2, 1:10 ET 1:1000 (V/V) et TSB préparé à l'eau de mer (TSBSW). Dans ce dernier cas, comme ce milieu précipite lors sa préparation, les cellules ont été rincées avec SW et finalement suspendues en TSBSW stérilisé par autoclavage (TSBSWa) ou centrifugé et puis stérilisé par filtration (filtres 0,22 µm diamètre de pore Millipore) (TSBSWb). 2 ml des cultures ou suspensions de la D et R ainsi réalisées ont été mis en incubation statique avec 4 ml de MM pendant 20 h à 37E C, ou simplement mis en contact sans ajout de MM, pendant 30 mn à 37E C, puis 200 µl de mélange ont été étalés sur TSA additionné de NaCl (0,3 M) (TSANam) et de Sm (50 µg/ml) et Nal (100 µg/ml).

Méthode E, (Figure 5). Appliquée aux souches *E. coli* LCB69 et *E. coli* 185 ou *E. coli* LCB402 précultivées comme pour la méthode D en TSBNa, les suspensions ont été réalisées en milieux TSBNa et TSBSW et les conjugaisons réalisées selon la méthode B. Les milieux de sélection étaient TSANa et TSA préparé à l'eau de mer (TSASW) additionnés de Km (50 µg/ml) et de différentes concentrations de Nal (100, 200 ou 300 µg/ml) suivant les cas.

Pour le contrôle des souches parentales, la sensibilité des cellules a été systématiquement testée par étalement de 100 µl de culture ou de suspension, sur milieux de sélection des transconjugants.

Les dénombrements des souches D et R ont été réalisés par étalement de dilutions adéquates de chaque culture ou suspension, sur milieu TSA (méthodes A, B et C), TSANam (méthode D) ou TSANa et TSASW (méthode E).

Toutes les boîtes ont été incubées 24 à 48 h à 37E C. Les colonies sur le milieu de sélection ont été comptées comme transconjugants présumés (un petit nombre d'entre eux étant "vérifiés" par extraction du plasmide). La fréquence de transfert a été déterminée en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de cellules donatrices par ml de mélange.

Toutes ces expériences ont été réalisées en triplicate.

3.1.4 Détection des plasmides

L'extraction des plasmides a été effectuée selon la méthode de Zhiu *et al.* (1990). Leur séparation a été effectuée par électrophorèse (microcomputer pulsed field dozer supply Consort) à 100 V et 40 mA, pendant 7h en gel d'agarose NA (Pharmacia AB Molecular Biology, Uppsala) à 0,8%, en tampon Tris-Borate (TBE) (Tris 90 mM, acide borique 90 mM, Na₂ EDTA 10 mM, pH 7,9 avec acide acétique glacial). Les gels ont été colorés au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) et examinés sous lumière UV (transilluminateur LKB 2011 Macrovue, 304 nm).

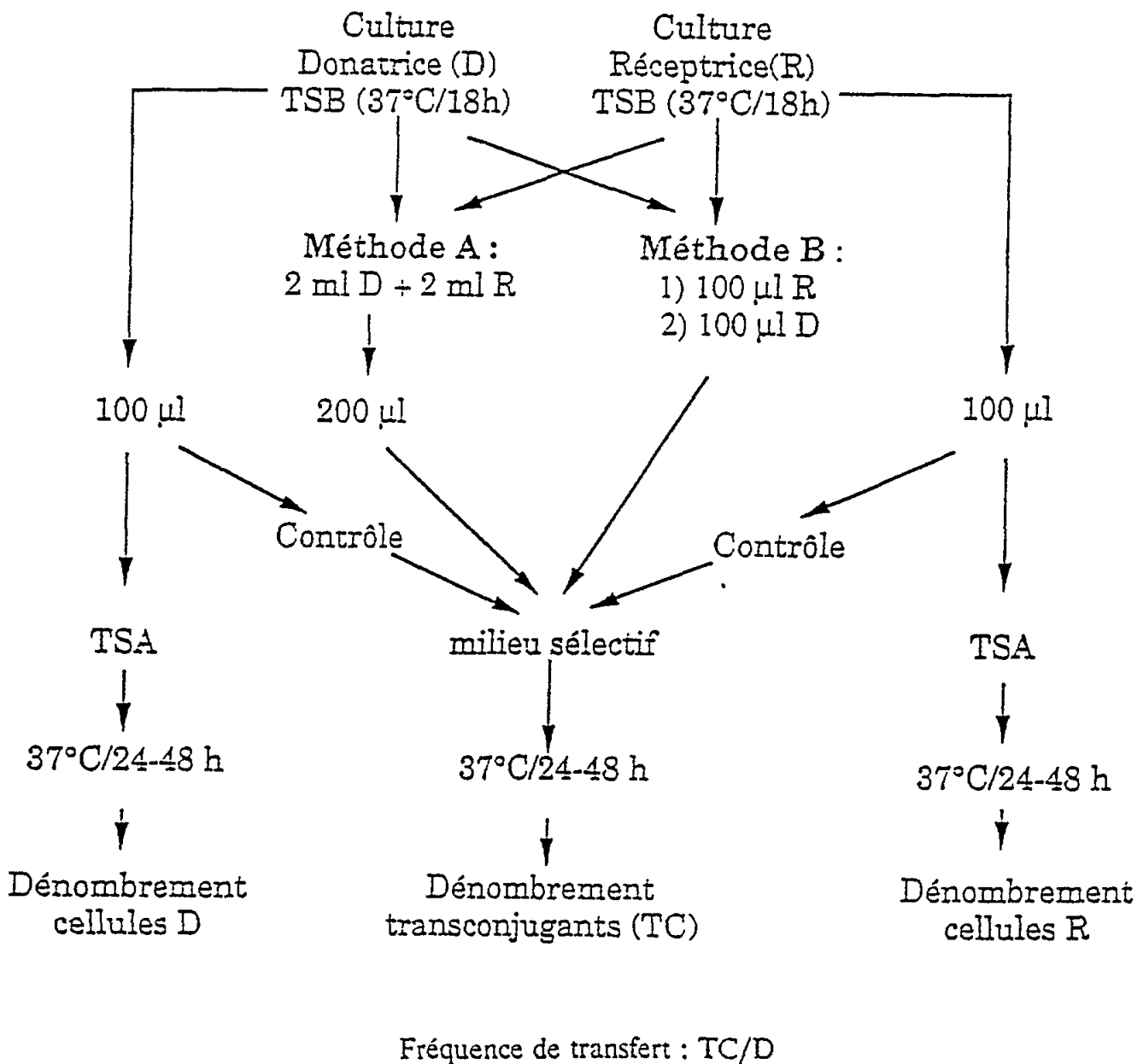
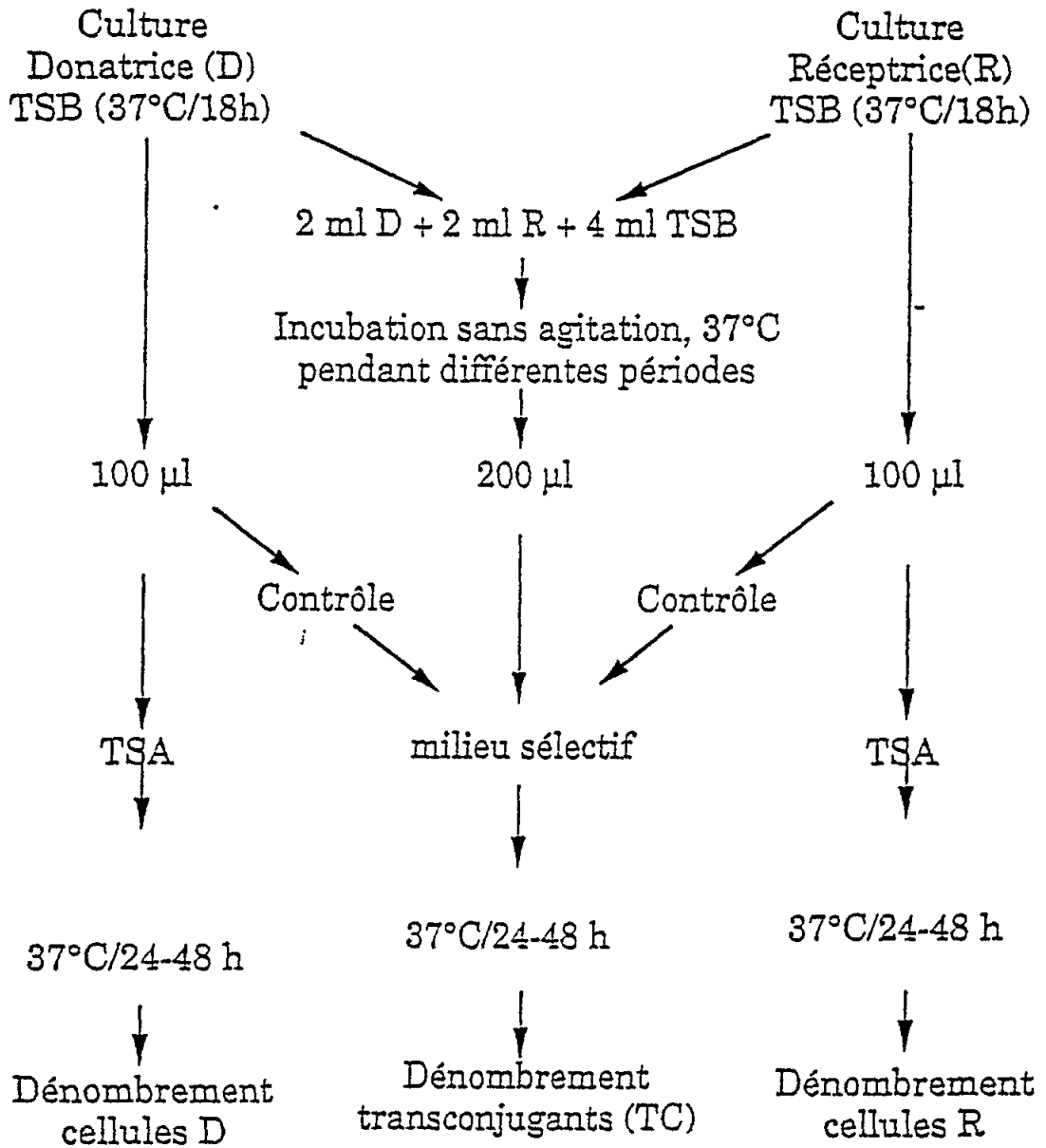


Figure 2 - Tests de conjugaison : méthodes A et B



Fréquence de transfert : TC/D

Figure 3 - Tests de conjugaison, méthode C

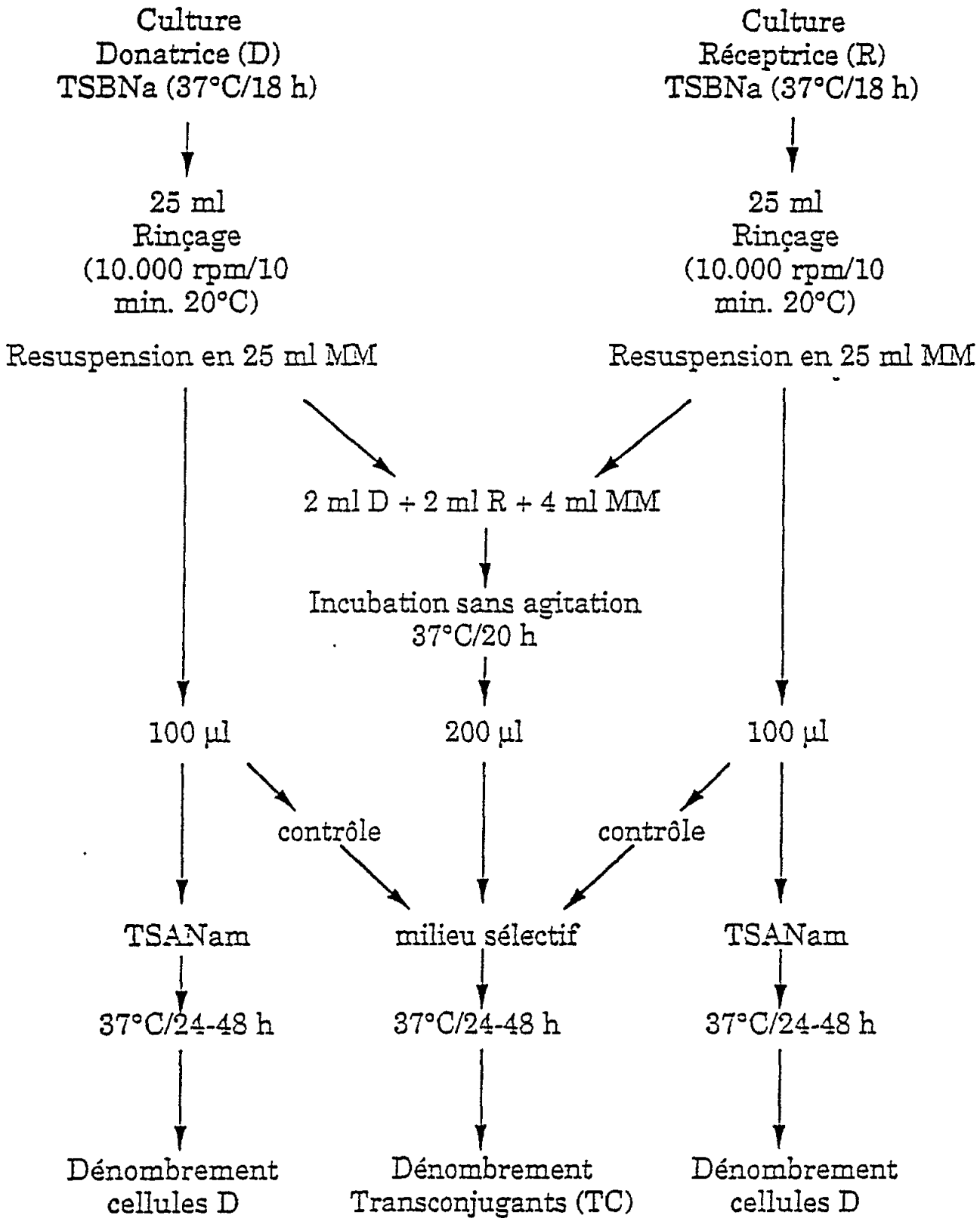
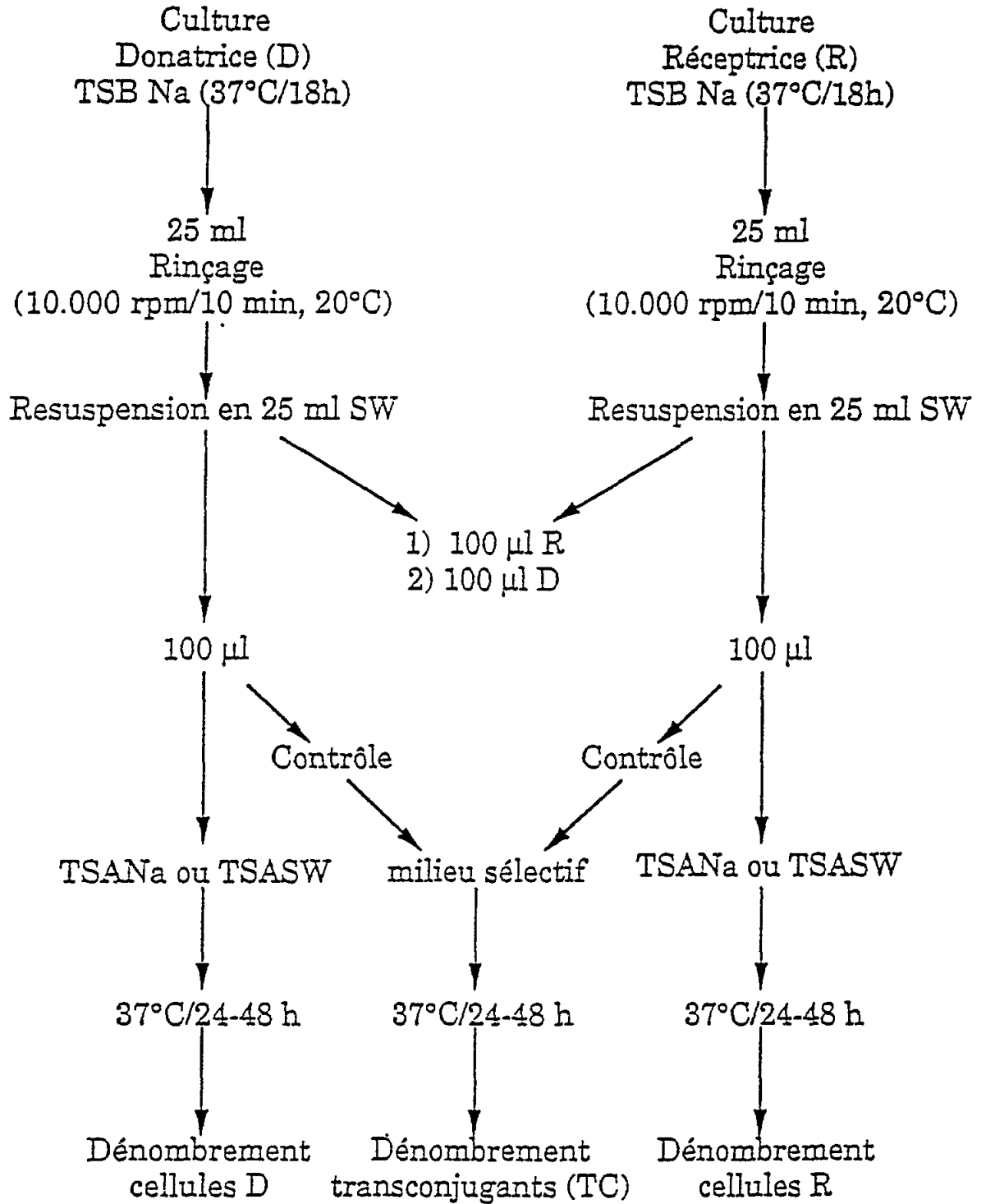


Figure 4 - Tests de conjugaison, méthode D



Fréquence de transfert : TC/D

Figure 5 - Tests de conjugaison, méthode E

3.2 RESULTATS - DISCUSSION

3.2.1 Incidence des plasmides R dans les souches d'*Escherichia coli* isolées dans la Ria de Ares-Betanzos (Galicia, Nord-Ouest de l'Espagne)

A partir de souches d'*E. coli* résistantes à un ou plusieurs antibiotiques, nous avons effectué un "screening" pour vérifier si elles portaient des plasmides de résistance aux antibiotiques ou plasmides R. Les essais de conjugaison ont été réalisés par la méthode C, pendant un temps de "mating" de 20 h. Les résultats obtenus (Tableau 2) montrent que de 22 souches, 11(50%) ont transféré leur résistance à *E. coli* 185.

Tableau 2

Incidence des plasmides conjugatifs de résistance aux antibiotiques chez les souches d'*Escherichia coli* isolées dans la Ria de Ares-Betanzos (Galicia, Nord-Ouest de l'Espagne)

Marqueurs de résistance	souches R+/souches testées
Am Cm Te Sm Km Sx Fm	0/1
Am Cm Te Km Sx Fm	1/1
Am Cm Te Sm Sx	4/4
Am Cm Te Km Sx	1/2
Am Te Km Sx	0/1
Am Te Sx	2/4
Cm Te Sx	0/1
Am Te	1/1
Te Sx	0/2
Cm Te	0/1
Te	2/4

Abréviations: Am (Ampicilline), Cm (Chloramphénicol), Te (Tétracycline), Sm (Streptomycine), Km (Kanamycine), Sx (Sulfamides), Fm (Nitrofurantoïne)

D'autre part, toutes les souches présentant le phénotype de résistance [Am Cm Te Sm], ont été capables de transférer leur résistance à *E. coli* 185. Dans la plupart des cas, les fréquences de transfert ont été faibles, à l'exception des souches 15 et 16 qui ont présenté des fréquences de transfert de 10^{-5} pour la souche 15 et entre $4,04 \times 10^{-4}$ et $1,2 \times 10^{-8}$ pour la souche 16, selon les antibiotiques employés pour la sélection des transconjugants (Tableau 3).

Tableau 3

Fréquence de transfert de la résistance aux antibiotiques
de différentes souches donatrices d'*E. coli* à *E. coli* 185

Souche donatrice	MR ^a	F ^b	Phénotype transféré
6	Cm	3,7x10 ⁻⁸	Am Cm Te Km Sx
	Km	3,7x10 ⁻⁸	Am Cm Te Km Sx
35	Km	3,7x10 ⁻⁸	Am Cm Te Km Sx
15	Cm	6,35x10 ⁻⁵	Am Cm Te Sm Sx
	Te	5,1x10 ⁻⁵	Am Cm Te Sm Sx
	Sm	3,24x10 ⁻⁵	Am Cm Te Sm Sx
16	Cm	4,04x10 ⁻⁴	Am Cm Te Sm Sx
	Te	1,02x10 ⁻⁸	Am Cm Te Sm Sx
	Sm	5,97x10 ⁻⁵	Am Cm Te Sm Sx
33	Cm	1,2x10 ⁻⁷	Am Cm Te Sm Sx
	Te	NT	
34	Cm	3,7x10 ⁻⁸	Am Cm Te Sm Sx
26	Te	2,96x10 ⁻⁷	Am Te Sx
34E	Te	3,7x10 ⁻⁸	Am Te Sx
42	Te	4,44x10 ⁻⁷	Te
27	Te	3,7x10 ⁻⁸	Te
14	Te	5,5x10 ⁻⁷	Te

^a MR = marqueur de résistance sélectionné: Am (Ampicilline),
Cm (Chloramphénicol), Te (Tétracycline), Sm (Streptomycine),
Km (Kanamycine), Sx (Sulfamides).

^b F = fréquence de transfert: nombre de transconjugants / nombre de
cellules donatrices (dans 1 ml de mélange).

NT : Pas de transfert détecté.

3.2.2 Modification de l'activité des antibiotiques dans les milieux salés

L'étude du transfert de plasmides dans les milieux salins nécessite l'emploi de milieux de sélection salés, où l'activité des antibiotiques peut être fortement perturbée. Il est pourtant indispensable de connaître l'activité des antibiotiques en milieux non salés (MH et MHA) comme en milieux salés (MHSW et MHASW).

Les résultats obtenus (Tableau 4) ont montré que l'activité du chloramphénicol sur la souche *E. coli* LCB69 était identique en MH ou MHSW et sur MHA ou MHASW.

Tableau 4

Influence de l'eau de mer sur l'activité de différents antibiotiques
(exprimée par leur concentration minimale inhibitrice = C.M.I.)

Souche	Antibiotique	C.M.I. (µg/ml)		zone d'inhibition (mm)	
		MH	MHSW	MHA	MHASW
<i>E. coli</i> 185	Streptomycine	12,5	50	22	10
<i>E. coli</i> 185	Kanamycine	6,25	50	25	22
<i>E. coli</i> 402	Kanamycine	3,13	25	22	20
<i>E. coli</i> 69	Chloramphénicol	6,25	6,25	32	32
<i>E. coli</i> 69	Ac. nalidixique	9	50	50	21
<i>E. coli</i> 69	Rifampicine	200	6,25	27	30

MH: Mueller-Hinton préparé à l'eau douce.

MHSW: Mueller-Hinton préparé à l'eau de mer.

MHA: Mueller-Hinto Agar préparé à l'eau douce.

MHASW: Mueller-Hinton Agar préparé à l'eau de mer.

Détermination de la C.M.I.: Des séries de tubes contenant 4 ml de MH (ou MHSW) et dilutions binaires de l'antibiotique ont été ensemencées avec 100 µl d'une dilution au 1/100e d'une culture (37E C, 18h) en TSB (ou TSBNa) (concentration finale: 10⁵ cels/ml), et incubées à 37E C pendant 18h.

La CMI correspondait à la première concentration d'antibiotique inhibant complètement la croissance.

Par contre, l'activité de l'acide nalidixique sur cette souche, non modifiée en milieux salés liquides (MHSW) était fortement diminuée en milieux salés solides (MHASW). Cette différence était vraisemblablement due à la précipitation de l'antibiotique en MHSW, empêchant sa diffusion dans les milieux salés solides. Par contre, l'activité de la R_p sur cette souche a été augmentée sur les milieux salés.

L'activité de la Km sur les souches *E. coli* 15 et *E. coli* LCB402 était plus faible dans le milieu à l'eau de mer; cette différence était moins perceptible en milieux solides (MHA, MHASW). De même, l'activité de la Sm sur la souche *E. coli* 185 était diminuée en milieux salés, liquides et solides (Tableau 4).

A partir de ces résultats, nous avons modifié la concentration des antibiotiques employés dans les milieux sélectifs salés, en utilisant Sm et Km à 50 µg/ml, et Nal à 100, 200 ou 300 µg/ml selon l'expérience.

3.2.3 Transfert du plasmide RP4

Les fréquences de transfert de ce plasmide sur milieu non salé (TSB), analysé par les méthodes A et B (mating sur le milieu sélectif) en utilisant comme souches donatrices *E. coli* LCB69 ou des TC issus de précédentes conjugaisons entre *E. coli* LCB69 (D) et *E. coli* LCB402 ou *E. coli* 185 (R), sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5

Variation de la fréquence de transfert de la résistance aux antibiotiques en employant deux méthodes de conjugaison

Souches		Méthode A ^a			Méthode B ^b		
		marqueur de résistance			marqueur de résistance		
D ^c	R ^c	Km	Te	Km-Te	Km	Te	Km-Te
<i>E. coli</i> LCB69	<i>E. coli</i> LCB402	1.51 10 ⁻⁵	2.13 10 ⁻⁴	2.68 10 ⁻⁵	1.51 10 ⁻⁵	4.0 10 ⁻⁴	4.36 10 ⁻⁵
<i>E. coli</i> LCB69	<i>E. coli</i> 185	1.68 10 ⁻⁵	3.86 10 ⁻⁴	1.76 10 ⁻⁵	1.20 10 ⁻⁵	1.81 10 ⁻⁴	1.44 10 ⁻⁵
<i>E. coli</i> (69-402) ^d	<i>E. coli</i> 185	1.75 10 ⁻⁴	4.33 10 ⁻⁴	4.52 10 ⁻⁵	8.86 10 ⁻⁵	4.92 10 ⁻⁴	1.56 10 ⁻⁴
<i>E. coli</i> (69-185) ^d	<i>E. coli</i> LCB402	1.18 10 ⁻³	6.57 10 ⁻³	3.05 10 ⁻³	8.79 10 ⁻⁴	3.77 10 ⁻³	1.68 10 ⁻³

Souches			Méthode A ^a			Méthode B ^b			
			marqueur de résistance			marqueur de résistance			
D	R	Cm	Sm	Te	Cm-Te-Sm	Cm	Sm	Te	Cm-Te-Sm
<i>E. coli</i> 15	<i>E. coli</i> 185	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
<i>E. coli</i> 16	<i>E. coli</i> 185	1.88x10 ⁻¹⁰	NT	NT	1.88x10 ⁻¹⁰	1.88x10 ⁻¹⁰	NT	NT	NT

^a : **Méthode A**: 2 ml de culture à 37E C en TSB (tryptic soy broth) pendant 18h des souches donatrice et réceptrice ont été mélangées, en maintenant ce mélange sous forte agitation pendant le temps d'étalement. 200 µl de ce mélange ont été étalés sur le milieu sélectif (TSA-tryptic soy agar- avec chloramphénicol ou acide nalidixique et l'antibiotique auquel la donatrice est résistante), les boîtes ont été incubées à 37E C pendant 24-48h.

^b : **Méthode B**: 100 µl d'une culture à 37E C pendant 18h en TSB de la souche réceptrice ont été étalés sur le milieu de sélection suivi par l'étalement de la même quantité de culture de la souche donatrice obtenue dans les mêmes conditions que la réceptrice. Les boîtes ont été incubées à 37E C pendant 24-48h. La fréquence de transfert est exprimée comme la relation entre le nombre de transconjugants et le nombre initial de cellules donatrices pour 1ml de mélange.

^c : D(donatrice), R(réceptrice).

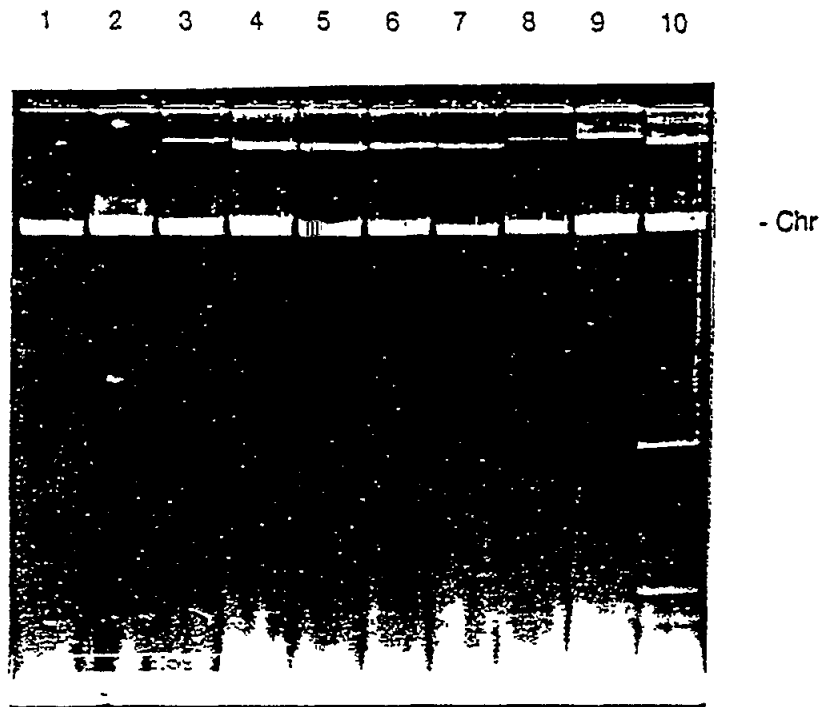
^d : Transconjugants obtenus en employant comme donatrice *E. coli* LCB69 et comme réceptrice *E. coli* LCB402 et *E. coli* K12 185.

Antibiotiques de sélection: Km (Kanamycine, 25 µg/ml), Te(Tétracycline, 25µg/ml) Cm (Chloramphénicol, 100 µg/ml), Sm (Streptomycine, 25), et Acide nalidixique (100 µg/ml).

NT : Pas de transfert détecté.

Cette fréquence était généralement élevée, ce qui a justifié le choix de ce plasmide pour réaliser la deuxième partie de ce travail. On notera cependant quelques variations de cette fréquence dépendant de la nature des antibiotiques utilisés et de la souche R. Elle était moins élevée lorsque le milieu de sélection était additionné de Km (1,18 x 10⁻³ à 1,2 x 10⁻⁵) plutôt que de Te (6,57 x 10⁻³ à 1,81 x 10⁻⁴) et plus élevée lorsque le TC [*E. coli* LCB69 x *E. coli* 185] était utilisé comme souche D et *E. coli* LCB402 comme souche R.

Ces résultats montrent donc que le plasmide RP4 peut être transféré des cellules D aux cellules R directement sur le milieu de sélection des TC Tableau 5; Fig. 6).



- (1) réceptrice *E coli* K12 185
- (2) réceptrice *E. coli* LCB402,
- (3) donatrice *E coli* LCB69 hébergeant le plasmide RP4,
- (4) TC LCB69xLCB402;
- (5) TC LCB69x185.
- (6) TC obtenus en conjugaison secondaire entre TC LCB69x185 (donatrice) et LCB402 (réceptrice),
- (7) TC obtenus en conjugaison secondaire entre TC LCB69xLCB402 (donatrice) et 185 (réceptrice);
- (8) donatrice *E coli* 15.
- (9) TC 15x185.
- (10) *E. coli* V517. Chr, DNA chromosomique.

Figure 6 - Détection de plasmides RP4 et pRAB15 par électrophorèse en gel d'agarose dans les cellules donatrices et les transconjugants(TC)

Ce transfert direct sur milieu de sélection des TC est la conséquence de l'extraordinaire rapidité de l'échange du plasmide, qui s'effectue à haute fréquence avant que les cellules soient inhibées par les antibiotiques ajoutés au milieu de sélection, même lorsque ceux-ci (Sm et Km) sont bactéricides (Current Protocols in Molecular Biology), 1987). Ce **biais expérimental majeur** a été signalé antérieurement par Smit and Van Elsas (1990) au cours d'une étude du transfert de RP4 entre souches de *Pseudomonas* dans les sols. Nos résultats sont par ailleurs en accord avec ceux de Walter *et al.* (1987), qui ont utilisé cette méthode comme une modification de celle proposée par Tardif et Grant (1983), et l'ont nommée "combined spread plate". Ces auteurs ont obtenu des fréquences de transfert semblables à celles données par d'autres méthodes plus classiques (filtration sur membrane et conjugaison en milieu liquide), bien que l'efficacité de chacune d'elles ait été variable selon le plasmide étudié. Par contre, nos résultats ne sont pas comparables à ceux de Tardif et Grant (1983) car, dans notre étude, le processus de conjugaison a eu lieu sur le milieu sélectif même, pendant l'incubation nécessaire au développement des TC, et non sur un milieu solide non sélectif (DST agar plates) pendant une nuit, la sélection des transconjugants étant faite postérieurement sur milieu Mac Conkey Agar contenant les antibiotiques de sélection.

La conjugaison sur le milieu sélectif représente un biais expérimental pour l'étude de la cinétique du transfert conjugatif de plasmides. Celle-ci nécessite l'interruption du processus d'échange après un certain temps d'incubation et son inhibition totale sur le milieu sélectif, ce qui peut être réalisé par l'emploi d'agents bactéricides ou de substances qui empêchent très rapidement la duplication et transfert de l'ADN, comme l'acide nalidixique (Curtiss, 1981; Burman, 1977; Lloyd *et al.*, 1980; Sugino *et al.*, 1977) ou la rifampicine (Curtiss, 1981). Néanmoins, nos expériences de conjugaison effectuées avec la souche 185 (résistance à l'acide nalidixique) comme réceptrice ont montré que l'acide nalidixique n'empêche pas le transfert du plasmide RP4 (Tableau 5, Fig. 6). Ces résultats sont analogues à ceux qui ont été obtenus avec des plasmides type N, dont le transfert n'était pas affecté par la présence d'acide nalidixique (Burman, 1977), bien que le mécanisme qui empêche le transfert ait pu être différent dans les deux cas. En revanche, Smit et Van Elsas (1990) n'ont pas obtenu de transfert du plasmide RP4 en présence d'acide nalidixique et de rifampicine (50 µg/ml de chaque), alors qu'ils ont observé un transfert en présence de streptomycine et rifampicine (50 µg/ml de chaque), et en ont conclu que le remplacement de la streptomycine par l'acide nalidixique produit une inhibition de la conjugaison. Puisque, dans notre cas, il a été possible d'obtenir des transconjugants en présence d'acide nalidixique, et pour éliminer la possibilité d'une action synergique de ces deux antibiotiques dans le blocage du transfert de ce plasmide, nous avons étudié son transfert d'*E. coli* LCB69 (D) à *E. coli* 185 (R), en employant différents mélanges de ces antibiotiques dans le milieu sélectif [TSA avec Km (50 µg/ml), Nal (100 µg/ml) et avec ou sans Rp (100 µg/ml)]. A ces concentrations, l'association [Nal + Rp] produit une inhibition totale de la croissance des souches D et R, mais n'empêche pas le transfert du plasmide RT4, bien que la fréquence de transfert ait été plus faible en employant l'association des deux antibiotiques ($5,1 \times 10^{-6}$) au lieu de l'acide nalidixique seul ($1,5 \times 10^{-5}$). La différence entre nos résultats et ceux de Smit et Van Elsas (1990) pourrait être due à l'emploi de différentes souches bactériennes (*Pseudomonas fluorescens* au lieu d'*Escherichia coli*).

Si la conjugaison sur le milieu de sélection des TC est un écueil pour l'étude de la cinétique d'un transfert plasmidique, on peut pas contre l'utiliser pour étudier l'influence sur ce transfert de différents composés ou facteurs du milieu, sans interférence du temps de mélange par exemple. Les seules limitations sont alors que **la densité des cellules soit suffisante pour permettre leur contact physique sur ce milieu** (Smit et Van Elsas, 1990) et que **les souches D et R puissent survivre suffisamment longtemps sur le milieu sélectif pour permettre le transfert et l'expression des gènes de résistance**. Nous avons donc employé une méthode de conjugaison directe sur le milieu sélectif (méthode B) pour l'étude de transfert du plasmide RP4 sur différents milieux salés.

Il était cependant nécessaire de préciser préalablement le comportement de la souche D dans ces conditions. Nous avons ainsi étudié la croissance de la souche *E. coli* LCB69 (sensible à Nal) pour différentes densités d'inoculation, sur milieu TSASW contenant différentes concentrations d'acide nalidixique (100, 200 ou 300 µg/ml selon l'expérience). Les résultats (Tableau 6) ont montré qu'il n'y avait pas de développement important de cette souche au-delà de 200 µg Nal/ml de milieu de sélection et que l'interférence due à ce développement était minimale pour l'inoculum le plus faible ($5,7 \times 10^4$ cellules par boîte).

Des tests de conjugaison ont été par ailleurs réalisés par la méthode B, en employant comme milieu de conjugaison-sélection le milieu TSANa additionné de 50 µg Km/ml et de Nal à différentes concentrations (100, 200 et 300 µg/ml selon l'expérience). Les résultats (Tableau 7) ont montré que cet agent inhibiteur ne diminuait la fréquence du transfert, ou la récupération des TC, qu'à la plus haute concentration utilisée (300 µg/ml). La haute osmolarité du milieu n'a pas diminué l'action des antibiotiques sur les cellules D et R inocuées à la densité de 3×10^6 cellules par boîte. Par contre, lorsque le milieu de conjugaison-sélection était préparé à l'eau de mer (TSASW), la souche D, bien que sensible à l'acide nalidixique, a donné quelques colonies en présence de 100 et 200 µg Nal/ml, même avec une densité d'inoculation moins importante (10^4 - 10^5 cellules/boîte) (Tableau 8).

Tableau 6

Dénombrement d'*E. coli* LCB69^a sur un milieu gelosé préparé à l'eau de mer (TSASW), et différents concentrations d'acide nalidixique

Cellules/boîte (calculée)	Colonies sur TSASW supplémentées avec acide nalidixique (µg/ml) ^b			
	400	300	200	100
5.7×10^7	>	>	>	>
5.7×10^6	162	168	247	>
5.7×10^5	12	10.5	21.5	97
5.7×10^4	1	0.5	1	8.5

^a : 25 ml d'une culture (18 h à 37E C en milieu TSBNa) ont été rincés et centrifugés (10000 rmp/10 min/20E C) avec de l'eau de mer stérile. 100 µl de dilutions décimales successives de cette suspension, ont été étalés sur milieu concentrations d'acide nalidixique et incubés pendant 24-48 h à 37E C.

^b : moyenne de 2 mesures.

> : très haute densité de colonies.

Quoi qu'il en soit, l'inhibition totale des cellules R sur le milieu sélectif et la différence morphologique des colonies formées par les souches D et R sur le milieu TSASW (colonies R plus jaunes, à bord régulier, convexes et muqueuses; colonies D plus blanches et plus petites, plates, à bord irrégulier) ont permis d'éviter ce biais expérimental.

Tableau 7

Fréquence de transfert du plasmide RP4 sur un milieu de sélection salé (TSANa) contenant différentes concentrations d'acide nalidixique^a

Nal(µg/ml)	D ^b	R ^b	D ^c	R ^c	F ^d
100	3.3 x 10 ⁶	1.83 x 10 ⁶	1	0	6.57 x 10 ⁶
200	3.3 x 10 ⁶	1.83 x 10 ⁶	1	0	9.09 x 10 ⁻⁷
300	3.93 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶	0	0	-

^a : 100 µl d'une culture à 37E C pendant 18h en TSBNa de la souche réceptrice ont été étalés sur le milieu de sélection suivi par l'étalement de la même quantité de culture de la souche donatrice obtenue dans les mêmes conditions que la réceptrice. Les boîtes ont été incubées à 37E C pendant 24-48 h.

Nal : acide nalidixique.

^b : D (donatrice, cellules/boîte), R (réceptrice, cellules/boîte).

^c : nombre de colonies D et R sur le milieu sélectif.

^d : F (Fréquence de transfert = rapport entre le nombre de transconjugants et le nombre initial de cellules D par ml de mélange).

Tableau 8

Fréquence de transfert du plasmide RP4 sur un milieu sélectif préparé à l'eau de mer (TSASW) contenant différentes concentrations d'acide nalidixique^a

Nal(µg/ml)	D ^b	R ^b	D ^c	R ^c	F ^d
100	2.4 x 10 ⁴	1.37 x 10 ⁴	12	0	1.77 x 10 ⁻⁴
200	2.63 x 10 ⁵	1.37 x 10 ⁵	20	0	2.14 x 10 ⁻⁵
300	4.13 x 10 ⁵	4.47 x 10 ⁵	1	0	1.44 x 10 ⁻⁵

^a : 100 µl d'une culture à 37E C pendant 18h en TSBNa de la souche réceptrice ont été étalés sur le milieu de sélection suivi par l'étalement de la même quantité de culture de la souche donatrice obtenue dans les mêmes conditions que la réceptrice. Les boîtes ont été incubées à 37E C pendant 24-48 h.

Nal : acide nalidixique.

^b : D (donatrice, cellules/boîte), R (réceptrice, cellules/boîte).

^c : nombre de colonies D et R sur le milieu sélectif.

^d : F (Fréquence de transfert = rapport entre le nombre de transconjugants et le nombre initial de cellules D par ml de mélange).

La comparaison des résultats obtenus par la même technique B, en employant un milieu de conjugaison-sélection non salé (TSA, Tableau 5), salé (TSANa, Tableau 7) ou préparé à l'eau de mer (TSASW, Tableau 8), en employant dans ces deux derniers cas **des souches préadaptées à la haute osmolarité**, montre que la fréquence de transfert du plasmide RP4 était plus élevée en milieu non salé ($1,68 \times 10^{-5}$) et en milieu préparé à l'eau de mer ($1,77 \times 10^{-4}$ à $1,44 \times 10^{-5}$ selon la concentration de Nal employée) qu'en milieu TSANa ($6,57 \times 10^{-6}$ à $9,09 \times 10^{-5}$ selon la concentration de Nal employée). Néanmoins, en employant ces mêmes milieux de conjugaison-sélection additionnés de Rp (100 µg/ml), la fréquence de transfert de RP4 sur les milieux TSANa et TSASW a été semblable ($3,68 \times 10^{-5}$ et $4,91 \times 10^{-5}$, respectivement) et 10 fois plus faible en TSA ($5,1 \times 10^{-6}$). Les contrôles effectués ont montré l'absence de croissance des cellules D et R sur le milieu sélectif contenant Rp, Nal et Km.

D'autre part, les mêmes tests effectués avec la souche R *E. coli* LCB402 ont montré une fréquence de transfert semblable sur milieu TSA non salé ($1,51 \times 10^{-5}$) et TSASW ($3,04 \times 10^{-5}$) et environ dix fois plus élevée sur le milieu TSANa ($1,3 \times 10^{-4}$). Ces résultats montrent donc que certains composants de l'eau de mer freinent le transfert du plasmide RP4, mais que cet effet disparaît avec des souches préadaptées à la haute osmolarité. Ces données montrent donc la nécessité d'approfondir les études sur l'influence que peuvent avoir divers composants de l'eau de mer sur le transfert des plasmides dans ce milieu.

3.2.4 Transfert du plasmide pRAB15

Contrairement à ce qui a été observé avec le plasmide RP4, les essais de conjugaison directe sur le milieu sélectif en employant comme donatrices les souches *E. coli* 15 et *E. coli* 16, et comme réceptrices *E. coli* 185 (Tableau 5), montrent que le plasmide pRAB15 n'était pas transféré directement sur les milieux de sélection des TC (méthodes A et B) où la fréquence de transfert était très faible (plasmide pRAB16), **ce qui a facilité l'examen des possibilités de son échange conjugatif par une méthode traditionnelle en milieu liquide.**

Nous avons donc étudié par la **méthode C** la fréquence de transfert de ce plasmide pRAB15 d'*E. coli* 15 à *E. coli* 185 pour différents temps de mélange, en employant un milieu de conjugaison non salé (TSB). Les résultats (Tableau 9) montrent qu'il n'a pas été possible, dans la plupart des cas, d'obtenir des TC sans l'incubation préalable du milieu de mélange: dans ce cas, un transfert à très faible fréquence n'a été détecté que sur le milieu sélectif additionné de Cm. Après un temps d'incubation du mélange [D+R] de 30 mn, correspondant au temps de génération de la souche D, la fréquence du transfert était encore très faible. Elle a augmenté progressivement avec le temps, jusqu'à atteindre $2,09 \times 10^{-4}$ à $3,24 \times 10^{-5}$, selon l'antibiotique utilisé pour la sélection des TC, après 20h d'incubation du mélange.

La possibilité de transfert de plasmides dans l'eau de mer a été testée en employant la **méthode D** dans un premier temps, avec des cellules D et R non adaptées aux conditions salines (cultivées sur milieu TSB), après différents temps de mélange (0, 2, 5 et 20h). **Aucun transconjugant n'a été obtenu dans ces conditions.**

D'autres tests ont été réalisés en adaptant préalablement les cellules D et R à la haute osmolarité par croissance sur milieu TSBNa. Les essais de conjugaison ont été réalisés employant la même méthode D, pour un temps de mélange de 20h et dans plusieurs milieux de mélange [D+R]: TSBNa et différentes dilutions de TSB en SW (Tableau 10).

Tableau 9

Fréquence de transfert du plasmide pRAB15 en Tryptic Soy Broth (TSB) après différentes périodes d'incubation du mélange [donatrice+réceptrice]

Temps d'incubation	Marqueurs de résistance sélectifs			
	Cm	Sm	Te	Cm-Te-Sm
0h	6.73×10^{-9}	NT	NT	NT
30 min	6.73×10^{-9}	1.86×10^{-8}	NT	1.86×10^{-8}
1h	5.61×10^{-8}	2.79×10^{-8}	1.87×10^{-9}	3.72×10^{-8}
4h	8.32×10^{-7}	1.07×10^{-6}	3.68×10^{-6}	2.03×10^{-5}
5h	1.88×10^{-6}	1.69×10^{-6}	1.96×10^{-6}	3.17×10^{-5}
20h	2.09×10^{-4}	3.24×10^{-5}	5.1×10^{-5}	6.6×10^{-5}
21h	>	>	>	>

^a : A partir de cultures (18h à 37E C en milieu TSB) des souches donatrice (D) (*E. coli* 15) et réceptrice (R) (*E. coli* 185), 2 ml D + 2 ml R + 4 ml TSB ont été mélangés et incubés sans agitation à 37E C pendant différentes périodes. 200 µl de chaque mélange ont été étalés sur le milieu sélectif, (TSA + acide nalidixique 100 µg/ml et 25 µg/ml de Cm, Te, Sm ou les trois antibiotiques), et incubés à 37E C pendant 24-48h. La fréquence de transfert est exprimée comme le rapport entre le nombre de transconjugants et le nombre initial de cellules donatrices pour ml de mélange.

Cm (Chloramphénicol), Te (Tétracycline), Sm (Streptomycine).

NT : Pas de transfert détecté.

Les résultats obtenus (Tableau 10) montrent que la fréquence de transfert après 20h, était environ 100 fois plus faible dans un milieu salé (TSBNa) que dans le même milieu non salé (TSB) (Tableau 9), alors qu'elle était analogue à cette dernière dans ce même milieu nutritif non salé dilué au demi par de l'eau de mer (TSB+SW, 1:1, V/V), dont l'osmolarité et le contenu en nutriments étaient donc réduits de moitié par rapport au milieu TSBNa. Dans les milieux progressivement moins nutritifs et plus riches en eau de mer, la fréquence de transfert était de plus en plus faible, mais encore décelable dans l'eau de mer contenant les éléments nutritifs du milieu TSB à la dilution de 1/1000 (V/V) (soit 20 mg de peptone et 2,5 mg de glucose). **Aucun transfert n'a été détecté dans l'eau de mer naturelle sans nutrilites.**

L'addition de glycine bêtaïne (GB) (5 mM) dans les milieux de conjugaison a augmenté environ 10 fois la fréquence du transfert (Tableau 11), ce qui confirme les résultats antérieurement obtenus par Breittmayer et Gauthier (1990) en ce qui concerne le transfert du plasmide RP4 dans les sédiments marins.

Tableau 10

Fréquence de transfert du plasmide pRAB15 d'*E. coli* 15 à *E. coli* 185, en milieux de culture salés et dans l'eau de mer^a

MM ^b	Fréquence de transfert	
	TSANam+Sm+Nal ^c	TSA+Sm+Nal ^c
TSBNa	3.56×10^{-7}	5.51×10^{-8}
TSB+SW 1:1	3.04×10^{-5}	1.86×10^{-5}
TSB+SW 1:9	1.43×10^{-8}	NT
TSB+SW 1:99	9.65×10^{-9}	NT
TSB+SW 1:999	7.91×10^{-10}	NT
SW	NT	NT

^a : 25 ml d'une culture (18h à 37E C en milieu TSBNa) des souches donatrice (D) (*E. coli* 15) et réceptrice (R) (*E. coli* 185) ont été rincés et centrifugés trois fois à 10000 rmp/10 min à 20E C avec le milieu MM. 2 ml de culture ou suspension de la D ont été mélangés avec 2 ml de culture ou suspension de la R et 4 ml MM, et ont été incubés sans agitation à 37E C pendant 20h. 200 µl de ce mélange ont été étalés sur boîtes de milieu sélectif et ont été incubés à 37E C pendant 24-48 h. La fréquence de transfert est exprimée comme le rapport entre le nombre de transconjugants pour ml et le nombre initial de cellules donatrices pour 1 ml de mélange.

^b : MM (milieu de conjugaison): TSB (Tryptic Soy Broth); TSBNa (TSB additionné de NaCl 0,5 M), TSBSW (TSB additionné d'eau de mer stérile); SW: eau de mer stérile.

^c : milieu sélectif: TSA (Tryptic Soy Agar); TSANam (TSA additionné de NaCl 0,3 M; Sm (Streptomycine, 50 µg/ml); Nal (Acide nalidixique, 100 µg/ml).

NT : pas de transfert détectable

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer ce phénomène, comme la protection par la GB des enzymes nécessaires à la conjugaison (Pollard et Wyn Jones, 1979; Arakane et Timasheff, 1983, la répression des fonctions du transfert de RP4 (breitmayr et Gauthier, 1990) ou la modification de la structure du DNA plasmidique, dont le superenroulement augmente dans les environnements à grande osmolarité (Higgins *et al.*, 1988). Les résultats de cette série de tests ont en outre confirmé ceux obtenus en l'absence de GB (Tableau 10), pour ce qui concerne l'effet de la salinité et de la quantité de nutrilites sur le transfert. Dans les deux cas, la récupération des TC était par ailleurs favorisé par l'emploi d'un milieu de sélection salé (TSANam) (Tableaux 10 et 11).

Les résultats obtenus en employant la méthode de conjugaison D après un temps de mélange de 20h, montrent que la fréquence du transfert a décru du milieu TSB+SW (1/1 V/V) ($8,69 \times 10^{-6} \pm 2,45 \times 10^{-5}$, moyenne de 5 expériences) au milieu TSBNa ($3,65 \times 10^{-7} \pm 5,9 \times 10^{-8}$, moyenne de 7 expériences) et au milieu TSBSWa ($9,1 \times 10^{-9} \pm 5,52 \times 10^{-9}$, moyenne de 3 expériences). Il faut

noter que le milieu TSBSWb présentait un important précipité après stérilisation, alors que le mélange TSB+SW en proportions 1:1 (V/V) était limpide. Néanmoins, aucun transconjugant n'a été isolé en employant le milieu TSBSWb, aussi limpide, mais où quelques composants ont été éliminés par centrifugation.

La fréquence du transfert après un temps de mélange de 30 min en eau de mer et dans différents milieux salés (TSBNa, TSB+SW 1:1, TSBSW et SW) était extrêmement faible et n'a pu être détectée qu'en employant le milieu sélectif à l'eau de mer ($2,12 \times 10^{-1}$), ce qui montre que l'utilisation de l'eau de mer ou des milieux salés n'augmentait pas son transfert. D'autre part, les essais de conjugaison après 20h de mélange pourraient fournir des résultats erronés, dûs directement à la multiplication des transconjugants et indirectement à celle des cellules donatrices et réceptrices, ce qui expliquerait aussi que les plus hautes fréquences de transfert ont été observées dans les milieux de conjugaison les plus riches en nutrilites.

Ces résultats montrent donc que la méthode B, ou "combined spread plate method", permet une évaluation plus juste de l'influence de différents milieux ou facteurs environnementaux sur la fréquence de transfert, essentiellement parce que cette influence est indépendante du temps de mélange. Par contre, seules peuvent alors être utilisées les souches capables de survivre et transférer leur(s) plasmide(s) sur le milieu sélectif.

Par ailleurs, il apparaît clairement que les souches non adaptées aux milieux salés ne transfèrent que très difficilement les plasmides R par conjugaison dans l'eau de mer, même ceux (comme le RP4) dont le transfert se fait à haute fréquence dans les conditions optimales du laboratoire.

Tableau 11

Fréquence de transfert du plasmide pRAB15 d'*E. coli* 15 à *E. coli* 185, en milieux salés et dans l'eau de mer additionnée de glycine bêtaïne^a

MM ^b	Fréquence de transfert	
	TSANam+Sm+Nal ^c	TSA+SmNal ^c
TSBNa	3.64×10^{-6}	4.70×10^{-6}
TSB+SW 1:1	4.90×10^{-4}	2.33×10^{-4}
TSB+SW 1:9	8.24×10^{-8}	4.82×10^{-8}
TSB+SW 1:99	2.34×10^{-8}	NT
TSB+SW 1:999	NT	NT
SW	4.94×10^{-9}	NT

^a : 25 ml d'une culture (18h à 37E C en milieu TSBNa) des souches donatrice (D) (*E. coli*) et réceptrice (R) (*E. coli* 185) ont été rincés et centrifugés trois fois à 10000 rmp/10 min à 20E C avec le milieu MM. 2 ml de culture (ou suspension) D ont été mélangés avec 2 ml de culture (ou suspension) R et 4 ml de MM additionné de glycine bêtaïne (5 mM), et ont été incubés sans agitation à 37E C pendant 20h. 200 µl de ce mélange ont été étalés sur boîtes de milieu sélectif et ont été incubés à 37E C pendant 24-48h. La fréquence de transfert est exprimée comme le rapport entre le nombre de transconjugants pour ml et le nombre initial de cellules donatrices pour 1ml de mélange.

^b : MM (milieu de conjugaison): TSB (Tryptic Soy Broth); TSBNa (TSB additionné de NaCl 0,5 M; SW (eau de mer filtré).

^c : Milieu sélectif: TSA (Tryptic Soy Agar); TSANam (TSA additionné de NaCl 0,3 M; Sm=Streptomycine, 50 µg/ml; Nal=Acide nalidixique, 100 µg/ml).

NT: pas de transfert détectable

4. TRANSFERT DANS LES SEDIMENTS

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Souches et plasmides

Les transferts ont été réalisés avec le plasmide et les souches suivants:

Plasmide : RPa

Souche donatrice: *E. coli* 69 (Nal^r, Km^r)

Souche réceptrice: *E. coli* 402 (Nal^r, Km^s)

4.1.2 Milieus de culture et de sélection

*Maintien des souches: souche D: Tryptic Soy Agar (TSA) + Km (25µg/ml)
souche R: TSA ou Nutrient Agar (Difco)

*Préparation des inoculums:
souche D: Tryptic Soy Broth (TSB) + Km (25 µg/ml)
souche R: TSB

Des tests ont également été réalisés à l'aide de ces mêmes souches **préadaptées à la haute osmolarité** par culture en milieux TSA, TSB, ou TSA+Km et TSB+Km additionnés de NaCl (0.5 M).

*Sélection des transconjugants: elle a été effectuée uniquement sur milieu TSA préparé à l'eau de mer (TSASW), additionné de Km (50 µg/ml) et de Nal (200 µg/ml).

4.1.3 Sédiments

Deux sédiments à structure différente ont été utilisés: un sédiment grossier (fin graviers et vase, sédiment **A**) et une vase fine (sédiment **B**), tous deux prélevés dans la Rade de Villefranche-sur-Mer. Ils ont été stérilisés par autoclavage pendant 15 minutes à 115E C.

4.1.4 Méthode de transfert

4.1.4.1 Dispositif expérimental

Les transferts ont été réalisés selon une méthode utilisée et décrite antérieurement par Breittmayer et Gauthier (1990).

Les cellules D et R, préalablement cultivées pendant 24h à 37E C en TSB ou TSB+NaCl 0.5M, ont été rincées 3 fois en eau de mer stérile (centrifugation: 10000 rmp, 20E C, 10 min) puis suspendues séparément en eau de mer stérile (suspensions mères, titrant environ 10¹⁰ UFC/ml). Ces SM ont été mélangées en proportion 1:1 et le mélange **immédiatement** mêlé aux sédiments (50 grammes) de manière à obtenir une densité moyenne de 2.10⁸ cellules [D et R] par gramme de sédiment inoculé. Les sédiments ont ensuite été incubés à 24E C (± 2E C) à l'obscurité.

4.1.4.2 Détection des transconjugants et mesure de la fréquence de transfert

Après des temps d'incubation variables (0h, 30 min, 1h, 3h, 6h, 24h), 1g de chaque sédiment a été prélevé et suspendu dans 10 ml d'eau de mer stérile. Cette suspension a été violemment agitée, puis laissée à décanter pendant 2 minutes. Les TC ont alors été dénombrés dans le surnageant, par étalement sur le milieu de sélection.

4.2 Résultats - Discussion

Le Tableau 12 présente les résultats concernant le transfert à partir de cellules cultivées à basse osmolarité. Le Tableau 13 présente ceux qui ont été obtenus avec les cellules préalablement cultivées sur milieu à haute osmolarité.

Tableau 12

Fréquence de transfert du plasmide RP4 d'*E. coli* 69 à *E. coli* 402 cultivés à basse osmolarité (TSB), dans deux sédiments marins stériles (moyennes sur deux tests)

Temps d'incubation (h)	Sédiment A	Sédiment B
0	ND ^a	ND
1	ND	ND
3	2.10^{-10}	$4,4. 10^{-9}$
6	$5,6. 10^{-7}$	$6,5. 10^{-6}$
24	$2,4. 10^{-6}$	$3,8. 10^{-5}$

^a aucun transconjugant détecté.

Tableau 13

Fréquence de transfert du plasmide RP4 d'*E. coli* 69 à *E. coli* 402 cultivés à haute osmolarité (TSB+NaCl 0.5M), dans deux sédiments marins stériles (moyennes sur deux tests)

Temps d'incubation (h)	Sédiment A	Sédiment B
0	ND ^a	ND
1	$1,2. 10^{-10}$	$8,7. 10^{-10}$
3	$2,6. 10^{-8}$	$6,4. 10^{-7}$
6	$7,7. 10^{-6}$	$2,3. 10^{-5}$
24	$1,6. 10^{-5}$	$2,7. 10^{-4}$

^a aucun transconjugant détecté.

Ces résultats montrent que, dans des sédiments marins dont la microflore a été tuée par chauffage, **le transfert du plasmide RP4 est possible et qu'il s'effectue à des fréquences relativement élevées**. Ce transfert paraît en outre **varier selon la nature du sédiment** : dans nos expériences, il était environ 5 à 10 fois plus fréquent dans le sédiment vaseux, dont le contenu en éléments organiques était plus élevé. Ceci peut s'expliquer par une meilleure survie des cellules D et R, soit grâce à la présence de substrats organiques qui maintiennent l'énergisation des cellules et un certain degré d'homéostasie, soit grâce à l'action protectrice d'osmolytes, également organiques, soit après l'action combinée de ces deux types de substrats.

On constate en outre que, conformément aux données publiées par Breittmayer et Gauthier (1990), la fréquence du transfert était (environ 10 fois) plus élevée lorsque les cellules D et R étaient adaptées à la haute osmolarité avant la conjugaison. Ceci confirme, une fois encore, l'importance

des processus d'osmorégulation dans la survie et la "réactivité" des cellules d'*E. coli* (et d'autres entérobactéries) dans l'environnement marin.

5. TRANSFERT DANS LE TUBE DIGESTIF DES MOULES

5.1 Matériels et méthodes

5.1.1 Souches et plasmides

Les transferts ont été effectués en employant les plasmides et souches suivants:

Plasmide : RP4

Souche donatrice : *E. coli* 69 (Nal^r, Km^r)

Souche réceptrice: *E. coli* 402 (Nal^r, Km^s).

5.1.2 Milieux de culture et de sélection

*Maintien : souche D: Tryptic Soy Agar (TSA) + Km (25µg/ml)
souche R: TSA ou Nutrient Agar (Difco)

*Préparation des inoculums: souche D: Tryptic Soy Broth (TSB) + Km (25 g/ml)
souche R: TSB

*Sélection des transconjugants(TC): elle a été effectuée exclusivement sur milieu mFC (Difco, spécifique des coliformes) préparé à l'eau de mer, additionné de Km (50 µg/ml) et de Nal (200 µg/ml).

5.1.3 Méthode de transfert

5.1.3.1 Dispositif expérimental

Les transferts ont été effectués dans des bacs de verre (environ 10 litres) contenant de l'eau de mer naturelle *non stérilisée*, maintenue à une température moyenne de 22E C (\pm 2E C) et oxygénée par bullage. Dans chaque bac, 4 moules de taille calibrée (5 à 6 cm de longueur) ont été placées à la surface d'un tamis de nylon à très grosses mailles (1 cm²) maintenu à distance du fond (environ 5 cm) par des plots de verre (voir Figure 7). Ce dispositif permet de récolter plus aisément les pelottes fécales émises par les moules.

5.1.3.2 Protocole d'étude des transferts

La détection des transferts de RP4 entre souches d'*E. coli* dans le tube digestif des moules a été réalisée selon le protocole suivant:

1. Préparer une culture (37E C, over-night) des souches D et R en TSB (50 ml).
2. Centrifuger ces cultures et suspendre les culots dans 5 ml d'eau de mer stérile (EMS).
3. Préparer un b cher (de 1 litre) contenant 500 ml d'eau de mer stérile à 20E - 22E C; y verser les suspensions de cellules D et R et bien homog niser. Dénombrer les cellules D et R dans cette suspension par dilution (en EMS) et étalement sur TSA (+K50 pour D, +Nal200 pour R).

4. Déposer immédiatement les 4 moules dans cette suspension mixte [D+R], disposer les bacs à la pénombre, et laisser les mollusques filtrer la totalité des bactéries (30 min à 1 h). Le flacon doit être parfaitement immobile, les moules fermant leurs valves dès la moindre secousse;
5. Récupérer les moules et les rincer énergiquement dans de l'eau de mer stérile;
6. Placer les moules dans le bac d'eau de mer et maintenir celui-ci à 22° C, sans agitation brusque, avec une légère aération de l'eau. Ne pas exposer le bac à la lumière.
7. Après différentes périodes d'incubation (30 min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h..), prélever:
 - * 200 ml de l'eau du bac (prélevée au-dessus du tamis, près des moules);
 - * quelques pelottes fécales au fond du bac (sous le tamis), avec une pipette stérile.
8. Dénombrer les transconjugants éventuels dans ces deux milieux
 - eau du bac: filtrer sur membranes (diamètre 47mm, pores 0,45 μ m) 10, 50 et 100 ml d'eau et déposer les membranes sur milieu [TSA eau de mer+K50+Nal200] (boîtes de Pétri diamètre 55mm);
 - pelottes fécales: dilacérer violemment les pelottes récoltées dans 1 ml de bouillon [TSB-K50+K50+Nal200] et étaler 50, 100 et 200 μ l de cette suspension sur milieu [mFC eau de mer+K50+Nal200] (boîtes de Pétri diamètre 100mm).
9. Incuber les boîtes de Pétri à 42° C pendant 24h et compter le nombre de colonies (TC) apparues sur le milieu ou les membranes.
Isoler quelques colonies (4 à 5) et vérifier la présence du plasmide RP4 dans ces souches par extraction (lyse alcaline, miniprep ou autre), purification et électrophorèse sur gel d'agarose.

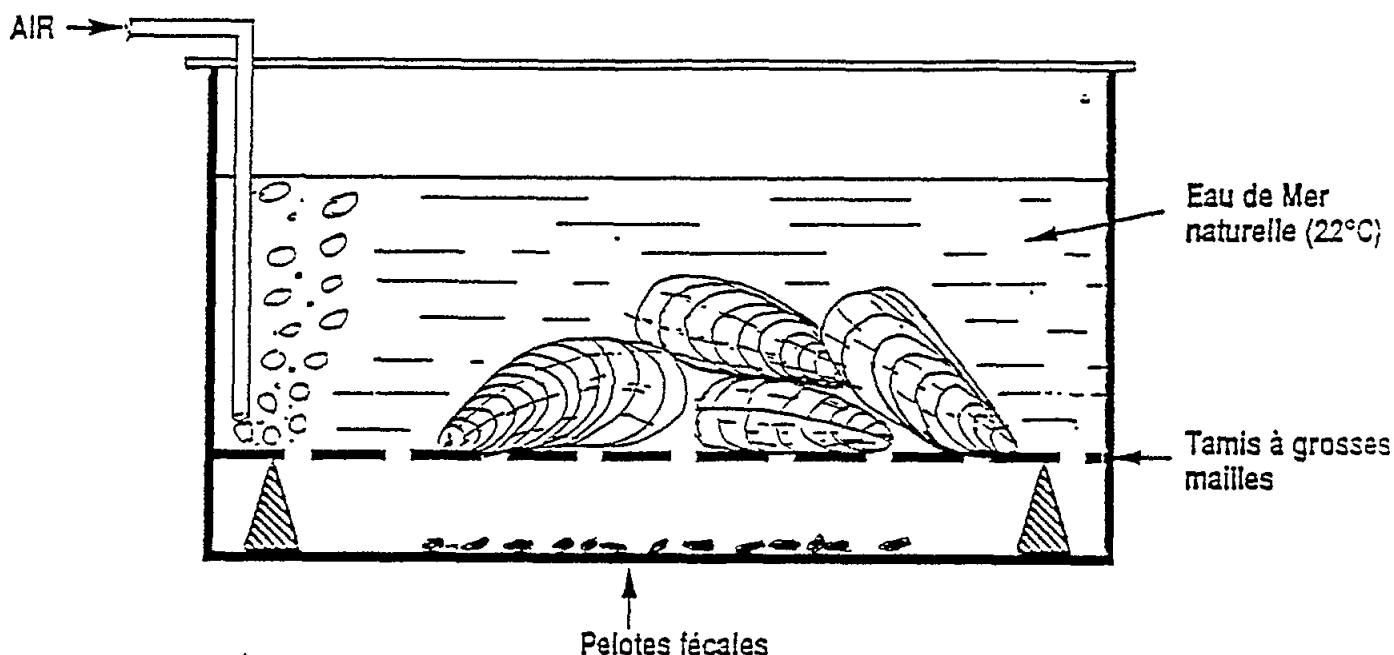


Figure 7 - Dispositif expérimental utilisé pour la détection des transferts de plasmides entre souches d'*E. coli* dans le tube digestif des mollusques lamellibranches (*Mytilus galloprovincialis*)

5.2 Résultats - Discussion

Compte tenu des difficultés techniques soulevés (et en partie résolues) lors de l'analyse des transferts dans les milieux de culture et dans l'eau de mer, il n'a pas été possible de multiplier les tests, qui n'ont été réalisés qu'en quelques exemplaires, dans un seul laboratoire (Nice).

Les résultats de deux séries de tests sont présentés dans le Tableau 14.

Tableau 14

Tranfert du plasmide RP4 d'*E. coli* 69 à *E. coli* 402 dans le tube digestif des moules, selon le protocole expérimental développé dans le texte

	Transconjugants dans	
	eau du bac (dans 100 ml)	pelottes fécales ^a (quantité indéterminée)
<u>Expérience 1</u>		
0h	0	-
30min	0	-
1h	0	+
3h	0	+
6h	21	+
12h	60	+
24h	0	-
<u>Expérience 2</u>		
0h	0	-
30min	0	-
1h	0	-
3h	0	+
6h	2	+
12h	12	+
24h	0	+

^a Quantification impossible du fait de la difficulté à prélever une quantité définie de pelottes fécales. Le signe + signifie seulement que des TC ont été détectés dans le broyat de pelottes prélevées.

Ces données, bien qu'à caractère préliminaire, suggèrent fortement que le transfert du plasmide RP4 s'effectue bien dans le tube digestif des mollusques, après une période d'incubation d'environ 1 à 3 heures, et ceci avant que des TC soient détectables dans l'eau du bac. Compte tenu des conditions de récupération des pelottes fécales, il n'a pas été possible de quantifier ce transfert. Ces résultats montrent aussi que des conjugaisons sont possibles dans l'eau de mer au voisinage des mollusques, à une fréquence supérieure à celle observée dans l'eau de mer isolée et non nutritive. Ceci pourrait être lié à l'excrétion par les moules de substances organiques (mucus, excréments) qui favorisent la survie des cellules d'*E. coli* suspendues dans les bacs expérimentaux, donc le transfert conjugal de leur plasmide.

6. CONCLUSIONS GENERALES

6.1 En ce qui concerne les transferts dans les milieux de culture et dans l'eau de mer

1. L'étude de l'activité des antibiotiques dans les milieux salés ou non salés, a montré que même si l'activité de certains d'entre eux, comme le chloramphénicol, n'a pas été affectée, d'autres ont présenté une plus faible activité en milieux salés. Par contre, l'activité de la rifampicine était plus élevée en milieux salés.
2. Le plasmide RP4 est transféré d'une cellule donatrice (*E. coli* LCB60) à d'autres cellules d'*E. coli* sur le milieu de sélection des transconjugants, grâce vraisemblablement à la rapidité du transfert qui s'effectue à haute fréquence avant que les cellules soient inhibées par les antibiotiques du milieu sélectif, même quand ceux-ci sont bactéricides.
3. L'acide nalidixique et la rifampicine (ou l'ensemble des deux), n'empêchent pas le transfert du plasmide RP4.
4. Les milieux salés, préparés à l'eau de mer ou additionnés de NaCl, n'empêchent pas le transfert du plasmide RP4, quand les cellules donatrices et réceptrices ont été préadaptées à haute osmolarité.
5. Les essais de conjugaison en employant comme donatrice la souche *E. coli* 15, qui héberge un plasmide que nous avons nommé pRAB15, montrent qu'il n'y a pas de transfert ou que la fréquence de transfert sur le milieu sélectif est très faible.
6. L'étude du transfert du plasmide pRAB15, en employant une méthode de conjugaison en milieu liquide, a montré que dans la plupart des cas, il a été possible d'obtenir des transconjugants après un temps d'incubation plus important que le temps de génération de la souche donatrice (30 min).
7. Le transfert du plasmide pRAB15 n'a été possible dans les milieux salés qu'en employant des souches donatrices et réceptrices préadaptées aux conditions salines. La fréquence de transfert a été de plus en plus faible dans des milieux progressivement carencés en nutrilites et enrichis en eau de mer. D'autre part, l'addition de glycine bêtaïne au milieu de culture a augmenté d'environ 10 fois la fréquence de leur transfert.
8. L'étude du transfert du plasmide pRAB15, en employant comme milieu de conjugaison le **TSB additionné de NaCl (0.5 M)**, le **TSB préparé à l'eau de mer** et **l'eau de mer**, après un temps d'incubation correspondant au temps de génération de la souche donatrice (30 min), montre qu'il n'y a pas de transfert dans ces conditions. D'autre part, la recherche de transferts après un temps de mélange de 20h peut **donner de faux résultats**, dûs directement à la multiplication des transconjugants et indirectement à la multiplication des cellules donatrices et réceptrices dans le milieu de conjugaison. Ces faux résultats peuvent aussi expliquer l'obtention des plus hautes fréquences dans les milieux nutritifs.

6.2 En ce qui concerne les transferts dans les sédiments marins

1. Ils sont possibles, mais leur fréquence dans les sédiments **non stérilisés, à microflore intacte** ne peut être déduite des tests effectués au cours de cette étude. Des travaux sont en cours pour tester cette fréquence.

2. Leur fréquence est variable d'un sédiment à l'autre, cette variation pouvant dépendre de la présence de substances nutritives ou osmoprotectrices organiques.
3. Des cellules préadaptées au choc osmotique sont capables de transmettre (cellules D) ou de recevoir (cellules R) un plasmide par conjugaison de manière plus facile, donc plus fréquente.

6.3 En ce qui concerne les transferts dans le tube digestif des moules

Le transfert est également possible. Les résultats présentés dans ce rapport sont cependant préliminaires: ils demandent confirmation par différentes équipes, à l'aide du même protocole mais sur des matériels différents. En particulier, il serait nécessaire de préciser leur fréquence.

7. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARAKANA, T. and S.N. TIMASHEFF, (1983). Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous aminoacid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* US, **224**, 169-177.
- AUBERT, M., M.J. GAUTHIER, J. AUBERT, and P. BERNARD (1981). Les systèmes d'information des microorganismes marins. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, **60-61** : 230pp.
- BELL, J.B., W.B. MACRAE, and G.E. ELLIOT (1980). Incidence of R factors in coliform, fecal coliform, and *Salmonella* populations of the Red River in Canada. *App. Environ. Microbiol.*, **40**, 486-491.
- BREITTMAYER, V.A. and M.J. GAUTHIER (1990). Influence of glycine betaine on the transfer of plasmid RP4 between *Escherichia coli* strains in marine sediments. *Lett. Appl. Microbiol.*, **10**, 65-68.
- BURMAN, L.G. (1977) R-plasmid transfer and its response to nalidixic acid. *J. Bacteriol.*, **131** : 76-81.
- CAIRNS, J. Jr., and J.R. PRATT (1986). Ecological consequence assessment: effects of bioengineered organisms. In : *Biotechnology risk assessment : Issues and methods for environmental introductions*, Fiksel, J., Covello, V.T. (eds), Pergamon Press. Inc., Elmsford, N.Y. 88-108.
- CHABBERT, Y.A. (1963). *L'antibiogramme : sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques*. Collection "Techniques de base". Ed. de la Tourelle. Saint-Mandé. 257 pp.
- CLUTTER, R.I., (1972). Subtle effects of pollution on inshore tropical plankton. In: *Marine pollution and sea life*, M. Ruivo ed., Fishing News (Book) Limited, London, pp. 435-439.
- COURVALIN, P., F. GOLDSTEIN, A. PHILIPPON and J. SIROT (1985). *L'antibiogramme*. MPC-Videom ed. Paris.
- CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (1987) Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience. USA. Supplement 3, 1.4.2.
- CURTISS, R. (1981) Gene transfert. In "*Manual of methods for general bacteriology*" P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips eds. American Society for Microbiology. Washington D.C.

- DATTA, N., R.W. HEDHES, E.J. SHAW, R.B. SYKES and M.H. RICHMOND (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **108**, 1244-1249.
- DAVISON, J. (1988). Plant beneficial bacteria. *Biotechnology*. **6**, 282-286.
- DEAN-ROSS, D (1986). Release of genetically engineered organisms: hazard assessment. *ASM News*, **52**, 572-575.
- GAUTHIER, M.J., P.M. MUNRO, and S. MOHADJER (1987). Influence of salts and sodium chloride on recovery of *Escherichia coli* from seawater. *Curr. Microbiol.* **15** : 5-10.
- GAUTHIER, M.J., G.N. FLATAU, D. LE RUDULIER, R.L. CLEMENT, and M.P. COMBARRO COMBARRO (1991) Intracellular accumulation of potassium and glutamate specifically enhances survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57(1)**, 272-276.
- GENTHNER, F.J., P. CHATTERJEE, T. BARKAY, and A.W. BOURQUIN (1988). Capacity of aquatic bacteria to act as recipients of plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 115-117.
- GHOSAL, D., I.S. YOU, D.K. CHATTERJEE and A.M. CHAKRABARTY (1985). Microbial degradation of halogenated compounds. *Science, (Wash. D C)*, **228**, 135-142.
- GLASSMAN. D.L. and N.A. McNICOL (1981). Plasmid frequency in natural populations of estuarine microorganisms. *Plasmid*, **5**, 231-236.
- GRABOW, W.O.K., I.G. MIDDENDORF, and O.W. PROZESKY (1973) Survival in maturation ponds of coliform bacteria with transferable drug resistance. *Water Res.* **7**, 1589-1597.
- GRIMES, D.J., and R.R. COLWELL (1986) Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semi-tropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 161-165.
- HADA, H.S. and R.K. SIZEMORE (1981). Incidence of plasmids in marine *vibrio* spp. isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 199-202.
- HALVORSON, H.O., D. PRAMER, and M. ROGUL (ed.) (1985). *Engineered organisms in the environment: scientific issues*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- HIGGINS C.F., C.J. DORMAN, D.A. STIRLING, L. WADDEL, I.R. BOOTH, G. MAY and E. BREMER (1988) A physiological role of DNA supercoiling in the osmotic regulation of gene expression in *S. typhimurium* and *E. coli*. *Cell*, **52** : 569-584.
- JOHNSTON, J.B., and S.G. ROBINSON (1984). *Genetic engineering and the development of new pollution control technologies*. U.S. EPA report 600/2-84-037. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- KELLEY, W.J., D.C. REANEY (1984). Mercury resistance among soil bacteria: ecology and transferability of genes encoding resistance. *Soil Biol. Biochem.* **16** : 1-8.
- KUENZI, M., F. ASSI, A. CHMIEL, C.H. COLLINS, M. DONIKAN, J.B. DOMINGUEZ, L. FINANCSEK, L.M. FOGARTI, W. FROMMER, F. HASKO, F. HASKO, J. HOVLAND, E.H. HOUWING, J.L. MAHLER, A. SANDKVIST, K. SARGEANT, C. SLOOVER and T. MUIJT (1985). Safe biotechnology: general considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21** : 1-6.
- KRAFT, I. and E. BOCK. Plasmid in Nitrobacter. *Arch. Microbiol.* **140** : 79-82.

- LLOYD, R.G., J. HART, and S. JOHNSON (1980) Loss of Hfr DNA from *Escherichia coli* merozygotes during inhibition of conjugation by nalidixic acid. *Genet. Res.*, **36** : 69-79.
- MACH, P.A. and D.J. GRIMES (1982). R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44** : 1395-1403.
- MC CLURE, N.C., J.C. FRY, A.J. WEIGHTMAN (1990). Gene transfer in activated sludge. In: *Bacterial genetics in natural environments*. J.C. Fry and M.J. Day (eds.), Chapman and Hall, London, pp. 111-132.
- MITCHELL. R. and C. CHAMBERLIN (1975). Factors influencing the survival of enteric microorganisms in the sea: and overview. In: *Proceedings of the International Symposium on Discharge of Sewage from Ocean Outfalls*, Gameson, A.L.H. (ed), Pergamon Press Inc, London, 237-251.
- MILEWSKI, E. (1985). Field testing of microorganism modified by recombinant DNA techniques. Applications, issues, and development of "points to consider" document. *Recomb. DNA Tech. Bull.* **8** : 102-108.
- MILLER, L.K., A.J. LINGG, and L.A. BULLA (1984). Bacterial viral and funganal insecticides. In: *Biotechnology and biological frontiers*. P.H. Benson (ed.). The American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, pp. 214-229.
- MUNRO, P.M., F.M. LAUMOND, and M.J. GAUTHIER (1987). 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 and J. BONGIOVANNI (1989). Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** : 2017-2024.
- PEARCE, J.B. (1972). The effect of solid waste disposal on benthic communities in the New York Bight. In: *Marine pollution and sea life*, M. Ruivo (ed.), Fishing News (Book) Limited, London. pp. 404-411.
- PICKUP, R.W. R.J. LEWIS and P.A. WILLIAMS (1983). *Pseudomonas* sp. MT14, a soil isolate which contains two large catabolic plasmids, one a TOL plasmid and one coding for phenylacetate metabolism and mercury resistance. *J. Gen. Microbiol.*, **129** : 153-158.
- POLLARD, A. and R.G. WYN JONES (1979). Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and others solutes. *Planta*, **144** : 291-298.
- POWLEDGE, T.M. (1983). Prospects for pollution control with microbes. *Biotechnology*, **9** : 743-755.
- RISSLER, J. (1984). Research needs for biotic environmental effects of genetically-engineered microorganisms. *Recomb. DNA Tech. Bull.* **7** : 20-30.
- SIZEMORE, R.K. and R.R. COLWELL, (1977). Plasmids carried by antibiotic-resistant marine bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **12** : 373-382.
- SMITH, H.W. (1970). Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R factors. *Nature (London)*, **228** : 1296-1298.

- SMITH, H.W. (1971). Incidence of R+ *Escherichia coli* in coastal bathing waters of Britain. *Nature (London)*, **234** : 155-156.
- SMIT, E. and J.D. VAN ELSAS, (1990). Determination of plasmid tranfert frequence in soil: Consequences of Bacterial mating on selective agar media. *Curr. Microbiol.*, **21** : 151-157.
- SNIESKO, S.F. (1974). The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.*, **6** : 197-208.
- SUGINO, A. C.L. PEEBLES, K.N. KREUZER, and N.R. COZZAVELLI (1977). Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* nal A gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, **47** : 4767-4771.
- TARDIF, G. and R.B. GRANT (1983). Transfer of plasmids from *Escherichia coli* to *Pseudomonas aeruginosa*: Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mutant with enhanced recipient ability for enterobacterial plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **24** : 201-208.
- TIEDJE, J.M., R.R. COLWELL, Y.L. GROSSMAN, R.E. HODSON, R.E. LENSKI, R.N. MACK and P.J. REGAL, (1989). The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. *Ecology*, **70** : 298-315.
- TORANZO, A.E., M.P. COMBARRO, M.L. LEMOS, and J.L. BARJA (1984). Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48** : 872-877.
- TREVORS, J.T. and K.M. ODDIE, (1986). R-plasmid transfer in soil and water. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 610-613.
- TREVORS, J.T., T. BARKAY and A.W. BOURQUIN (1987). Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review. *Can. J. Microbiol.*, **33** : 191-198.
- WALTER, M.V., A. PORTEOUS, and J. SEIDLER (1987). Measuring genetic stability in bacteria of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53** : 105-109.
- WEINBERG, S.R. and G. STOTZKY (1972). Conjugation and genetic recombination of *Escherichia coli* in soil. *Soil Biol. Biochem.*, **4** : 171-180.
- WILLETS, N. and B. WILKINS (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol Rev.*, **48** : 24-41.
- XU, H.S., N. ROBERTS, F.L. SINGLETON, R.W. ATWELL, D.J. GRIMES and R.R. COLWELL (1982). Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environments. *Microbial Ecol.*, **8** : 313-323.
- ZHOU, C., Y. YANG, and A.Y. YONG (1990). Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques*, **8** : 172-173.

ETUDE EXPERIMENTALE DU TRANSFERT DE GENES PLASMIDIQUES ENTRE LES ENTEROBACTERIES DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

par

Michel J. Gauthier

1. INTRODUCTION - BUTS DU TRAVAIL

Ce travail fait suite à un ensemble de recherches réalisés en 1990 dans le cadre du contrat FRA47(K), portant sur le même thème du transfert de plasmides de résistance aux antibiotiques (plasmides R) entre souches d'*Escherichia coli* dans l'environnement marin, et plus particulièrement dans trois de ses compartiments: l'eau de mer, les sédiments et le tractus digestif des invertébrés (mollusques lamelibranches). Les résultats de ces recherches ont été consignés dans un rapport établi par M.J. Gauthier, Y. Martin et V. Torregrossa en 1991. Une partie de ces résultats a fait l'objet d'une publication (Combarro *et al.*, 1991).

Au cours de l'année 1990, les recherches effectuées dans le cadre du présent contrat avaient montré que :

- le transfert de plasmides R (RP4, pRB15) était possible dans les conditions marines (haute salinité, basse température, faible teneur en matières organiques), mais qu'il dépendait étroitement de la présence d'éléments nutritifs dans le milieu de conjugaison. Il était en outre très variable, à la fois selon les souches donatrices ou réceptrices utilisées et selon les plasmides considérés;
- ce transfert était favorisé par la présence dans le milieu de conjugaison d'osmolytes organiques comme la glycine bêtaïne;
- il semblait dépendre, au moins pour certaines souches d'*E. coli*, de la nature de la matrice saline, donc de la présence de certains ions qui pourraient faciliter le transfert.

Sur la base de ces résultats, et pour aider à mettre au point un système de transfert standard qui pourrait être utilisé pour analyser les échanges de gènes plasmidiques dans d'autres compartiments du milieu marin (sédiments, surfaces, animaux), il a été proposé d'effectuer l'ensemble des recherches suivantes, en trois phases complémentaires successives :

- optimisation de la technique de transfert de plasmides conjugatifs entre souches d'*E. coli* **dans l'eau de mer ou un milieu liquide salin à même osmolarité**, et établissement d'un protocole standard de conjugaison applicable à l'étude des transferts de plasmides en mer;
- étude de l'**influence des ions majeurs de l'eau de mer (Cl⁻, SO₄²⁻, Na⁺, K⁺, Mg²⁺) sur la fréquence du transfert** d'un plasmide R (RP4) entre souches d'*E. coli*;
- analyse de l'**incidence de la régulation osmotique par le glutamate sur la fréquence du transfert** de ce plasmide entre ces souches.

2. ETABLISSEMENT D'UN PROTOCOLE STANDARD D'ETUDE DES TRANSFERTS CONJUGATIFS DANS L'EAU DE MER ET LES MILIEUX SALINS OLIGOTROPHES

2.1 Matériels et méthodes

2.1.1 Souches bactériennes et plasmides

Quatre souches appartenant à l'espèce *Escherichia coli* ont été utilisées au cours de ce travail:

- Deux souches comme **donatrices (D)** :

* *E. coli* LCB69 (C600/RP4) (génotype : *thi1*, *leu6*, *lac Y*, *ton A21/RP4*).

* *E. coli* 15, souche sauvage isolée de la Ria de Ares-Betanzos (Galicie, Espagne).

- Deux souches comme **réceptrices (R)** :

* *E. coli* LCB402 (nE 6173 dans la collection du Coli Genetic Stock Center [CGSC] (génotype : *leu*: Tn9 *rrnD-rrnE*), résistante au chloramphénicol (Cm).

* *E. coli* 185, résistante à l'acide nalidixique (Nal) et à la rifampicine (Rp).

Ces souches ont été conservées en stock à -20E C (en bouillon nutritif glycérimé) et cultivées sur milieu Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco Lab., Detroit, Mich., USA) ou en bouillon Tryptic Soy Broth (TSB(Difco) pour les expériences.

Deux plasmides conjugatifs ont été utilisés, après insertion dans les deux souches donatrices décrites ci-dessus :

* RP4 : PM=43 Md, conférant la résistance à l'ampicilline (Am), à la kanamycine (Km) et à la tétracycline (Te);

* pRAB15, PM>37Md, conférant la résistance à Am, Cm, Te et streptomycine (Sm).

2.1.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques

Des séries de tubes contenant 4 ml de milieu Mueller-Hinton (Institut Pasteur Production, France) préparé à l'eau distillée (MH) ou à l'eau de mer (MHSW) et les dilutions binaires de l'antibiotique à étudier ont été ensemencées avec 100 µl d'une dilution au 1/100e d'une culture en TSB (ou TSB additionné de 0,5 M NaCl = TSBNa) incubée à 37E C pendant 18h (concentration finale: 10⁵ cellules/ml). La CMI correspondait à la première concentration d'antibiotique inhibant complètement la croissance après 18h d'incubation à 37E C.

La sensibilité à certains antibiotiques a également été déterminée par la méthode de l'antibiogramme standard (Chabbert, 1963; Courvalin *et al.*, 1985) sur milieux MH et MHSW solides (MHA, MHASW) (Institut Pasteur Production).

2.1.3 Tests de conjugaison

Deux types de milieux ont été utilisés pour ces tests :

- des milieux **liquides**

. nutritif complexe: bouillon TSB,

. non nutritifs, définis: eau distillée additionnée de NaCl (~ 35 g/l) (EDS) ou eau de mer artificielle (EMA) dont la composition était la suivante (en g/l) :

NaCl	23,5
MgCl ₂	5
Na ₂ SO ₄	3,9
CaCl ₂ ·H ₂ O	1,1
KCl	0,7
NaHCO ₃	0,2
KBr	0,1
H ₃ BO ₃	0,03
SrCl ₂ ·6H ₂ O	0,03
NaF	0,003
Eau distillée:	Q.S.P. 1000 grammes
pH : 8.0	

Stérilisation par autoclavage à 120E C / 15 min

- des milieux **solides** :
les mêmes que ci-dessus, gélifiés par ajout d'agar noble (Difco)(15 g/l).

Les tests de conjugaison proprement dits ont été réalisés selon deux méthodes, décrites comme suit et schématisées dans les Figures 1 et 2 :

- Une **méthode A**, en **milieux liquides** (Figure 1):

Dans le cas des conjugaisons en milieu nutritif complexe (TSB), 2 ml de culture des cellules D et 2 ml de culture des cellules R en milieu TSB (18h à 37E C) ont été mélangés dans un flacon erlenmeyer de 25 ml, le mélange étant ensuite incubé à 20E et 30E C pendant des périodes croissantes (1, 6 et 24h). Après chacune de ces périodes, 200 µl du mélange ont été étalés sur les milieux de sélection des transconjugants (TC).

Dans le cas des conjugaisons en milieux non nutritifs (EDS, EMA), les cellules D et R cultivées en milieu TSB (18h, 37E C) ont été rincées à trois reprises (10000xg, 20E C, 10 min) dans le liquide utilisé pour la conjugaison, et le culot de la dernière centrifugation suspendu dans ce même liquide de manière à obtenir la même DO que la culture avant rinçage. 2 ml de suspension D et 2 ml de suspension R ont ensuite été mélangés et les TC sélectionnés, après incubation pendant 2, 6 et 24h à 20E C et 30E C, comme décrit ci-dessus.

- Une **méthode B**, sur **milieux solides** (Figure 2):

Les cellules D et R ont été cultivées comme en A, 100 µl de chacune des deux cultures ont ensuite été mélangés sur une lame de cellophane stérile montée sur tambour, déposée sur les deux milieux non nutritifs gélosés (EDS et EMA additionnées d'agar noble, 15 g/l). Après des périodes d'incubation croissantes à 20E et 30E C, les tambours de cellophane ont été transférés sur milieux de sélection des TC (voir Rapport OMS 1990 par Gauthier *et al.*).

La sélection des TC a été réalisée sur milieu TSA additionné des inhibiteurs des cellules D (Rp et/ou Nal, 100 µg/ml) et des cellules R (Km et/ou Te, 25 µg/ml).

Pour le contrôle des souches parentales, la sensibilité des cellules a été systématiquement testée par étalement de 100 µl de culture ou de suspension, sur les milieux de sélection des TC.

Toutes les boîtes de sélection des TC ont été incubées 24 à 48 h à 37E C avant dénombrement. Toutes les colonies apparues ont été considérées comme TC présumés

(un petit nombre d'entre eux étant "vérifiés" par extraction du plasmide). La **fréquence de transfert** a été exprimée par le **rapport du nombre de transconjugants au nombre de cellules donatrices dans 1ml de mélange**.

Toutes les expériences ont été réalisées à trois reprises.

2.1.4. Détection des plasmides

L'extraction des plasmides a été effectuée selon la méthode de Zhou *et al.* (1990). Leur séparation a été effectuée par électrophorèse (microcomputer pulsed filed dozer supply Consort) sous 100 V et 40 mA pendant 7h, en gel d'agarose NA (Pharmacia AB Molecular Biology, Uppsala) à 0,8%, en tampon Tris-Borate (TBE) (Tris 90 mM, acide borique 90 mM, Na₂ EDTA 10 mM, pH 7,9 avec acide acétique glacial). Les gels ont été colorés au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) et examinés sous lumière UV à 304 nm (transilluminateur LKB 2011 Macrovue).

2.2 Résultats - Discussion

Plusieurs facteurs ou conditions expérimentales ont influencé le transfert conjugatif des plasmides RP4 et pRAB15, dans le milieu complexe comme dans les milieux salins non nutritifs (Tableaux 1A et 1B):

La température

En milieu liquide comme sur milieu solide, les deux plasmides étaient transférés plus fréquemment à 30E C qu'à 20E C. Ceci confirme nos observations précédentes (Gauthier *et al.*, 1991b) et est en accord avec les données publiées par ailleurs sur le transfert conjugatif de plasmides R dans les milieux naturels (Fry & Day, 1990) ou au laboratoire (Wilkins, 1990; Combarro *et al.*, 1991).

La nature du milieu de conjugaison

Le transfert était beaucoup plus faible dans les milieux salins non nutritifs (EMA et EDS) que dans le milieu nutritifs (TSA ou TSB). Les raisons en sont évidentes, les milieux carencés en éléments nutritifs étant très défavorables au maintien de l'énergie et du métabolisme des cellules conjugantes, indispensables au processus de conjugaison (Wilkins, 1990; Willets & Wilkins, 1984).

On notera cependant que la fréquence du transfert des deux plasmides était différente dans les deux milieux non nutritifs, et systématiquement plus élevée dans le milieu DS que dans l'eau de mer EMA., quel qu'aient été la température de conjugaison et la consistance du milieu (liquide ou solide). Cette observation confirme bien les données préliminaires présentées dans notre précédent rapport : l'eau de mer est effectivement défavorable au processus de conjugaison, pour une raison indépendante de sa seule salinité (ou osmolarité). Cet aspect a été développé dans la suite du travail (voir Chapitre 3).

La consistance du milieu

Pour les deux plasmides, aussi bien à 20E qu'à 30E C, et que ce soit en milieu nutritif ou non, le transfert était significativement (2 à 5 fois) plus élevé sur les milieux solides que dans les mêmes milieux à l'état liquide. Ceci pourrait être dû à plusieurs facteurs, isolément ou simultanément: un meilleur maintien du contact physique entre cellules D et R, et/ou une aération plus efficace du milieu, par exemple.

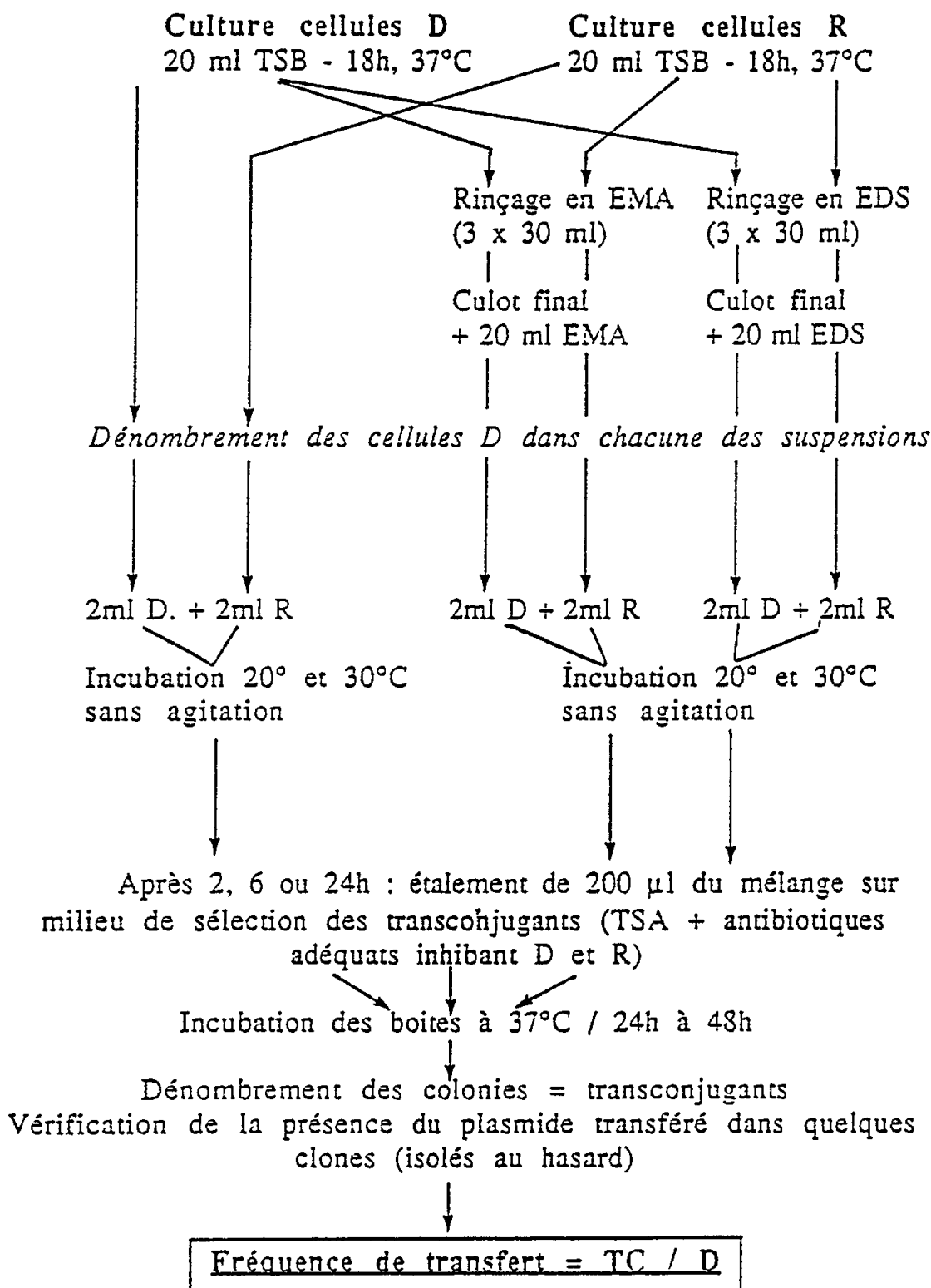


Figure 1. Tests de conjugaison, méthode A, en milieux liquides

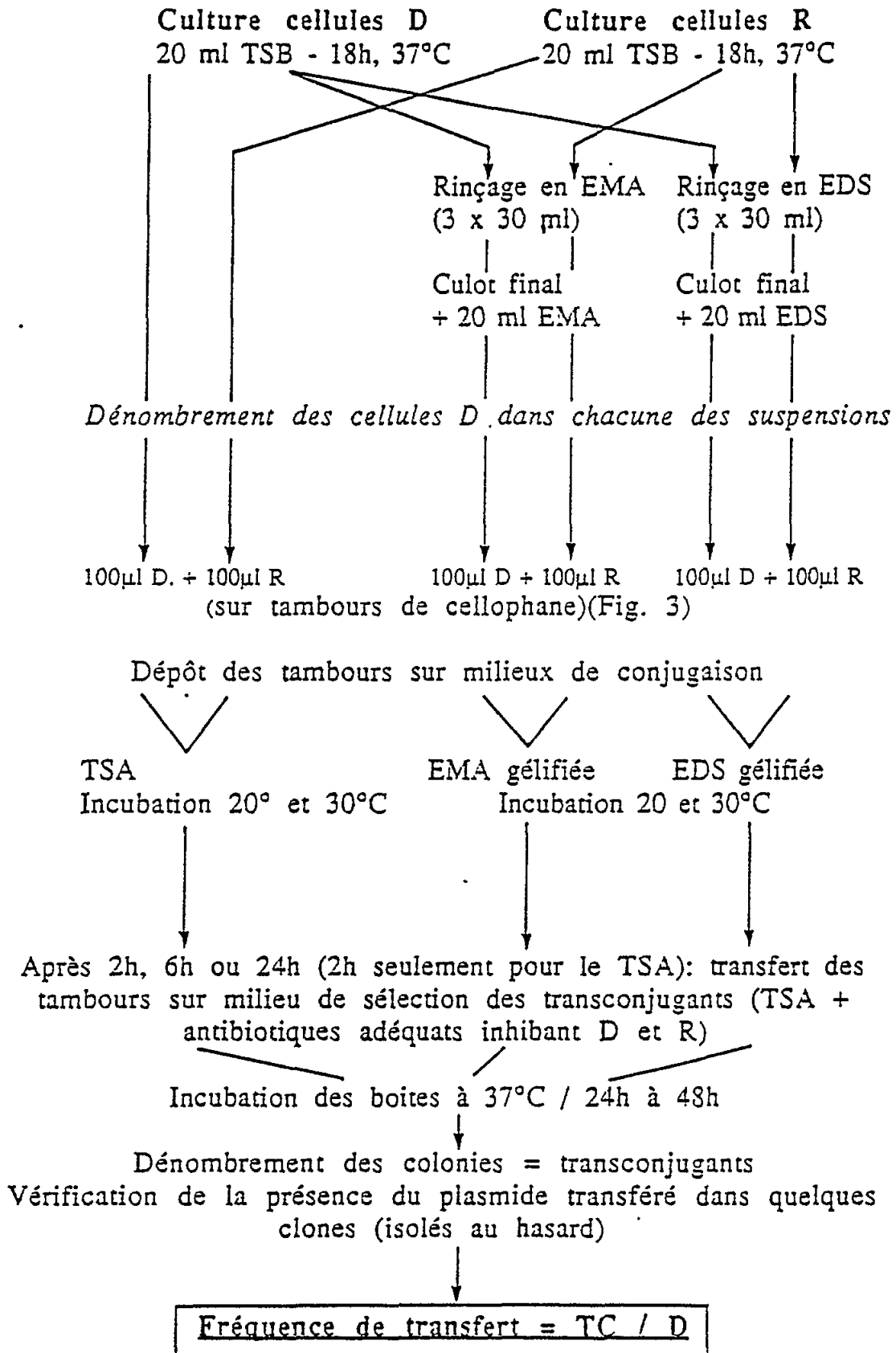


Figure 2. Tests de conjugaison, méthode B, en milieux solides

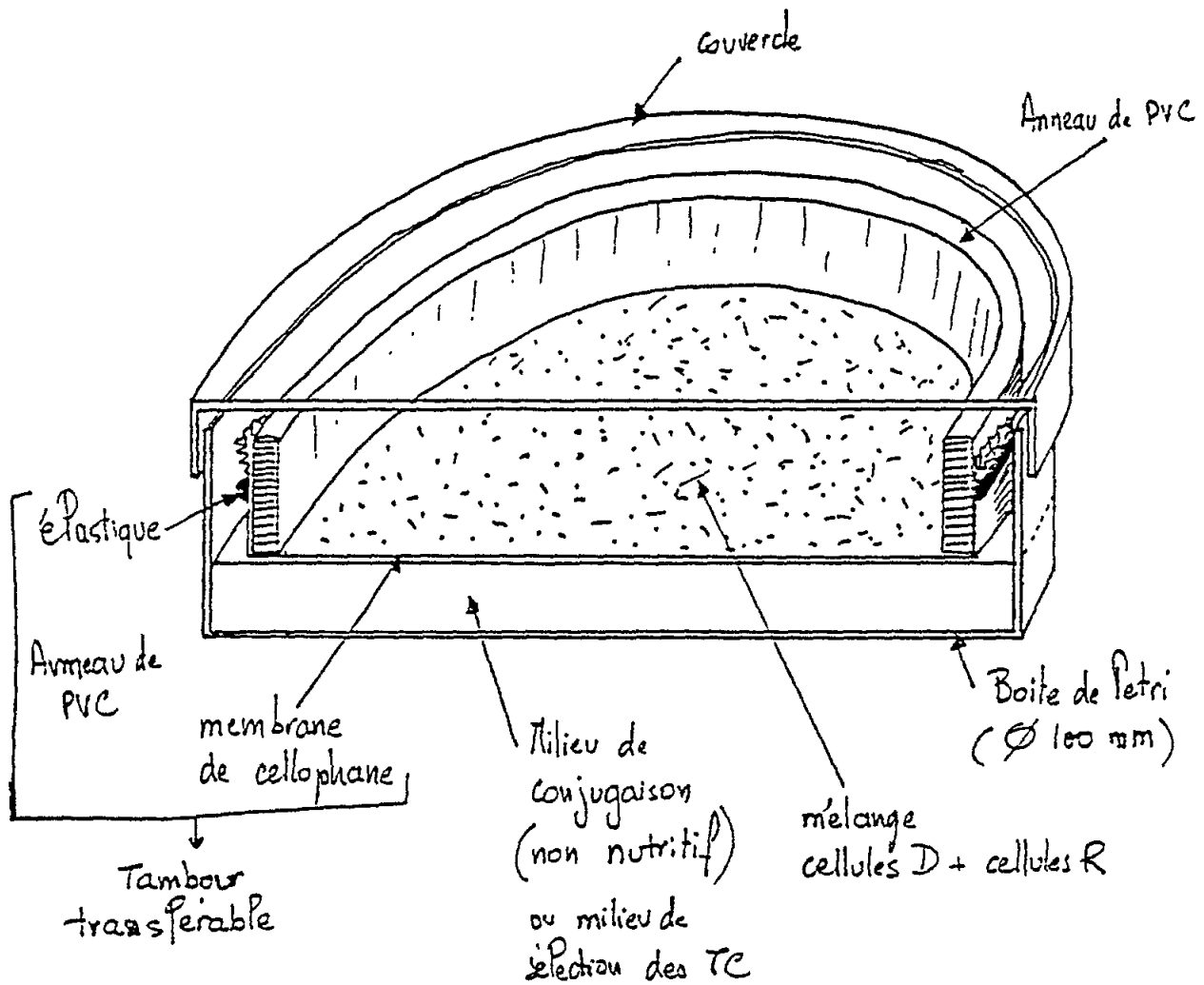


Figure 3. Coupe schématique du dispositif de transfert sur milieu non nutritif solide (eau de mer ou solution saline) utilisant des tambours de cellophane

Après la période de conjugaison (2, 6 ou 24 h), le tambour de cellophane est transféré sur milieu nutritif permettant la sélection des transconjugants (TSA + antibiotiques anti-D et anti-R). Les TC sont dénombrés sur la membrane après 24h d'incubation à 37° C.

Tableau 1A

Fréquence du transfert du plasmide RP4 d'*E. coli* LCB69 à *E. coli* LCB402, en milieu nutritif (=TSB, TSA) ou non nutritif (eau de mer artificielle=EMA et eau distillée salée=EDS), liquides ou solides

	Fréquence de transfert après ^a		
	2h	6h	24h
<u>Conjugaison à 30E C</u>			
Milieus liquides			
TSB	2,3 10 ⁻⁷	6,1 10 ⁻⁵	7,7 10 ⁻⁴
EMA	ND	ND	1,5 10 ⁻⁸
EDS	ND	9,8 10 ⁻⁹	8,4 10 ⁻⁸
Milieus solides			
TSA	8,1 10 ⁻⁶	-	-
EMA	ND	5,5 10 ⁻⁸	5,9 10 ⁻⁷
EDS	ND	8,1 10 ⁻⁸	2,7 10 ⁻⁷
<u>Conjugaison à 20E C</u>			
Milieus liquides			
TSB	2 10 ⁻⁸	1,2 10 ⁻⁵	1,1 10 ⁻³
EMA	ND	ND	1,8 10 ⁻⁹
EDS	ND	ND	2,4 10 ⁻⁸
Milieus solides			
TSA	1,4 10 ⁻⁷	-	-
EMA	ND	ND	3,4 10 ⁻⁸
EDS	ND	6,1 10 ⁻⁹	8,7 10 ⁻⁸

^a moyennes de deux ou trois mesures
 ND, non déterminé
 -, non réalisable.

Tableau 1B

Fréquence du transfert du plasmide pRAB15 d'*E. coli* 15 à *E. coli* 185, en milieu nutritif (=TSB, TSA) ou non nutritif (eau de mer artificielle=EMA et eau distillée salée=EDS), liquides ou solides

	Fréquence de transfert après ^a		
	2h	6h	24h
<u>Conjugaison à 30E C</u>			
Milieux liquides			
TSB	2,8 10 ⁻⁷	6,8 10 ⁻⁵	9,8 10 ⁻⁴
EMA	ND	ND	ND
EDS	ND	1,1 10 ⁻⁹	6,2 10 ⁻⁹
Milieux solides			
TSA	3,9 10 ⁻⁷	-	-
EMA	ND	ND	5,3 10 ⁻⁹
EDS	ND	1,5 10 ⁻⁸	9,4 10 ⁻⁸
<u>Conjugaison à 20E C</u>			
Milieux liquides			
TSB	6,7 10 ⁻⁸	2,3 10 ⁻⁶	1,1 10 ⁻⁵
EMA	ND	ND	2,1 10 ⁻⁹
EDS			
Milieux solides			
TSA	7,7 10 ⁻⁷	-	-
EMA	ND	ND	ND
EDS	ND	6,9 10 ⁻⁹	1,4 10 ⁻⁸

^a moyennes de deux mesures
 ND, non déterminé
 -, non réalisable.

Considérant l'ensemble de ces données, **nous avons donc choisi le protocole B comme protocole standard** et réalisé l'ensemble des autres tests de conjugaison selon cette méthode, à 30E C et sur milieux solides.

On remarquera également que, comme nous l'avons observé au cours de l'étude effectuée l'année précédente (Gauthier *et al.*, 1991b), le plasmide RP4 était plus fréquemment transféré que le plasmide pRAB15, dans toutes les conditions expérimentales testées.

3. INFLUENCE DES IONS DE L'EAU DE MER SUR LE TRANSFERT

Au cours de l'étude effectuée sur ce thème en 1990, nous avons observé une diminution très significative de la fréquence de transfert du plasmide RP4 dans les milieux (TSA ou TSB) préparés à l'eau de mer complète plutôt qu'à l'eau distillée salée par ajout de NaCl (à salinité égale). Ces résultats, considérés alors comme préliminaires, suggéraient fortement que certains éléments minéraux de l'eau de mer pouvaient intervenir en freinant ou, plus généralement, en défavorisant le transfert. A la réflexion, il était aussi possible que la diminution observée puisse découler d'une mauvaise survie des cellules D et/ou R dans l'eau de mer que dans l'eau distillée salée.

Ces deux hypothèses ont donc été testées, selon les méthodes décrites ci-après.

3.1 Matériels et méthodes

3.1.1. Méthode d'étude du transfert

Sur la base des résultats décrits dans le Chapitre 2, tous les tests de conjugaison effectués au cours de cette partie du travail ont été réalisés à l'aide de la méthode A, sur milieux solides (transferts sur cellophane). Les TC ont été dénombrés selon la technique décrite dans ce même chapitre.

3.1.2 Milieux de conjugaison

Le but des tests de conjugaison étant ici d'évaluer l'influence des cinq ions majeurs de l'eau de mer (Na^+ , K^+ , Mg^{++} , Cl^- , SO_4^{--}) sur la fréquence du transfert des deux plasmides en eau de mer artificielle, nous avons utilisé diverses formules de cette EMA dans laquelle chacun de ces ions a été supprimé spécifiquement. Pour chacun des sels présents en concentration $>1\text{g/l}$, l'ion complémentaire a été restitué au milieu par ajout d'une quantité (isomoléculaire) d'un sel d'un autre ion. Ces milieux de conjugaison étaient donc les suivants :

EMA standard (référence).

EMA sans Na^+ : NaCl et Na_2SO_4 remplacés par KCl et K_2SO_4 , NaF remplacé par HF.

EMA sans K^+ : KCl et KBr remplacés par NaCl et NaBr respectivement.

EMA sans Mg^{++} : MgCl_2 remplacé par 2 NaCl.

EMA sans Cl^- : NaCl, MgCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KCl, et SrCl remplacés respectivement par KCl, MgSO_4 , CaSO_4 et SrSO_4 .

EMA sans SO_4^{--} : Na_2SO_4 remplacé par K_2SO_4 .

3.1.3 Tests de survie des cellules D et R dans les milieux de conjugaison

L'évolution de la viabilité (évaluée en première approximation par mesure de la perte du pouvoir de culture) des quatre souches D et R dans l'eau de mer et dans l'eau distillée salée (à salinité égale = 35 g NaCl) a été analysée dans des microcosmes, au laboratoire.

Ces tests de survie ont été réalisés dans des flacons Erlenmeyer de 250 ml, contenant 100 ml d'eau de mer naturelle autoclavée (120E C, 15 min.) ou d'eau distillée salée (35g NaCl/l). Les cellules bactériennes, préalablement cultivées sur TSA, ont été incubées pendant 18h à 37E C en couillon TSB. Elles ont été lavées trois fois en eau distillée salée ou en eau de mer par centrifugation ($10000 \times g$, 10 min, 20E C) et le culot final a été suspendu dans 2 ml du même liquide que celui utilisé pour le rinçage. Les microcosmes ont été inoculés à l'aide de ces suspensions, jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire d'environ $1 \text{ à } 2 \cdot 10^6$ unités formant colonies (UFC)/ml, puis incubés à la température ambiante (20E à 22E C) à l'obscurité, sous agitation lente. Le nombre d'UFC dans chaque microcosme a ensuite été évalué séquentiellement en fonction du temps

d'incubation, par la technique de filtration sur membranes (Millipore, pores de 0,45 micron) et culture sur milieu Nutrient Agar (Difco) à 37E C pendant 24h.

Chaque test de survie a été effectué à deux reprises.

3.2 **Résultats - Discussion**

Le Tableau 2 présente les résultats des tests de conjugaison effectués dans les différentes formules d'EMA. Deux des observations précédentes réapparaissent ici : le plus faible transfert de pRAB15 et, pour le plasmide RP4, une apparition très tardive des TC (aucun après 6h d'incubation du mélange D+R).

Tableau 2

Fréquence du transfert des plasmides RP4 (*E. coli* LCB69 à *E. coli* LCB402) et pRAB15 (*E. coli* 15 à *E. coli* 185) après incubation pendant 6 et 24 heures à 30E C, en eau de mer artificielle contenant ou non des ions Na⁺, K⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻ et SO₄⁻.

Milieux de conjugaison	Fréquence de transfert des plasmides			
	RP4		pRAB15	
	6h	24h	6h	24h
EMA standard	ND	2,8 10 ⁻⁸	ND	ND
EMA sans Na ⁺	ND	1,9 10 ⁻⁸	ND	ND
EMA sans K ⁺	ND	3,1 10 ⁻⁸	ND	ND
EMA sans Mg ⁺⁺	ND	ND	ND	ND
EMA sans Cl ⁻	ND	3,4 10 ⁻⁸	ND	ND
EMA sans SO ₄ ⁻	ND	2,4 10 ⁻⁸	ND	ND

En ce qui concerne l'influence de la composition de l'EMA sur la fréquence du transfert, seule l'absence d'ions Mg⁺⁺ s'est traduite par une diminution du transfert, aucun TC n'ayant été détecté en EMA carencée en cet ion. Ce résultat semble donc en contradiction avec l'observation faite au Chapitre 2, qui montrait une augmentation de la fréquence du transfert de RP4 en milieu EDS qui ne contenait pas d'ions Mg⁺⁺.

Lorsque l'on compare le comportement des quatre souches d'*E. coli* utilisées comme donatrices (LCB69, 15) ou réceptrices (LCB402, 185) dans l'EMA standard et l'EDS (Figure 4, A et B), il apparait clairement que leur survie est très significativement plus importante dans l'eau distillée saline.

Ces deux ensembles de résultats suggèrent que la diminution des potentialités de transfert du plasmide RP4 dans l'eau de mer résulte surtout de la plus faible survie des cellules D et R dans ce milieu, et non à la présence de l'un de ses constituants minéraux. De très nombreux exemples de ce type ont été décrits dans les milieux naturels, où le potentiel de survie des cellules conjugantes est l'un des facteurs qui influencent le plus directement les transferts géniques conjugatifs (Wilkins, 1990; Fry & Day, 1990). Nous mêmes avons décrit une facilitation du transfert de RP4 d'*E. coli* à *E. coli* dans les sédiments marins en présence de glycine bêtaïne (Breittmayer & Gauthier, 1990), osmolyte qui améliore et prolonge considérablement la survie de cette bactérie dans l'eau de mer (Munro *et al.*, 1989).

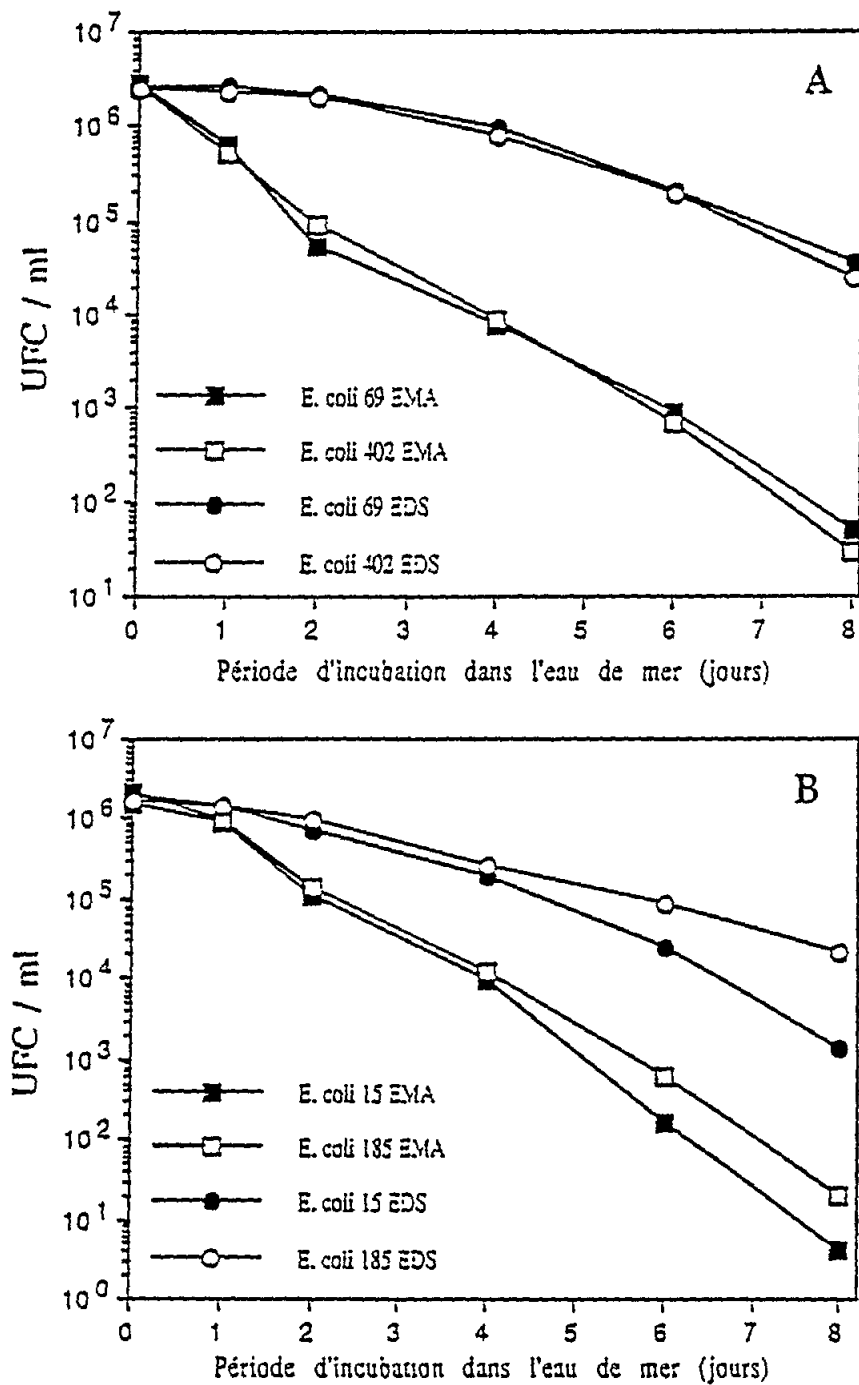


Figure 4. Variation du nombre de cellules cultivables dans l'eau de mer artificielle (EMA) et dans l'eau distillée salée (NaCl, 35 g/l) (EDS) des souches d'*E. coli* LC869 et LC8402 (A), et *E. coli* 15 et 185 (B), en fonction du temps d'incubation dans ces milieux

4. INFLUENCE DE LA REGULATION OSMOTIQUE SUR LE TRANSFERT

Les travaux effectués par ailleurs dans notre Laboratoire, ont montré que le maintien de la viabilité des cellules d'*E. coli* dans l'eau de mer est fortement influencé par la manière dont elles surmontent le choc hyperosmotique subi lors du transfert dans cette eau (Gauthier *et al.*, 1987; Munro *et al.*, 1989). Ces cellules acquièrent une grande résistance à l'eau de mer lorsqu'elles peuvent restaurer leur équilibre osmotique au moment du choc, grâce à divers mécanismes bien décrits par ailleurs (voir revues dans: Booth *et al.*, 1988; Csonka, 1989).

Nous avons récemment établi que l'un des événements les plus précoces qui influence le devenir des entérobactéries en mer et oriente leur évolution ultérieure dans ce milieu, est **l'accumulation spécifique de glutamate de potassium** (Gauthier *et al.*, 1991a). Cet acide aminé permet aux cellules de surmonter le choc osmotique subi lors de leur arrivée en mer et maintient leur homéostasie à moyen terme, ce qui leur laisse éventuellement le temps d'activer et de faire fonctionner des systèmes de régulation osmotique plus pérennes comme le transport ou la synthèse intracellulaire d'osmolytes compatibles (tréhalose, glycine bêtaïne, proline, etc.). Ce mécanisme protecteur initial dépend évidemment de la présence de substrats organiques assimilables, indispensables au maintien du métabolisme énergétique, et de glutamate (ou de ses précurseurs, le 2-oxoglutarate et la glutamine) dans le milieu.

Nous avons donc proposé d'examiner l'influence de cette accumulation de K⁺glutamate sur la fréquence du transfert des plasmides RP4 et pRAB15 d'*E. coli* à *E. coli* dans l'eau distillée salée et dans l'eau de mer.

4.1 Matériels et méthodes

4.1.1 Tests de conjugaison

Le transfert des plasmides RP4 d'*E. coli* LCB69 à *E. coli* LCB402, et pRAB15 d'*E. coli* 15 à *E. coli* 185, a été analysé selon les mêmes techniques que précédemment, dans l'eau de mer et l'eau distillée salée contenant ou non du glutamate de potassium (10mM).

4.1.2. Dosage du glutamate

L'accumulation de glutamate par les cellules D et R dans les milieux de conjugaison, a été vérifiée par mesure directe de la concentration intracellulaire de cet acide aminé au moment de la détection des TC.

Cette mesure a été faite en utilisant le test enzymatique développé par Beutler et Michal (1974). Les résultats ont été exprimés en micromoles de glutamate par gramme de cellules (poids sec).

4.2 Résultats - Discussion

L'addition de glutamate de potassium à l'EMA ou à l'EDS utilisées pour la conjugaison augmente la fréquence de transfert de RP4 d'environ 50 fois dans l'EMA et d'environ 100 fois dans l'EDS. Cette augmentation est d'environ 70 fois pour le transfert de pRAB15 (Tableau 3).

Tableau 3

Fréquence du transfert des plasmides RP4 (*E. coli* LCB69 à *E. coli* LCB402) et pRAB15 (*E. coli* 15 à *E. coli* 185) après 24h d'incubation à 30E C, dans l'eau de mer artificielle et l'eau distillée salée contenant ou non du glutamate de potassium (10mM)

Milieux de conjugaison	Fréquence de transfert des plasmides	
	RP4	pRAB15
EMA	3,4 10 ⁻⁸	ND
EMA + glutamate	6,7 10 ⁻⁶	2,1 10 ⁻⁸
EDS	6,5 10 ⁻⁷	1,6 10 ⁻⁹
EDS + glutamate	8,3 10 ⁻⁴	8,4 10 ⁻⁸

Dans ces deux milieux, les souches D et R utilisées ont effectivement accumulé le glutamate présent dans l'eau (Tableau 4), de manière analogue; il s'agit là d'une observation importante puisque l'on sait que, dans l'eau de mer, le transport transmembranaire de nombreux substrats nutritifs est fortement inhibé, quel que soit le système de transport impliqué (translocation de groupe, protéines affines, ion co-transport) (Roth *et al.*, 1985).

Tableau 4

Concentration intracellulaire de glutamate (micromoles/g de cellules sèches) dans les cellules d'*E. coli* LCB69, LCB402, 15 et 185 incubées pendant 24h à 30E C, dans l'eau de mer artificielle (=EMA) ou l'eau distillée salée (=EDS) pour les tests de conjugaison en présence ou non de glutamate de potassium (10mM) (voir Tableau 3)

Milieu de conjugaison	Souches <i>E. coli</i>			
	D		R	
	LCB69	15	LCB402	185
EMA	132	65	89	102
EMA + glutamate	4520	3690	5200	2110
EDS	95	45	54	89
EDS + glutamate	5230	4560	5600	3210

Il apparait donc que le glutamate de potassium, dont on connaît le rôle dans la régulation osmotique des entérobactéries en situation de stress hyperosmotique (Booth *et al.*, 1988; Csonka, 1989; Measures, 1975), améliore très significativement le potentiel de transfert conjugal de plasmides chez *E. coli* au moins. Il s'agit là d'une preuve supplémentaire de l'importance des processus de régulation osmotique pour l'adaptation de cette bactérie (et vraisemblablement des autres entérobactéries qui possèdent des mécanismes de régulation osmotique analogues, dont les *Salmonella*) dans l'environnement marin. Cet acide aminé peut jouer un rôle plus important encore sur ce plan que la glycine bêtaïne puisqu'il intervient plus précocement dans la réponse de ces bactéries au choc osmotique, en qualité de contre-ion du potassium puis de signal intracellulaire déclenchant le transport et/ou la synthèse des osmolytes compatibles (glycine bêtaïne, tréhalose, proline) (Booth & Higgins, 1990).

5. CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats obtenus au cours de ce complément d'étude sur les transferts de plasmides en milieu marin ont apporté quelques éléments qui permettent de mieux comprendre et interpréter les résultats précédemment décrits:

- Le transfert conjugatif de plasmides R entre souches d' *Escherichia coli* est 1000 à 10000 fois plus rare dans l'eau de mer oligotrophe que dans un milieu nutritif bactériologique comme le bouillon Trypticase Soja. Cette observation est très classique et traduit l'influence primordiale de l'état métabolique et énergétique des cellules (surtout donatrices) lors du processus de conjugaison.
- Pour la même raison, le transfert est toujours plus fréquent à 30E C qu'à 20E C.
- Ce transfert est plus difficile en eau de mer que dans une simple solution de NaCl en eau distillée à même pression osmotique. Cet effet défavorable est, au moins en partie, dû à la moins bonne survie dans l'eau de mer des cellules donatrices et réceptrices. Par contre, les ions Mg++ semblent favoriser ce transfert dans l'eau de mer.
- Quel que soit le milieu de conjugaison (nutritif ou non), le transfert est plus élevé sur milieux solides qu'en milieux liquides. Sur cette base, nous préconisons donc l'utilisation d'un protocole standard de conjugaison applicable à tous les milieux, dont les eaux oligotrophes, après leur solidification par l'agar ou d'autres agents gélifiants non nutritifs. De ce point de vue, la méthode pourrait être améliorée en effectuant le transfert sur eau de mer solidifiée par le gel de silice, substrat plus neutre et exempt de toute trace de matières organiques.
- Le transfert conjugatif entre souches d' *E. coli* est considérablement facilité lorsque le milieu de conjugaison contient des osmolytes organiques qui permettent aux cellules D et R de mieux surmonter le choc hyperosmotique subi lors du transfert à l'eau de mer. Cette observation avait déjà été faite pour la glycine bétaine (Breitmayer & Gauthier, 1990), osmolyte majeur chez les entérobactéries (LeRudulier & Bouillard, 1983). La présente étude montre qu'il en est de même pour le **glutamate** (plus précisément son sel de potassium), qui intervient plus précocement au cours de la réponse au stress osmotique chez les entérobactéries.

6. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEUTLER, H.O., & G. MICHAL (1974). Colorimetric method for the determination of L-glutamic acid in foodstuffs, p. 1708-1713. In: H.U. Bergmeyer (ed.), *Methods of enzymatic analysis*. Academic Press Inc., New York.
- BOOTH, I.R., J. CAIRNEY, L. SUTHERLAND, & C.F. HIGGINS (1988). Enteric bacteria and osmotic stress : and integrated homeostatic system. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, p. 35S-49S.
- BOOTH, I.R., & C.F. HIGGINS (1990). Enteric bacteria and osmotic stress : intracellular potassium glutamate as a secondary signal of osmotic stress? *FEMS Microbiol. Rev.* **75** : 239-246.
- BREITMAYER, V.A. & M.J. GAUTHIER (1990). Influence of glycine bétaine on the transfer of plasmid RP4 between *Escherichia coli* strains in marine sediments. *Letts. Appl. Microbiol.*, **10** : 65-68.
- CHABBERT, Y.A. (1963). L'antibiogramme : sensibilité et résistance des bactéries aux antibiotiques. Coll. "*Techniques de base*" Ed. de la Tourelle, Saint-Mandé, 257 pp.

- COMBARRO M.P., M.J. GAUTHIER & V.A. BREITTMAYER, (1991). Conjugative transfer of R plasmids between *Escherichia coli* strains on saline selective media and in seawater. *J. Microbiol. Meth.* sous presse.
- COURVALIN, P., F. GOLDSTEIN, A. PHILIPPON & J. SIROT (1985). *L'antibiogramme*. MPC-Videom Ed., Paris.
- CSONKA, L.N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* **53** : 121-147.
- FRY, J.C. & M.J. DAY (1990). Plasmid transfer in the epilithon, pp. 55-80. In *Bacterial genetics in natural environments*, J.C. Fry & M.J. Day (eds), Chapman and Hall, London.
- GAUTHIER, M.J., P.M. MUNRO & S. MOHADJER (1987). Influence of salts and sodium chloride on recovery of *Escherichia coli* from seawater. *Curr. Microbiol.*, **15** : 5-10.
- GAUTHIER, M.J., G.N. FLATAU, D. LERUDULIER, R.L. CLEMENT & M.P. COMBARRO-COMBARRO (1991). Intracellular accumulation of potassium and glutamate enhances survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57** : 272-276.
- GAUTHIER, M.J., Y. MARTIN & V. TORREGROSSA (1991). *Etude expérimentale du transfert de gènes plasmidiques entre entérobactéries dans l'eau de mer, les sédiments et le tractus digestif des invertébrés marins*. Rapport final Contrat FRA 47(K). 46 pp.
- LERUDULIER, D., & L. BOUILLARD (1983). Glycine bêtaïne, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46** : 152-159.
- MEASURES, J.C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophylic bacteria. *Nature (London)*, **257** : 398-400.
- 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.
- ROTH, W.G., M.P. LECKIE & D.N. DIETZLER (1985). Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **126** : 434-441.
- WILKINS, B.M. (1990). Factors influencing the dissemination of DNA by bacterial conjugation, pp.22-30. In: *Bacterial genetics in natural environments*, J.C. Fry & M.J. Day (eds), Chapman and Hall, London.
- WILLETTS, N., & B.M. WILKINS (1984). Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiol. Rev.*, **48** : 24-41.
- ZHOU, C., Y. YANG & A.Y. YONG (1990). Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques*, **8** : 172-173.

PUBLICATIONS OF THE MAP TECHNICAL REPORTS SERIES

1. UNEP/IOC/WMO: Baseline studies and monitoring of oil and petroleum hydrocarbons in marine waters (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens, 1986 (96 pages) (parts in English, French or Spanish only).
2. UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of metals, particularly mercury and cadmium, in marine organisms (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens, 1986 (220 pages) (parts in English, French or Spanish only).
3. UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of DDT, PCBs and other chlorinated hydrocarbons in marine organisms (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens, 1986 (128 pages) (parts in English, French or Spanish only).
4. UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine organisms and their populations (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens, 1986 (118 pages) (parts in English, French or Spanish only).
5. UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine communities and ecosystems (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens, 1986 (146 pages) (parts in English or French only).
6. UNEP/IOC: Problems of coastal transport of pollutants (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (English only).
7. UNEP/WHO: Coastal water quality control (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parts in English or French only).
8. UNEP/IAEA/IOC: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens, 1986 (42 pages) (parts in English or French only).
8. Add. UNEP: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). Addendum, Greek Oceanographic Cruise 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (English only).
9. UNEP: Co-ordinated Mediterranean pollution monitoring and research programme (MED POL - PHASE I). Final report, 1975-1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986 (276 pages) (English only).
10. UNEP: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G). Final reports on projects dealing with toxicity (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987 (118 pages) (English only).
11. UNEP: Rehabilitation and reconstruction of Mediterranean historic settlements. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986 (158 pages) (parts in English or French only).
12. UNEP: Water resources development of small Mediterranean islands and isolated coastal areas. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parts in English or French only).

13. UNEP: Specific topics related to water resources development of large Mediterranean islands. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parts in English or French only).
14. UNEP: Experience of Mediterranean historic towns in the integrated process of rehabilitation of urban and architectural heritage. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (500 pages) (parts in English or French only).
15. UNEP: Environmental aspects of aquaculture development in the Mediterranean region. Documents produced in the period 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (101 pages) (English only).
16. UNEP: Promotion of soil protection as an essential component of environmental protection in Mediterranean coastal zones. Selected documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (424 pages) (parts in English or French only).
17. UNEP: Seismic risk reduction in the Mediterranean region. Selected studies and documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (247 pages) (parts in English or French only).
18. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by mercury and mercury compounds. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987 (354 pages) (English and French).
19. UNEP/IOC: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by petroleum hydrocarbons. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988 (130 pages) (English and French).
20. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and health effects (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988 (156 pages) (English only).
21. UNEP/UNESCO/FAO: Eutrophication in the Mediterranean Sea: Receiving capacity and monitoring of long-term effects. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988 (200 pages) (parts in English or French only).
22. UNEP/FAO: Study of ecosystem modifications in areas influenced by pollutants (Activity I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parts in English or French only).
23. UNEP: National monitoring programme of Yugoslavia, Report for 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (English only).
24. UNEP/FAO: Toxicity, persistence and bioaccumulation of selected substances to marine organisms (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parts in English or French only).
25. UNEP: The Mediterranean Action Plan in a functional perspective: A quest for law and policy. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (English only).

26. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean Region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (English only).
27. UNEP: Implications of expected climate changes in the Mediterranean Region: An overview. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (English only).
28. UNEP: State of the Mediterranean marine environment. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (English only).
29. UNEP: Bibliography on effects of climatic change and related topics. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (English only).
30. UNEP: Meteorological and climatological data from surface and upper measurements for the assessment of atmospheric transport and deposition of pollutants in the Mediterranean Basin: A review. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (English only).
31. UNEP/WMO: Airborne pollution of the Mediterranean Sea. Report and proceedings of a WMO/UNEP Workshop. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parts in English or French only).
32. UNEP/FAO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parts in English or French only).
33. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of organotin compounds as marine pollutants in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (English and French).
34. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by cadmium and cadmium compounds. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (English and French).
35. UNEP: Bibliography on marine pollution by organotin compounds. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (English only).
36. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (French only).
37. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with eutrophication and plankton blooms (Activity H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parts in English or French only).
38. UNEP: Common measures adopted by the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (English, French, Spanish and Arabic).
39. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organohalogen compounds. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (English and French).
40. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activities H,I and J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (English and French).
41. UNEP: Wastewater reuse for irrigation in the Mediterranean region. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (English and French).

42. UNEP/IUCN: Report on the status of Mediterranean marine turtles. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (English and French).
43. UNEP/IUCN/GIS Posidonia: Red Book "Gérard Vuignier", marine plants, populations and landscapes threatened in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (French only).
44. UNEP: Bibliography on aquatic pollution by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (English only).
45. UNEP/IAEA: Transport of pollutants by sedimentation: Collected papers from the first Mediterranean Workshop (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 December 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (English only).
46. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and rotavirus-induced gastroenteritis among bathers (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46, UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (English only).
47. UNEP: Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II workshop on jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parts in English or French only).
48. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parts in English or French only).
49. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants. Survival of pathogens. Final reports on research projects (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991 (71 pages) (parts in English or French only).
50. UNEP: Bibliography on marine litter. MAP Technical Reports Series No. 50. UNEP, Athens, 1991 (62 pages) (English only).
51. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with mercury, toxicity and analytical techniques. MAP Technical Reports Series No. 51. UNEP, Athens, 1991 (166 pages) (parts in English or French only).
52. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with bioaccumulation and toxicity of chemical pollutants. MAP Technical Reports Series No. 52. UNEP, Athens, 1991 (86 pages) (parts in English or French only).
53. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on epidemiological study on bathers from selected beaches in Malaga, Spain (1988-1989). MAP Technical Reports Series No. 53. UNEP, Athens, 1991 (127 pages) (English only).
54. UNEP/WHO: Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants (Activity A): Final reports on selected microbiological projects. MAP Technical Reports Series No. 54. UNEP, Athens, 1991 (83 pages) (English only).
55. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K): Final report on project on survival of pathogenic organisms in seawater. MAP Technical Reports Series No. 55. UNEP, Athens, 1991 (95 pages) (English only).
56. UNEP/IOC/FAO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by persistent synthetic materials which may float, sink or remain in suspension. MAP Technical Reports Series No. 56. UNEP, Athens, 1991 (113 pages) (English and French).

57. UNEP/WHO: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G): Final reports on projects dealing with carcinogenicity and mutagenicity. MAP Technical Reports Series No. 57. UNEP, Athens, 1991 (59 pages) (English only).
58. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 58. UNEP, Athens, 1991 (122 pages) (English and French).
59. UNEP/FAO/IAEA: Proceedings of the FAO/UNEP/IAEA Consultation Meeting on the Accumulation and Transformation of Chemical contaminants by Biotic and Abiotic Processes in the Marine Environment (La Spezia, Italy, 24-28 September 1990), edited by G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 59. UNEP, Athens, 1991 (392 pages) (English only).
60. UNEP/WHO: Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants (Activity A): Final reports on selected microbiological projects (1987-1990). MAP Technical Reports Series No. 60. UNEP, Athens, 1991 (76 pages) (parts in English or French only).
61. UNEP: Integrated Planning and Management of the Mediterranean Coastal Zones. Documents produced in the first and second stage of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 61. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1991 (437 pages) (parts in English or French only).
62. UNEP/IAEA: Assessment of the State of Pollution of the Mediterranean Sea by Radioactive Substances. MAP Technical Reports Series No. 62, UNEP, Athens, 1992 (133 pages) (English and French).

PUBLICATIONS "MAP TECHNICAL REPORTS SERIES"

1. PNUE/COI/OMM: Etudes de base et surveillance continue du pétrole et des hydrocarbures contenus dans les eaux de la mer (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens, 1986 (96 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
2. PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue des métaux, notamment du mercure et du cadmium, dans les organismes marins (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens, 1986 (220 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
3. PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue du DDT, des PCB et des autres hydrocarbures chlorés contenus dans les organismes marins (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens, 1986 (128 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
4. PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les organismes marins et leurs peuplements (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens, 1986 (118 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
5. PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les communautés et écosystèmes marins (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens, 1986 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
6. PNUE/COI: Problèmes du transfert des polluants le long des côtes (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (anglais seulement).
7. PNUE/OMS: Contrôle de la qualité des eaux côtières (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. PNUE/AIEA/COI: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens, 1986 (42 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. PNUE: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED Add. POL VIII). Addendum, Croisière Océanographique de la Grèce 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (anglais seulement).
9. PNUE: Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée (MED POL -PHASE I). Rapport final, 1975-1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986 (276 pages) (anglais seulement).
10. PNUE: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la toxicité (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987 (118 pages) (anglais seulement).
11. PNUE: Réhabilitation et reconstruction des établissements historiques méditerranéens. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986 (158 pages) (parties en anglais ou français seulement).
12. PNUE: Développement des ressources en eau des petites îles et des zones côtières isolées méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).

13. PNUE: Thèmes spécifiques concernant le développement des ressources en eau des grandes îles méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).
14. PNUE: L'expérience des villes historiques de la Méditerranée dans le processus intégré de réhabilitation du patrimoine urbain et architectural. Documents établis lors de la seconde phase de l'Action prioritaire (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (500 pages) (parties en anglais ou français seulement).
15. PNUE: Aspects environnementaux du développement de l'aquaculture dans la région méditerranéenne. Documents établis pendant la période 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (101 pages) (anglais seulement).
16. PNUE: Promotion de la protection des sols comme élément essentiel de la protection de l'environnement dans les zones côtières méditerranéennes. Documents sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (424 pages) (parties en anglais ou français seulement).
17. PNUE: Réduction des risques sismiques dans la région méditerranéenne. Documents et études sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
18. PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le mercure et les composés mercuriels. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987 (354 pages) (anglais et français).
19. PNUE/COI: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures de pétrole. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988 (130 pages) (anglais et français).
20. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et les effets sur la santé (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988 (156 pages) (anglais seulement).
21. PNUE/UNESCO/FAO: Eutrophisation dans la mer Méditerranée: capacité réceptrice et surveillance continue des effets à long terme. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988 (200 pages) (parties en anglais ou français seulement).
22. PNUE/FAO: Etude des modifications de l'écosystème dans les zones soumises à l'influence des polluants (Activité I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
23. PNUE: Programme national de surveillance continue pour la Yougoslavie, Rapport pour 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (anglais seulement).
24. PNUE/FAO: Toxicité, persistance et bioaccumulation de certaines substances vis-à-vis des organismes marins (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parties en anglais ou français seulement).

25. PNUE: Le Plan d'action pour la Méditerranée, perspective fonctionnelle; une recherche juridique et politique. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (anglais seulement).
26. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (anglais seulement).
27. PNUE: Implications des modifications climatiques prévues dans la région méditerranéenne: une vue d'ensemble. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (anglais seulement).
28. PNUE: Etat du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (anglais seulement).
29. PNUE: Bibliographie sur les effets des modifications climatiques et sujets connexes. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (anglais seulement).
30. PNUE: Données météorologiques et climatologiques provenant de mesures effectuées dans l'air en surface et en altitude en vue de l'évaluation du transfert et du dépôt atmosphériques des polluants dans le bassin méditerranéen: un compte rendu. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (anglais seulement).
31. PNUE/OMM: Pollution par voie atmosphérique de la mer Méditerranée. Rapport et actes des Journées d'étude OMM/PNUE. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
32. PNUE/FAO: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parties en anglais ou français seulement).
33. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation des composés organostanniques en tant que polluants du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (anglais et français).
34. PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le cadmium et les composés de cadmium. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (anglais et français).
35. PNUE: Bibliographie sur la pollution marine par les composés organostanniques. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (anglais seulement).
36. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (français seulement).
37. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche consacrés à l'eutrophisation et aux efflorescences de plancton (Activité H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parties en anglais ou français seulement).
38. PNUE: Mesures communes adoptées par les Parties Contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (anglais, français, espagnol et arabe).
39. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution par les composés organohalogénés. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (anglais et français).

40. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activités H, I et J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (anglais et français).
41. PNUE: Réutilisation agricole des eaux usées dans la région méditerranéenne. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (anglais et français).
42. PNUE/UICN: Rapport sur le statut des tortues marines de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (anglais et français).
43. PNUE/UICN/GIS Posidonie: Livre rouge "Gérard Vuignier" des végétaux, peuplements et paysages marins menacés de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (français seulement).
44. PNUE: Bibliographie sur la pollution aquatique par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (anglais seulement).
45. PNUE/AIEA: Transfert des polluants par sédimentation: Recueil des communications présentées aux premières journées d'études méditerranéennes (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 décembre 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (anglais seulement).
46. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et la gastroentérite provoquée par le rotavirus entre les baigneurs (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46. UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (anglais seulement).
47. PNUE: Les proliférations de méduses en Méditerranée. Actes des 11èmes journées d'étude sur les méduses en mer Méditerranée. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parties en anglais ou français seulement).
48. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parties en anglais ou français seulement).
49. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques. Survie des Pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche (activité K). MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991 (71 pages) (parties en anglais ou français seulement).
50. PNUE: Bibliographie sur les déchets marins. MAP Technical Reports Series No. 50. UNEP, Athens, 1991 (62 pages) (anglais seulement).
51. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant du mercure, de la toxicité et des techniques analytiques. MAP Technical Reports Series No. 51. UNEP, Athens, 1991 (166 pages) (parties en anglais ou français seulement).
52. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant de la bioaccumulation et de la toxicité des polluants chimiques. MAP Technical Reports Series No. 52. UNEP, Athens, 1991 (86 pages) (parties en anglais ou français seulement).
53. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur l'étude épidémiologique menée parmi les baigneurs de certaines plages à Malaga, Espagne (1988-1989). MAP Technical Reports Series No. 53. UNEP, Athens, 1991 (127 pages) (anglais seulement).

54. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continue des polluants marins (Activité A): Rapports finaux sur certains projets de nature microbiologique. MAP Technical Reports Series No. 54. UNEP, Athens, 1991 (83 pages) (anglais seulement).
55. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Rapport final sur le projet sur la survie des microorganismes pathogènes dans l'eau de mer. MAP Technical Reports Series No. 55. UNEP, Athens, 1991 (95 pages) (anglais seulement).
56. PNUE/COI/FAO: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les matières synthétiques persistantes qui peuvent flotter, couler ou rester en suspension. MAP Technical Reports Series No. 56. UNEP, Athens, 1991 (113 pages) (anglais et français).
57. PNUE/OMS: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la cancérogénicité et la mutagénicité. MAP Technical Reports Series No. 57. UNEP, Athens, 1991 (59 pages) (anglais seulement).
58. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 58. UNEP, Athens, 1991 (122 pages) (anglais et français).
59. PNUE/FAO/AIEA: Actes de la réunion consultative FAO/PNUE/AIEA sur l'accumulation et la transformation des contaminants chimiques par les processus biotiques et abiotiques dans le milieu marin (La Spezia, Italie, 24-28 septembre 1990), publié sous la direction de G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 59. UNEP, Athens, 1991 (392 pages) (anglais seulement).
60. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continue des polluants marins (Activité A): Rapports finaux sur certains projets de nature microbiologique (1987-1990). MAP Technical Reports Series No. 60. UNEP, Athens, 1991 (76 pages) (parties en anglais ou français seulement).
61. PNUE: Planification intégrée et gestion des zones côtières méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première et de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 61. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1991 (437 pages) (parties en anglais ou français seulement).
62. PNUE/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les substances radioactives. MAP Technical Reports Series No. 62, UNEP, Athens, 1992 (133 pages) (anglais et français).



Issued and printed by:

Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme

Additional copies of this and other publications issued by
the Mediterranean Action Plan of UNEP can be obtained from:

Coordinating Unit for the Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
P.O.Box 18019
11610 Athens
GREECE



Publié et imprimé par:

Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l'Environnement

Des exemplaires de ce document ainsi que d'autres
publications du Plan d'action pour la Méditerranée
du PNUE peuvent être obtenus de:

Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l'Environnement
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
B.P. 18019
11610 Athènes
GRECE