

EXPÉRIMENTATION EN CAPTEUR À MEMBRANE. RÉSISTANCE AU CUIVRE D'*ESCHERICHIA COLI* DANS LES EAUX INTERSTITIELLES DE SÉDIMENTS MARINS : RÔLE DES PROTÉINES

M. RICHOU¹, C. LE POUPON¹, D. FEVRIER¹, C. MIRRE², J. BENAÏM¹

¹ Laboratoire de Chimie Marine des Organométalliques, Université de Toulon et du Var, 83957 La Garde, France

² Laboratoire de Biologie de la différenciation cellulaire L.A. CNRS n°179, case 901, 13288 Marseille cedex 9, France

Dans les eaux naturelles, les métaux Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ sous leur forme libre sont reconnus toxiques pour les systèmes biologiques (HART, 1981).

Ainsi pour les bactéries, les ions Cu²⁺ sont indispensables dans leur métabolisme mais peuvent causer des effets cellulaires toxiques si le niveau des ions libres Cu²⁺ n'est pas contrôlé. Plusieurs types de mécanismes de résistance au Cu²⁺ ont été recensés (TREVORS, 1987; SILVER et WALDERHAUG, 1992).

L'accumulation - séquestration du cuivre par des protéines membranaires externes et périplasmiques a été proposée comme mécanisme de résistance pour un certain nombre de souches bactériennes afin d'abaisser le niveau intracellulaire d'un grand flux de Cu²⁺. Le plasmide portant l'opéron résistant au cuivre consiste en quatre gènes cop ABCD, opérant sous le contrôle d'un promoteur cuivre (MELLANO et COOKSEY, 1988).

La présence de formes bactériennes hautement résistantes à des concentrations élevées de métaux lourds est commune dans la nature au voisinage de déchets industriels. Ces souches contiennent des mégaplasmides. *Alcaligenes eutrophus* CH 34 contient le plasmide pMOL 30 (238 Kb) qui dirige la résistance aux métaux lourds Pb²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺. L'intérêt de ces plasmides est de pouvoir se transmettre facilement d'une souche à l'autre (MERGEAY et NIES, 1985).

Nous avons montré (RICHOU *et al.*, 1992) les possibilités de survie en capteur à membrane d'*Escherichia coli*, dans les eaux interstitielles de sédiments marins d'un port contenant des taux très élevés de métaux lourds.

Le but de ce travail a été de déterminer si la forme de résistance aux métaux Cu²⁺ d'*Escherichia coli* est due essentiellement à un mécanisme d'accumulation qui lui est propre ou/et si la possibilité de transmission de plasmide de bactéries du sédiment marin d'une souche à l'autre existe, ce qui augmenterait sa résistance.

Pour cela, les bactéries *Escherichia coli* sont placées dans un capteur à membrane. Des expériences en écosystème contrôlé sont effectuées dans des sédiments marins méditerranéens chargés en métaux lourds.

La résistance au cuivre d'*Escherichia coli* est testée. Pour cette étude, nous avons effectué des cultures cellulaires d'*Escherichia coli* témoins et après expérimentation *in situ*. Ces cultures se déroulent en absence et en présence de cuivre jusqu'à 4 mM pendant 20 heures.

A partir de cellules entières, de cellules lysées et de cellules fractionnées, les protéines totales, solubles et insolubles sont identifiées par leur masse molaire par électrophorèse de type LAEMMLI et quantifiées par la méthode de BRADFORD. Le dosage du Cu²⁺ libre, complexé et/ou accumulé par les différents types de protéines est effectué par Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (D.P.A.S.V.) par la méthode des ajouts dosés. Le nombre de sites de fixation du Cu²⁺ des différents types de protéines est ainsi déterminé en µmoles d'équivalent Cu²⁺ par µg de protéines en solution.

L'ensemble de ces résultats semble prouver l'existence chez *Escherichia coli* d'un mode de résistance au Cu²⁺ par accumulation par les protéines qui lui est propre et une augmentation de cette résistance après contact avec le milieu naturel.

REFERENCES

- HART B.T., 1981. Trace metal complexing capacity of natural waters : a review. *Environmental Technology letters*, 2 : 95-110.
- MELLANO M.A. et COOKSEY D.A., 1988. Induction of the copper resistance operon from *Pseudomonas syringae*. *J. Bacteriol.*, 170 : 4399-4401.
- MERGEAY M. et NIES D., 1985. *Alcaligenes eutrophus* CH34 Is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *J. Bacteriol.*, 162 : 328-334.
- RICHOU M., MIRRE C., BENAMOÛ C., MOUREAU Z., BENAÏM J., 1992. Expérimentation en capteur à membrane. Taux de survie d'*Escherichia coli* dans les eaux interstitielles de sédiments marins. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 33 : 201.
- SILVER S. et WALDERHAUG M., 1992. Gene regulation of plasmid-and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 56 : 125-228.
- TREVORS J.T., 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiol. Sci.*, 4 : 29-31.

