

UNIVERSITÉ D'OTTAWA



OTTAWA ONTARIO
CANADA K1N 6N5

UNIVERSITY OF OTTAWA

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

FACULTY OF SCIENCE AND ENGINEERING
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Dépendance énergétique et halotolérance du transport d'acide
alpha-aminoisobutyrique chez la bactérie halophile modérée
Vibrio costicola

Francette HAMAIDE

Thèse soumise à l'Ecole des Etudes Supérieures,,
Université d'Ottawa, pour l'obtention du diplôme
de Doctorat en Biologie.



Candidate

Directeur de These



Francette Hamaide, Ottawa, Canada, 1984.

UMI Number: DC53969

INFORMATION TO USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleed-through, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI Microform DC53969
Copyright 2011 by ProQuest LLC
All rights reserved. This microform edition is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.

ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

Avant-Propos

A Dr D.J. Kushner j'exprime toute ma gratitude de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir confié le projet de recherches qu'il avait lui-même abordé.

La majeure partie du travail sur l'aspect énergétique du transport d'ATP a été réalisée dans le laboratoire de Dr G.D. Sprott (NRC, Ottawa). Je remercie Dr G.D. Sprott pour sa collaboration constante, ses conseils, ses critiques. Que Dr K. Jarrell et Madame K. Shaw sachent aussi combien j'ai apprécié de travailler en leur compagnie.

A tous ceux qui ont contribué à cette thèse, soit en me conseillant, soit en me procurant les publications nécessaires, soit en réalisant graphiques et photographies; à Dr J.T. Arnason qui a mis l'électrode à oxygène à ma disposition; à Dr D.L. Brown, Dr N. Chaly, Dr J.R. Colvin (NRC) et Monsieur L. Sowden (NRC) qui m'ont initiée à la microscopie électronique; à Dr G.B. Patel (NRC) et Monsieur B.J. Agnew (NRC) grâce à qui j'ai pu cultiver Vibrio costicola en fermenteur; à l'Université d'Ottawa et l'Ente'aide Universitaire Mondiale du Canada qui m'ont accordé des bourses d'étude; aux nombreuses personnes qui m'ont encouragée; à Monsieur D. MacLachlan; je dis "Merci".

Enfin, mais non pas de moindre valeur, le soutien de Dr J.-J. Sanglier des Ets Sandoz (Bâle, Suisse) et de Messieurs Les Professeurs R. Durand et J.-P. Larpent de l'Université de Clermont-Ferrand (France) pour effectuer les démarches nécessaires pour mon départ de France, la compréhension de ma famille, leur permanente présence pendant la durée de ma thèse sont profondément appréciés et remerciés.

Sommaire

Résumé	viii
Abstract	xi
Liste des Tableaux	xiv
Liste des Figures	xvi

INTRODUCTION

1. Halophilisme:définition.	1
2. Ecologie des microorganismes halophiles.	2
3. Classification.	3
4. Tolérance au sel.	7
1. définition de l'activité de l'eau	7
2. mécanismes théoriques de l'halophilisme	10
3. osmorégulation chez les procaryotes	12
a) les bactéries halophiles extrêmes	13
b) les bactéries non-halophiles, halophiles-modérées, marines et halotolérantes.	16
* les solutés compatibles	16
* mécanismes d'accumulation	22
* mécanismes d'osmorégulation	30
* dépendance énergétique	33
c) les algues bleu-vert	35
d) applications	36
4. osmorégulation chez les microorganismes eucaryotes	39
a) les levures	39
b) les algues	42
5. conclusion	45

5. Le transport de Na^+ .	49
1. mise en évidence	49
2. théorie chemiosmotique	50
3. modes d'excrétion de Na^+	56
a) Na^+/H^+ antiport	56
b) Na^+ /cation ATPase	57
c) pompe à Na^+ /décarboxylase	62
d) pompe à Na^+ /respiration	62
e) conclusions	63
4. rôle du Na^+ et des gradients de Na^+	64
5. considérations évolutionnaires	71
6. Propos de la thèse.	72
 <u>MATERIEL & METHODES</u>	 74
1. Culture .	74
2. Préparation des bactéries et des solutions salines .	75
3. Mesure du volume intracellulaire .	76
4. Mesure du gradient de protons (ΔpH).	76
5. Mesure du potentiel de membrane ($\Delta \Psi$).	78
6. Etude métabolique des différents marqueurs .	80
7. Culture sur milieu synthétique .	81
8. Transport d'AIB .	82
9. Efflux d'AIB.	84
10. Transport d'AIB en réponse à des sources d'énergie créées artificiellement .	86

11. Mesure de la respiration.	86
12. Mesure de l'ATP.	88
13. Mise en évidence de l'antiport Na^+/H^+ .	88
14. Culture en fermenteur à différents pH.	90
15. Mesure de la lyse.	91
16. Microscopie optique.	92
17. Microscopie électronique.	92
18. Poids sec.	94
19. Inhibiteurs.	95
20. Réactifs.	95
21. Reproductibilité des résultats	96
22. Abréviations et symboles	96
<u>RESULTATS</u>	97
1. Caractérisation du transport d'AIB.	97
1. détermination du volume intracellulaire	97
2. dépendance énergétique du transport d'AIB	100
a) mesure de la PMF	100
b) effet du pH_0 sur le transport d'AIB et la respiration	105
c) effet de donneurs d'électrons	110
d) effet d'inhibiteurs	112
e) transport d'AIB en réponse à des sources d'énergie créées artificiellement	118
3. effet de l'environnement ionique sur le transport d'AIB, $\Delta\Psi$, la respiration, et la teneur en ATP des cellules	120

4. caractéristiques du transport d'AIB	128
a) étude cinétique	128
b) définition du système de transport	128
2. Antiport Na^+/H^+ .	132
1. mise en évidence	132
2. rôle dans la régulation du pH_i	137
3. croissance de <i>V. costicola</i> en fonction du pH_o	137
3. Tolérance de <i>V. costicola</i> aux fortes concentrations de NaCl.	140
1. effet de la concentration en NaCl du milieu de culture sur l'halotolérance du transport d'AIB	141
a) accumulation d'AIB	141
b) efflux d'AIB	143
2. effet du pH extérieur sur l'halotolérance du transport d'AIB	145
3. étude cinétique du transport d'AIB en relation avec l'halotolérance	147
4. étude du développement de l'halotolérance du transport d'AIB	150
5. étude de la perte de l'halotolérance du transport d'AIB	154
6. relation entre l'halotolérance du transport d'AIB et la pression osmotique interne des bactéries	156
7. étude microscopique	160
a) morphologie des cultures	160
b) observations cytologiques	162
8. effet des fortes concentrations en NaCl sur la consommation d'oxygène et la teneur en ATP	165

<u>DISCUSSION</u>	167
-------------------	-----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	192
----------------------	-----

Annexe	218
--------	-----

Kushner, D.J., F. Hamaide, and R.A. MacLeod. 1983. Development of salt-resistant active transport in a moderately halophilic bacterium. J. Bacteriol. 153:1163-1171.

Hamaide, F., D.J. Kushner, and G.D. Sprott. 1983. Proton motive force and Na⁺/H⁺ antiport in a moderate halophile. J. Bacteriol. 156:537-544.

Résumé

Vibrio costicola est une bactérie halophile modérée qui se développe sur une vaste échelle de concentrations en NaCl (0.2 - 3.5 M), avec une culture optimale en présence de 1 M NaCl (Forsyth et Kushner, 1970). L'augmentation de la concentration en NaCl du milieu de culture de 0.5 M à 1 M NaCl résulte en un développement de l'halotolérance des bactéries, comme mis en évidence par une meilleure capacité des bactéries cultivées à 1 M NaCl (= bactéries tolérantes) à transporter l'acide alpha-aminoisobutyrique (AIB) en présence de 3 M et 4 M NaCl par rapport à celles cultivées à 0.5 M NaCl (= bactéries sensibles).

L'aspect énergétique du transport d'AIB est étudié sur les bactéries cultivées à 1 M NaCl. Le potentiel électrochimique de membrane diminue de 170 à 100 mV quand le pH extérieur augmente de 5,7 à 9.0. Cette diminution a lieu malgré une forte augmentation du potentiel de membrane à cause du gradient de pH qui diminue progressivement, s'annule à pH 7.5 et s'inverse au-delà de pH 7.5. L'activité respiratoire, le taux de transport d'AIB et le potentiel de membrane ont tous les trois des profils de pH similaires avec un optimum à pH 8.5-9.0. Le potentiel de membrane et le transport d'AIB montrent des réponses similaires à divers inhibiteurs métaboliques et à

l'environnement ionique, en particulier la formation et le maintien du potentiel de membrane et le transport d'AIB requièrent la présence des ions Na^+ . La dissipation du potentiel électrique par le cation triphénylméthylphosphonium abolit le transport d'AIB sans affecter fortement la respiration. Ces résultats, avec ceux obtenus par l'induction de sources d'énergie artificielle, indiquent que le potentiel électrique est une force essentielle au transport d'AIB et que le taux de transport est maximisé par la présence supplémentaire d'un gradient de Na^+ . Ce gradient de Na^+ est établi par l'activité d'un antiport Na^+/H^+ qui peut convertir la force protomotrice créée par l'efflux de protons au cours de l'activité respiratoire. Cet antiport Na^+/H^+ joue aussi un rôle dans la régulation du pH cytoplasmique des bactéries à pH alcalin, expliquant leur capacité à se développer de manière optimale sur une large échelle de pH, allant de 6.5 à 9.0. L'étude cinétique révèle 3 effets des ions Na^+ sur le transport d'AIB: (1) une augmentation de l'affinité du système de transport pour l'AIB (K_t diminue) ($[\text{Na}^+] < 0.2 \text{ M}$); (2) une augmentation de la vitesse maximale V_{max} du transport ($0.2 \text{ M} < [\text{Na}^+] < 1 \text{ M}$); (3) une diminution de la V_{max} sans changement de K_t ($[\text{Na}^+] > 1 \text{ M}$).

Les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl ont toutes les deux un système de transport d'AIB de constante K_t très voisine qui fonctionne le mieux à pH alcalin. Les bactéries cultivées

à 0.5 M NaCl peuvent rapidement développer un système de transport d'AIB halotolérant par incubation dans le milieu de culture complexe contenant 1 M NaCl, même en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique. La tolérance de leur transport d'AIB à 3 M NaCl peut être développée par incubation en solution saline 1 M NaCl, mais la présence de substances particulières dans la solution saline d'incubation, telle la bétaine, est nécessaire pour qu'elles développent un transport d'AIB tolérant à 4 M NaCl. Les bactéries cultivées à 1 M NaCl conservent un système de transport d'AIB tolérant à 3 M NaCl après incubation en solution saline 0.5 M NaCl, mais un simple lavage en solution 0.5 M NaCl rend leur transport d'AIB sensible à 4 M NaCl.

Les fortes concentrations en NaCl provoquent la plasmolyse des bactéries tolérantes et sensibles, et inhibent fortement leur respiration. Les bactéries tolérantes gardent une activité respiratoire endogène double de celle des bactéries sensibles, mais la différence dans l'halotolérance de l'activité respiratoire entre les bactéries tolérantes et sensibles est moindre que celle observée dans le transport d'AIB. Par contre, les bactéries tolérantes peuvent mieux conserver leur teneur en ATP intracellulaire en présence de 3 et 4 M NaCl que celles sensibles. Les résultats suggèrent que la différence d'halotolérance observée entre les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl réside dans leur différente capacité à établir et maintenir un potentiel de membrane en présence de fortes concentrations en sel.

Abstract

Vibrio costicola is a moderately halophilic bacterium which can grow over a wide range of concentrations of NaCl from 0.2 to 3.5 M with optimal growth at 1 M NaCl (Forsyth and Kushner, 1970). Increasing the NaCl content of the growth media from 0.5 to 1 M results in the development of salt-tolérance in the bacteria, as show by a better ability of the bactéria grown in 1 M NaCl (= tolérant) to transport alpha-aminoisobutyric acid (AIB) in the presence of 3 or 4 M NaCl than those grown in 0.5 M NaCl (= sensitive).

The energetics of AIB transport was studied on bacteria grown in 1 M NaCl. The electrochemical membrane potential steadily decreases from about 170 to 100 mV as the pH of the medium is adjusted from 5.7 to 9.0. This decline occurs despite a large increase in the membrane potential, because of the loss of the pH gradient that decreases to zero at pH 7.5, and reverses above pH 7.5. Respiratory rate, AIB transport, and membrane potential all exhibit similar profiles with optima at pH 8.5-9.0. The membrane potential and AIB transport show similar responses to various metabolic inhibitors and to the ionic environment; both the formation (and/or maintenance) of the membrane potential and AIB transport require the presence of Na⁺ ions. Dissipation of the membrane potential with triphenylmethylphosphonium cations

abolishes AIB transport without greatly affecting respiration. These results and those obtained with artificially established energy sources suggest that the electrical potential is obligatory for AIB transport and that for maximum rates of transport a Na^+ gradient is also required. This Na^+ gradient is established by a Na^+/H^+ antiport activity which may convert the protonmotive force created by the proton efflux during respiration to the gradient. A role for Na^+/H^+ antiport activity in cytoplasmic pH regulation at alkaline pH can also explain the broad pH range for optimal growth from 6.5 to the alkaline extreme of pH 9.0. Transport kinetics reveal three effects of Na^+ ions; the first to increase the apparent affinity (K_t) of the transport system for AIB ($[\text{Na}^+] < 0.2 \text{ M}$); the second to increase the maximal velocity (V_{max}) of transport ($0.2 \text{ M} < [\text{Na}^+] < 1 \text{ M}$); and the third to decrease the V_{max} without affecting K_t ($[\text{Na}^+] > 1 \text{ M}$).

Bacteria grown at 0.5 M and 1 M NaCl have both an AIB transport system with a very similar K_t with optimal activity at alkaline pH. Bacteria grown in 0.5 M NaCl can rapidly develop a halotolerant AIB transport system during incubation in the complex growth medium containing 1 M NaCl, even in the presence of an inhibitor of protein synthesis. Tolerance of their AIB transport to 3 M NaCl can be developed by their incubation in saline solution containing 1 M NaCl, but certain substrates, such as betaine, are required in the incubation saline solution containing 1 M NaCl to develop tolerance of AIB transport to 4 M NaCl.

Bacteria grown in 1 M NaCl retain an AIB transport system tolerant to 3 M NaCl after incubation in saline solution containing 0.5 M NaCl, but AIB transport becomes sensitive to 4 M NaCl after washing the cells in saline solution containing 0.5 M NaCl.

High NaCl concentrations induce plasmolysis and strongly inhibit respiration of both tolerant and sensitive bacteria. Although tolerant bacteria retain an endogenous respiratory rate twice higher than sensitive cells, the difference in the halotolerance of their respiratory activities is less marked than that observed by AIB transport. However, the tolerant bacteria are better able to retain their internal ATP content in the presence of 3 and 4 M NaCl compared to sensitive cells. These results suggest that the difference in the halotolerance observed between the bacteria grown in 0.5 and 1 M NaCl is due to the difference in their ability to establish and maintain a membrane potential in the presence of high salt concentrations.

Liste des Tableaux

1. Classification des microorganismes selon leur réponse au sel.	4
2. Exemples de limite inférieure d' a_w pour la culture de divers microorganismes.	9
3. Accumulation de K^+ en réponse au choc osmotique chez diverses bactéries.	17
4. Accumulation d'acides aminés en réponse au choc osmotique mise en évidence chez diverses bactéries.	21
5. Exemples de concentrations internes de Na^+ en fonction de la concentration externe chez diverses bactéries.	52
6. Les différents types de mécanismes connus utilisés par certaines bactéries pour excréter les ions Na^+ .	59
7. Exemples de transports de substrats activés par les ions Na^+ chez diverses bactéries.	68
8. Pénétration des composés utilisés pour mesurer l'espace intracellulaire dans les culots de bactéries.	99
9. Effet de quelques donneurs d'électrons sur l'activité respiratoire, le transport d'AIB, $\Delta\psi$, et l'ATP intracellulaire.	111
10. Effet d'inhibiteurs sur l'activité respiratoire endogène, $\Delta\psi$, et le transport d'AIB.	114
11. Effet de divers ions sur le transport d'AIB, $\Delta\psi$, la consommation d' O_2 , et la teneur en ATP intracellulaire.	121
12. Effet de diverses concentrations de KCl et NaCl sur $\Delta\psi$ et le transport d'AIB.	127
13. Effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB.	129
14. Compétition pour le transport d'AIB avec divers acides aminés non radioactifs.	131
15. Effet de NaCl sur le pH_i de <i>Vibrio costicola</i> .	138
16. Effet du pH extérieur sur l'halotolérance du transport d'AIB.	146

17. Effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB.	148
18. Effet de divers milieux d'incubation sur le développement de la tolérance à 4 M NaCl du transport d'AIB chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl.	151
19. Effet de divers milieux d'incubation sur le développement de la tolérance à 3 et 4 M NaCl du transport d'AIB chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl.	153
20. Effet de diverses solutions sur la perte de la tolérance au sel du transport d'AIB des bactéries cultivées à 1 M NaCl.	157
21. Effet des fortes concentrations en NaCl sur la consommation d'oxygène et la teneur en ATP des bactéries.	166

Liste des Figures

1. Voie de synthèse du glutamate à partir de l'ammoniac chez <i>Aerobacter aerogenes</i> .	25
2. Relations métaboliques entre les principaux acides aminés dans l'osmorégulation des bactéries.	27
3. A. Représentation schématique des molécules d'eau impliquées dans un groupe hydrophobe. B. Représentation schématique de l'association de la proline avec un groupe hydrophobe.	34
4. Transformation génétique pour l'induction de l'osmotolérance.	38
5. Schéma hypothétique de la synthèse et de la dégradation du glycérol chez <i>Dunaliella</i> .	44
6. Hypothèse chemiosmotique: niveau physiologique.	55
7. Modèles du transport de Na^+ : l'antiport et la pompe modulaire Na^+/H^+ ATPase.	61
8. Croissance de <i>Vibrio costicola</i> sur milieux synthétiques (1 M NaCl) en présence de divers substrats.	101
9. Accumulation de (^{14}C)DMO et (^{14}C)méthylamine en fonction du pH extérieur.	103
10. Influence de TPB^- sur l'accumulation de (^3H)TPMP $^+$.	106
11. Influence de pH _o sur la force protomotrice de <i>Vibrio costicola</i> .	107
12. Effet du pH extérieur sur le transport d'AIB.	108
13. Effet du pH extérieur sur la respiration endogène et l'oxydation de l'éthanol.	109
14. Effet du DCCD sur le transport d'AIB, la teneur en ATP, le taux respiratoire et $\Delta\psi$.	113
15. Effet du TPMP $^+$ sur le transport d'AIB et la respiration.	117
16. Accumulation d'AIB en réponse à des sources d'énergie créées artificiellement.	119

17. Effet de l'environnement ionique sur l'efflux de l'AIB accumulé par les bactéries.	123
18. Effet de l'environnement ionique sur $\Delta\Psi$ et le transport d'AIB.	124
19. Courbes représentatives typiques de l'effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB.	130
20. Influence de NaCl et d'inhibiteurs sur l'efflux de protons liés à la respiration de <i>Vibrio costicola</i> .	133
21. Effet d'ionophores et du butanol sur l'antiport Na^+/H^+ .	136
22. Culture de <i>Vibrio costicola</i> en fonction du pH extérieur.	139
23. Effet de la concentration en NaCl sur le transport d'AIB.	142
24. Effet des fortes concentrations en NaCl sur l'efflux d'AIB.	144
25. Courbes représentatives typiques de l'effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB en relation avec son halotolérance.	149
26. Effet de la bétaine sur le transport d'AIB en présence de diverses concentrations en NaCl.	155
27. Détermination du point de lyse.	159
28. Microscopie optique de <i>Vibrio costicola</i> cultivé sur milieu complexe 1 % PPT contenant 0.5 ou 1 M NaCl.	161
29. Micrographie de <i>Vibrio costicola</i> cultivé sur milieu complexe contenant 0.5 M NaCl et incubé en solution saline contenant 0.5 M, 1 M, 3 M, ou 4 M NaCl.	163
30. Micrographie de <i>Vibrio costicola</i> cultivé sur milieu complexe contenant 1 M NaCl et incubé en solution saline contenant 1 M, 3 M, ou 4 M NaCl.	164
31. Modèle pour le transport d'AIB chez <i>Vibrio costicola</i> .	176

1. Introduction

1. Halophilisme: définition.

Le chlorure de sodium est nécessaire à tous les animaux à sang chaud et sa répartition géographique a affecté la colonisation de vastes régions et influencé le cours de l'histoire (Bloch, 1963). Pendant des siècles, il fut le moyen essentiel de conserver la nourriture contre la détérioration microbienne (Troller et Christian, 1978). La majorité du sel était obtenue par évaporation solaire de l'eau de mer (Baas-Becking, 1931), et de nombreuses bactéries et autres microorganismes se sont adaptés et peuvent proliférer en présence de concentration élevée de sel (parfois jusqu'à saturation, soit environ 5 M NaCl) si les autres conditions de croissance sont par ailleurs favorables. Le terme "halophile", dérivé du grec "halos" et "philus", signifiant respectivement "sel" et "aimant" fut alors introduit pour désigner les microorganismes qui requièrent la présence de NaCl pour se développer (Larsen, 1962; Gibbons, 1969).

2. Ecologie des microorganismes halophiles.

Parmi les sites naturels extrêmement salés, la Mer Morte en Israël, et le Grand Lac Salé aux Etats-Unis restent les plus étudiés. Pendant longtemps, par leur coloration rouge (dûe à la présence de caroténoïdes), les bactéries halophiles extrêmes (genres *Halobacterium* et *Halococcus*) ont été considérées comme les seules occupantes de ces environnements extrêmes. Mais la présence d'algues (*Dunaliella*) dans la Mer Morte a été rapportée (Nissenbaum, 1975); et des protozoaires, des artémies (*Artemia salina*), des algues (*Dunaliella salina*, *D. viridis*) ont été signalés dans le Grand Lac Salé (Post, 1977). Plus récemment, dans les lacs alcalins Wadi Natrum en Egypte, de nombreuses bactéries, bactéries phototrophiques (*Ectothiorhodospira*), cyanobactéries, des algues eucaryotes (*Dunaliella*) ainsi que certains zooflagellés ont été identifiés (Imhoff et al., 1979).

Les localisations de choix pour les microorganismes halophiles plus modérés et halotolérants sont les aliments salés. Ainsi, divers organismes, parmi lesquels des *Micrococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, spirochètes et levures furent accusés de détériorer des peaux et poissons salés par leur pouvoir protéolytique et pour la plupart d'entr'eux de causer une pigmentation rouge (Lochhead, 1934; Scott, 1957). Des espèces de *Vibrio* halophiles (*V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*) responsables de nombreuses gastroentérites au Japon, se développent sur les poissons

(Sakazaki, 1969). *V. costicola* fut isolé pour la première fois sur du bacon en Australie (Smith, 1938).

La mer contient aussi ses bactéries, en général des bâtonnets mobiles Gram-négatifs et non pigmentés. La plupart d'entr'eux appartiennent aux genres *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromobacter*, et *Flavobacterium*. Des espèces sporulantes peuvent être localisées dans les sédiments marins (Larsen, 1962). Les bactéries marines peuvent être cultivées sur un milieu faiblement salé (0.2 à 0.5 M NaCl), mais sont souvent inhibées par de fortes concentrations en sel (MacLeod, 1968; Kakimoto *et al.*, 1974). Quelques champignons marins ont aussi pu être isolés (voir Jennings, 1983).

3. Classification.

La tolérance au sel de certains organismes, l'halophilisme à divers degrés pour d'autres ont conduit Larsen (1962) à élaborer une classification. Reprise par Kushner (1978), cette classification répartit les microorganismes en 6 catégories: (1) non-halophile, (2) faible-halophile, (3) halophile-moderé, (4) halophile extrême limite, (5) halophile extrême, et (6) halo-tolérant (Tableau 1).

Catégorie	Zone optimale de culture	Exemples
non-halophile	inférieure à 0.2 M NaCl	la plupart des Eubactéries et des microorganismes d'eau douce
faible-halophile	0.2 - 0.5 M NaCl	de nombreux microorganismes marins
halophile-moderé	0.5 - 2.5 M NaCl	bactéries dont certains <i>Vibrio</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Micrococcus</i> , quelques algues
halophile extrême limite	1.5 - 4.0 M NaCl	<i>Ectothiorhodospira</i> <i>Actinopolyspora halophila</i> (actino- mycète)
halophile extrême	2.5 - 5.2 M NaCl	<i>Halobacterium</i> , <i>Halococcus</i>
halotolérant	non-halophile, mais peut supporter NaCl de façon très variable selon les espèces	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Halomonas</i> <i>elongata</i> , <i>Cocchochloris elabens</i> (algue bleu-vert) quelques levures et champignons

Tableau 1. Classification des microorganismes selon leur réponse au sel, (D'après Kushner, 1978).

Les bactéries halophiles extrêmes reçoivent un intérêt tout particulier, non seulement par leur adaptation et croissance dans un environnement de teneur en NaCl supérieure à 3 M NaCl, mais aussi par la présence d'une protéine membranaire unique, la bactériorhodopsine qui leur fournit de l'énergie en jouant le rôle de pompe à protons (voir Stoeckenius *et al.*, 1979), et par leur appartenance au groupe des Archaeobacteria, à côté des bactéries méthanogènes et thermoacidophiles (Woese, 1981).

Les bactéries phototrophes du genre *Ectothiorhodospira* (Raymond et Sistrom, 1969; Imhoff et Trüper, 1977) et l'actinomycète *Actinopolyspora halophila* (Gochnauer *et al.*, 1975) forment un groupe marginal entre les bactéries halophiles modérées et halophiles extrêmes, puisque leur limite inférieure de croissance en NaCl est plus élevée que celle des halophiles-modérées, mais leur limite supérieure n'atteint pas celle de la saturation, caractéristique des bactéries halophiles extrêmes.

Les bactéries halophiles-modérées peuvent en général se développer sur une vaste échelle de concentrations en NaCl (0.5 à 3.5 M). De nombreuses bactéries responsables de détérioration alimentaire appartiennent à cette catégorie. Peuvent aussi s'y rattacher les bactéries marines qui exigent la présence de 0.5 M NaCl pour se développer, comme *Vibrio parahaemolyticus* (Morishita, 1980). Chez certains organismes, la

limite inférieure de concentration en NaCl de croissance varie avec la température: ainsi *Planococcus halophilus* ne requiert qu'une infime quantité de NaCl (10 mM) pour se développer à 20°C, mais au-delà de 25°C, sa croissance n'est rendue possible qu'en présence de 0.5 M NaCl spécifiquement, (Novitsky et Kushner, 1975; 1976). La corrélation d'une croissance à limite supérieure de température plus élevée de NaCl dans le milieu de culture n'est pas particulière à *P. halophilus*. Des effets protecteurs du sel ont aussi été obtenus sur la bactérie marine psychrophile *Vibrio marinus*, dont la limite supérieure de température est de 10.5°C à une salinité de 0.7 ‰ et de 21.2°C à 3.5 ‰ (Stanley et Morita, 1968), sur des bactéries lactiques (*Pediococcus homari*) et certains *Lactobacillus* (Goldman et al., 1963) et encore sur *Salmonella* (Matches et Liston, 1972; Tesone et al., 1981), *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, et *Clostridium perfringens* (Tesone et al., 1981). Chez la bactérie halotolérante *S. aureus*, la limite supérieure de température pour la croissance, production d'entérotoxine, coagulase et nucléase thermostable peut être augmentée de 2°C si la culture contient 1 M NaCl ou 1 M KCl ou encore 0.4 M MgCl₂ (Hurst et al., 1980). Des changements dans les propriétés des membranes cellulaires influençant les transports de substrats pourraient être à l'origine des effets "température-salinité" observés (Ishida et al., 1974). Toutefois le mécanisme n'est pas encore élucidé.

Ces effets suggèrent aussi une révision de la classification des bactéries halophiles et halotolérantes en tenant compte du facteur température de croissance.

4. Tolérance au sel.

1. définition de l'activité de l'eau:

Les effets des différents facteurs environnants, tels la sécheresse ou l'addition de solutés au milieu de culture sur la physiologie microbienne ont été pendant longtemps déterminés en fonction d'un seul facteur général, l'activité thermodynamique de l'eau (Scott, 1957). Par définition, l'activité de l'eau (a_w) est la mesure de l'eau libre dans un système: quand un soluté est dissous dans l'eau, une partie de l'eau lui devient liée, diminuant ainsi la quantité d'eau libre disponible. En termes thermodynamiques, il y a diminution de l'entropie quand un soluté est dissous dans l'eau. Il y a aussi une diminution de la pression de vapeur, qui peut s'exprimer selon la loi de Raoult:

$$\frac{P}{P_0} = \frac{N_2}{N_1 + N_2}$$

où P et P_0 sont respectivement les pressions de vapeur de la solution et de l'eau; N_1 et N_2 les nombres de moles de soluté et de solvant.

Le rapport P/P_0 est numériquement égal à la valeur de l'activité de la solution, l'activité de l'eau de l'eau pure étant de 1. Les pressions de vapeur peuvent être déterminées de manière directe manométriquement (voir Corry, 1973), mais les mesures par méthodes indirectes (par mesure de conduction électrique, résistance, capacitance...) sont de plus en plus couramment employées (Troller, 1983).

Les limites de culture de différentes espèces de microorganismes ont été définies de telle sorte qu'il y ait une valeur minimale de l' a_w en dessous de laquelle l'organisme ne peut pas se développer (Tableau 2). Les valeurs sont très variables selon les espèces: par exemple la plupart des espèces du genre *Pseudomonas* ne peuvent pas se développer en dessous de 0.95 a_w alors que certaines souches de *S. aureus* peuvent croître à 0.86 a_w . Les procaryotes qui tolèrent la plus faible a_w sont bien évidemment les bactéries halophiles extrêmes (0.75 a_w). Certaines levures osmophiles et des champignons xérophiles peuvent se développer lentement à des a_w aussi faibles que 0.61. La limite absolue pour toute culture microbienne est voisine de 0.60. En dessous de 0.55 a_w , l'ADN est dénaturé (Falk *et al.*, 1963). La plupart des microorganismes ont une a_w optimale supérieure à 0.99, et en général leur taux de croissance ralentit quand l' a_w diminue (Corry, 1973). Toutefois pour certaines levures et les bactéries halophiles, il existe une limite

Organisme	a_w limite inférieure	Références
<u>Bactéries:</u>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.94-0.98	Burcik (1950)
<i>Rhizobium</i>	0.96-0.98	Burcik (1950)
<i>Bacillus subtilis</i>	0.95	Burcik (1950)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	0.94	Burcik (1950)
<i>Escherichia coli</i>	0.93	Burcik (1950)
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	0.93	Marshall et al. (1971)
<i>Salmonella oranienburg</i>	0.94	Marshall et al. (1971)
<i>S. typhimurium</i>	0.92	Clayson et Blood (1957)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86-0.88	Scott (1953)
<i>Vibrio costicola</i>	0.86	Kushner (1978)
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	0.86	Kushner (1978)
<i>Halobacteria, Halococci</i>	0.75	Kushner (1978)
<u>Levures:</u>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.90 (sucre)	Brown et Edgley (1980)
<i>S. rouxii</i>	0.62 (sucre) 0.85 (NaCl)	Brown et Edgley (1980)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	0.85 (NaCl)	Norkrans (1966)
<u>Champignons:</u>		
<i>Xeromyces bisporus</i>	0.61	Pitt et Christian (1968)
<i>Aspergillus</i>	0.75	Pitt (1975)
<i>Penicillium</i>	0.80	Pitt (1975)

Tableau 2. Exemples de limite inférieure d' a_w pour la culture de divers microorganismes.

supérieure de l' a_w . Par exemple, la moisissure *Xeromyces bisporus* ne se développe pas si l' a_w est supérieure à 0.97 et *Halobacterium* a une limite supérieure voisine de 0.93.

2. mécanismes théoriques de l'halophilisme:

Pendant longtemps, les biologistes furent réticents à l'idée qu'un système vivant pouvait fonctionner en solutions de sel saturées et voulurent expliquer la physiologie halophile dans un milieu intérieur dilué. Il est maintenant reconnu que le milieu cellulaire n'est pas dilué (Brown, 1964), et la physiologie cellulaire doit être expliquée en termes d'un intérieur qui est thermodynamiquement ajusté à l'environnement.

Un microorganisme répond à une nouvelle situation physico-chimique essentiellement en 2 phases, suivies d'une troisième, représentant l'état parfaitement adapté (Brown, 1976):

Phase 1: Quand une cellule est transférée dans un milieu de plus faible a_w , elle doit procéder à un rapide ajustement thermodynamique. Cet ajustement, d'une durée de quelques minutes, voire quelques secondes, implique un flux d'eau et un choc osmotique transitoire qui dans des cas extrêmes peut être léthal.

Phase 2: Si l'organisme a passé avec succès la première phase d'ajustement thermodynamique, il entre dans la seconde phase d'adaptation. Au cours de cette étape, il répond aux nouvelles conditions environnantes par des changements dans son métabolisme, ses processus de transport, les activités, régulations et biosynthèses de ses enzymes. Ce réajustement physiologique complexe requiert de l'énergie et est bien plus lent que la phase 1, de l'ordre d'une génération.

A la suite de ces deux phases, l'organisme devient complètement adapté à son nouvel environnement et est phénotypiquement différent de ce qu'il était dans les conditions initiales. C'est par son comportement au cours de cette phase 3 qu'un organisme peut être classé comme halotolérant ou halophile selon son aptitude à se développer normalement dans un environnement à forte salinité. Brown (1976) a proposé 2 types essentiels de mécanismes qui, en théorie, pourraient expliquer la phase 3 de l'halophilisme:

Mécanisme 1:

Les protéines d'un organisme tolérant sont fondamentalement et généralement différentes de celles correspondantes d'un organisme non tolérant et sont mieux adaptées à fonctionner dans des conditions extrêmes. C'est le cas des bactéries halophiles extrêmes qui exigent la présence de fortes concentrations de sel pour survivre (voir Lanyi, 1974).

Mécanisme 2:

Les protéines des organismes tolérants et non tolérants sont essentiellement similaires, mais à de faibles a_w , des modifications dans les conditions intracellulaires diminuent les effets inhibiteurs de l'environnement et gardent ainsi fonctionnels les systèmes enzymatiques. C'est par exemple le cas de l'algue verte *Dunaliella* et des cellules eucaryotes xérotolérantes (Brown, 1978).

3. osmorégulation chez les procaryotes:

Tous les microorganismes capables de se développer à de faibles a_w accumulent des solutés de nature inorganique et/ou organique pour augmenter leur pression osmotique interne, de telle sorte qu'elle devienne légèrement supérieure à l'osmolarité du milieu de culture. Ces solutés n'inhibent pas l'activité enzymatique (d'où leur dénomination de "soluté compatible") et sont définis comme substances qui à forte concentration protègent les enzymes contre l'inhibition et l'inactivation (Brown, 1976). Ils jouent ainsi un double rôle: ce sont à la fois des substances osmotiquement actives et des agents protecteurs de l'activité enzymatique.

a) les bactéries halophiles extrêmes:

Parmi les procaryotes, ce sont sans aucun doute les bactéries halophiles extrême qui offrent l'exemple le plus frappant d'adaptation. C'est par l'accumulation de fortes concentrations de K^+ , à la place de Na^+ , que ces bactéries équilibrent leur pression osmotique à travers la membrane cellulaire. Ainsi, le gradient int/ext (K^+ intracellulaire/ K^+ extracellulaire) peut atteindre 1000/1 (Ginzburg *et al.*, 1971) et à trop faible concentration dans le milieu de culture, les ions K^+ peuvent devenir un facteur limitant pour la croissance de ces bactéries (Gochnauer et Kushner, 1969). Dans un milieu contenant 3.3 M NaCl, *Halobacterium cutirubrum* peut accumuler 5.32 M KCl (Matheson *et al.*, 1976) et *H. salinarium* 4.6 M KCl en présence de 4.0 M NaCl (Christian et Waltho, 1962). Il a aussi été calculé que K^+ peut représenter 30 à 40 % du poids sec de *H. halobium* (Gochnauer et Kushner, 1971).

L'état des ions K^+ à l'intérieur des cellules reste un sujet controversé (Brown et Sturtevant, 1980). Des études de résonance magnétique nucléaire suggèrent que les ions K^+ étaient présents sous forme liée (Cope et Damadian, 1970), mais dans une étude plus récente, Shporer et Civan (1977) montrèrent que la majeure partie des ions K^+ étaient libres dans la cellule. Par ailleurs, Lanyi et Silverman (1972) ne purent mettre en évidence

de liaisons de K^+ dans des pâtes de cellules lysées par gel et dégel de *H. cutinubrum*. Plus récemment, Brown et Sturtevant (1980) et Brown et Duong (1982) mesurèrent l'état de l'eau chez *H. halobium* par calorimétrie à balayage différentielle et chaleur de dilution et conclurent que les ions K^+ étaient libres à l'intérieur du cytoplasme.

Chez *H. halobium*, les ions K^+ sont rapidement accumulés en présence de lumière. Cette accumulation est neutralisée non pas par un efflux de protons mais par celui des ions Na^+ , et la source d'énergie pour ce transport est le potentiel de membrane (Wagner *et al.*, 1978). La présence de canaux membranaires sélectifs aux ions K^+ ou l'intervention d'ionophores à K^+ sont des mécanismes possibles qui ont été proposés pour l'entrée de K^+ dans les cellules, mais ils restent actuellement sans preuves suffisantes (Wagner *et al.*, 1978). Les gradients d'ions Na^+/K^+ transmembranaires pourraient avoir une fonction d'énergie tampon: ainsi, le maintien du niveau d'ATP et la mobilité de *H. halobium* placé dans des conditions anaérobiques à l'obscurité dépend de l'amplitude des gradients Na^+/K^+ , les ions K^+ diffusant vers l'extérieur et les ions Na^+ entrant dans la cellule. Si la solution d'incubation ne contient pas d'ions Na^+ , l'ATP intracellulaire diminue rapidement et les cellules perdent leur mobilité (Brown *et al.*, 1983).

Les enzymes des bactéries halophiles extrêmes répondent au sel de manière variable et peuvent être classées en 3 catégories (Kushner, 1978):

(1) celles inactives en absence de NaCl ou KCl et dont l'activité optimale requiert la présence de 2-4 M (NaCl ou KCl). Ainsi, l'aspartate transcarbamylase de *H. cutirubrum* est dénaturée irréversiblement en quelques minutes si la concentration en sel est inférieure à 2 M (Norberg *et al.*, 1973);

(2) celles qui ont une activité optimale en présence de 0.5 à 1.5 M NaCl ou KCl et sont inhibées par des concentrations plus élevées, telle l'isocitrate deshydrogénase de *H. salinarium* (Aitken et Brown, 1972);

(3) celles qui ont la plus grande activité en absence de sel et sont inhibées par les fortes concentrations. La synthétase des acides gras (Pugh *et al.*, 1971) est une de ces rares enzymes. Son inhibition par les fortes concentrations de sel peut expliquer la faible proportion d'acides gras formés par ces organismes.

Il est désormais bien établi que les protéines des bactéries halophiles extrêmes présentent un caractère acide, et qu'une partie des cations (Na^+ , K^+) jouent un rôle dans la neutralisation des charges négatives. Le maintien des interactions hydrophobiques requiert aussi la présence de sel, mais la plupart des protéines sont mieux stabilisées par Na^+ que par K^+ (Lanyi, 1974), à

l'exception des ribosomes. Les ribosomes de *H. cutinubrum* sont stables seulement en présence de 4 M KCl et ces ions ne peuvent pas être substitués par NaCl (Bayley et Kushner, 1964). Le cytoplasme de *H. salinarium* contient une forte concentration de Cl^- (3.6 M) qui pourraient neutraliser une partie des ions K^+ (Christian et Waltho, 1962).

b. les bactéries non-halophiles, halophiles-modérées, marines et halotolérantes:

* les solutés compatibles:

L'accumulation de K^+ en réponse à une augmentation de la pression osmotique du milieu est le mode essentiel d'adaptation des bactéries halophiles extrêmes, mais ce processus d'halotolérance peut être rencontré chez d'autres bactéries, aussi bien halophiles-modérées, halotolérantes, marines que non-halophiles (Tableau 3). C'est en fait sur *Escherichia coli*, dans un milieu non nutritif que Ørskov (1948) découvrit le premier que la plasmolyse des cellules due à une diminution de l' a_w du milieu pouvait être rapidement renversée si le milieu contenait à la fois des ions K^+ et des substrats et que cette réversion s'accompagnait d'un transport actif de K^+ .

Certaines molécules organiques contribuent aussi à l'osmorégulation des bactéries non-halophiles, halophiles-modérées, marines et halotolérantes. Ce sont essentiellement les acides aminés proline, glutamate et leurs dérivés glutamine, acide

Organisme	Références
<u>non-halophile:</u>	
<i>Salmonella oranienburg</i>	Christian (1955 b)
<i>Escherichia coli</i>	Epstein et Schultz (1965)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Tempest et Meers (1968)
<u>marin:</u>	
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	Thompson et MacLeod (1973)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Unemoto et Hayashi (1979)
<u>halophile-moderé:</u>	
<i>Vibrio costicola</i>	Christian et Waltho (1962) Shindler <i>et al.</i> (1977)
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	Christian et Waltho (1962) Sadler <i>et al.</i> (1980)
<i>Pseudomonas</i> No 101	Masui et Wada (1973)
Bactérie non identifiée	Matheson <i>et al.</i> (1976)
<u>halotolérant:</u>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Christian et Waltho (1964)
<i>Rhizobium japonicum</i>	Yelton <i>et al.</i> (1983)
<i>Rhizobium</i> sp UMKL 20	Yap et Lim (1983)

Tableau 3. Accumulation de K^+ en réponse au choc osmotique chez diverses bactéries.

γ -aminobutyrique (Measures, 1975; Brown et Stanley, 1972; Tempest *et al.*, 1970a) qui sont accumulés en réponse à l'augmentation de l'osmolarité du milieu de culture (Tableau 4).

De plus en plus nombreuses études sur les solutés compatibles indiquent que la bétaine (dérivé triméthylé de la glycine) joue un rôle important dans l'osmotolérance des bactéries à côté du glutamate et de la proline. Ainsi, il fut observé qu'un apport exogène de bétaine dans un milieu de forte osmolarité lève l'inhibition de croissance de *Vibrio parcolans* (Dulaney *et al.*, 1968) et encore de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae* (Le Rudulier et Bouillard, 1983). L'addition de bétaine supprime aussi partiellement l'inhibition de la fixation de l'azote en milieu de forte osmolarité chez *K. pneumoniae* (Bouillard et Le Rudulier, 1983). L'effet protecteur de la bétaine contre le choc osmotique fut aussi démontré sur la bactérie halotolérante Ba 1, isolée de la Mer Morte, chez laquelle elle augmente la résistance au sel de la chaîne respiratoire (Rafaeli-Eshkol, 1968; Rafaeli-Eshkol et Avi-Dor, 1968). Récemment, Risk *et al.* (1982) démontrèrent que lorsque cette bactérie Ba 1 est cultivée sur une large échelle de concentrations en NaCl (0.6 à 3 M), elle synthétise de la bétaine proportionnellement à l'osmolarité du milieu de culture. Des résultats similaires furent observés chez la bactérie halophile extrême limite phototrophe *Ectothiorhodospira halochloris* (Galinski et Trüper, 1982).

Organisme	Acides aminés accumulés	Références
<u>non-halophile:</u>		
<i>Escherichia coli</i>	glutamate, GABA*, proline	A**
<i>Serratia marcescens</i>	glutamate, proline	A
<i>Erwinia carotovora</i>	glutamate	Tempest et al. (1970a)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	glutamate	A
<i>P. fluorescens</i>	glutamate	Tempest et al. (1970a)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	glutamate, proline glutamate glutamate, glutamine	A Tempest et al. (1970a) Brown et Stanley (1972)
<i>Salmonella oranienburg</i>	proline glutamate, proline	Christian (1955a) A
<i>S. typhimurium</i>	proline glutamate, glutamine	Csonka (1980) Csonka (1981a)
<i>Sarcina lutea</i>	proline	A
<i>Clostridium sporogenes</i>	glutamate, GABA, proline	A
<i>Streptococcus faecalis</i>	GABA, proline	A
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	proline	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	glutamate, proline	A

.../...

Organisme	Acides aminés accumulés	Références
<i>Bacillus megaterium</i>	proline glutamate, GABA, proline	A Tempest <i>et al.</i> (1970a)
<i>B. subtilis</i>	proline	A
<i>B. subtilis</i> var. <i>Niger</i>	glutamate, GABA, proline proline	Tempest <i>et al.</i> (1970a) Brown et Stanley (1972)
<i>B. polymyxa</i>	glutamate, GABA, proline	Tempest <i>et al.</i> (1970a)
<i>B. cereus</i>	proline	A
<u>marin:</u>		
<i>Vibrio alginolyticus</i>	glutamate, proline	Unemoto et Hayashi (1979)
<i>V. parahaemolyticus</i>	glutamate	A
<i>Beneckea harveyi</i>	glutamate	Makemson et Hastings (1979)
<u>halotolérant:</u>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	glutamine, proline proline proline	Anderson et Witter (1982) Koujima <i>et al.</i> (1978) A
<i>Rhizobium</i> WR 1001	glutamate	Hua <i>et al.</i> (1982)
<i>Rhizobium</i> sp UMKL 20	glutamate	Yap et Lim (1983)

.../...

Organisme	Acides aminés accumulés	Références
<i>Rhizobium japonicum</i> 191	glutamate	Yelton <i>et al.</i> (1983)
<i>Halomonas elongata</i>	glutamate, glutamine	Vreeland <i>et al.</i> (1983)

Tableau 4. Accumulation d'acides aminés en réponse au choc osmotique mise en évidence chez diverses bactéries.

(GABA* = acide γ -aminobutyrique; A** = Measures, 1975).

* mécanismes d'accumulation:

Dans leur étude sur le transport de K^+ chez *E. coli*, Epstein et Schultz (1965) mirent en évidence que les bactéries s'adaptent rapidement à des changements brutaux d' a_w et qu'elles peuvent maintenir une activité osmotique égale ou légèrement supérieure à celle du milieu environnant en régulant leur concentration en K^+ . Des études génétiques sur le système de transport de *E. coli* ont permis d'identifier un opéron (*Kdp*) dont l'expression est induite par une diminution de pression de turgescence (Epstein et Laimins, 1980; Laimins *et al.*, 1981). Les ions K^+ intracellulaires seraient sous forme libre, osmotiquement actifs. L'observation que l'augmentation de K^+ intracellulaire augmente l'osmolarité cellulaire d'environ moitié de celle du milieu a suggéré que chaque molécule puisse être associée avec un anion intracellulaire. Ainsi, l'augmentation de l'osmolarité cellulaire serait égale à celle du milieu si les anions accumulés avec K^+ étaient univalents et osmotiquement actifs (Epstein et Schultz, 1965).

De nombreuses bactéries répondent au choc osmotique par une accumulation accrue de L-proline et/ou L-glutamate. Mais dans les études réalisées sur milieu complexe (Measures, 1975; Koujima *et al.*, 1978), il n'est pas possible de déterminer si l'augmentation de la concentration interne de ces acides aminés résulte de la stimulation de leur biosynthèse ou de leur trans-

port. Les pools d'acides aminés libres furent aussi examinés dans un certain nombre de bactéries cultivées à différentes osmolarités sur milieu minimum, en absence d'acides aminés exogènes (Tempest *et al.*, 1970a), mais les résultats restent complexes.

Chez la majorité des bactéries, le glutamate est synthétisé à partir du 2-oxoglutarate et NH_3 par la glutamate deshydrogénase (GDH). Observant que l'activité de la GDH de *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* était très sensible aux variations de pH et que l'addition de NaCl dans le milieu de culture provoquait invariablement un efflux de protons mesurable par l'acidification du milieu, Tempest *et al.* (1970a) suggérèrent que l'activité de la GDH était stimulée par la variation de pH intracellulaire dans le sens de synthèse de glutamate à partir de glucose et de NH_3 , pour restaurer la concentration interne en H^+ .

Mais toutes les espèces de *Bacillus* qu'ils étudièrent répondaient au choc osmotique en accumulant à la fois proline, glutamate et glutamine et à un rythme si lent qu'ils suspectèrent la présence d'une voie métabolique autre que la GDH pour la synthèse du glutamate.

C'est en cherchant à expliquer comment *K. aerogenes* pouvait se développer dans des conditions limitantes en NH_3 en ne conte-

nant presque pas de GDH qu'ils mirent en évidence cette autre voie de synthèse par la glutamate synthétase (GS) et la glutamine amide-2-oxoglutarate amidotransférase (GOGAT), par laquelle la glutamine réagit avec le 2-oxoglutarate pour former 2 molécules de glutamate (Tempest *et al.*, 1970b) (Figure 1). Ce système a maintenant été découvert dans de nombreuses bactéries dont certains *Bacillus* et Measures (1975) confirma que lorsque les bactéries synthétisent le glutamate essentiellement par le système (GS-GOGAT), les changements dans le pool d'acides aminés après leur transfert dans un milieu à plus faible a_w ne concernent pas uniquement le glutamate. Toutefois, Hua *et al.* (1982) rapportèrent récemment que la bactérie fixatrice d'azote *Rhizobium* WR 1001 accumule de fortes quantités de glutamate en réponse au choc osmotique mais que la GDH a une très faible activité, et que le système (GS-GOGAT), qui est la voie d'assimilation de l'azote chez cette bactérie, serait la voie de synthèse du glutamate dans les conditions de stress. La régulation de la synthèse du glutamate se révèle fort complexe (voir Tyler, 1978), et peu d'informations sont actuellement connues concernant la synthèse du glutamate en relation avec l'osmorégulation.

Tempest *et al.* (1970a) observèrent une corrélation entre la présence intracellulaire des ions K^+ et de glutamate, et suggèrent que le glutamate contribue à neutraliser les charges apportées par K^+ lors de son accumulation en réponse à

une augmentation de NaCl extracellulaire, répondant ainsi à la question posée par Epstein et Schultz (1965) (voir p 22). Measures (1975) apporta un élément supplémentaire à cette théorie en montrant que la GDH de plusieurs espèces (*E. coli*, *K. aerogenes*, *B. subtilis*, *S. aureus*) était 10 fois plus active en présence de 500 mM K^+ dans le sens de synthèse de glutamate. Dendinger et Brenchley (1980) observèrent aussi une activité 2 fois plus élevée de la GDH chez *S. typhimurium* en présence de 500 mM K^+ .

Il est intéressant de noter que les acides aminés accumulés par les bactéries en réponse au choc osmotique (glutamate, proline, glutamine, acide γ -aminobutyrique) sont très étroitement liés métaboliquement (Figure 2), et que la formation de glutamate et/ou glutamine sont les principales voies d'assimilation de NH_3 pour les bactéries. Si le glutamate porte une charge négative à pH physiologique et requiert un contre-ion (K^+) pour assurer l'électroneutralité de la cellule, les autres acides aminés offrent l'avantage d'être neutres. Gould et Measures (1977) émirent l'hypothèse que le glutamate était le soluté compatible employé par les bactéries les moins osmotolérantes et que les plus osmotolérantes utilisaient la proline ou l'acide γ -aminobutyrique.

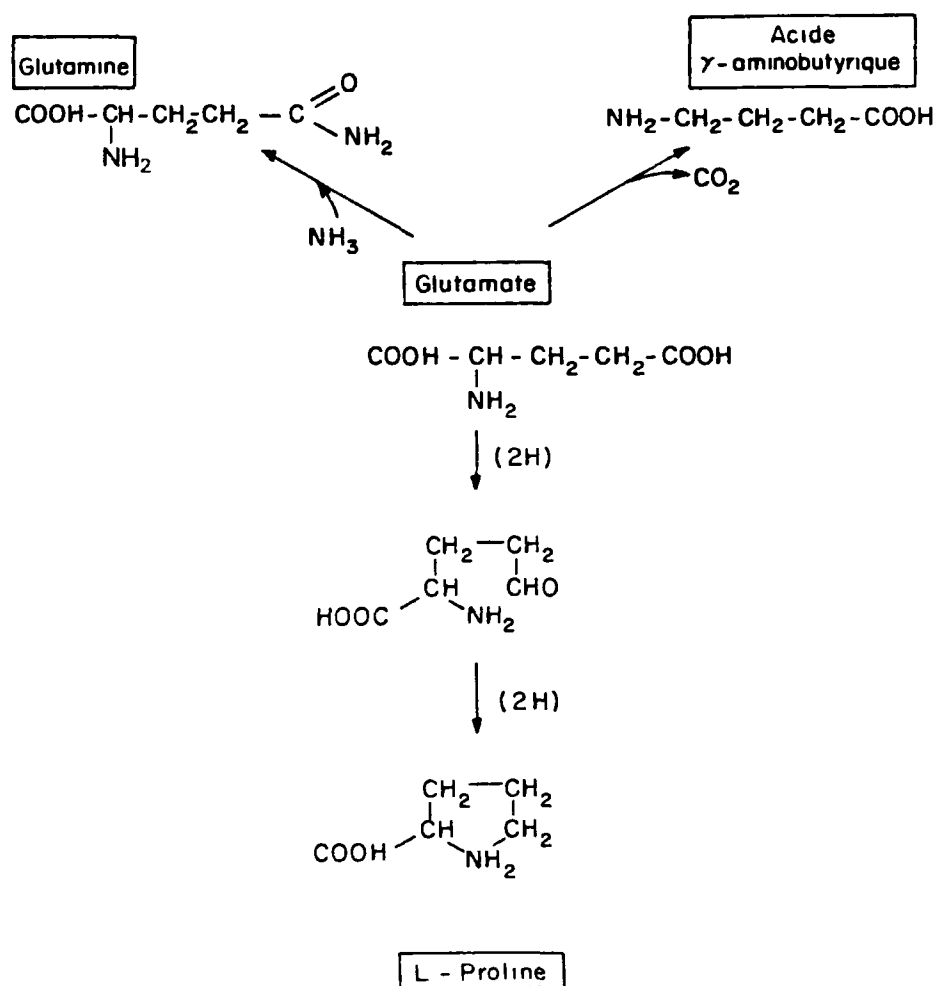


Figure 2. Relations métaboliques entre les principaux acides aminés impliqués dans l'osmorégulation des bactéries.

L'accumulation d'acide γ -aminobutyrique a été rapportée chez les rares espèces possédant une glutamate décarboxylase (*E. coli*, *Clostridium sporogenes*, *Streptococcus faecalis*) (Measures, 1975) et jusqu'à présent quelques espèces seulement dont *K. aerogenes* (Brown et Stanley, 1972), *S. aureus* (Anderson et Witter, 1982), *S. typhimurium* (Csonka, 1981a), *Halomonas elongata* (Vreeland *et al.*, 1983) sont connues pour stimuler leur synthèse de glutamine en réponse à une augmentation de la pression osmotique du milieu par NaCl.

En 1955, J.H.B. Christian observa que dans des milieux d'osmolarité inhibitrice, les taux de croissance (Christian, 1955) puis de respiration (Christian et Waltho, 1966; Christian et Hall, 1972) de *Salmonella oranienburg* étaient spécifiquement stimulés par l'addition de proline. Repartant sur ces bases, Csonka et coll. entreprirent une étude plus approfondie sur le mode d'osmorégulation de la proline:

Dans une première étape, Csonka (1980) observa que l'inhibition de la croissance de *S. typhimurium* causée par de fortes concentrations de saccharose, NaCl, sulfate d'ammonium ou phosphate de potassium pouvait être levée au moins partiellement par la présence de L-proline dans le milieu de culture, et conclut que la L-proline répond de manière générale à la faible a_w du milieu de culture, et non pas à un soluté spécifique. Il

mit aussi en évidence que cette stimulation de la croissance dans un milieu de forte osmolarité est spécifique de la proline en testant d'autres acides aminés et trouva par des mutants qui ne peuvent pas convertir la L-proline en glutamate que le catabolisme de cet acide aminé n'est pas nécessaire pour stimuler la croissance.

Dans une deuxième étape, il sélectionna des mutants qui produisent des quantités élevées de proline et observa qu'ils peuvent se développer avec un temps de doublement de 4 heures dans un milieu minimal contenant 0.65 M NaCl, comparé à 8 heures pour la souche parentale, confirmant le rôle central de la L-proline dans le développement de l'osmotolérance. Les niveaux de proline intracellulaire de tous ces mutants sont régulés de telle sorte qu'ils augmentent en réponse au choc osmotique. Ainsi, en absence de choc osmotique, 78 % de la proline synthétisée est excrétée dans le milieu et seulement 22 % reste dans les cellules, alors qu'en présence de 0.8 M NaCl, seulement 19 % de proline est excrétée et 81 % reste dans les cellules. Les souches de type sauvage ne contiennent que de faibles quantités de proline, même après leur culture dans un milieu à forte osmolarité (Csonka, 1981b).

Csonka (1981b) envisagea alors 3 mécanismes par lesquels ces mutants pourraient réguler les niveaux intracellulaires de proline:

- (1) le stress stimule la synthèse de proline;
- (2) le taux de synthèse est constant, mais la dégradation de la proline est inhibée;
- (3) les cellules ont une plus grande aptitude à retenir l'acide aminé, soit en diminuant son excrétion, soit en la réincorporant du milieu au moyen d'une perméase.

Deux perméases du système de transport de la L-proline de *S. typhimurium* ont déjà été identifiées (Ratzkin et Roth, 1978; Anderson *et al.*, 1980; Wood, 1981). Les récentes observations de Csonka (1982) suggèrent qu'il en existe une troisième dont la fonction serait d'accumuler de fortes concentrations de proline pendant le choc osmotique et dont la régulation serait à l'image de l'opéron *Kdp* qui code pour le transport de K^+ chez *E. coli* et qui est sensible à l'osmolarité du milieu (voir p 22).

Il fut par ailleurs montré que chez *E. coli* l'accumulation de L-proline est stimulée proportionnellement à l'osmolarité du milieu extérieur (Britten et McClure, 1962) et que le transport de proline augmente dans les vésicules de *E. coli* placées dans des milieux de forte osmolarité (Kaback et Deuel, 1969).

*** mécanismes d'osmorégulation:**

Comment l'augmentation des concentrations de proline, glutamate, acide γ -aminobutyrique, glutamine peut-elle résulter en une meilleure osmotolérance?

Une réponse possible est que ces solutés permettent de maintenir l'osmolarité du cytoplasme à une valeur égale ou légèrement supérieure à celle du milieu extérieur et évitent ainsi la deshydratation (Brown, 1976) comme illustré par l'exemple suivant de *Bacillus subtilis* cultivé à 0.995 a_w (Gould et Measures, 1977). Dès son transfert dans un milieu 0.97 a_w contenant 1 M NaCl, l'extinction optique à 580 nm augmente, accompagnée d'une contraction des cellules due à la deshydratation osmotique puisque NaCl ne pénètre pas dans les cellules. La perte d'eau stoppe immédiatement la croissance des bactéries et l'activité de nombreuses enzymes. Après quelques minutes, de fortes quantités de proline sont accumulées, soit par transport si le milieu en contient, soit par biosynthèse, et les cellules se rehydratent. Le cytoplasme devient alors légèrement hypertonique par rapport à l'environnement, et la croissance reprend, bien qu'à un taux plus faible. Il est évident que, bien que le métabolisme cellulaire soit arrêté pendant la deshydratation, les réactions impliquées dans l'adaptation doivent être résistantes aux faibles a_w . Dans cet organisme, l'adaptation nécessite la synthèse de nouvelles protéines, puisqu'elle est impossible en présence de rifampicine ou de chloramphénicol.

La fonction de la bêtaïne dans l'osmorégulation est encore mal connue. La première question à élucider est de savoir si c'est bien la bêtaïne elle-même qui est active ou un dérivé.

En conclusion de résultats préliminaires obtenus chez certaines espèces d'Entérobactéries dont *K. pneumoniae*, la bétaine ne serait pas métabolisée (Le Rudulier et Bouillard, 1983). Toutefois, son oxydation a été rapportée chez la bactérie marine *Achromobacter cholinophagum* (Shieh, 1966), de même que son intervention dans des réactions de transméthylation (Byerrum *et al.*, 1956). Son rôle pourrait se situer au niveau de la membrane comme agent de stabilisation (Shkedy-Vinkler et Avi-Dor, 1975). L'hypothèse généralement reconnue est que la bétaine, tout comme les acides aminés, agit en tant qu'effecteur osmotique et contribue ainsi à augmenter la pression osmotique interne pour éviter la deshydratation.

Une alternative au rôle de la proline et de la bétaine a été proposée (Schobert, 1977; Schobert et Tschesche, 1978). Schobert s'oppose à l'hypothèse courante en s'appuyant sur les bases que toute protéine dissoute a une activité optimale dans un milieu de force ionique et de concentration en substances organiques de faible masse moléculaire définies. Ainsi, si la concentration en solutés augmente par des ions ou des substances organiques de faible masse moléculaire, il y a compétition pour l'hydratation et éventuellement précipitation de la protéine. Même si un reflux de l'eau du milieu dans le cytoplasme intervient dans la régulation osmotique, l'équilibre de concentrations résulterait en une diminution du potentiel de l'eau, défavorable pour l'hydratation des biopolymères.

Sa théorie repose sur le fait que la proline est très soluble dans l'eau (162 g/100 ml H₂O à 25°C) et que c'est une molécule zwitterionique (Tanford, 1980) qui peut donc s'associer à la fois aux groupes hydrophiles par son groupe carboxylique hydrophile et aux groupes hydrophobes par son noyau pyrrole hydrophobe (Figure 3). Rendant ainsi hydrophiles les groupements hydrophobes des protéines qui sont les plus sensibles au mouvement de l'eau, la proline augmente la stabilité et la solubilité des protéines à forte pression osmotique.

La bétaine est également très soluble dans l'eau (157 g/100 ml H₂O à 19°C). Etant aussi une molécule zwitterionique, avec les groupements méthyl comme partie hydrophobe et le groupe carboxylique comme partie hydrophile, elle pourrait, à l'image de la proline, stabiliser les groupements hydrophobes des biopolymères (Schobert, 1977).

*** dépendance énergétique:**

Les microorganismes exposés au stress osmotique utilisent un certain nombre de processus pour combattre la deshydratation et pouvoir survivre et se développer. L'accumulation de solutés organiques et inorganiques, la synthèse des solutés organiques sont des phénomènes énergétiquement dépendants pour la cellule. Le coût de la tolérance au stress peut être facilement déterminé sur des organismes hétérotrophes en leur donnant une quantité connue de source de carbone. La quantité utilisée pour les

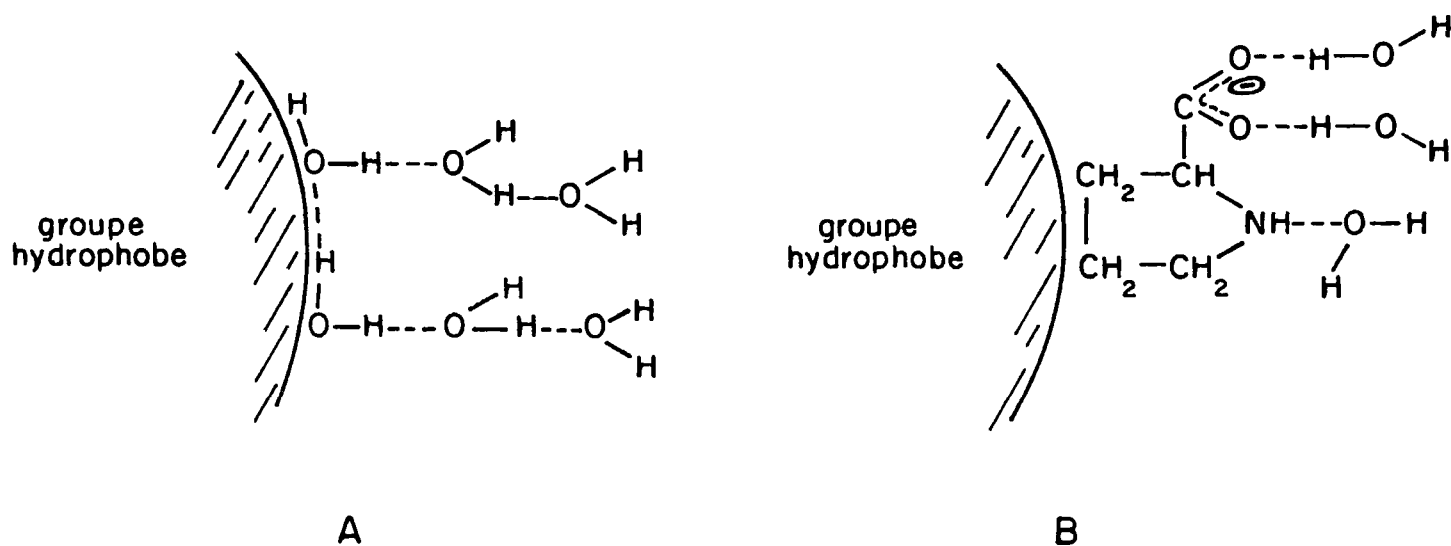


Figure 3

A . Représentation schématique des molécules d'eau impliquées dans un groupe hydrophobe.

B . Représentation schématique de l'association de la proline avec un groupe hydrophobe.

(D'après Schobert, 1977)

divers processus et pour la croissance peut être évaluée par la production de biomasse et la consommation de carbone. Ainsi, des calculs effectués sur la bactérie fixatrice d'azote *Klebsiella pneumoniae* révèlent que 26 ATP/N₂ sont suffisants pour la fixation de N₂ chez la souche N 20, mais que 61 ATP/N₂ sont requis en présence de 0.3 ou 0.4 M NaCl, 67 ATP/N₂ avec 0.5 M NaCl et 82 ATP/N₂ quand le milieu contient 0.6 M NaCl (Rains *et al.*, 1982).

Le maintien des concentrations élevées d'acides aminés à l'intérieur du cytoplasme requiert aussi de l'énergie, comme mis en évidence par l'addition de l'agent découplant TCS, qui provoque un rapide efflux de proline (Gould et Measures, 1977).

c) les algues bleu-vert:

C'est aux frontières des mondes des bactéries procaryotes par leur organisation cellulaire et des plantes eucaryotes par leurs réactions photosynthétiques que se situent les algues bleu-vert ou cyanobactéries. Les études sur leur halophilisme et halotolérance restent encore peu nombreuses (voir Golubic, 1980). Toutefois, deux exemples d'osmorégulation peuvent être cités. Le premier concerne l'accumulation d'ions inorganiques K⁺ par la cyanobactérie halophile *Aphanothece halophytica* pour ajuster sa pression osmotique interne en fonction de la concentration externe en NaCl, (Yopp *et al.*,

1978). Le second exemple concerne l'accumulation d'un composé organique, le seul à avoir été trouvé jusqu'à présent dans cette division des Cyanophyta. Il s'agit du 2-O- α -D glucopyranosyl-glycérol identifié par résonance magnétique nucléaire chez l'algue *Synechococcus* (Borowitzka *et al.*, 1980; Norton *et al.*, 1982). La voie de synthèse de ce glucosylglycérol et les bases moléculaires pour la régulation de sa concentration cytoplasmique ne sont pas encore connues. Ce composé trouvé aussi chez l'autre algue bleu-vert *Agmenellum quadruplicatum* (Kollman *et al.*, 1979) présente une forte analogie structurale avec les hétérosides des algues rouges (Rhodophyta) (Kauss, 1969), mais les fonctions osmorégulatrices de ces hétérosides chez les algues rouges restent encore un sujet controversé (Kremer, 1981). Les analogies structurales des 2-O- α -D sucre-glycérol et leur rôle éventuel dans l'osmorégulation sont d'un intérêt tout particulier dans le domaine de l'évolution moléculaire entre les algues bleu-vert et les algues rouges; ces algues ayant déjà des phycobilisomes immunologiquement similaires (Kao *et al.*, 1973).

d) applications:

L'isolement de mutants de *S. typhimurium* qui accumulent de fortes quantités de proline et acquièrent ainsi le phénotype d'osmotolérance, et la localisation de la mutation sur un

plasmide F', de réplication autonome et transmissible par conjugaison parmi les Entérobactéries (Csonka, 1980) ouvrent la voie à un nouveau champ d'applications des manipulations génétiques: l'osmorégulation. Les objectifs sont doubles:

- (1) "construire" des organismes qui aident à comprendre les bases biochimiques et physiologiques de l'osmorégulation;
- (2) développer la tolérance d'organismes sensibles, c'est-à-dire les rendre capables de survivre et de se multiplier dans l'environnement hostile, dans le but d'applications économiques (Figure 4). Ainsi, l'un des objectifs d'importance économique est l'obtention de souches de *Rhizobium* qui soient osmotolérantes (Le Rudulier et Valentine, 1982): la salinité des sols est en effet un problème de plus en plus grave dans les régions irriguées (Rains, 1979), et de nombreuses souches de *Rhizobium* qui nodulent des cultures de légumineuses sont sensibles au sel, ce qui affecte le taux de fixation d'azote par symbiose chez les plantes. Mais en première approche, c'est sur *Klebsiella pneumoniae* que fut réalisé le transfert du plasmide F' qui conféra à *S. typhimurium* la capacité de surproduire la proline et de développer l'osmotolérance, et il s'avère que la mutation stimule l'activité de la nitrogénase de 10 à 25 fois dans un milieu d'osmolarité élevée (0.4 à 0.6 M NaCl) (Le Rudulier *et al.*, 1981; 1982).

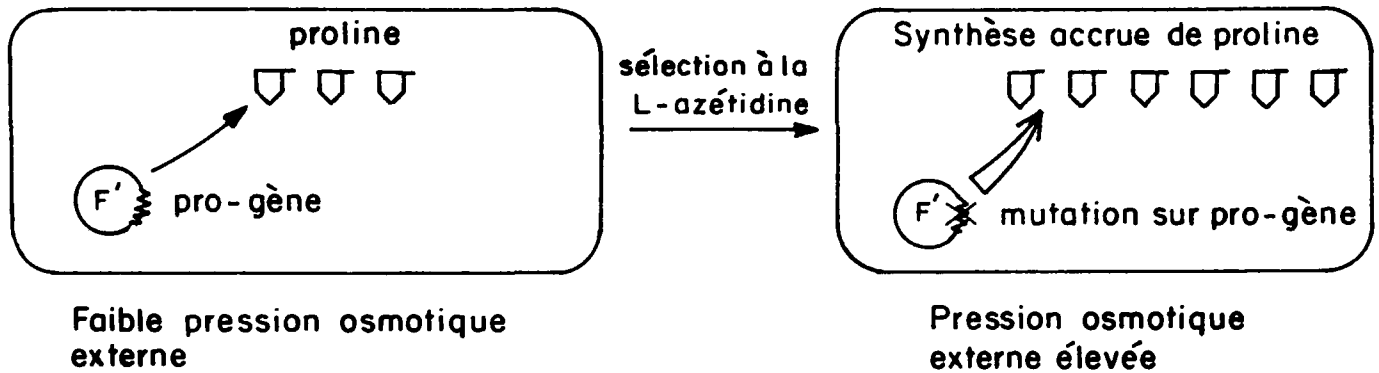


Figure 4. Transformation génétique pour l'induction de l'osmotolérance.

Le plasmide F' est porteur du gène de la biosynthèse de la proline (pro-gène). L'addition de concentrations toxiques de L-azétidine 2-carboxylate, analogue de la L-proline, permet d'obtenir des mutants surproducteurs de proline conférant le phénotype d'osmotolérance (D'après Rains *et al.*, 1982).

4. osmorégulation chez les microorganismes eucaryotes:

Parmi les microorganismes eucaryotes capables de s'adapter dans des environnements hypertoniques, on trouve:

- (1) des levures xérotolérantes (= tolérantes au sucre et/ou au sel selon la dénomination de Brown (1976), et moisissures, illustrées par *Saccharomyces rouxii* et *Xeromyces bisporus* (voir Tableau 2 p 9);
- (2) les algues halophiles, représentées par quelques espèces du genre *Dunaliella*.

Les eucaryotes halotolérants et halophiles répondent au choc osmotique en accumulant de fortes quantités de polyols (en général le glycérol) ou composés analogues. Cette accumulation des polyols a au moins 3 fonctions (Brown, 1978):

- (1) osmorégulation;
- (2) réserve de nourriture;
- (3) protection de l'activité enzymatique à faible a_w (voir aussi Schobert, 1977).

a) les levures:

Soit la levure xérotolérante *Saccharomyces rouxii*, qui peut se développer entre 1.0 a_w et 0.62 a_w en présence de sucre, et supporte des concentrations de sel jusqu'à 0.85 a_w ; la levure

non tolérante *S. cerevisiae* dont la limite de croissance est 0.90 a_w en présence de sucre, et la levure halotolérante *Debaryomyces hansenii* qui peut être cultivée entre 1.0 a_w et 0.85 a_w en présence de sel (soit de 0 à 4 M NaCl). Ces levures produisent toutes les trois du glycérol en réponse à un choc osmotique, mais leur mécanisme d'osmorégulation est pour chacune différent:

S. rouxii répond à une diminution de l' a_w du milieu extérieur en retenant à l'intérieur de sa cellule une plus large proportion de sa production constante de glycérol;

S. cerevisiae répond en stimulant sa synthèse de glycérol, mais en n'en gardant qu'une faible proportion constante, ce qui induit de grandes pertes énergétiques et limite sa tolérance aux faibles a_w ;

D. hansenii répond à une augmentation de la salinité du milieu extérieur à la fois en synthétisant davantage de glycérol et en en gardant une plus grande proportion (Gustafsson et Nor-krans, 1976; Gustafsson, 1979).

L'étude du métabolisme de *S. rouxii* et *S. cerevisiae* révèle plusieurs différences phénotypiques significatives:

Chez *S. rouxii*, le glycérol est transporté de façon active et non chez *S. cerevisiae*. De plus, lorsque ces levures sont cultivées sur un milieu minimal (0.997 a_w), *S. rouxii* est riche en acide linoléique (C_{18:2}) et aucun ne peut être détecté chez

S. cerevisiae. Ces deux différences au niveau membranaire ne sont sans doute pas sans rapport: Walker et Kummerow (1964) ont en effet mis en évidence une corrélation entre la teneur d'acide linoléique et l'imperméabilité au glycérol chez les érythrocytes, d'autre part, la membrane cytoplasmique de *Dunaliella* qui est imperméable au glycérol (Brown *et al.*, 1982) est aussi riche en acide linoléique et linolénique (C_{18:3}) (Evans *et al.*, 1982; Fried *et al.*, 1982).

Les voies de synthèse du glycérol sont aussi différentes entre *S. cerevisiae* et *S. rouxii*: celle de *S. cerevisiae* fait intervenir presque exclusivement la voie de la glycolyse et la formation de NADH⁺ alors que celle de *S. rouxii* dépend essentiellement de NADPH⁺ par le cycle des pentoses. Ainsi, la stimulation de la production de glycérol en réponse au choc osmotique chez *S. cerevisiae* a des incidences sur tout l'ensemble du métabolisme pour la régénération de NADH⁺, alors que celle de *S. rouxii* ne requiert pas de réactions supplémentaires pour la formation de NADPH⁺ puisqu'il est déjà réduit au cours du cycle des pentoses (Brown et Edgley, 1980). Un efflux de K⁺ a été mis en évidence comme réponse au choc osmotique chez *S. cerevisiae* et *S. rouxii*. Cet efflux a pour conséquence d'activer la 3-phosphoglycérol deshydrogénase, enzyme catalysant la réduction de la dihydroxyacétone phosphate en 3-phosphoglycérol, normalement inhibée dans les concentrations

physiologiques de K^+ , et par là-même favorise la synthèse de glycérol chez *S. cerevisiae* (Brown et Edgley, 1980). Par contre, les activités spécifiques des enzymes de la glycolyse de *S. rouxii* ne sont que peu affectées pendant le choc osmotique (Edgley et Brown, 1983).

b) les algues:

Ce sont quelques espèces d'algues vertes photoautotrophes du genre unicellulaire sans paroi *Dunaliella* qui représentent les organismes eucaryotes halotolérants extrêmes. Ils sont en effet capables de s'adapter et se développer dans des milieux dont la concentration en NaCl peut varier de 0.5 M jusqu'à saturation (environ 5 M NaCl). Le mécanisme responsable de cette unique halotolérance fait à nouveau intervenir le soluté compatible glycérol, dont la concentration intracellulaire est proportionnelle et presque isomolaire à la concentration en NaCl du milieu de culture. Certaines algues cultivées dans un milieu contenant 4 M NaCl contiennent environ 50 % de glycérol sur la base de leur poids sec (Ben Amotz et Avron, 1982). L'application commerciale de *Dunaliella* pour la production de glycérol est actuellement à l'étude (Ben Amotz et Avron, 1983).

La régulation de *Dunaliella* avec le glycérol se fait entièrement par ajustements biochimiques, c'est-à-dire que la concentration intracellulaire de glycérol est contrôlée par synthèse

et dégradation avec pratiquement aucune perte à l'extérieur de la cellule (Brown et Borowitzka, 1979), contrairement au cas des levures *S. cerevisiae* et *S. rouxii* précédemment décrit. Quatre enzymes ont été mises en évidence et un schéma hypothétique pour le métabolisme du glycérol a récemment été proposé (Ben Amotz et Avron, 1982) (Figure 5).

La synthèse du glycérol dépend des métabolites photosynthétiques du cycle de Calvin. Elle peut aussi avoir lieu en l'absence de lumière à partir des réserves accumulées, mais qui ne sont pas osmotiquement actives, par exemple l'amidon qui est alors métabolisé par la voie de la glycolyse. Le triose phosphate formé est ensuite réduit en phosphoglycérol et déphosphorylé comme chez *S. cerevisiae*. Par contre, la conversion du glycérol en polysaccharides emprunte la voie inverse de celle suivie par *S. rouxii* par l'intermédiaire de la dihydroxyacétone.

Des études cinétiques sur la variation de concentrations intracellulaires de glycérol au cours de la transition d'un milieu dilué à un milieu fortement salé indiquent que le processus est très rapide: la synthèse de glycérol peut être détectée après quelques minutes de transition; et cette synthèse ne requiert pas la synthèse de nouvelles protéines (Ben Amotz et Avron, 1978; Borowitzka *et al.*, 1977). Toutefois, le signal qui commande l'osmorégulation n'est pas encore connu. Il peut s'agir soit d'une variation de concentration de certains métabolites (NADP, ATP, H^+ ou dihydroxyacétone...) (Ben Amotz et

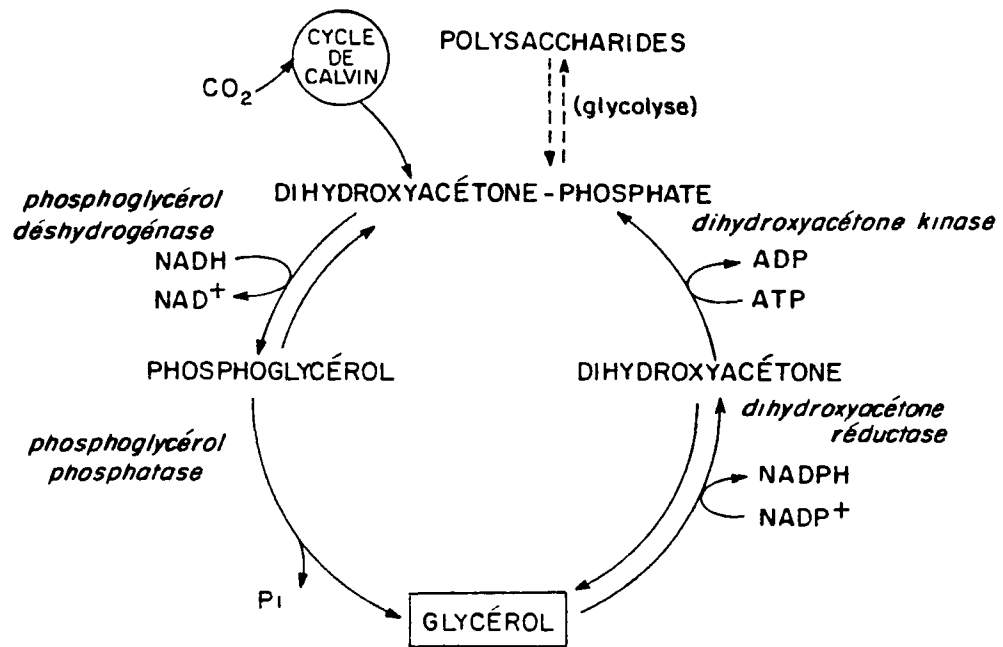


Figure 5. Schéma hypothétique de la synthèse et de la dégradation du glycérol chez *Dunaliella*, (Adapté d'après Ben Amotz et Avron, 1982).

Avron, 1980), soit d'une modification du volume cellulaire (Brown et Borowitzka, 1979), soit d'un changement dans la structure lipidique de la membrane (Curtain *et al.*, 1983). Les sites de synthèse et d'accumulation du glycérol ne sont pas encore établis (Brown et Borowitzka, 1979).

5. conclusion:

Le problème fondamental de la salinité auquel les organismes doivent faire face est l'effet disruptif des ions Na^+ sur la structure et la fonction des ribosomes et sur les systèmes enzymatiques sensibles au sel.

Pour y remédier, la plupart des cellules bactériennes, animales et végétales ont développé des mécanismes d'exclusion du Na^+ et du transport de Cl^- . Le plus efficace est sans doute celui des organismes halophiles extrêmes, puisqu'ils peuvent se développer dans des solutions saturées de NaCl (5 M) et garder une faible concentration interne en Na^+ en utilisant l'énergie liée aux systèmes de transport membranaire (Lanyi, 1982). Cette stratégie est commune à tous les organismes halotolérants (Développée dans le paragraphe suivant p 49 pour les procaryotes), mais la perte d'eau qui suit l'exclusion du sel est compensée différemment par les organismes:

Les bactéries halophiles extrêmes vivant dans un milieu où la salinité est très élevée et constante accumulent de fortes

concentrations de K^+ à la place de Na^+ . Ces ions servent à l'équilibre osmotique de l'eau à travers la membrane cellulaire. Mais bien que les ions KCl soient moins toxiques que NaCl, les protéines, ribosomes et membranes ont dû subir certaines modifications dans leur composition et leur nature physico-chimique pour rester fonctionnels en présence de si fortes quantités de KCl.

Les bactéries halophiles modérées ou halotolérantes, et quelques eucaryotes développent une autre stratégie pour une adaptation rapide dans un milieu où la salinité est variable, et souvent plus faible: l'accumulation de fortes quantités d'acides aminés (glutamate, proline, acide β -aminobutyrique, glutamine), parfois en combinaison avec les ions K^+ , ou encore bétaine, sucres, polyols (glycérol). La plupart des enzymes ou autres constituants cellulaires essentiels restent fonctionnels en présence de ces grandes quantités de solutés et souvent l'adaptation ne nécessite pas la synthèse de nouvelles protéines. Par contre, ce mode d'adaptation requiert le développement de mécanismes de contrôle qui soient sensibles à l'environnement et qui régulent la réponse cellulaire.

Du point de vue phylogénétique, on peut se demander pourquoi les "anciennes" bactéries halophiles extrêmes accumulent des ions inorganiques (K^+) alors que les procaryotes et eucaryotes accumulent des composés métaboliques de faible poids

moléculaire riches en énergie, et pourquoi ce sont toujours les mêmes classes de produits qui sont accumulés par des organismes phylogénétiquement si diversifiés.

Selon Yancey *et al.* (1982), l'adoption répétée de quelques classes de solutés compatibles par des organismes phylogénétiquement différents en réponse au choc osmotique peut être le reflet de deux phénomènes importants:

- (1) un phénomène physique, par lequel les interactions physico-chimiques entre les solutés, l'eau et les macromolécules déterminent quels sont les types de solutés compatibles avec les structures macromoléculaires et leur fonction;
- (2) un phénomène de "simplicité génétique", par lequel, grâce à l'utilisation du système de solutés compatibles, les protéines restent fonctionnelles sur une vaste échelle de concentrations. Seules les Halobactéries ont été capables de modifier leurs protéines pour se conformer à l'environnement extrêmement salé. Tous les autres organismes devant faire face à un choc osmotique emploient une stratégie qui demande un changement génétique minimal, mais qui offre une grande flexibilité pour une adaptation dans des environnements de salinité fort variée.

La récente application du génie génétique dans le domaine de l'osmorégulation a 2 buts essentiels interdépendants: une meilleure compréhension du phénomène de l'osmorégulation, et

le développement de souches tolérantes capables de croître et de se reproduire dans un environnement salé. L' a_w de l'environnement tend à diminuer de plus en plus et il est important de "fabriquer" des organismes productifs dans des environnements salés (exemple *Rhizobium*). Le problème de la salinité n'est certes pas nouveau, puisque les sols irrigués de la vallée de l'Euphrate des temps bibliques devinrent si salés que les cultures n'y poussèrent plus, mais de mêmes dévastations ont lieu aujourd'hui sur des terres autrefois riches, comme les terres de Mexico irriguées par les eaux de plus en plus salées du Colorado (voir San Pietro, 1982; Epstein *et al.*, 1980).

A présent, peu d'informations sont connues sur les mécanismes de tolérance au sel chez les plantes supérieures et les cellules eucaryotes. Plus de renseignements sont disponibles chez les microorganismes, tant au niveau physiologique que moléculaire, et ils sont par là-même les modèles de choix pour les manipulations génétiques. En outre ils se développent relativement rapidement dans des milieux simples et sont plus maniables pour des études moléculaires et génétiques que les plantes. Mais déjà des similitudes apparaissent entre les procaryotes et les plantes: le rôle des ions inorganiques K^+ dans l'équilibre de la balance osmotique (Rains *et al.*, 1982), l'accumulation de proline, bêtaïne, glycérol comme solutés compatibles organiques (Wyn-Jones, 1980; Jefferies, 1980). Il est évident

que la compréhension des mécanismes de régulation chez les microorganismes, et en particulier chez les algues bleu-vert photosynthétiques et les algues vertes donnera des informations de bases importantes pour l'étude de la tolérance au sel chez les plantes supérieures et aidera à la formation de plantes halotolérantes, capables d'être cultivées sur des terrains à forte salinité.

5. Le transport de Na^+ .

1. mise en évidence:

L'aptitude des bactéries à se développer en présence de fortes concentrations de sel dépend de leurs possibilités à excréter de larges quantités de Na^+ du cytoplasme et à les remplacer par des solutés plus compatibles avec les processus intracellulaires, soit K^+ dans le cas des Halobactéries, soit des acides aminés parfois en combinaison avec K^+ , sucres, polyols (glycérol) dans le cas des bactéries, levures, algues, plantes halophiles et halotolérantes. Les organismes cultivés en présence de sel doivent donc transporter les ions Na^+ à travers la membrane cytoplasmique à un rythme beaucoup plus élevé que lorsqu'ils se développent dans un environnement peu salé. Toutefois, l'excrétion des ions Na^+ du cytoplasme est un phénomène observé non seulement chez les procaryotes et eucaryotes halophiles,

mais c'est une caractéristique universelle de toute cellule vivante (voir revues Crane, 1977; West, 1980). L'amplitude du gradient ($[Na^+]_{intracellulaire} / [Na^+]_{extracellulaire}$) est variable selon l'organisme et la pression osmotique du milieu (Tableau 5). La formation de ce gradient requiert de l'énergie comme mis en évidence chez la bactérie marine aérobie stricte *Alteomonas haloplanktis*, où les ions Na^+ s'équilibrent de part et d'autre de la membrane cytoplasmique lorsqu'elle est placée dans des conditions anaérobiques (Thompson et MacLeod, 1971; 1973).

2. théorie chemiosmotique:

Dans le cadre de la théorie chemiosmotique, il ne fait aucun doute que l'éjection de protons est le phénomène qui précède la translocation des cations (K^+ , Na^+).

Proposée par Peter Mitchell (1961), la théorie chemiosmotique se caractérise par des réactions vectorielles à travers une membrane et l'établissement d'une différence de potentiel électrochimique. Cette membrane peut être soit la membrane interne des mitochondries, la membrane thylakoïde des chloroplastes, ou soit la membrane plasmique des procaryotes.

Organisme	$[Na^+]_{ext}$ (M)	$[Na^+]_{int}$ (M)	$\frac{[Na^+]_{int}}{[Na^+]_{ext}}$	Références
<u>non-halophile:</u>				
<i>Salmonella oranienburg</i>	0.15	0.13	0.87	Christian et Waltho (1962)
<u>marin:</u>				
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0.5	0.4	0.8	Unemoto et Hayashi (1979)
	1.0	0.6	0.5	
	1.5	0.8	0.53	
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	0.3	0.12	0.41	Thompson et MacLeod (1973)
	0.5	0.19	0.37	
<i>Halomonas elongata</i>	0.06	0.04	0.66	Vreeland <i>et al.</i> (1983)
	1.38	0.31	0.23	
	3.41	0.63	0.18	
<u>halophile-modéré:</u>				
<i>Vibrio costicola</i>	1.0	0.68	0.68	Christian et Waltho (1962)
	0.6	0.50	0.84	Shindler <i>et al.</i> (1977)
	1.0	0.58	0.58	
	1.6	1.09	0.68	
	2.0	0.90	0.45	
<i>Paracoccus halodenitrificans</i>	1.0	0.31	0.31	Christian et Waltho (1962)
	1.0 exp.*	0.11	0.11	Sadler <i>et al.</i> (1980)
	stat.	0.51	0.51	
	3.0 exp.	0.13	0.04	
	stat.	1.07	0.36	

.../...

Organisme	$[Na^+]_{ext}$ (M)	$[Na^+]_{int}$ (M)	$\frac{[Na^+]_{int}}{[Na^+]_{ext}}$	Références
<i>Micrococcus varians</i> var. <i>halophilus</i>	1.0 4.0	1.17 2.11	1.17 0.53	Chan <i>et al.</i> (1979)
<i>Pseudomonas</i> No 101	1.0 2.0 3.0	0.90 1.15 1.04	0.90 0.57 0.35	Masui et Wada (1973)
Bactérie non identifiée	0,6 exp. 0.6 stat. 4.4 exp. 4.5 stat.	0.05 0.29 0.62 1.01	0.08 0.50 0.14 0.22	Matheson <i>et al.</i> (1976)
<u>halophile extrême:</u>				
<i>Halobacterium cutirubrum</i>	3.3	0.80	0.24	Matheson <i>et al.</i> (1976)
<i>H. salinarium</i>	4.0	1.37	0.34	Christian et Waltho (1962)
<i>Halococcus (Sarcina)</i> <i>morrhuae</i>	4.0	3.17	0.79	Christian et Waltho (1962)
<u>halotolérant:</u>				
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.15	0.1	0.65	Christian et Waltho (1962)

Tableau 5. Exemples de concentrations internes de Na^+ ($[Na^+]_{int}$) en fonction de la concentration externe ($[Na^+]_{ext}$) chez diverses bactéries.

(* exp. = phase exponentielle de croissance; stat. = phase stationnaire de croissance)

Le potentiel électrochimique $\tilde{\mu}_i$ d'une substance i en solution est donné à pression constante par:

$$\tilde{\mu}_i = Z_i F \Psi + \mu_i = Z_i F \Psi + \mu_i^0 + R T \ln (m_i f_i)$$

où Z_i = nombre de charge; F = le Faraday; Ψ = le potentiel électrostatique du milieu; μ_i = le potentiel chimique; μ_i^0 = le potentiel chimique dans les conditions standard; m_i = la molarité; f_i = le coefficient d'activité.

La différence de potentiel électrochimique pour i de part et d'autre d'une membrane séparant 2 phases est donnée par:

$$\Delta \tilde{\mu}_i = Z_i F \Delta \Psi + R T \Delta \ln (m_i f_i)$$

où $\Delta \Psi$ est le potentiel de membrane.

Pour les protons:

$$\Delta \tilde{\mu}_{H^+} = F \Delta \Psi - 2.3 R T \Delta pH$$

Mitchell utilise la notation Δp (force protomotrice ou PMF) pour désigner la différence électrochimique de protons, en unités électriques (mV). La PMF est rendue par:

$$\Delta p = \frac{\Delta \tilde{\mu}_{H^+}}{F} = \Delta \Psi - Z \Delta pH$$

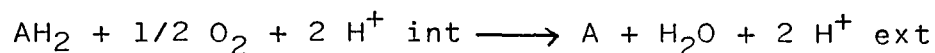
où $Z = 2.3 \frac{R T}{F}$ (à 30°C, $Z = 60$ mV).

La force protomotrice est donc constituée d'une composante électrique $\Delta\psi$ (le potentiel de membrane) et d'une composante osmotique, le facteur $-Z \Delta pH$. Cette différence de potentiel électrique et la différence de pH sont à l'origine de la synthèse d'ATP et de la translocation des ions.

La théorie chemiosmotique repose sur 4 postulats fondamentaux, correspondants aux 4 systèmes structuraux et fonctionnels de la Figure 6. Depuis l'établissement de la théorie (1961), ces postulats ont été étudiés en détails et sont maintenant considérés comme des faits réels:

a) une chaîne respiratoire ou photorédox assurent l'éjection de protons:

Le processus d'oxydoréduction provoque le transfert d'électrons et de protons par une chaîne dans le sens thermodynamique conduisant à une expulsion de protons vers le milieu extérieur (il s'agit donc d'un mécanisme vectoriel). Les composants de la chaîne sont arrangés à l'intérieur de la membrane en boucles d'oxydo-réduction, dont l'équation globale serait:



b) des systèmes membranaires d'échange-diffusion:

Il existe des systèmes d'échange-diffusion tels des échanges électroneutres entre des protons et des cations (antiports) ou des transports simultanés d'anions et de protons (symports) pour l'équilibre osmotique et le transport des métabolites.

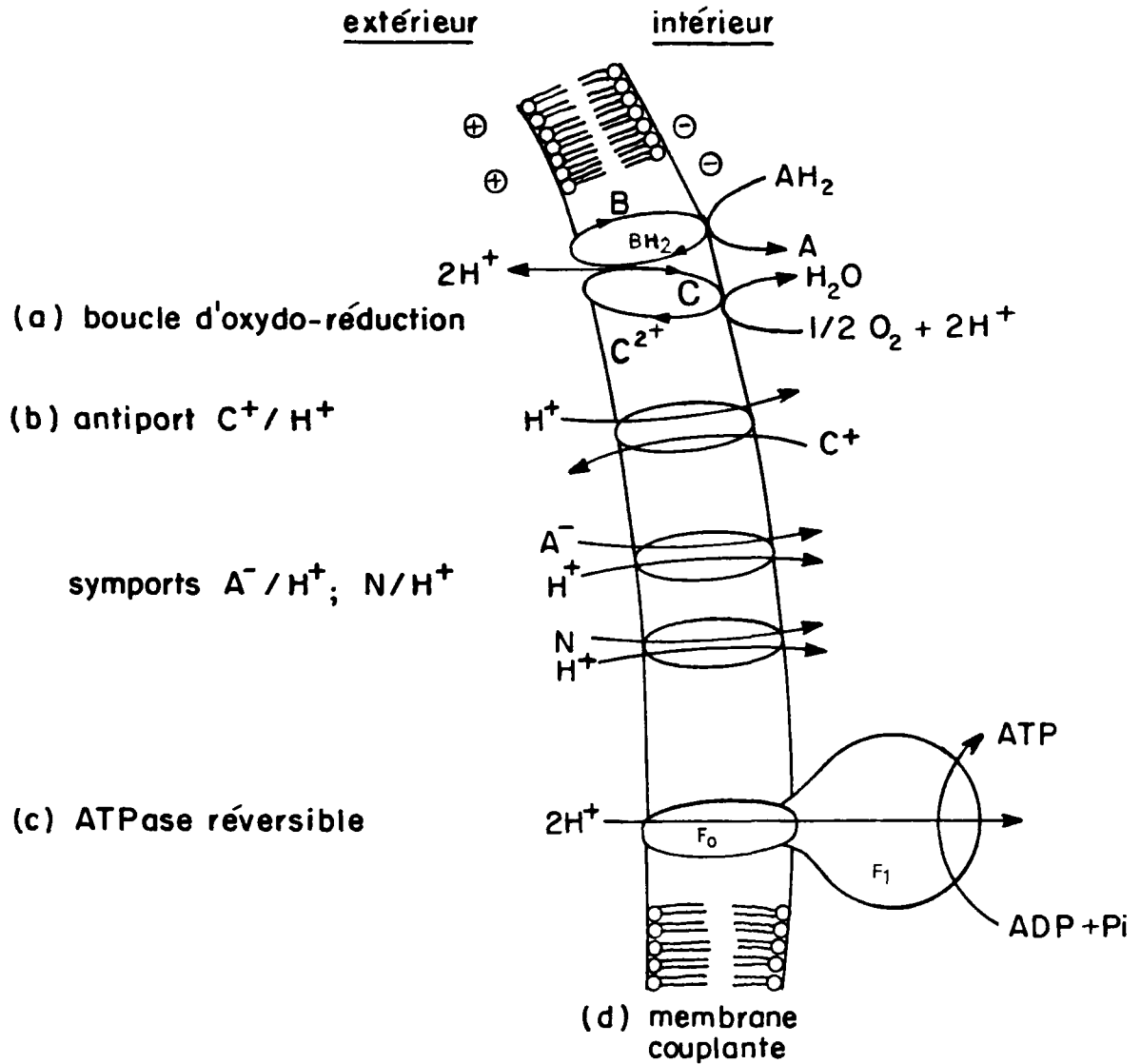


Figure 6. Hypothèse chemiosmotique: niveau physiologique,
(Adapté d'après Mitchell, 1979).

(C^+ = cation; A^- = anion; N = molécule non chargée)

c) une ATPase réversible assurant le pompage des protons:

Les protons éjectés peuvent être recyclés par le fonctionnement d'une pompe à protons membranaire réversible, le complexe enzymatique (F_1F_0) ATPase.

d) une membrane couplante imperméable aux ions:

La membrane interne, qui contient les systèmes (a), (b), (c) est une barrière osmotique non aqueuse, librement perméable à l'eau et pratiquement imperméable aux protons et à la plupart des autres ions.

3. modes d'excrétion de Na^+ :

a) Na^+/H^+ antiport:

Le système de transport de Na^+ le plus commun chez les bactéries est l'antiport Na^+/H^+ . C'est un système de transport secondaire, consommant l'énergie du gradient électrochimique de protons, qui est établi par les systèmes de transport primaires (chaînes d'oxydoréduction, (F_1F_0) ATPase).

C'est sur *Streptococcus faecalis* que fut mis en évidence le premier antiport Na^+/H^+ d'origine microbienne, lorsque Harold et Papineau (1972b) montrèrent que l'exclusion de Na^+ était inhibée par des découplants. Ils isolèrent également un mutant qui avait perdu cet antiport, mais dont les propriétés pouvaient

être partiellement restaurées par l'addition de monensine, un ionophore qui échange spécifiquement les ions Na^+ et H^+ (Bakker, 1979).

Utilisant les mêmes techniques que celles par lesquelles Mitchell et Moyle (1967, 1969a) mirent en évidence l'antiport Na^+/H^+ dans la membrane interne des mitochondries, West et Mitchell (1974) démontrèrent l'existence d'un antiport Na^+/H^+ chez *E. coli*. Ainsi, lorsque *E. coli* est placé dans des conditions anaérobiques, l'addition de Na^+ provoque une acidification de la suspension cellulaire, qui est partiellement renversée en présence de CCCP. De plus, l'injection d'une pulsion d'oxygène provoque une expulsion des ions H^+ par la chaîne respiratoire qui rentrent lentement dans la cellule, mais dont le retour est accéléré en présence de Na^+ . La présence de cet antiport chez *E. coli* a été confirmée à plusieurs reprises et la découverte d'antiport Na^+/H^+ a été étendue à d'autres bactéries (Tableau 6).

b) $\text{Na}^+/\text{cation ATPase}$:

Bien que la présence d'un antiport Na^+/H^+ chez *S. faecalis* fût la conclusion logique des expériences menées par Harold et Papineau (1972 a,b), l'observation que l'application d'une force artificielle $\Delta\psi$, ΔpH ou même un gradient de Na^+ ne résultait jamais en une translocation d'ions Na^+ dans les cellules sans substrat ne pouvait être expliquée et la question de savoir

Organisme	Références
<u>antiport Na^+/H^+:</u>	
<i>Escherichia coli</i>	West et Mitchell (1974) Schuldiner et Fishkes (1978) Beck et Rosen (1979) Tsuchiya et Takeda (1979 a,b) Reenstra <i>et al.</i> (1980)
<i>Salmonella typhimurium</i>	Tokuda et Kaback (1977) Niiya <i>et al.</i> (1980)
<i>Halobacterium halobium</i>	Lanyi et MacDonald (1976) Lanyi et Silverman (1979) Luisi <i>et al.</i> (1980)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Bhattacharyya et Barnes (1978)
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	Niven et MacLeod (1978)
<i>Bacillus alcalophilus</i>	Mandel <i>et al.</i> (1980) Guffanti (1983)
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Benyoucef <i>et al.</i> (1982)
Bactérie thermophile PS3	Goto <i>et al.</i> (1980)
<i>Vibrio costicola</i>	Hamaide <i>et al.</i> (1983)
<u>Na^+/cation ATPase:</u>	
<i>Streptococcus faecalis</i>	Heefner et Harold (1982)
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Benyoucef <i>et al.</i> (1982)
<u>pompe à Na^+/décarboxylase:</u>	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Dimroth (1982)
<i>Micrococcus lactilyticus</i> (= <i>Veillonella alcalescens</i>)	Hilpert et Dimroth (1982)

.../...

Organisme	Références
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	Buckel et Semmler (1982; 1983)
<i>Peptococcus aerogenes</i>	Buckel et Semmler (1983)
<i>Clostridium symbiosum</i> (= <i>C. microsporium</i>)	Buckel et Semmler (1983)
<u>pompe à Na⁺/respiration:</u>	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Tokuda et Unemoto (1982)
<i>V. costicola</i>	Tokuda et Unemoto (1983)

Tableau 6. Les différents types de mécanismes connus utilisés par certaines bactéries pour excréter les ions Na⁺.

pourquoi le transport de Na^+ est si étroitement lié au métabolisme restait sans réponse. De récentes études indiquent que l'exclusion de Na^+ peut être couplée plus directement avec l'utilisation d'ATP, par une Na^+/H^+ ATPase, sans consommer l'énergie du gradient électrochimique de protons (Heefner *et al.*, 1980). L'échange Na^+/H^+ est alors sous la dépendance de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP et est électroneutre. Le complexe Na^+/H^+ ATPase serait formé de 2 sous-unités, l'une catalytique et l'autre l'antiport Na^+/H^+ , selon le modèle de la pompe modulaire établi par Heefner (1982) sur les bases que lorsque le système de transport est dissocié soit par une mutation, soit par l'action d'une protéase, l'activité de l'antiport Na^+/H^+ redevient dépendante de ΔP (Figure 7).

Jinks *et al.* (1978) ont également détecté une ATPase activée par les ions Na^+ dans des préparations de membrane de *Acholeplasma laidlawii*, mais jusqu'à présent aucune évidence ne prouve que cette enzyme est impliquée dans le transport des ions Na^+ . Par contre, les mouvements de Na^+ et K^+ de *Mycoplasma mycoides* var. *Capri* pourraient être catalysés par une (Na^+-K^+) ATPase, comme celle trouvée chez les organismes supérieurs, en plus d'un antiport Na^+/H^+ (Benyousef *et al.*, 1982).

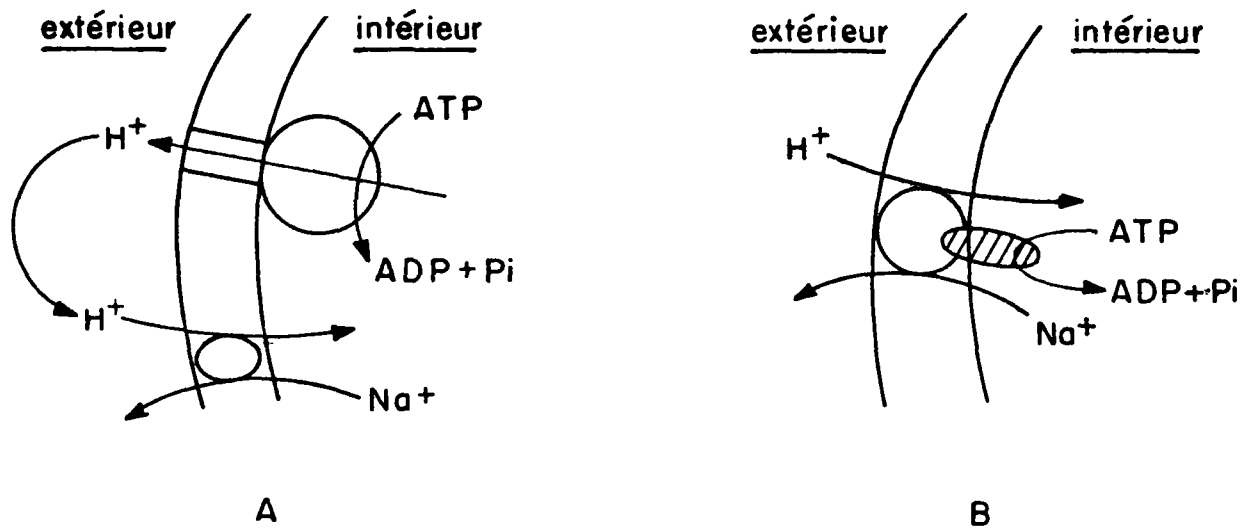


Figure 7. Modèles du transport de Na^+ :

A. l'antiport: les ions Na^+ et H^+ sont échangés sous la dépendance d'un gradient électrochimique de protons;

B. la pompe modulaire Na^+/H^+ ATPase: les ions Na^+ et H^+ sont échangés sous la dépendance de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP (voir texte).

(D'après Heefner, 1982).

c) pompe à Na^+ /décarboxylase:

Un autre mécanisme de conversion de l'énergie récemment découvert consiste en la formation d'une pompe à Na^+ primaire à partir d'une réaction enzymatique autre que celle de l'hydrolyse de l'ATP catalysée par la (F_1F_0) ATPase.

Klebsiella aerogenes peut être cultivée sur citrate dans des conditions anaérobiques en présence d'ions Na^+ , et Dimroth (1982) découvrit que les ions Na^+ sont activement transportés au cours de la réaction de décarboxylation par l'oxaloacétate décarboxylase, la deuxième enzyme impliquée dans la fermentation du citrate, et enzyme liée à la membrane.

La méthylmalonyl-CoA décarboxylase de *Micrococcus lactilyticus* (= *Veillonella alcalescens*) (Hilpert et Dimroth, 1982) et la glutaconyl-CoA décarboxylase de *Acidaminococcus fermentans* (Buckel et Semmler, 1982; 1983), de *Peptococcus aerogenes* et *Clostridium symbiosum* (= *C. microsporium*) (Buckel et Semmler, 1983) sont les deux autres exemples connus d'enzymes membranaires qui catalysent le transport des ions Na^+ et convertissent ainsi l'énergie de décarboxylation en un gradient de Na^+

d) pompe à Na^+ /respiration:

La formation d'un gradient de Na^+ et d'un potentiel de membrane en présence de protonophores a conduit Tokuda et Unemoto (1982)

à découvrir que, en milieu alcalin, la bactérie marine *Vibrio alginolyticus* expulse directement des ions Na^+ par la chaîne respiratoire, sans l'intermédiaire d'un efflux de H^+ comme supposé par la théorie de Mitchell (1966). Tout récemment, ces mêmes auteurs identifièrent une pompe à Na^+ primaire similaire chez *V. costicola* (Tokuda et Unemoto, 1983).

e) conclusions:

Que la force protomotrice joue un rôle dans l'exclusion de Na^+ par le biais d'un antiport Na^+/H^+ est un fait maintenant supporté par de nombreuses évidences, mais qui n'apparaît plus comme caractéristique universelle des bactéries.

S. faecalis, *A. laidlawii*, et *M. mycoides* sont toutes les trois des bactéries glycolytiques qui obtiennent leur énergie par la synthèse d'ATP. Or, il a été mis en évidence que le gradient électrochimique de protons établi par le système H^+ -ATPase est bien moins large que celui obtenu par la voie oxydative (Kashket, 1981 a,b). Une PMF réduite pourrait favoriser le développement de mécanismes alternatifs chez ces bactéries tel que la Na^+ /cations ATPase, et expliquer par ailleurs pourquoi les bactéries anaérobiques *K. aerogenes*, *M. lactilyticus*, *A. fermentans*, *P. aerogenes* et *C. symbiosum* établissent en partie leur gradient de Na^+ en utilisant l'énergie libérée au cours de décarboxylations catalysées par des enzymes membranaires (Heefner, 1982; Buckel et Semmler, 1983).

La pompe à Na^+ de la bactérie marine *V. alginolyticus* et de la bactérie halophile modérée *V. costicola* est considérée comme un avantage pour l'organisme se développant dans un milieu riche en Na^+ (Tokuda et Unemoto, 1982; 1983). Toutefois, il est à noter que les bactéries halophiles extrêmes vivant dans des milieux de salinité bien plus élevée (3 à 5 M NaCl) établissent leur gradient de Na^+ par la seule voie de l'antiport Na^+/H^+ puisque l'halorhodopsine qui avait été considérée comme une pompe à Na^+ (Greene et Lanyi, 1979) est désormais identifiée comme étant une pompe électrogénique à Cl^- , activée par la lumière (Schobert et Lanyi, 1982; Lanyi et Schobert, 1983).

4. rôle du Na^+ et des gradients de Na^+ :

Que les ions Na^+ jouent un rôle important dans le transport de substrat chez les eucaryotes est un fait établi depuis déjà longtemps (voir revues Crane, 1977; West, 1980; Eddy, 1981), par contre chez les procaryotes, bien que leur influence à divers niveaux du métabolisme soit maintenant connue, leur rôle fondamental n'est pas encore clairement élucidé.

Tout comme chez les eucaryotes, les ions Na^+ peuvent influencer le transport de nombreux substrats chez les bactéries, même parmi celles qui ne requièrent pas la présence de Na^+ pour se développer (voir Lanyi, 1979). Lorsque leur effet sur le processus de transport est une stimulation ou une exigence (Tableau 7),

Organisme	Substrat	Effet	Références
<u>non-halophile:</u>			
<i>Escherichia coli</i> B	glutamate	stimulation ($K_m \downarrow$) exigence	Frank et Hopkins (1969) Tsuchiya <i>et al.</i> (1977 a)
<i>E. coli</i> B (vés.)	glutamate	stimulation exigence exigence	Miner et Frank (1974) Hasan et Tsuchiya (1977) MacDonald <i>et al.</i> (1977)
<i>E. coli</i> K 12	glutamate	exigence ($K_m \downarrow$)	Halpern <i>et al.</i> (1973)
<i>E. coli</i> K 12 (vés.)	glutamate	exigence ($K_m \downarrow$)	Kahane <i>et al.</i> (1975)
<i>E. coli</i>	mélibiose	stimulation ($K_m \downarrow$)	Tanaka <i>et al.</i> (1980)
	TMG	exigence	Tsuchiya <i>et al.</i> (1977 b) Tsuchiya et Wilson (1978)
<i>E. coli</i> (bactéries + vés.)	TMG	stimulation	Lopilato <i>et al.</i> (1978)
<i>E. coli</i> (vés.)	TMG	exigence	Cohn et Kaback (1980)
<i>E. coli</i> (vés.)	succinate	stimulation	Rayman <i>et al.</i> (1972)
<i>E. coli</i>	proline	stimulation ($V_{max} \nearrow$)	Stewart et Booth (1983)
<i>E. coli</i>	K^+	stimulation	Sorensen et Rosen (1980)

.../...

Organisme	Substrat	Effet	Références
<i>Salmonella typhimurium</i>	TMG	exigence ($K_m \downarrow$)	Stock et Roseman (1971)
<i>S. typhimurium</i> (vés.)	TMG	exigence	Tokuda et Kaback (1977)
<i>S. typhimurium</i>	mélibiose	exigence exigence ($K_m \downarrow$)	Van Thienen <i>et al.</i> (1978) Niiya <i>et al.</i> (1980)
<i>Bacillus licheniformis</i> (bactéries + vés.)	glutamate	stimulation	MacLeod <i>et al.</i> (1973)
<i>Bacillus subtilis</i> (vés.)	glutamate	exigence ($K_m \downarrow$)	Kusaka et Kanai (1979)
<i>B. alcalophile</i>	AIB glucose	exigence stimulation	Koyama <i>et al.</i> (1976)
<i>B. alcalophile</i> No 10A-2	AIB	stimulation	Kitada et Horikoshi (1980 a)
<i>B. alcalophile</i> No 8-1	AIB	stimulation ($K_m \downarrow$)	Kitada et Horikoshi (1977; 1980 a)
<i>B. alcalophile</i> No 8-1 (vés.)	sérine	stimulation	Kitada et Horikoshi (1980 b)
<i>B. alcalophilus</i>	AIB	exigence	Guffanti <i>et al.</i> (1978)
<i>B. alcalophilus</i> (vés.)	AIB	exigence ($K_m \downarrow$)	Bonner <i>et al.</i> (1982)
<i>B. firmus</i> RAB (vés.)	AIB	exigence	Krulwich <i>et al.</i> (1982)

.../...

Organisme	Substrat	Effet	Références
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	K ⁺ , Pi, glutamate	exigence	Kodama et Taniguchi (1977)
<i>P. aeruginosa</i> (vés.)	L-leucine	stimulation (K _m ↓)	Hoshino et Kageyama (1979)
	thréonine	stimulation	Shiio <i>et al.</i> (1973)
<i>Brevibacterium flavum</i>	thréonine sérine	stimulation	Shiio <i>et al.</i> (1973)
<i>Aerobacter cloacae</i>	thréonine	stimulation	Shiio <i>et al.</i> (1973)
<i>Serratia marcescens</i>	thréonine	stimulation	Shiio <i>et al.</i> (1973)
<i>Micrococcus glutamicus</i>	thréonine	stimulation	Shiio <i>et al.</i> (1973)
<i>M. lysodeikticus</i>	succinate glucose L-valine	stimulation (K _m ↓)	Ariel et Grossowicz (1974)
<i>Mycobacterium phlei</i> (vés.)	proline	exigence (V _{max} ↑)	Hirata <i>et al.</i> (1974)
<i>Chromatium vinosum</i>	AIB, alanine	exigence (K _m ↓)	Pettitt <i>et al.</i> (1982)
	L-aspartate	stimulation	Cobb et Knaff (1983)

.../...

Organisme	Substrat	Effet	Références
<u>marin</u>			
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	AIB, D-fucose	exigence	Drapeau <i>et al.</i> (1966)
<i>A. haloplanktis</i> (vés.)	AIB, L-alanine	exigence	Sprott <i>et al.</i> (1975)
<i>Photobacterium fischeri</i>	AIB	exigence	Drapeau <i>et al.</i> (1966)
<i>Vibrio alginolyticus</i>	AIB	exigence	Tokuda <i>et al.</i> (1982)
<u>halophile-moderé</u>			
<i>Vibrio costicola</i>	AIB	exigence	Kushner <i>et al.</i> (1983)
Bactérie halophile Ba 1	proline	stimulation	Peleg <i>et al.</i> (1980)
<u>halophile extrême limite:</u>			
<i>Ectothiorhodospira shaposhnikovii</i>	succinate, fumarate, malate	exigence	Karzanov et Ivanovsky (1980)
<u>halophile extrême:</u>			
<i>Halobacterium salinarum</i>	L-glutamate	exigence	Stevenson (1966)
<i>H. halobium</i> (vés.)	tous les acides aminés	exigence (V _{max} ↗)	MacDonald <i>et al.</i> (1977)
<u>halotolérant:</u>			
<i>Halomonas elongata</i>	AIB	exigence	Martin <i>et al.</i> (1983)

Tableau 7. Exemples de transports de substrats activés par les ions Na⁺ chez diverses bactéries.

(AIB = acide α -aminoisobutyrique; TMG = méthyl β -D-thiogalactopyranoside; vés. = vésicules)

ces ions peuvent intervenir de 3 manières différentes:

(a) soit en jouant un rôle de cofacteur: ils induisent un changement conformationnel de la protéine, la rendant plus adéquate pour transporter le substrat;

(b) soit en participant à la translocation des métabolites au travers la cellule (symport, antiport): ils fournissent l'énergie nécessaire au transport actif en se déplaçant au travers la membrane dans le sens de leur gradient;

(c) soit en influençant la source d'énergie impliquée dans le transport (exemple: potentiel de membrane): ils ont dans ce cas un effet plus général sur toutes les fonctions de la membrane énergétiquement dépendantes.

Les ions Na^+ peuvent aussi être inhibiteurs comme c'est le cas du transport d'acides aminés neutres chez *Streptomyces hydrogenans* (Ring *et al.*, 1976) ou de citrate chez *Aerobacter aerogenes* (Eagon et Wilkerson, 1972). Enfin, chez aucune espèce de *Streptococcus*, un système de transport de sucre ou d'acide aminé dépendant de Na^+ n'a encore été rapporté, laissant supposer que le gradient de Na^+ établi par la Na^+/H^+ ATPase intervient dans d'autres processus que le transport de substrats (Heefner, 1982).

La participation de l'antiport Na^+/H^+ dans la régulation du pH cytoplasmique est supportée par de plus en plus nombreuses preuves (voir Padan *et al.*, 1981; Booth et Kroll, 1983). Il

a par exemple été montré chez *E. coli* que par l'intermédiaire de l'antiport Na^+/H^+ les ions Na^+ et H^+ étaient échangés de manière électrogénique à pH alcalin, de telle sorte que le pH interne des bactéries reste plus acide (Schuldiner et Fishkes, 1978).

Les évidences les plus probantes sont sans doute celles obtenues par la sélection de mutants ayant perdu cet antiport, et l'étude de leur comportement. Ainsi le mutant DZ3 de *E. coli* qui ne peut plus excréter les ions Na^+ perd la faculté de se développer à pH alcalin (Zilberstein *et al.*, 1982 a) et possède des systèmes de transport dépendants de Na^+ (glutamate, mélibiose) défectueux (Zilberstein *et al.*, 1982 b). De même, lorsque *Bacillus alcalophilus* ne peut plus excréter les ions Na^+ , il ne se développe plus à pH alcalin (pH 8.5-11.5) et ne transporte plus l'AIB à ces pH, avec ou sans Na^+ . Par contre ce mutant non alcalophile acquiert la faculté de se développer à des pH plus acides (Krulwich *et al.*, 1979) et peut transporter l'AIB à pH acide sans exiger les ions Na^+ (Krulwich *et al.*, 1979). A la suite de ces observations, Guffanti *et al.* (1981) ont émis l'hypothèse que tous les systèmes de transport dépendants de Na^+ (antiport Na^+/H^+ ; symports $\text{Na}^+/\text{substrat}$) ont une sous-unité commune, à l'image du modèle proposé par Hong (1977), selon lequel tous les symports $\text{H}^+/\text{substrat}$ partageraient la même sous-unité H^+ .

5. considérations évolutives:

Le transport de Na^+ a en principe 2 fonctions: excréter les ions Na^+ pour garder optimales les activités cytoplasmiques, et participer aux processus énergétiques de la membrane, soit en contribuant au transport actif de métabolites, soit en influençant le gradient de protons. D'un point de vue évolutif, la question est de savoir quel mécanisme vient en premier: le transport de Na^+ est-il tout d'abord un mécanisme pour maintenir l'environnement intérieur fonctionnel, ou bien est-il tout d'abord un mécanisme pour mieux répartir les ressources énergétiques de la cellule?

Skulachev (1978) a émis l'hypothèse que le gradient de Na^+ servirait d' "énergie tampon": d'une part l'alcalinisation du pH cytoplasmique due à la translocation des protons serait évitée par le biais d'un antiport Na^+/H^+ , éventuellement réversible dans des conditions défavorables de pH, et d'autre part la transformation d'un gradient de H^+ en un gradient de Na^+ permettrait d'augmenter la capacité énergétique à travers la membrane des bactéries, puisque le gradient de pH que la cellule peut établir est limité par le besoin de maintenir un pH cytoplasmique favorable aux fonctions métaboliques. Lanyi (1979) remarqua que si cette hypothèse est bien supportée par les observations faites sur les bactéries halophiles extrêmes, elle n'est pas aussi applicable dans le cas de bactéries non halophiles,

où le gradient de Na^+ n'est guère plus large que celui de H^+ , et où par conséquent l'énergie emmagasinée par un gradient de Na^+ n'est pas plus grande que celle conservée par un gradient de H^+ . Ainsi, ces questions évolutives sur le transport de Na^+ restent entières.

6. Propos de la thèse.

Vibrio costicola est une bactérie halophile-moderée qui peut se développer sur une échelle de concentrations en NaCl variant de 0.2 à 3.5 M. Des résultats préliminaires ont suggéré que la membrane cellulaire, point de contact entre la cellule bactérienne et son environnement, puisse être un site privilégié pour la compréhension de l'adaptation physiologique des bactéries aux variations extérieures de concentrations en NaCl. En effet, *V. costicola* peut transporter l'acide α -aminoisobutyrique (AIB) en présence d'un vaste rang de concentrations en NaCl dont la limite supérieure dépend de la concentration en NaCl à laquelle les bactéries sont cultivées. Ainsi, les bactéries cultivées à 1 M NaCl peuvent transporter l'AIB en présence de 3 M et même 4 M NaCl, alors que celles cultivées sur le même milieu mais en présence de 0.5 M NaCl ont un système de transport d'AIB très sensible à 3 M NaCl et pratiquement complètement inhibé en présence de 4 M NaCl (Kushner, 1980).

C'est à partir de cette observation de base qu'a été construite cette thèse. Dans un premier temps, des expériences furent réalisées pour déterminer quelles conditions d'incubation permettaient à des bactéries cultivées à 0.5 M NaCl de développer un transport d'AIB halotolérant, et inversement, sous quelles conditions les bactéries cultivées à 1 M NaCl perdaient-elles cette capacité d'accumuler l'AIB en présence de 4 M NaCl. Mais aucun système de transport n'avait jusqu'alors été étudié chez *V. costicola* et la connaissance de principes généraux concernant l'accumulation de l'AIB et la génération de l'énergie s'est révélée indispensable. C'est pourquoi, la première partie des "Résultats" présente certaines caractéristiques du transport d'AIB obtenues sur des bactéries cultivées à leur concentration optimale en NaCl (1 M) (Forsyth et Kushner, 1970). Cette partie est suivie de la mise en évidence d'un antiport Na^+/H^+ et de ses conséquences pour les bactéries. Finalement l'étude comparative de la tolérance au sel entre les bactéries cultivées à 0.5 M et celles cultivées à 1 M NaCl est décrite, abordée au niveau spécifique du système de transport de l'AIB, et reliée à l'ensemble de la bactérie.

2. Matériel & Méthodes

1. Culture.

Vibrio costicola NRCC 37001 est cultivé en fiole cônique d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu et incubé à 30°C avec une agitation constante. Le milieu de culture consiste en 1 % (poids/volume) protéose-peptone n° 3 (Difco), 1 % (pds/vol) bactotryptone (Difco), et 0.5 ou 1 M NaCl (pH final 7.6). La souche est entretenue par repiquages successifs sur milieu gélosé (1.5 %, pds/vol) de même composition que le milieu de culture et conservée à 4°C.

A l'exception de l'étude de la tolérance au sel où les bactéries sont cultivées à 0.5 et 1 M NaCl (section 3 des "Résultats"), toutes les autres expériences de caractérisation du transport d'AIB et la mise en évidence de l'antiport Na^+/H^+ sont réalisées sur des bactéries cultivées dans des conditions optimales de 1 M NaCl (Forsyth et Kushner, 1970).

2. Préparation des bactéries et des solutions salines.

Les bactéries sont recueillies en fin de phase exponentielle (16 à 18 heures de culture), à une densité de 1.0 à 1.5 mg (poids sec/ml) et lavées 2 fois avec une solution saline contenant 0.5 ou 1 M NaCl selon la concentration en sel du milieu de culture, 8 mM KCl, 0.4 mM MgSO_4 , 0.2 mM KH_2PO_4 , et 50 mM tampon TRIS (Tris [hydroxyméthyl] -aminométhane)-HCl (Trizma-HCl, Sigma) (pH final 7.2) (ou autrement précisé). Les suspensions sont utilisées immédiatement à la densité indiquée et gardées dans la glace dans le cas d'expériences successives ou prolongées.

Pour les études sur l'effet du pH extérieur (pHo), les solutions salines sont préparées en solution tampon MES (acide 2 [N-morpholinoéthane] sulfonique)-KOH (50 mM) pour les pH inférieurs à 7.2, et en solution tampon Tris-HCl pour ceux supérieurs à 7.2, contenant 1.0 M NaCl, 8 mM KCl, 0.2 mM KH_2PO_4 et 0.4 mM MgSO_4 .

Toutes les autres solutions salines (2 M, 3M, 4M NaCl; 1 M KCl; 1 M LiCl; 1 M NH_4Cl ; 1 M Choline-Cl), ou toute solution contenant un mélange de sels sont préparés en solution Tris-HCl (50 mM), avec l'addition des mêmes ions minéraux KCl (8 mM), MgSO_4 (0.4 mM) et KH_2PO_4 (0.2 mM) (pH 7.2 ou 8.7-8.8) (ou autrement précisé).

3. Mesure du volume intracellulaire.

L'espace d'un culot de bactéries (cultivées à 1 M NaCl) occupé par l'inuline (carboxyl [^{14}C] inuline 0.2 mg, 2.5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$), l'urée ([^{14}C] urée, 0.1 mM, 1.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) et le raffinose ([^3H] raffinose, 0.1 mM, 0.54 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est comparé à l'espace total déterminé par gravimétrie (Maloney *et al.*, 1975).

Les marqueurs radioactifs sont ajoutés à 5 ml de bactéries en solution tampon Tris (1 M NaCl, pH 7.2) à une densité de 2 mg (poids sec)/ml. Après incubation à température ambiante pendant 15-20 min, les tubes sont centrifugés (10 min, 7700 x g). Les culots sont extraits avec 1 M HClO_4 . La radioactivité des extraits et des surnageants dilués 10 fois avec HClO_4 (1 M) est déterminée dans 5 ml d'Aquasol (Jarrell et Sprott, 1981).

4. Mesure du gradient de protons (ΔpH).

Le pH intracellulaire des bactéries (cultivées à 1 M NaCl) est mesuré par la distribution d'un acide faible lipophile [^{14}C] DMO (5,5-diméthyl-2,4-oxazolidinedione) ou d'une base faible [^{14}C] méthylamine entre l'espace intracellulaire des bactéries et le milieu (Rottenberg, 1975). Les bactéries sont incubées à une densité de 1.1 mg (poids sec)/ml pendant 20 min à 30°C dans des solutions contenant 1 M NaCl à différents pH

avant que ne soit ajouté le DMO (2.6 μM , 55.4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) pour les $\text{pH} \leq 7.6$, ou la méthylamine (8.92 μM , 56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) pour les $\text{pH} \geq 7.2$. Après 20 autres minutes d'incubation, les bactéries sont centrifugées dans une microcentrifuge (Fisher, modèle 235) (2 min, 13000 x g), et les culots sont extraits avec 1 M HClO_4 . La radioactivité des extraits et des surnageants dilués 10 fois avec HClO_4 (1 M) est déterminée dans 5 ml d'Aquasol. Des bactéries sont aussi incubées à pH 7.2 en présence de $[^{14}\text{C}]$ urée (0.1 mM, 1.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). L'espace occupé par l'urée, molécule librement perméable (voir "Résultats" p 99) permet de connaître le volume total (intracellulaire et extracellulaire) des culots de bactéries et de calculer ainsi le % de pénétration des autres marqueurs, en supposant que le volume intracellulaire des bactéries ne varie pas avec le pH extérieur. Le pH des surnageants est mesuré avec un Orion digital pH mètre. Le pH interne est calculé pour le DMO d'après la formule de Mitchell *et al.*, 1979):

$$\Delta\text{pH} = \text{pH}_i - \text{pH}_o = \log \left[\frac{\text{DMO}_{\text{int}}}{\text{DMO}_{\text{ext}}} (1 + 10^{\text{pKa} - \text{pH}_o}) - 10^{\text{pKa} - \text{pH}_o} \right]$$

en prenant 6.3 pour la valeur du pKa du DMO (Addanki *et al.*, 1968). Pour la méthylamine, le pH interne est calculé suivant Maloney *et al.* (1975). Le ΔpH représente la différence entre le pH interne (pH_i) et le pH externe (pH_o).

Pour déterminer l'effet de NaCl sur le pHi de *Vibrio costicola*, les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont lavées 2 fois avec des solutions Tris-HCl contenant soit 1 M NaCl, soit 1 M KCl (pH final 7.0 ou 9.0). Pour réaliser l'essai dans des conditions anaérobiques, les bactéries sont transférées dans des bouteilles à sérum de 60 ml, à une densité de 30 à 40 mg (poids sec)/ml et placées sous atmosphère d'azote (pur sans oxygène) pendant au moins 30 min à la température ambiante. Des échantillons de chaque suspension sont ensuite transférés avec une seringue Hamilton dans la même solution anaérobie respective placée dans d'autres bouteilles à sérum fermées sous atmosphère d'azote, et contenant la $[^{14}\text{C}]$ méthylamine (8.92 μM , 56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) ou la $[^{14}\text{C}]$ urée (0.1 mM, 1.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Les bactéries sont alors incubées à une densité voisine de 1 mg (poids sec)/ml pendant 20 min à 30°C, puis centrifugées dans une microcentrifuge et traitées comme précédemment. La même expérience est aussi réalisée dans des conditions aérobiques.

5. Mesure du potentiel de membrane ($\Delta\Psi$).

$\Delta\Psi$ est déterminé en mesurant l'accumulation d'un cation lipophile, le triphénylméthylphosphonium (TPMP^+), en présence de l'anion tétraphénylboron (TPB^-) (Maloney *et al.*, 1975). Les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont incubées à une densité

de 0.5 mg (poids sec)/ml pendant 20 min à 30°C dans la solution saline indiquée avant d'ajouter le $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ ($10\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) et $2\ \mu\text{M}\ \text{TPB}^-$. Après 20 autres min d'incubation, 0.5 ml sont filtrés sur filtre (Millipore $0.45\ \mu\text{m}$) ayant été trempés dans de l'eau contenant $10\ \mu\text{M}\ \text{TPMP}^+$ non radioactif (Shioi *et al.*, 1980) et lavés immédiatement par 5 ml de solution identique à celle d'incubation sans TPMP^+ ni TPB^- . L'accumulation de TPMP^+ est corrigée pour les liaisons non spécifiques du marqueur en soustrayant les cpm obtenus en filtrant un échantillon de bactéries juste après l'addition de $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$ et avant celle de TPB^- . Les filtres sont solubilisés au moins 12 heures en présence de 5 ml d'Aquasol avant que la radioactivité ne soit comptée. Le potentiel de membrane est calculé d'après la formule de Nernst $\Delta\psi = 60 \log (\text{TPMP}^+_{\text{int}}/\text{TPMP}^+_{\text{ext}})$ (Rottenberg, 1975).

La force protomotrice totale Δp est calculée en remplaçant $\Delta\psi$ et ΔpH par leurs valeurs dans l'équation $\Delta p = \Delta\psi - Z \Delta\text{pH}$, avec $Z = 60\ \text{mV}$ à 30°C (Mitchell, 1966)(voir p 53).

Dans le test de l'effet des alcools sur $\Delta\psi$, les alcools sont ajoutés après les 20 min d'incubation des bactéries quelques secondes avant le $[^3\text{H}]\text{TPMP}^+$. Leur concentration finale est de 20 mM.

6. Etude métabolique des différents marqueurs.

Les bactéries sont incubées avec les marqueurs radioactifs pendant 20 min à pH 7.2 en présence d'urée et de raffinose, et au pH optimal de l'accumulation du DMO (pH 5.5) et de la méthylamine (pH 9.2), et pendant 30 min en présence d'AIB au pH optimal de 8.8. Les bactéries sont ensuite centrifugées et le surnageant (S1) est conservé. Les culots sont traités par 0.1 ml de n-butanol pendant 15 min à 80°C. Puis 0.3 ml d'eau sont ajoutés et l'incubation est poursuivie pendant 15 autres min à 80°C (Jarrell et Sprott, 1981). La suspension est centrifugée 10 min dans une microcentrifuge (Fisher, modèle 235), et le surnageant (S2) est conservé. Les surnageants (S1) et (S2) sont examinés par chromatographie:

urée: silica gel G, 250 μ m d'épaisseur (Analtech); solvant, chloroforme-méthanol-eau (70:50:10, vol/vol);

raffinose: silica gel 60, 250 μ m d'épaisseur (BDH) au préalable traitée pendant 1 min avec 4 g NaHSO₃ en solution dans 80 ml d'eau et 120 ml d'éthanol, séchée à l'air et activée à 100°C pendant 30 min (Cook, 1976); solvant, acétate d'éthyle-méthanol-acide acétique-eau (60:15:15:10, vol/vol);

DMO: silica gel G, 250 μ m d'épaisseur (Analtech) ; solvant, chloroforme-méthanol (90:10, vol/vol);

méthylamine: cellulose 100 μm d'épaisseur (Brinkmann); solvant, isopropanol-éthanol-eau-HCl (75:75:45:5, vol/vol).

AIB: silica gel G, 250 μm d'épaisseur (Analtech); solvant, n-propanol-NH₄OH (70:30, vol/vol).

Les R_f des composés originaux urée, raffinose, DMO, méthylamine, et AIB, déterminés par autoradiographie sont respectivement 0.62, 0.07, 0.77, 0.57, et 0.46.

7. Culture sur milieu synthétique.

C'est sur le milieu synthétique SGP (Shindler, 1976) contenant 1 M NaCl, 72 mM K₂HPO₄, 8 mM KH₂PO₄, 0.41 mM MgSO₄, 37.4 mM NH₄Cl, et 15.1 mM (NH₄)₂SO₄ (pH 7.6) que la capacité de *Vibrio costicola* à utiliser divers substrats comme seule source de carbone et d'énergie est testée. La concentration finale des substrats glucose (Anachemia), glycérol (Anachemia), saccharose (Anachemia), bêtaïne (Sigma) est de 20 mM, celle de l'inuline (Sigma) est de 5 g/l. Ces milieux sont stérilisés par filtration sous vide (filtres Nalgène, 0.20 μm) et 50 ml sont placés dans des fioles Erlenmeyer de 500 ml stérilisées. L'inoculum consiste en une faible quantité de bactéries ayant été cultivées la nuit précédente sur milieu complexe gélosé (voir paragraphe 1 p 74). Les cultures sont incubées à 30°C et vigoureusement agitées. La croissance est évaluée par mesure de la densité optique à 660 nm (spectrophotomètre Perkin-Elmer Coleman, modèle 575).

8. Transport d'AIB.

Les bactéries sont incubées à une densité de 0.5 mg (poids sec)/ml pendant 20 min à 30°C dans les solutions salines indiquées. L'AIB ($1\text{-}[^{14}\text{C}]$ AIB, 200 μM , 0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est ajouté et des échantillons (0.5 ml) sont filtrés sur filtres d'acétate de cellulose (Millipore, 0.45 μm) en général après 1 et 30 min (ou autrement précisé), et lavés immédiatement avec la même solution que celle d'incubation, sans AIB. Les filtres sont placés dans 5 ml de cocktail Scintiverse (Fisher), Aquasol (New England Nuclear) ou ACS (Amersham), et la radioactivité est comptée sur 5 ou 10 min.

Pour tester l'effet des alcools (jouant le rôle de donneurs d'électrons), les alcools sont ajoutés à la fin du temps d'incubation des bactéries, à une concentration finale de 20 mM, quelques secondes avant l'AIB.

Lors de l'étude de l'inhibition du transport d'AIB par d'autres acides aminés non radioactifs, les bactéries sont incubées en solution Tris-HCl (1 M NaCl, pH 8.7). Les acides aminés sont alors ajoutés à une concentration finale de 20 ou 500 μM , immédiatement suivis par le $[^{14}\text{C}]$ AIB (20 μM , 4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$). Le transport est mesuré par filtration dans les conditions de vitesse initiale, après 30 sec et 1 min.

Pour les expériences de cinétique, lorsque les bactéries cultivées à 1M NaCl sont incubées à une densité de 0.5 mg

(poids sec)/ml pendant 45 min à 30°C dans des solutions salines contenant de faibles concentrations en NaCl (50, 100, 150, et 200 mM), la pression osmotique de ces solutions est ajustée à 1 M avec respectivement 0.95, 0.90, 0.85 et 0.80 M KCl (pH final 8.7). Le [^{14}C] AIB (2 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$ ou 4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est ajouté à des concentrations finales variant de 5 à 50 μM (≥ 0.1 M NaCl) ou de 20 à 200 μM (0.05 M NaCl) et l'accumulation d'AIB est mesurée dans les conditions de vitesse initiale après 30 sec, par filtration comme précédemment décrit. La représentation $[\text{AIB}]/v$ en fonction d' $[\text{AIB}]$ est choisie pour déterminer les paramètres cinétiques (Hammes, 1982). Le coefficient de corrélation des courbes est généralement supérieur à 0.93, et les paramètres cinétiques sont calculés par régression linéaire (calculatrice scientifique EL-5103, Sharp).

Dans l'étude du transport d'AIB dans les fortes concentrations en sel, les bactéries sont incubées à une densité de 0.1 à 0.2 mg (poids sec)/ml à 30°C dans les solutions contenant 0.5, 1, 3, ou 4 M NaCl (pH final 7.2). Le [^{14}C] AIB (200 μM , 0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est soit déjà présent dans ces solutions salines, soit ajouté après 45 min d'incubation. Le transport d'AIB est mesuré comme décrit en tête de paragraphe.

Pour tester l'effet du pH extérieur sur l'halotolérance du système de transport d'AIB, les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl sont incubées à une densité de 0.5 mg (poids sec)/ml

pendant 45 min à 30°C dans les solutions salines contenant 0.5, 1, 3, ou 4 M NaCl (pH final 7.2 ou 8.7), avant que le $[^{14}\text{C}]$ AIB (200 μM , 0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) ne soit ajouté. Le transport d'AIB est mesuré par filtration comme précédemment décrit après 1 et 30 min d'accumulation.

Pour les expériences de cinétique en relation avec la tolérance au sel, les bactéries sont cultivées à 0.5 et 1 M NaCl et incubées à une densité de 0.5 mg (poids sec)/ml pendant 45 min à 30°C dans les solutions salines contenant 0.5 et 1 M NaCl, et 3 M NaCl pour les bactéries cultivées à 1 M NaCl (pH final 8.7). Le $[^{14}\text{C}]$ AIB (4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est ajouté à des concentrations finales variant de 5 à 50 μM . L'accumulation d'AIB est mesurée par filtration après 30 sec et les courbes de cinétique sont tracées comme précédemment décrit.

9. Efflux d'AIB.

Les bactéries sont incubées à une densité de 0.7 à 1.0 mg (poids sec)/ml pendant 30 min à 30°C en présence de $[^{14}\text{C}]$ AIB (200 μM , 0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) dans les conditions optimales d'accumulation (1 M NaCl, pH 8.8). Les bactéries sont ensuite centrifugées (10 min, 7700 x g) à 4°C et remises en suspension dans la même solution saline que celle utilisée pour le transport, mais sans AIB. Des fractions de cette suspension bactérienne sont alors diluées à une concentration finale de 0.25 à 0.50 mg

(poids sec)/ml dans des solutions salines contenant 1 M KCl, LiCl, Choline-Cl ou NH_4Cl (pH final 8.8). Aux temps indiqués, des échantillons (0.5 ml) sont filtrés et traités comme pour la mesure du transport d'AIB. Les bactéries gardées dans la glace en solution 1 M NaCl (pH 8.8) ne perdent pas de quantité significative d'AIB au cours de l'expérience.

Pour l'étude de l'effet des fortes concentrations en NaCl sur l'efflux d'AIB, les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl sont incubées à une densité de 0.5 mg (poids sec)/ml pendant 45 min à 30°C dans les solutions salines contenant respectivement 0.5 et 1 M NaCl (pH 7.2). Le $[^{14}\text{C}]$ AIB (200 μM , 0.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) est alors ajouté et le transport est mesuré comme précédemment décrit. Après 30 min d'accumulation, de faibles quantités de NaCl solide (g) sont ajoutées dans certaines fioles d'essais pour atteindre les concentrations de 3 et 4 M NaCl. Les cristaux de NaCl sont dissous par vive agitation en moins de 15 sec. Le transport d'AIB est poursuivi pendant 30 autres min, comme précédemment décrit, en prenant soin de laver les échantillons filtrés de 3 et 4 M NaCl avec des solutions salines de même concentration en NaCl.

10. Transport d'AIB en réponse à des sources d'énergie créées artificiellement.

Les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont lavées 2 fois avec les solutions Tris-HCl contenant soit 1 M NaCl, soit 1 M KCl (pH final 7.0 ou 9.0). Les bactéries sont ensuite transférées dans des bouteilles à sérum de 60 ml, à une densité voisine de 30 mg (poids sec)/ml et placées dans des conditions anaérobiques par un courant continu d'azote (pur sans oxygène) pendant au moins 30 min, à température ambiante. Les suspensions sont alors incubées à 30°C et à intervalles, 100 µl sont transférés avec une seringue Hamilton dans des bouteilles à sérum similaires contenant 5 ml de la solution de transport (1 M NaCl; pH 9.0; [¹⁴C] AIB, 5 µM, 10 µCi/µmol) sous atmosphère d'azote. Des échantillons de 0.5 ml sont filtrés en fonction du temps et lavés avec la même solution anaérobique que celle utilisée pour le transport sans AIB.

11. Mesure de la respiration.

La respiration est mesurée avec une électrode à oxygène Y.S.I. (Yellow Springs Instrument Co, modèle 5331), directement reliée à un enregistreur. L'électrode plonge dans la solution saline d'essai (5 ml) agitée uniformément par agitation magnétique. Un système fermé de circulation d'eau autour de la fiole d'essai permet de contrôler la température à 30°C.

Les bactéries (1.0 mg poids sec) et les substrats (concentration finale 20 mM) sont ajoutés avec une seringue Hamilton. Une réponse instantanée dans la consommation d'oxygène peut être observée. C'est le taux initial de la respiration (en général de 2 à 3 min) qui est mesuré dans l'expérience de la tolérance aux fortes concentrations en sel et l'oxydation de divers substrats (succinate, glucose, glycérol, méthanol, éthanol, propanol ou butanol). Par contre, les effets du pH, des inhibiteurs et de divers ions (KCl, LiCl, NH_4Cl , Choline-Cl) sur la respiration sont mesurés après incubation des bactéries pendant 20 min à 30°C. Pour l'étude de l'influence du pH extérieur sur la respiration, le pH de chaque suspension bactérienne est déterminé après la mesure de la respiration, avec un Orion digital pH mètre. Pendant tout le temps des expériences, les bactéries sont conservées dans la glace sous aération constante (parfois pendant 4 heures).

Du fait que la solubilité de l'oxygène est variable selon la force ionique du milieu et la nature des ions en solution, l'appareil est calibré avec chaque solution saline différente saturée en air sans bactéries, et la quantité d'oxygène dissous de chaque solution est déterminée chimiquement par iodométrie selon la technique de Winkler (1888) (voir Rodier, 1971, Taras, 1971).

12. Mesure de l'ATP.

Un ml de suspension de bactéries de densité 0.5 mg (poids sec)/ml est ajouté à 1 ml HClO_4 (12 %, vol/vol) ayant été refroidi dans la glace. Le mélange est laissé pendant 20 min dans la glace avant d'être neutralisé par une solution contenant 0.72 M KOH et 0.16 M KHCO_3 (Bagnara et Finch, 1972). La détermination de l'ATP est réalisée par réaction avec le complexe luciférine-luciférase (Sigma) sur le canal ^3H d'un compteur à scintillation (Stanley et Williams, 1969).

L'extraction de l'ATP est réalisée sur les suspensions de bactéries après la dernière filtration à 30 min du transport d'AIB. Dans le cas particulier de l'étude de la tolérance au sel, les bactéries sont cultivées à 0.5 et 1 M NaCl et incubées pendant 45 min à 30°C dans des solutions contenant 0.5, 1, 3, ou 4 M NaCl (pH 7.2) avant l'extraction de l'ATP.

13. Mise en évidence de l'antiport Na^+/H^+ .

Les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont lavées en solution faiblement tamponnée contenant 1 M KCl, 0.4 mM MgSO_4 , 0.2 mM KH_2PO_4 , 50 mM KSCN et 1 mM Tris-HCl (pH 7.5). Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans cette solution à une densité de 4 mg (poids sec)/ml et gardées dans la glace pendant plusieurs

heures (parfois de 4 à 6 heures) sans changement notable dans les activités observées.

Les suspensions de bactéries (5 ml, 4 mg (poids sec)/ml) sont placées dans la cuve décrite par Patel et Agnew (1981) connectée à une électrode à H^+ et continuellement agitées par un agitateur magnétique à température ambiante, en présence d'anhydrase carbonique (100 μ g, 2100 U/mg) (Sigma) (Niven et MacLeod, 1978). Le système est hermétiquement fermé par un bouchon de caoutchouc au travers duquel les injections sont réalisées à l'aide de seringues Hamilton. Deux aiguilles hypodermiques permettent d'exclure l'air du système et de le remplacer par un courant continu d'azote. L'électrode du pH mètre est reliée à un enregistreur. Pendant la période d'équilibrage (environ de 30 min à 1 h), le pH est ajusté à 7.5 par de faibles additions de solutions anaérobiques de HCl ou KOH. Ce pH correspond à celui où le pH interne des bactéries s'équilibre avec celui du milieu extérieur ($\Delta pH = 0$) (voir "Résultats" p 107).

Les solutions salines ajoutées (50 μ l) contiennent 2.5 M (KCl, NaCl ou Choline-Cl) + 3 mM KCl, 0.4 mM $MgSO_4$, 0.2 mM KH_2PO_4 (pH ajusté à 7.5 par HCl ou KOH), et sont au préalable saturées par de l'azote ou de l'oxygène.

L'effet des ionophores CCCP (carbonyl cyanide-chlorophényl-hydrazone), TCS (3,3',4'5 tétrachlorosalicylanilide) et

monensine est étudié en incubant les bactéries pendant 20 min à 30°C en leur présence (concentration finale 20 μ M) avant de les placer dans la cuve d'essai. Un contrôle est réalisé en incubant les bactéries en présence de méthanol, le solvant des inhibiteurs (concentration finale 47 mM).

Comme contrôle du système, les bactéries sont placées à 85°C pendant 30 min en présence de 20 μ l de n-butanol (concentration finale 44 mM). Des traces de DNase et de RNase (Sigma) sont ensuite ajoutées à la suspension pour en réduire la viscosité avant de la placer dans la cuve d'essai.

14. Culture en fermenteur à différents pH.

Vibrio costicola est mis en culture à 30°C dans un fermenteur de 3 l (Pegasus) contenant 2 l de milieu complexe déjà décrit (Protéose-peptone 1 %, Tryptone 1 %), avec 1 M NaCl et 0.06 % (poids/vol) polypropylène glycol comme agent antimousse. Les conditions aérobiques sont assurées en faisant circuler un courant d'oxygène pur à un débit de 130 ml/min dispersé par un Vibromixer (Pegasus). Le pH est régulé automatiquement par des additions de NaOH (2 N), avec des variations de moins de 0.05 unités de pH. L'inoculum consiste en 20 ml d'une culture en fin de phase exponentielle (24 mg poids sec). Les temps de génération sont calculés à partir de mesures horaires de densité optique à 660 nm (spectrophotomètre Perkin-Elmer

Coleman, modèle 575) pendant 8 heures. Des courbes de croissance séparées sont obtenues pour chaque pH testé.

15. Mesure de la lyse.

Les suspensions bactériennes lavées (5 ml, 0.2 à 0.3 mg (poids sec)/ml) sont distribuées dans plusieurs tubes et centrifugées (10 min, 4000 x g). Les culots des bactéries sont remis en suspension dans 5 ml de solution tampon Tris-HCl (pH 7.2) ne contenant pas d'autres sels minéraux que NaCl dont la concentration varie de 0 à 0.5 M par intervalles de 0.05 M. Les suspensions sont ensuite laissées 10 min à température ambiante et centrifugées (10 min, 4000 x g). L'absorption du surnageant est lue à 260 nm (ultraviolet spectrophotomètre SP 8-100 Pye Unicam). La valeur du point de lyse est déterminée par extrapolation des courbes représentant le pourcentage de lyse en fonction de la concentration en NaCl, la valeur 100 % étant attribuée à la densité optique du surnageant des bactéries ayant été remises dans la solution Tris-HCl sans NaCl.

16. Microscopie optique.

Un état frais est réalisé sur les bactéries cultivées à 0.5 M et 1 M NaCl en mélangeant sur une lamelle une goutte de poly-L-lysine (agent fixateur réduisant la mobilité des bactéries) et une goutte de culture. Les préparations sont lavées en solution Tris-HCl (pH 7.2) de même concentration en sel que celle du milieu de culture et observées en microscopie optique (Zeiss), en contraste de phase et interférences de Nomarski.

17. Microscopie électronique.

Des échantillons sont préparés pour être observés en microscopie électronique sur des bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl. Après leur deuxième lavage, les bactéries (100 ml, 1 à 1.5 mg poids sec/ml) sont incubées pendant 45 min à 30° C dans des solutions salines contenant 0.5, 1, 3, ou 4 M NaCl (pH final 7.2). Les bactéries sont ensuite centrifugées (10 min, 7700 x g) et fixées 10 à 20 min par addition de 10 ml de la solution saline de même concentration en NaCl que celle d'incubation contenant 0.08 % OsO₄ (Unemoto *et al.*, 1977). Après centrifugation (5 min, 5000 x g), les bactéries sont remises en suspension dans la même solution de fixation pendant 16 à 18 heures, centrifugées à nouveau, reprises

dans de la gélose (2 % en solution aqueuse), bien homogénéisées et déposées sur des lames de verre en forme de gouttes. Cet enrobage dans la gélose est réalisé à 45°C. Refroidies et gélifiées, les gouttes sont découpées en petits cubes de moins de 1 mm de côté. Les blocs de gélose sont traités pendant 2 heures dans une solution aqueuse de 0.5 % d'acétate d'uranyle (Weakley, 1981) avant d'être deshydratés par des bains de 10 min dans des concentrations croissantes d'éthanol dont la concentration varie de 10 à 100 % par progression régulière de 10 %. Pour faciliter l'infiltration de la résine dans les tissus, les blocs de gélose sont ensuite placés dans 2 bains successifs (10 min chacun) d'époxypropane, puis 1 heure dans un mélange époxypropane-résine (1:1, vol/vol), et finalement dans la résine seule et laissés toute la nuit à température ambiante. Quand l'infiltration est complète, les échantillons sont transférés dans de la résine fraîche dans des capsules de gélatine. Ces capsules sont placées dans une étuve à 60°C et laissées 1 ou 2 jours pour la polymérisation de la résine. La résine utilisée a la composition suivante (Luft, 1961): résine Epon 812 (Fisher) 44 ml, NMA (nalc méthyl anhydride) (Ladd) 22 ml, DDSA (Dodecenyl succinic anhydride) (Ladd) 28 ml, DMP 30 (tri (diméthyl aminométhyl) phénol) (Fisher) 1.4 ml.

Les échantillons sont sectionnés à l'aide de couteaux de verre sur un ultramicrotome (Porter-Blum MT2-B) et déposés sur des grilles de cuivre (200 μ) couvertes de gel Formvar et de

carbone. Les sections sont colorées par la double coloration acétate d'uranyle (10 min) et citrate de plomb (5 min) (Reynolds, 1963; Fraska et Parks, 1965), avant d'être examinées en microscopie électronique (Philips) à 60 kV.

18. Poids sec.

Toutes les activités sont exprimées sur la base du poids sec des bactéries. Deux méthodes ont été utilisées pour l'obtention du poids sec:

(a) les bactéries en suspension dense sont séchées à 110°C jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant, et une correction pour le poids de sel extracellulaire est apportée par le séchage simultané d'un volume égal de la même solution saline.

(b) les bactéries en suspension dense sont centrifugées (10 min, 7700 x g) et les culots de centrifugation sont séchés à 62°C jusqu'à l'obtention d'un poids sec constant, puis placés à 550°C pendant 6 heures. Les cendres ainsi obtenues permettent de corriger pour le poids de sel extracellulaire. Aucune différence dans la valeur du poids sec des bactéries séchées à 62°C ne peut être décelée si elles sont placées ensuite pendant plusieurs heures sous vide dans une étuve à 45°C.

19. Inhibiteurs.

Les ionophores, le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), le N-éthyl maléimide (NEM) et les ions TPMP⁺ et TPB⁻ sont mis en solution dans le méthanol. Des contrôles sont réalisés pour tester l'effet du méthanol seul. Les traitements sont de 20 min à 30°C.

20. Réactifs.

Les produits radioactifs suivants viennent de New England Nuclear (Lachine, Québec, Canada): (2-¹⁴C) DMO (55.4 mCi/mmol), (¹⁴C) urée (57 mCi/mmol), (méthyl-³H) TPMP⁺ (57.4 mCi/mmol), (carboxyl-¹⁴C) inuline (2.5 mCi/g), (³H) raffinose (7.8 Ci/mmol), (1-¹⁴C) AIB (53.2 mCi/mmol). (¹⁴C) méthylamine (56 mCi/mmol) provient de Amersham, Oakville, Ontario, Canada. Anhydrase carbonique (2100 U/mg), TPB⁻, DNase, RNase, valinomycine, gramicidine, CCCP, chloramphénicol ont été commandés à Sigma Chemical Co, St Louis, Mo; nigéricine à Calbiochem-Behring Co; DCCD à Schwarz/Mann, Orangeburg, N.Y.; TCS à Fisher Scientific Co, Nepean, Ontario, Canada; DNP à Matheson, Coleman and Bell, Norwood, Ohio; et TPMP⁺ (bromure) à ICN, K & K Laboratories Inc, Plainview, N.Y.. Monensine est un don de Eli Lilly Canada Inc.

21. Reproductibilité des résultats.

Toutes les expériences ont été répétées au moins 2 fois, plus souvent 3 fois ou plus, et les résultats obtenus étaient généralement reproductibles dans une marge d'erreur d'environ 5 %.

22. Abréviations et symboles.

Tris: Tris (hydroxyméthyl)aminométhane

Mes: acide 2 (N-morpholinométhane) sulfonique

PPT: Protéose-Peptone, Tryptone
(Milieu de culture complexe de *Vibrio costicola*. La concentration 0.5 ou 1 % est exprimée en poids/volume)

AIB: acide alpha-aminoisobutyrique

PMF: force protomotrice

Δp : gradient électrochimique de protons

$\Delta \psi$: différence de potentiel électrique de membrane

ΔpH : différence de potentiel chimique de membrane

pHi : pH interne des bactéries

pHo: pH externe du milieu

DMO: 5,5-diméthyl-2,4-oxazolidinedione

TPMP⁺: triphénylméthylphosphonium (cation)

TPB⁻: tétraphénylboron (anion)

TCS: 3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide

CCCP: carbonyl cyanide-m-chlorophénylhydrazone

DCCD: N,N'-dicyclohexylcarbodiimide

NEM: N-éthylmaléimide

3 . Résultats

1. Caractérisation du transport d'AIB.

1. détermination du volume intracellulaire:

Tout au long de cette étude, l'incorporation d'AIB est exprimée en termes de nmoles par mg (poids sec) de bactéries. Cependant, pour connaître les rapports de concentrations d'ions, la détermination du volume interne des bactéries est nécessaire, des changements dans les volumes intracellulaires pouvant conduire à des changements seulement apparents dans le rapport de concentrations (Maloney *et al.*, 1975).

La technique requiert un marqueur radioactif soluble dans l'eau, imperméable à la bactérie et ne se fixant pas sur la membrane cytoplasmique. Son choix est établi en comparant l'espace occupé par le composé radioactif dans un culot de bactéries à l'espace total d'eau du culot déterminé par gravimétrie (Maloney *et al.*, 1975; Rottenberg, 1979). L'inuline, molécule utilisée pour mesurer l'espace extracellulaire de très nombreuses bactéries (Padan *et al.*, 1976; Collins et Hamilton, 1976; Guffanti *et al.*, 1978) fut aussi testée chez *V. costicola*. De par son poids moléculaire élevé (voisin de 5000), cette molécule peut être imperméable au niveau de la paroi cellulaire et l'eau intracellulaire mesurée peut donc contenir aussi l'espace périplasmique entre la membrane et la paroi, mais ce

volume est généralement considéré comme étant faible par rapport au volume d'eau intracellulaire, et l'erreur est négligeable (Maloney *et al.*, 1975). Le raffinose, triose composé de glucose-galactose-fructose, de PM 594 fut testé en parallèle avec l'inuline. Ces 2 molécules occupent environ 59 % de l'espace du culot bactérien (Tableau 8).

Une alternative de la gravimétrie pour connaître l'espace total (intracellulaire + extracellulaire) est l'emploi d'une molécule radioactive librement perméable. L'eau tritiée ($^3\text{H}_2\text{O}$) est généralement employée, mais chez *Vibrio costicola* l'urée pénètre aussi complètement dans le cytoplasme. Cette technique fut préférée car en considérant la pénétration de l'urée à 100 %, les pourcentages de pénétration de l'inuline et du raffinose sont plus reproductibles que ceux obtenus par la technique gravimétrique. La forte erreur rencontrée dans la technique gravimétrique pourrait être due au poids de NaCl extracellulaire. La valeur retenue pour l'espace intracellulaire de *V. costicola* à 1 M NaCl est de 1.81 $\mu\text{l}/\text{mg}$ (poids sec), obtenue en utilisant la molécule d'urée comme substrat perméable (considérée à 100 % de pénétration) et celle de raffinose pour la détermination du volume extracellulaire.

Les chromatographies sur couche mince des surnageants et des extraits cellulaires révèlent que ni l'urée, ni le raffinose ne sont métabolisés. D'autre part, *V. costicola* ne peut pas se

Composé	Pénétration (%)		Espace intracellulaire (μ l/mg poids sec)	
- (gravimétrie)	100 ^b	94.2 $\pm$ 9.2 ^c		
urée	107.1 $\pm$ 10.6	100		
inuline	58.8 $\pm$ 8.6	54.7 $\pm$ 3.8	1.56 $\pm$ 0.41 ^b	1.82 $\pm$ 0.16 ^c
raffinose	58.8 $\pm$ 5.1	55.1 $\pm$ 3.8	1.57 $\pm$ 0.31	1.81 $\pm$ 0.24

Tableau 8. Pénétration des composés utilisés pour mesurer l'espace intracellulaire dans les culots de bactéries^a.

^a Les composés radioactifs sont ajoutés à la suspension bactérienne en solution 1 M NaCl pendant 20 min, puis les échantillons sont centrifugés et la distribution de la radioactivité entre les surnageants et les culots est mesurée (Rottenberg, 1975). Les valeurs représentent la moyenne de 9 expériences indépendantes $\pm$ erreur standard.

^b calculé en déterminant l'espace total d'eau du culot par gravimétrie (100 % pénétration)

^c calculé en considérant que l'urée occupe 100 % de l'espace d'eau du culot (100 % pénétration)

développer dans un milieu ne contenant que l'inuline comme source de carbone et d'énergie (Figure 8).

D'autres marqueurs pour la détermination du volume intracellulaire ont été testés mais pas retenus: le dextran (Sadler *et al.*, 1980; Sprott et Jarrell, 1981), la taurine (Kashket et Barker, 1977; Kashket *et al.*, 1980) ne donnent pas des résultats reproductibles, et le saccharose (Sprott et Jarrell, 1981; Bakker et Mangerich, 1981) est métabolisé par les bactéries (Figure 8). (Les autres substrats glycérol, glucose, bétaine, de la Figure 8 sont utilisés dans une autre section).

2. dépendance énergétique du transport d'AIB:

Puisque la force protomotrice (PMF) résultant de l'activité respiratoire est la source d'énergie de nombreux systèmes de transport membranaires, l'effet du pH extérieur (pH_o) est étudié à la fois sur la PMF, le transport d'AIB et la respiration de *V. costicola*

a) mesure de la PMF:

Le ΔpH est mesuré par la distribution d'acide faible lipophile (DMO) ou de base faible (méthylamine). La répartition de ces composés repose sur le fait que les espèces non dissociées d'acide ou de base faible diffusent librement au travers la

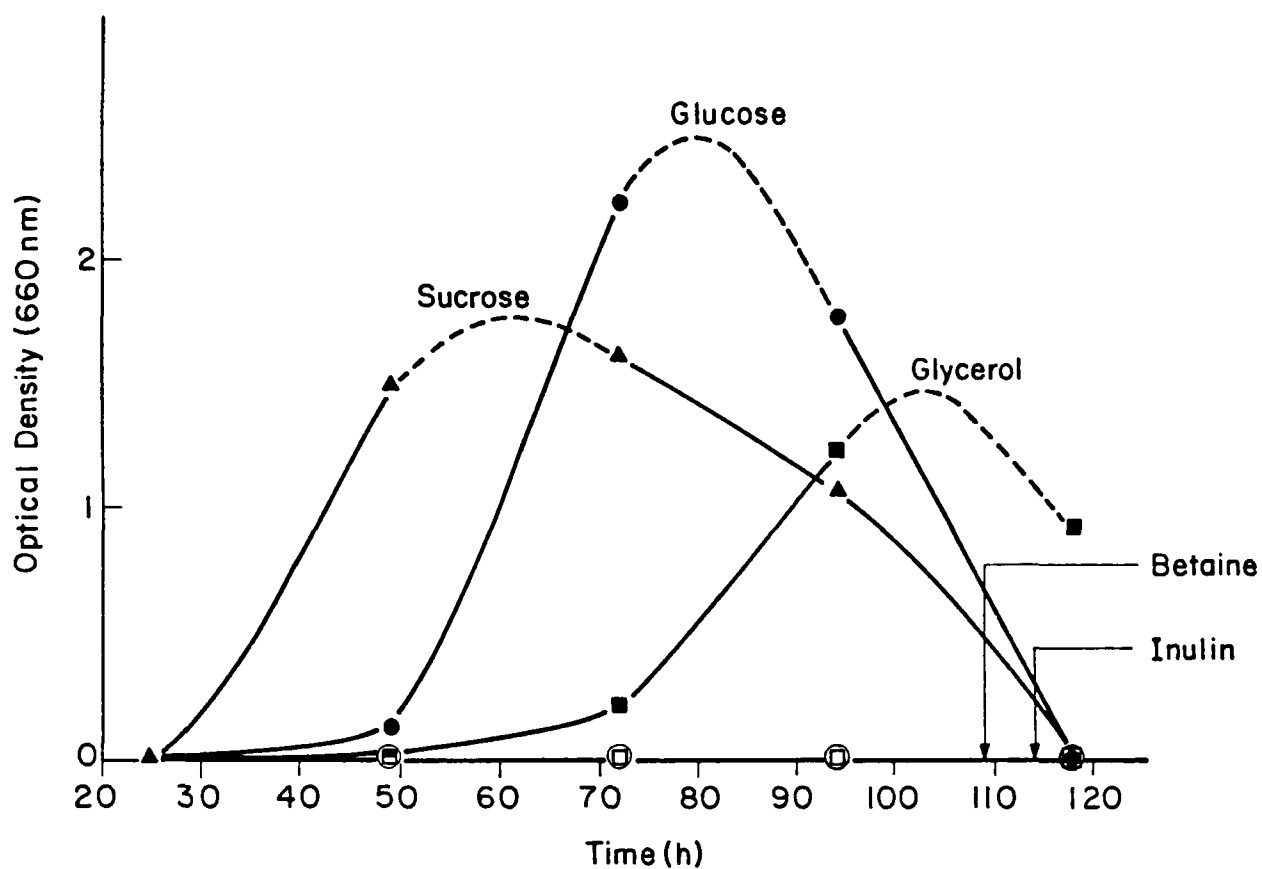


Figure 8. Croissance de *Vibrio costicola* sur milieux synthétiques (1 M NaCl) en présence de divers substrats^a.

^a Les substrats glucose (●), saccharose ("sucrose", ▲), glycérol (■), bétaine (○) sont ajoutés à une concentration finale de 20 mM, l'inuline (□) de 5 g/l. La croissance est mesurée par lecture de la densité optique à 660 nm.

membrane, alors que les espèces ionisées sont imperméables. Ainsi, si le compartiment interne de la bactérie est plus alcalin que le milieu externe, l'équilibre entre les espèces dissociées et non dissociées de l'acide faible est déplacé dans le sens d'une accumulation dans la bactérie (Rottenberg, 1975).

L'accumulation du DMO ou de la méthylamine chez *V. costicola* a lieu sur une vaste échelle de pH (Figure 9), avec un optimum de 330 % à pH 5.6 pour le DMO et de 600 % à pH 9.2 pour la méthylamine. *V. costicola* lyse à pH acides inférieurs à 5.0 et à pH alcalins supérieurs à 9.5. Cette lyse se manifeste par un éclaircissement immédiat de la suspension. A pH 7.5, quand le pH des bactéries s'équilibre avec celui du milieu extérieur ($\Delta \text{pH} = 0$) d'après la distribution de la méthylamine, une faible accumulation de DMO peut être décelée (équivalente à 120 % de pénétration), sans doute due à des liaisons non spécifiques du composé. Les chromatographies sur couche mince des surnageants et des extraits cellulaires révèlent que ni le DMO, ni la méthylamine ne sont métabolisés par les bactéries.

Le potentiel de membrane ($\Delta \psi$) (intérieur négatif) est déterminé par la distribution d'un cation entre les bactéries et le milieu extérieur. Le principe de la technique repose sur le fait que le cation migre au travers la membrane jusqu'à l'établissement d'un équilibre qui est fonction du potentiel

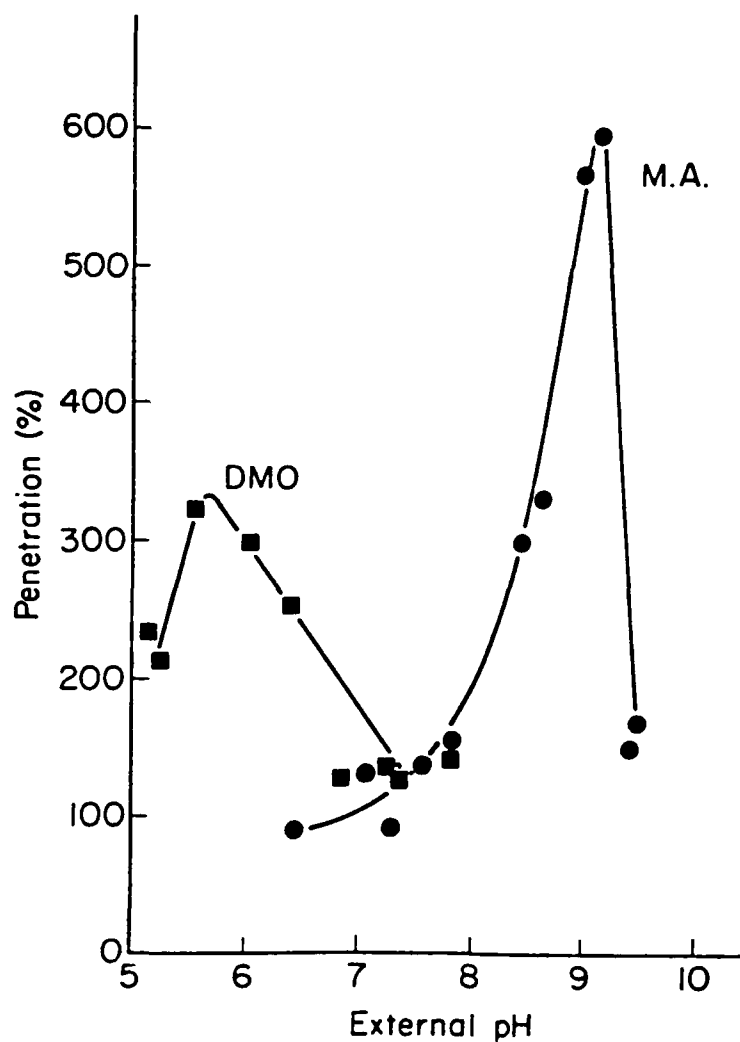


Figure 9. Accumulation de (^{14}C)DMO (■) et (^{14}C)méthylamine (●) en fonction du pH extérieur^a.

^a Les bactéries sont incubées en solution 1 M NaCl.
100 % pénétration représente l'équilibre des composés à travers la membrane.

électrique existant. Pour que cette technique soit valable, les ions choisis doivent être librement perméables au travers la membrane et s'équilibrer rapidement avec un faible taux de liaisons non spécifiques. Les ions couramment employés sont ceux pour lesquels les membranes sont rendues perméables par l'usage d'ionophores spécifiques tel K^+ (ou Rb^+) en présence de valinomycine (Rottenberg, 1975). La mesure de $\Delta\psi$ par la distribution de $^{86}Rb^+$ en présence de valinomycine présente l'avantage que ces ions ont de très faibles liaisons non spécifiques avec les structures cellulaires externes ou les composés intracellulaires (Jarrell et Sprott, 1983 a). Toutefois, chez *V. costicola* pratiquement aucune accumulation de $^{86}Rb^+$ ne peut être obtenue en présence de valinomycine (20 à 50 μM), même après traitement des bactéries par l'EDTA (5 mM) (Bakker, 1982).

Les autres types d'ions couramment employés sont des ions organiques lipophiliques synthétiques tel que le triphénylméthylphosphonium (TPMP $^+$) et le tétraphénylphosphonium (TPP $^+$) (Rottenberg, 1975). Le TPMP $^+$ fut choisi pour mesurer $\Delta\psi$ chez *V. costicola* car le TPP $^+$ donne de très fortes liaisons non spécifiques, comme mis en évidence par de rapides filtrations juste après addition du composé à la suspension de bactéries. Certaines bactéries requièrent la présence du contre-ion TPB $^-$ pour faciliter le transport de TPMP $^+$ (Kashket, 1979; Jarrell et Sprott, 1981), d'autres non (Harold et Papineau, 1972 a). Pour *V. costicola*, l'accumulation de TPMP $^+$ est largement favorisée par la présence

de l'anion TPB^- dans le taux de vitesse initiale ($t < 2$ min), mais à 10 min, le même état d'équilibre est atteint et maintenu au moins jusqu'à 20 min, durée d'incubation choisie (Figure 10).

En conditions aérobiques, les 2 composantes de Δp sont affectées par le pH_o (Figure 11). Le potentiel chimique ($60 \cdot \Delta \text{pH}$) diminue progressivement au fur et à mesure que le pH_o augmente, s'annule à pH_o 7.5 et est inversé pour les pH_o plus alcalins. Le pH_i des bactéries augmente de 6.9 à 8.0 quand le pH_o s'échelonne de 5.1 à 9.2 avec un isopH de 7.5. Leur intérieur est alcalin par rapport aux pH_o inférieurs à 7.5 et acide par rapport à ceux supérieurs à pH 7.5. Le potentiel de membrane augmente progressivement en fonction du pH_o jusqu'à 160-170 mV vers pH 9.0. Toutefois, cette augmentation de $\Delta \Psi$ à pH alcalins ne compense pas le gradient de pH et la PMF totale Δp calculée avec les valeurs de ΔpH et $\Delta \Psi$ (Mitchell, 1966) diminue de 168 à 95 mV au fur et à mesure que le pH_o augmente de 5.5 à 9.0.

b) effet du pH_o sur le transport d'AIB et la respiration:

L'accumulation d'AIB mesurée après 1 et 30 min (Figure 12), de même que l'activité respiratoire endogène ou l'oxydation d'éthanol (Figure 13) des bactéries sont optimales à des pH alcalins compris entre 8.5 et 9.0. Ces résultats montrent une forte corrélation entre le transport d'AIB, la respiration et $\Delta \Psi$ dont la valeur

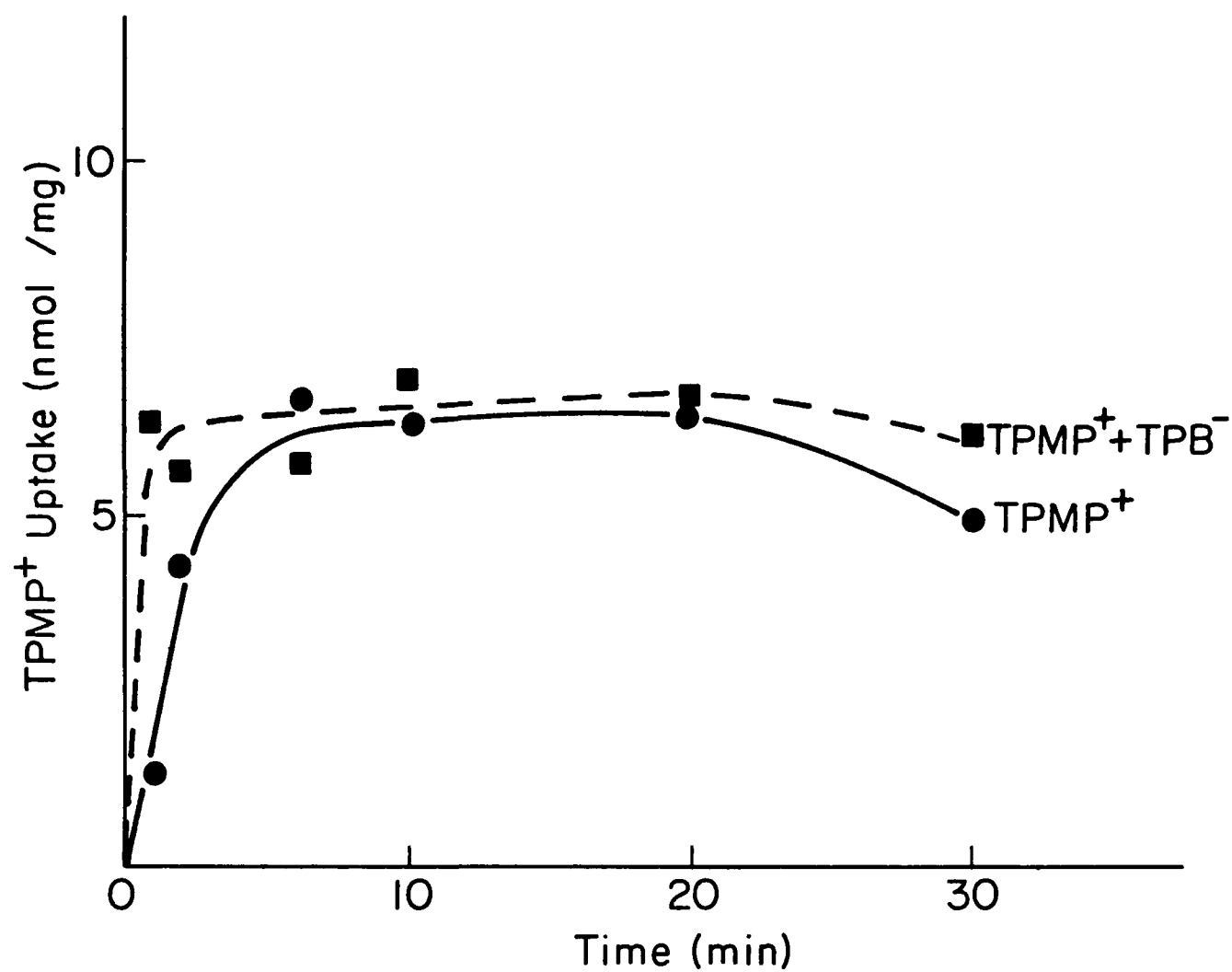


Figure 10. Influence de TPB⁻ sur l'accumulation de (³H)TPMP⁺ ^a.

^a L'accumulation de (³H)TPMP⁺ est mesurée en présence (■) ou non (●) de TPB⁻ (2 μM) sur les bactéries incubées 20 min à 30°C en solution 1 M NaCl (pH 8.8).

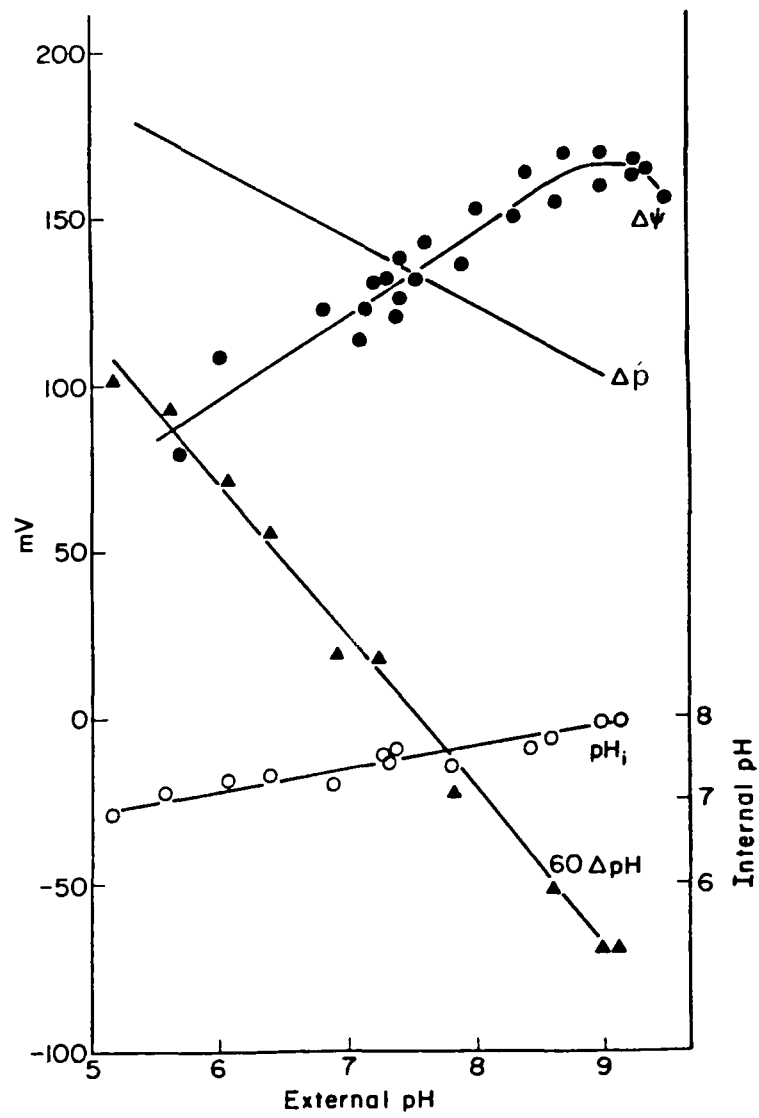


Figure 11. Influence de pH_o sur la force protomotrice de *Vibrio costicola*.

(Δp est calculé par addition de $\Delta\psi$ (intérieur négatif) et de $60 \cdot \Delta pH$; Mitchell, 1966)

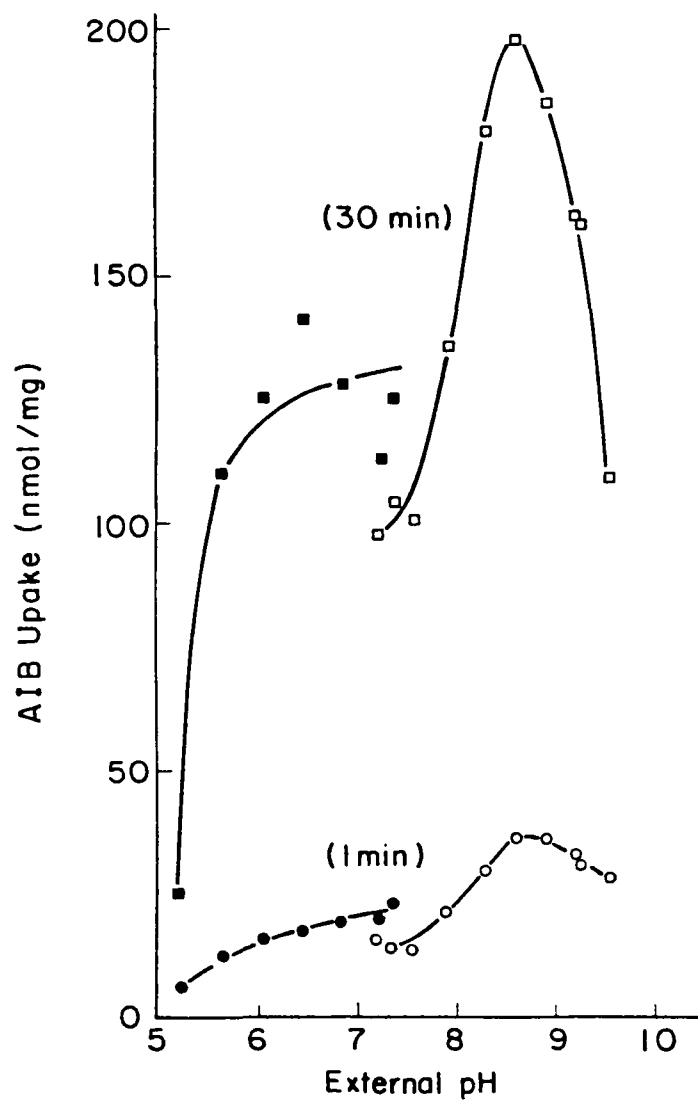


Figure 12. Effet du pH extérieur sur le transport d'AIB^a.

^a Le transport d'AIB est mesuré après 1 et 30 min sur des bactéries incubées 20 min à 30°C en solution Mes-KOH (●, ■) ou Tris-HCl (○, □) contenant 1 M NaCl.

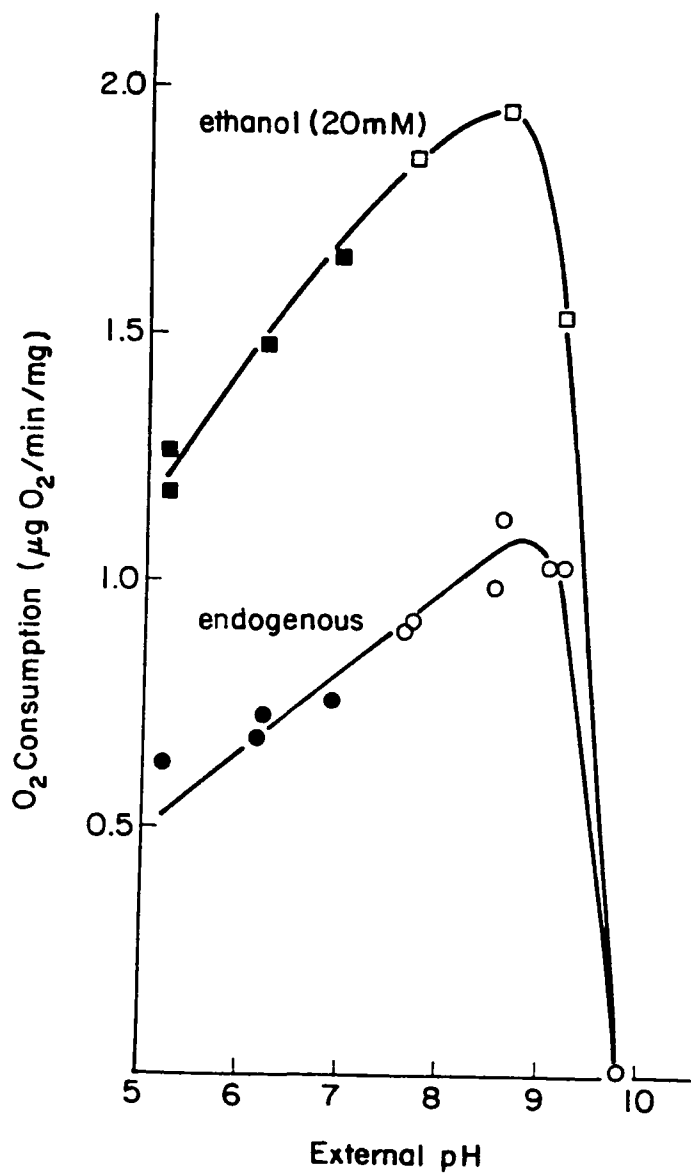


Figure 13. Effet du pH extérieur sur la respiration endogène (○, ●) et l'oxydation de l'éthanol (□, ■)^a.

^a Les bactéries sont incubées 20 min à 30°C en solution tampon Mes-KOH (●, ■) ou Tris-HCl (○, □) contenant 1 M NaCl.

optimale de 168 mV est atteinte à pH 9.0.

La chromatographie sur couche mince des extraits cellulaires et des surnageants révèle que l'AIB n'est pas métabolisé.

c) effet de donneurs d'électrons:

L'effet de donneurs d'électrons est testé sur le transport d'AIB en utilisant divers alcools. Ces substrats dont la pénétration dans les cellules ne requiert ni énergie, ni ions Na^+ furent déjà utilisés avec succès sur *Alteromonas haloplanktis* (Sprott et MacLeod, 1974; Thompson et MacLeod, 1974).

Les effets des alcools sont mesurés sur des suspensions bactériennes à pH 8.8 où ΔpH n'est supposé apporter aucune contribution énergétique pour le transport d'AIB. Les alcools (éthanol, propanol, butanol), qui augmentent immédiatement le taux respiratoire, stimulent aussi la synthèse d'ATP des bactéries et le transport d'AIB, mais n'induisent aucun changement dans $\Delta\Psi$. Une incubation des bactéries en présence des alcools de 20 min au lieu de quelques secondes avant d'ajouter le TPMP⁺ ne produit pas non plus de changement dans $\Delta\Psi$. Le méthanol ne produit aucun changement dans les activités testées (Tableau 9).

Ces résultats suggèrent que l'énergie générée par la respiration pendant l'oxydation des donneurs d'électrons n'est pas nécessairement conservée sous forme mesurable de $\Delta\Psi$, mais est plutôt

Donneur d' électrons	Activité respiratoire ($\mu\text{g O}_2/\text{min/mg}$)	Transport d'AIB (nmol/mg)		$\Delta\Psi$ (mV)	ATP intracellulaire ($\mu\text{g/mg}$)
		1 min	30 min		
Endogène	2.20	29	173	147	5.34
Méthanol (20 mM)	2.15	26	168	152	5.34
Ethanol (20 mM)	3.14	63	325	151	9.57
Propanol (20 mM)	3.21	66	313	148	9.07
Butanol (20 mM)	2.61	42	227	146	8.95

Tableau 9. Effet de quelques donneurs d'électrons sur l'activité respiratoire, le transport d'AIB, $\Delta\Psi$, et l'ATP intracellulaire ^a.

^a Les bactéries sont incubées en solution 1 M NaCl (pH 8.8). Les essais sont initiés juste après l'addition des alcools. L'ATP est extrait sur les bactéries après leur transport d'AIB à 30 min.

immédiatement utilisée pour la synthèse d'ATP et pour le transport d'AIB.

d) effet d'inhibiteurs:

Le DCCD est un inhibiteur de l'activité ATPasique des mitochondries et de nombreuses bactéries dont *V. costicola* (Higa et Cazzulo, 1978; Bengis-Garber et Kushner, 1981). Présent à des concentrations inférieures à 40 μM , le DCCD diminue fortement la teneur en ATP des bactéries et stimule la respiration et le transport d'AIB, alors que $\Delta\Psi$ reste constant (Figure 14). Ces résultats indiquent que l'ATP ne participe pas directement au transport d'AIB puisque le DCCD stimule le taux de transport d'AIB dans des conditions où il diminue fortement la teneur en ATP intracellulaire. A plus forte concentration (80 μM), le DCCD n'agit plus spécifiquement sur l'ATPase puisque la respiration et le transport d'AIB sont inhibés et $\Delta\Psi$ est dissipé.

Le Tableau 10 présente l'effet de divers inhibiteurs sur la respiration, le potentiel de membrane et le transport d'AIB chez *V. costicola*:

Le N-éthylmaléimide (NEM) qui réagit avec les groupements sulfhydryls et KCN inhibent fortement la chaîne respiratoire et le transport d'AIB, suggérant que l'énergie nécessaire pour le

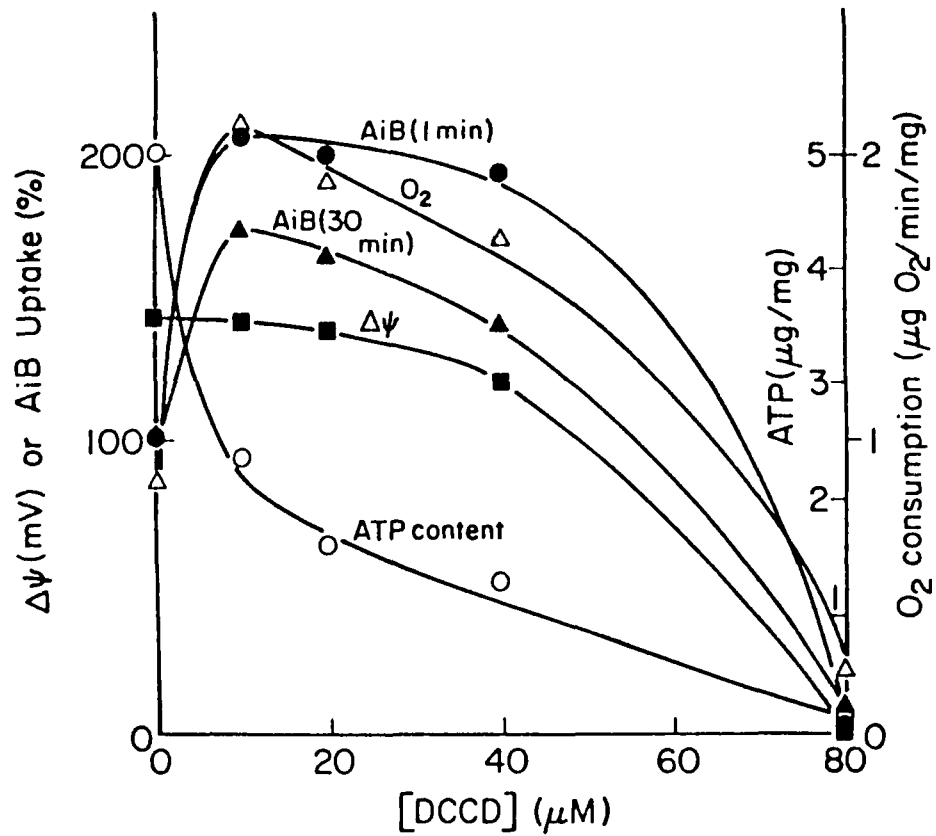


Figure 14. Effet du DCCD sur le transport d'AIB, la teneur en ATP, le taux respiratoire et $\Delta\psi^a$.

^a Les activités endogènes sont mesurées sur les bactéries incubées 20 min à 30°C en présence de DCCD, en solution 1 M NaCl (pH 8.8). L'accumulation d'AIB représentant 100 % est de 29 et 151 nmol/mg à 1 et 30 min respectivement.

Traitement	Activité respiratoire endogène	$\Delta\Psi$	Transport d'AIB 1 min
Activité (% du contrôle)			
NEM (10 mM)	16	17	0
KCN (10 mM)	0	8	8
TCS (20 μ M)	69	28	1
CCCP (20 μ M)	264	32	2
Valinomycine (20 μ M) + KCl (0.5 M)	PF*	49	53
Nigéricine (20 μ M)	186	3	2
Monensine (20 μ M)	262	39	24
Gramicidine (10 μ g/ml)	92	108	61

Tableau 10. Effet d'inhibiteurs sur l'activité respiratoire endogène, $\Delta\Psi$, et le transport d'AIB ^a.

^a Les activités endogènes sont mesurées sur les bactéries incubées 20 min à 30°C en présence des inhibiteurs, en solution 1 M NaCl (pH 8.8).
100 % activité = 0.58 μ g O₂/min/mg pour la respiration; 156 mV pour $\Delta\Psi$; 27.5 nmol/mg pour le transport d'AIB.

* PF = pas fait.

transport actif d'AIB dérive de la respiration.

Les agents découplants TCS et CCCP dissipent partiellement le potentiel de membrane et inhibent fortement le transport d'AIB. Le fait que le taux d'inhibition du transport d'AIB soit bien plus élevé que celui de $\Delta\Psi$ suggère que le TCS et le CCCP n'agissent pas seulement comme découplants. D'autre part, leur mode d'action est vraisemblablement différent, puisque le CCCP stimule la respiration alors que le TCS l'inhibe partiellement.

Chez *V. costicola*, la valinomycine (+ K^+) dissipe partiellement $\Delta\Psi$ et le transport d'AIB est inhibé dans les mêmes proportions. En présence de K^+ , la valinomycine forme un complexe liposoluble chargé positivement qui diffuse rapidement à travers la membrane. Ainsi, tout comme les découplants, la valinomycine (+ K^+) provoque un échange électrogénique d'ions résultant en une diminution de $\Delta\Psi$ (Harold *et al.*, 1974).

La monensine et la nigéricine stimulent la respiration, mais $\Delta\Psi$ est dissipé et le transport d'AIB inhibé dans les mêmes proportions. La monensine et la nigéricine sont des ionophores qui, en principe, catalysent des échanges électroneutres entre Na^+/H^+ et K^+/H^+ respectivement et qui ne devraient donc pas dissiper $\Delta\Psi$ (Harold *et al.*, 1974). Chez *V. costicola*, ces molécules agissent davantage comme le protonophore CCCP.

La gramicidine est un agent conducteur non spécifique des cations K^+ , Na^+ , et H^+ par son aptitude à former des canaux au

travers la membrane (Bakker, 1979). Chez *V. costicola*, la présence de gramicidine a peu ou pas d'effet sur la respiration et $\Delta\Psi$, mais le transport d'AIB est partiellement inhibé. Bien que cette absence d'inhibition de la gramicidine chez *V. costicola* reste jusqu'à présent inexplicable, elle peut être confirmée par un manque d'inhibition de la croissance des bactéries en milieu synthétique à pH 8.5, en présence de gramicidine (20 μM) (Résultats non montrés).

Les effets du cation lipophile TPMP⁺ en présence de TPB⁻ (2 μM) sont mesurés à la fois sur le transport d'AIB et la respiration endogène des bactéries (Figure 15). Des concentrations supérieures à 40 μM inhibent complètement le transport d'AIB. Par contre la capacité des bactéries à respirer ne diminue que faiblement, même en présence de fortes concentrations de TPMP⁺ (100 μM). Le cation lipophile est accumulé par les bactéries et abolit $\Delta\Psi$ selon la concentration ajoutée (Michel et Oesterhelt, 1976).

Ces résultats montrent que le transport d'AIB peut être inhibé dans des conditions où la respiration est stimulée, et que la dissipation de $\Delta\Psi$ induit généralement une inhibition du transport d'AIB dans les mêmes proportions. Cette étude suggère que le transport d'AIB dépende de la force protomotrice générée par la respiration ($\Delta\Psi$ à pH alcalin) plutôt que de la respiration elle-même.

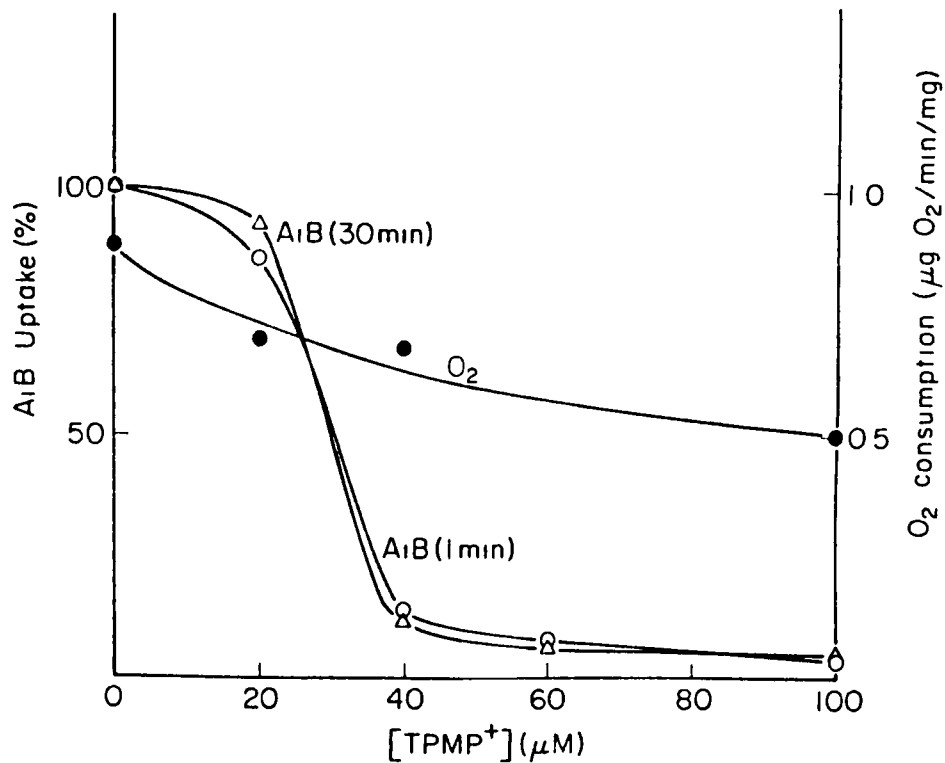


Figure 15. Effet du TPMP⁺ sur le transport d'AIB et la respiration ^a.

^a Les activités endogènes sont mesurées sur les bactéries incubées 20 min à 30°C en présence de TPMP⁺ non radioactif, en solution 1 M NaCl (pH 8.8). L'accumulation d'AIB représentant 100 % est de 29 et 151 nmol/mg à 1 et 30 min respectivement.

e) transport d'AIB en réponse à des sources d'énergie créées artificiellement:

Pour déterminer si les ions Na^+ interviennent comme source d'énergie dans le transport d'AIB, les bactéries ayant été privées d'énergie sont exposées en présence de $\Delta\psi$ et/ou d'un gradient de Na^+ induits artificiellement. Le potentiel de membrane est créé en transférant les bactéries de pH 7 à pH 9. Le gradient de pH ainsi établi provoque une diffusion des ions H^+ vers l'extérieur (intérieur initialement acide), conduisant ainsi à la formation de $\Delta\psi$ (intérieur négatif) et une accumulation d'AIB jusqu'à un gradient int/ext de 150 peut être observée (Figure 16). De fortes concentrations de TPMP^+ inhibent partiellement l'accumulation d'AIB en réponse à $\Delta\psi$ (comme à la Figure 15), et seulement une faible accumulation d'AIB a lieu en absence d'un changement de pH.

La formation de $\Delta\psi$ par la création d'un gradient de pH devrait être favorisée par la présence d'un protonophore comme observé chez *E. coli* (Tsuchiya et al., 1977a) ou *A. haloplanktis* (Niven et MacLeod, 1980). Toutefois, chez *V. costicola*, aucune accumulation d'AIB ne peut être observée si les bactéries sont préincubées à pH 7 et ensuite transférées à pH 9 en présence de TCS ou CCCP. Ces résultats, en accord avec ceux du Tableau 10, suggèrent que le TCS et le CCCP puissent agir directement au niveau de la molécule de transport d'AIB, comme il a été démontré sur le

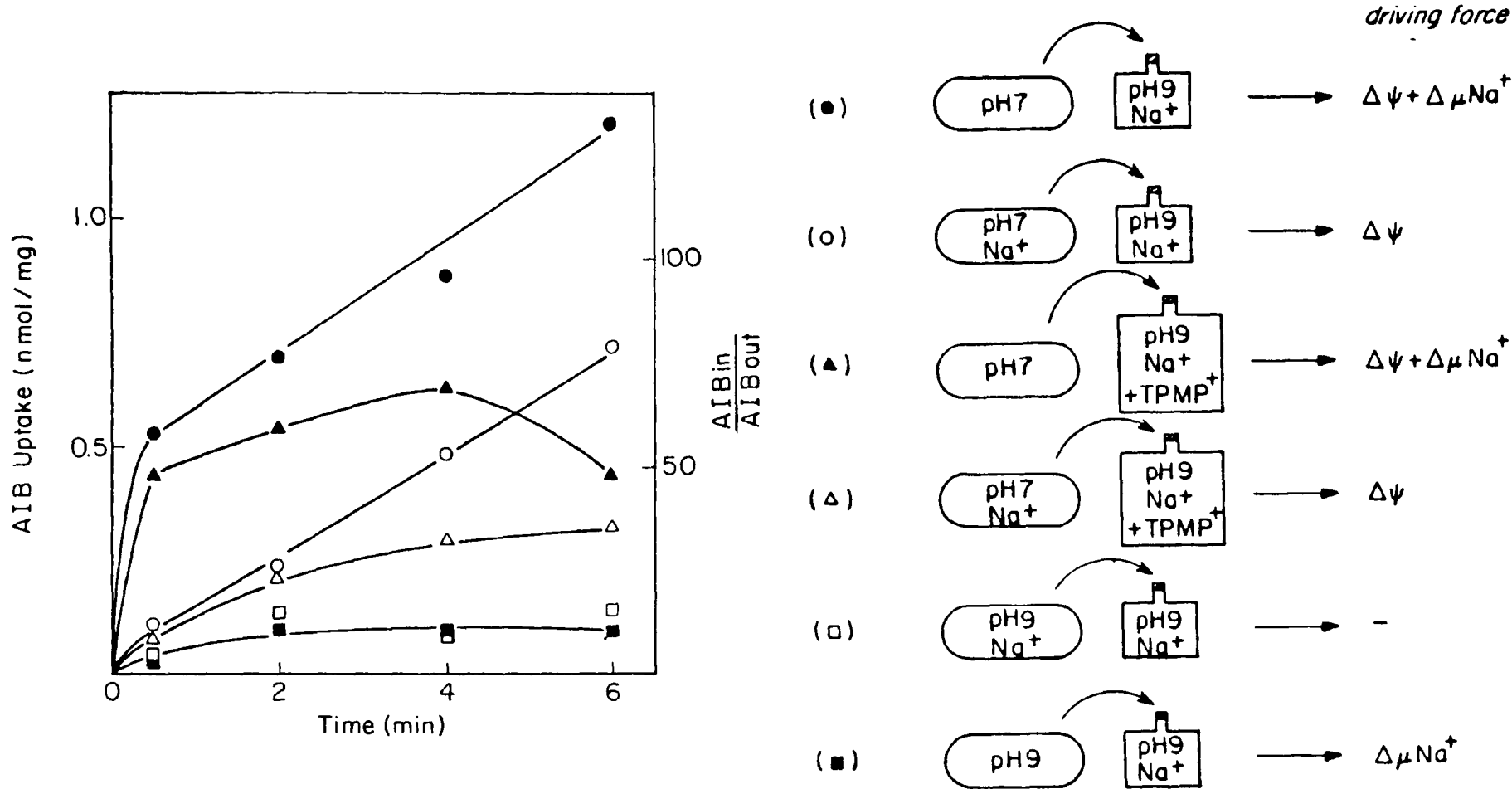


Figure 16. Accumulation d'AIB en réponse à des sources d'énergie créées artificiellement ^a.

^a Les bactéries placées en solutions anaérobiques 1 M KCl (●, ■, ▲) ou 1 M NaCl (○, ◻, △) à pH 7 (●, ○, ▲, △) ou pH 9 (■, ◻) sont ensuite transférées dans des fioles anaérobiques contenant 1 M NaCl et (¹⁴C)AIB (pH 9). Les fioles (▲, △) contiennent aussi 100 μM TPMP⁺ + 2 μM TPB⁻.

transport de la glycine et de la proline chez *Bacillus subtilis* (Brummett et Ordal, 1977).

Pour établir un potentiel chimique de Na^+ , une suspension de bactéries en solution 1 M KCl est transférée dans une solution contenant 1 M NaCl (avec ou sans changement de pH pour créer $\Delta\psi$). Aucune accumulation n'a lieu en réponse à un gradient de Na^+ seul, mais le transport est plus important lorsque les 2 forces, $\Delta\psi$ et le gradient de Na^+ , sont combinées. Les cinétiques du transport d'AIB montrent un taux lent et constant en réponse à $\Delta\psi$ et une accumulation plus rapide attribuable au gradient de Na^+ additionnel. Ces résultats suggèrent que $\Delta\psi$ est nécessaire pour l'accumulation d'AIB, mais que la présence du potentiel chimique de Na^+ supplémentaire permet d'obtenir un meilleur taux de transport.

3. effet de l'environnement ionique sur le transport d'AIB, $\Delta\psi$, la respiration, et la teneur en ATP des cellules:

V. costicola requiert les ions Na^+ pour se développer mais peut respirer en solution 1 M KCl, LiCl, NH_4Cl ou Choline-Cl (Tableau 11), et même accroître sa consommation d'oxygène en présence d'éthanol, à l'exception des bactéries en solution dans 1 M Choline-Cl où une grande proportion d'entr'elles lysent. Les bactéries peuvent aussi synthétiser de l'ATP en solution 1 M KCl en présence d'éthanol, même si leur teneur

Ion (1M)	Transport d'AIB ^b				$\Delta\psi$		Consommation d'O ₂		Teneur en ATP ^c	
	Endogène		Ethanol ^d		Endogène		Endogène	Ethanol	Endogène	Ethanol
	1 min	30 min	1 min	30 min						
	nmol/mg				$\frac{[TPMP^+]_{int}}{[TPMP^+]_{ext}}$		mV	$\mu g\ O_2/min/mg$	$\mu g/mg$	
NaCl	29	163	52	227	420	157	1.0	2.4	4.27	6.51
KCl	2	8	3	7	19	76	1.3	1.9	0.88	3.06
LiCl	0	0	PF*	PF	38	95	0.25	1.2	PF	PF
NH ₄ Cl	0	3	PF	PF	27	78	0.57	2.1	PF	PF
Choline Cl	0	0	PF	PF	20	86	0.56	0.56	PF	PF

Tableau 11. Effet de divers ions sur le transport d'AIB, $\Delta\psi$, la consommation d'O₂, et la teneur en ATP intracellulaire ^a.

^a Les bactéries sont incubées 20 min à 30°C en solution saline (pH 8.5-8.8).

^b Le transport est mesuré après 1 min et 30 min.

^c L'ATP est extrait sur les cellules ayant accumulé l'AIB pendant 30 min.

^d L'éthanol (20 mM) est ajouté à la fin du temps d'incubation des bactéries, 10 sec avant de commencer les essais.

* PF = pas fait.

en ATP est faible dans les conditions endogènes. Par contre, aucun transport d'AIB n'a lieu en absence de NaCl, et si l'éthanol stimule fortement le transport d'AIB en solution 1 M NaCl, aucune stimulation ne peut être observée en solution 1 M KCl. De même, $\Delta\psi$ est fortement diminué en solution 1 M KCl, LiCl, NH_4Cl ou Choline-Cl en absence de Na^+ . Ces valeurs de $\Delta\psi$ représentent de très faibles distributions de TPMP^+ (int/ext) par rapport à celle observée en présence de NaCl.

En outre de leur présence obligatoire pour l'accumulation d'AIB, les ions Na^+ sont nécessaires pour maintenir la concentration interne d'AIB: un efflux d'AIB immédiat a lieu lorsque les bactéries ayant accumulé l'AIB dans des conditions optimales (1 M NaCl, pH 8.8) sont transférées dans des solutions salines de même pression osmotique mais sans NaCl (pH 8.8) (Figure 17).

Pour étudier davantage la relation entre $\Delta\psi$ et le transport d'AIB en fonction de l'environnement ionique, les bactéries sont incubées dans différentes concentrations en NaCl (Figure 18).

Quand la concentration en NaCl diminue jusqu'à 0.3 M NaCl sans aucune compensation pour garder constante à 1M la pression osmotique du milieu (Figure 18 A), $\Delta\psi$ est encore à sa valeur optimale mais le transport d'AIB diminue d'environ 50 %. Ces résultats suggèrent que les ions Na^+ ont un rôle dans le transport d'AIB additionnel à celui joué dans $\Delta\psi$. En-dessous

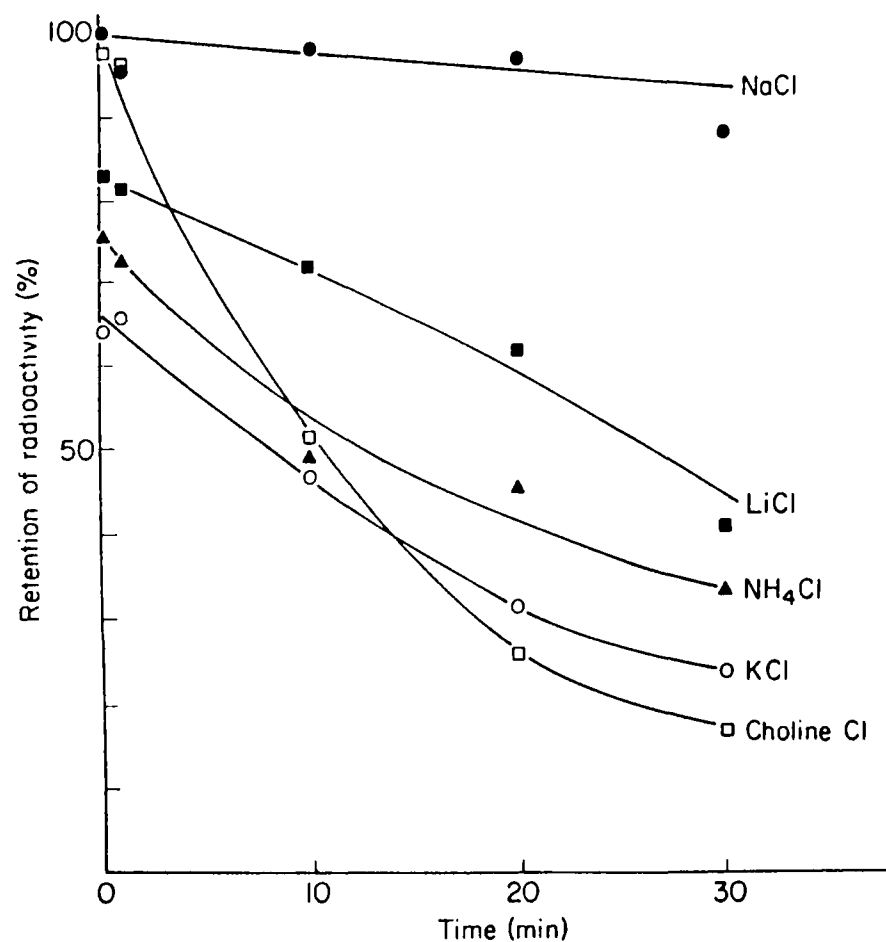
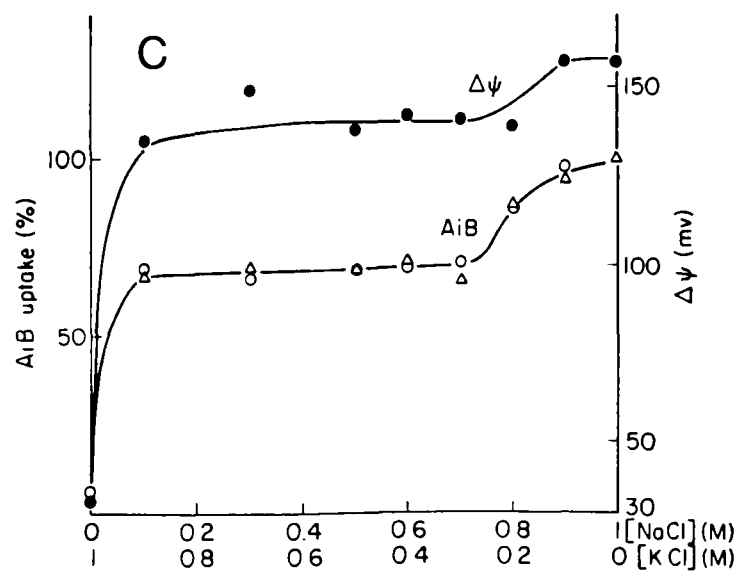
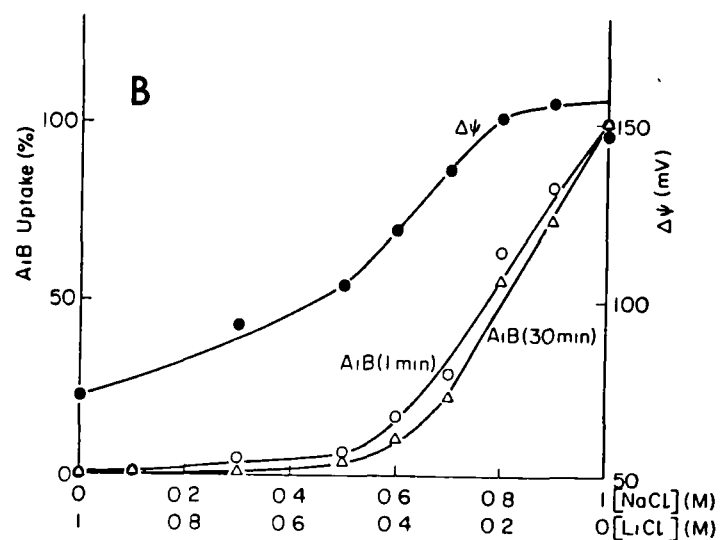
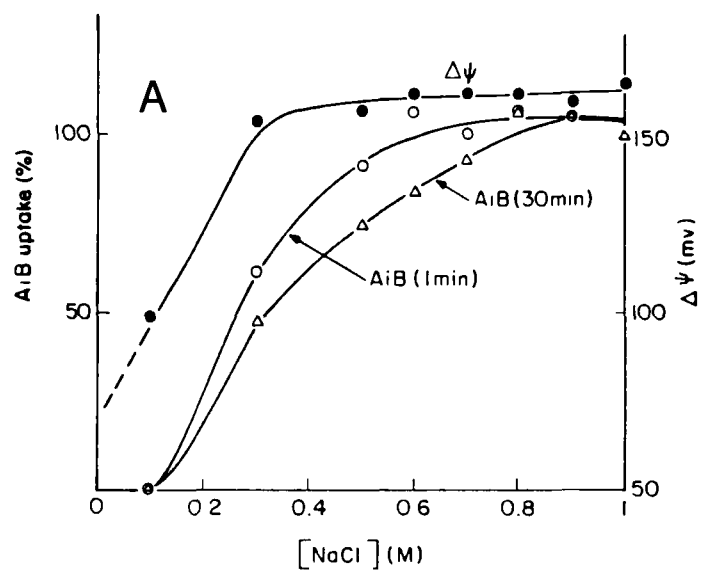


Figure 17. Effet de l'environnement ionique sur l'efflux de l'AIB accumulé par les bactéries ^a.

^a Les bactéries ayant accumulé (¹⁴C)AIB en solution 1 M NaCl (pH 8.8) sont transférées en solution contenant 1 M NaCl, KCl, LiCl, NH₄Cl ou Choline Cl (pH 8.8) sans AIB, et le transport d'AIB est mesuré en fonction du temps.

Figure 18. Effet de l'environnement ionique sur $\Delta\psi$ et le transport d'AIB ^a.

^a Les bactéries sont incubées pendant 20 min à 30°C dans les solutions indiquées (pH 8.8), sans substrat. Les accumulations d'AIB représentant 100 % sont pour 1 (○) et 30 (△) min, en nmol/mg 30 et 170 (Fig. A), 24 et 137 (Fig. B) et 30 et 160 (Fig. C).



de 0.3 M NaCl, $\Delta\Psi$ et le transport d'AIB sont fortement inhibés; les bactéries lysent en absence de NaCl.

Quand l'osmolarité du milieu est maintenue à 1 M avec LiCl (Figure 18 B), de fortes diminutions d'activité peuvent être observées à la fois sur $\Delta\Psi$ et le transport d'AIB quand la concentration en NaCl diminue, et en comparant avec la Figure 18 A, il est évident que les ions LiCl ont un effet inhibiteur.

Lorsque les ions KCl sont utilisés pour compenser la pression osmotique du milieu, les bactéries gardent un potentiel de membrane et un transport d'AIB appréciables en présence de 0.1 M NaCl (Figure 18 C). Entre 0.1 et 0.7 M NaCl, les ions KCl exercent sur $\Delta\Psi$ et le transport d'AIB un effet inhibiteur moindre que LiCl. Toutefois, en présence de 0.8 M NaCl + 0.2 M KCl, les activités ne sont pas aussi élevées que celles observées en présence de 0.8 M NaCl sans KCl ou 1 M NaCl.

Dans tous les cas présents, les profils d'activité de $\Delta\Psi$ et du transport d'AIB en réponse à l'environnement ionique sont parallèles.

Les effets ioniques observés sur $\Delta\Psi$ suggèrent soit que les ions Na^+ sont spécifiquement nécessaires pour la formation ou le maintien d'un potentiel de membrane appréciable, soit que les autres ions dissipent le potentiel de membrane. Pour distinguer entre ces 2 possibilités, les bactéries sont lavées en solution 1 M KCl ou 1 M NaCl et testées dans des solutions

contenant diverses proportions de NaCl + KCl (Tableau 12).

Lorsque les bactéries sont lavées en solution 1 M KCl et gardées dans des solutions ne contenant pas de NaCl, leur potentiel de membrane est dissipé et elles n'accumulent pas d'AIB. Un transfert en solution saline contenant 0.5 ou 1 M NaCl leur permet de rétablir ces activités. En particulier, les bactéries transférées en solution 1 M NaCl sans KCl présentent un potentiel de membrane et un transport d'AIB d'activité très voisine de celle des bactéries ayant été gardées en solution 1 M NaCl. Les taux d'activité sont légèrement plus faibles lorsque les ions KCl (0.5 ou 1 M) restent présents avec NaCl (0.5 ou 1 M).

Lorsque les bactéries lavées en solution 1 M NaCl sont transférées en solution ne contenant pas NaCl, leur potentiel de membrane est dissipé et leur transport d'AIB inhibé. Si elles sont placées en solution 0.5 M NaCl sans KCl, leurs activités restent très élevées, voire identiques à celles des bactéries gardées en solution 1 M NaCl. L'addition de 0.5 M ou 1 M KCl à des suspensions bactériennes en solution 0.5 et 1 M NaCl ne diminue pratiquement pas $\Delta\psi$.

Ces résultats suggèrent que les ions Na^+ sont essentiels pour la formation et le maintien de $\Delta\psi$, et que les ions KCl ont un effet inhibiteur modéré sur $\Delta\psi$ et sur le transport d'AIB.

Solution saline		Solution de lavage (1M)					
KCl (M)	NaCl (M)	KCl			NaCl		
		$\Delta\psi$ (mV)	Transport d'AIB (nmol/mg)		$\Delta\psi$ (mV)	Transport d'AIB (nmol/mg)	
			1 min	30 min		1 min	30 min
0	0	37 $\pm$ 53	1 $\pm$ 1	1 $\pm$ 1	39 $\pm$ 56	0	0
0.5	0	37 $\pm$ 52	0	0	76 $\pm$ 18	0	0
1	0	51 $\pm$ 73	0	0	0	1 $\pm$ 1	8 $\pm$ 2
0	0.5	148 $\pm$ 3	30 $\pm$ 3	144 $\pm$ 29	152 $\pm$ 10	28 $\pm$ 4	124 $\pm$ 11
0.5	0.5	138 $\pm$ 5	16 $\pm$ 3	104 $\pm$ 21	139 $\pm$ 4	17 $\pm$ 1	90 $\pm$ 10
1	0.5	121 $\pm$ 4	13 $\pm$ 1	75 $\pm$ 19	132 $\pm$ 8	13 $\pm$ 1	74 $\pm$ 6
0	1	154 $\pm$ 1	33 $\pm$ 4	174 $\pm$ 29	157 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3	174 $\pm$ 15
0.5	1	123 $\pm$ 15	14 $\pm$ 2	79 $\pm$ 12	148 $\pm$ 1	15 $\pm$ 2	92 $\pm$ 1
1	1	123 $\pm$ 19	7 $\pm$ 3	44 $\pm$ 4	142 $\pm$ 7	7 $\pm$ 1	51 $\pm$ 3

Tableau 12. Effet de diverses concentrations de KCl et NaCl sur $\Delta\psi$ et le transport d'AIB ^a.

^a Les bactéries sont lavées 2 fois en solution contenant 1 M NaCl ou 1 M KCl (pH 7.2) et incubées 20 min à 30°C dans des solutions salines contenant diverses concentrations de NaCl et KCl (pH 8.8). Les résultats sont la moyenne de 2 expériences indépendantes $\pm$ erreur standard.

4. caractéristiques du transport d'AIB.

a) étude cinétique:

Comme suggéré par la Figure 18 A, l'étude cinétique du transport d'AIB met en évidence que les ions Na^+ interviennent directement sur la protéine de transport, en plus de leur rôle pour établir et maintenir $\Delta\Psi$. En fonction des concentrations testées, 2 effets de NaCl sur le transport d'AIB peuvent être distingués (Tableau 13; Figure 19):

A faibles concentrations ($50 \text{ mM} < [\text{Na}^+] < 200 \text{ mM}$), les ions Na^+ augmentent l'affinité de la protéine de transport pour l'AIB (K_t diminue), mais la V_{max} reste constante;

A plus fortes concentrations de NaCl ($0.2 \text{ M} < [\text{Na}^+] < 1 \text{ M}$), l'affinité de la protéine pour l'AIB reste constante mais la V_{max} augmente.

b) définition du système de transport:

Le transport d'AIB peut être inhibé par d'autres acides aminés non radioactifs lorsque ceux-ci sont ajoutés dans la même solution d'incubation en même temps que le (^{14}C)AIB. Ainsi, la glycine, la L-alanine et l'AIB ajoutés dans un rapport de concentrations 1/1 avec le (^{14}C)AIB ($20 \mu\text{M}$) induisent environ 50 % d'inhibition du transport d'AIB (Tableau 14). Lorsque le rapport de concentra-

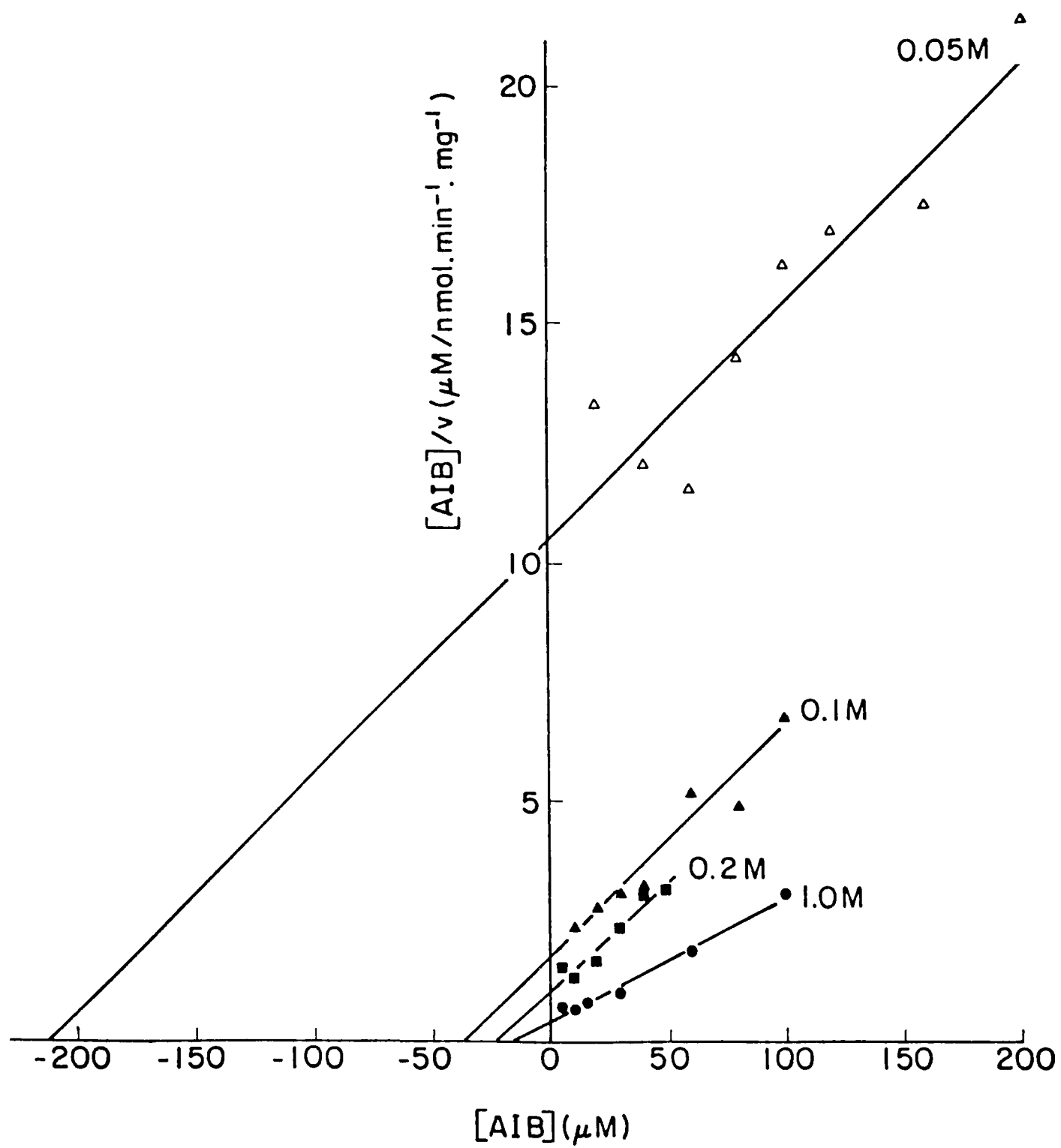
Solution saline		K_t	V_{max}
NaCl (M)	KCL (M)	(μ M)	(nmol/min/mg)
0.05	0.95	197.79 $\pm$ 63.45 (3)	17.97 $\pm$ 4.84
0.10	0.90	40.95 $\pm$ 3.44 (2)	24.68 $\pm$ 4.68
0.15	0.85	30.29 $\pm$ 3.65 (2)	24.56 $\pm$ 1.36
0.20	0.80	22.02 $\pm$ 4.80 (2)	22.02 $\pm$ 1.41
1.0	0	19.75 $\pm$ 4.73 (5)	40.95 $\pm$ 6.86

Tableau 13. Effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB ^a.

^a Les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont incubées 45 min à 30°C dans les solutions salines indiquées (pH 8.7) après 2 lavages en solution 1 M NaCl. Le transport d'AIB est déterminé après 30 sec.
Les résultats sont la moyenne d'expériences indépendantes dont le nombre est donné entre parenthèses $\pm$ erreur standard.

Figure 19. Courbes représentatives typiques de l'effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB ^a.

- ^a Les bactéries sont incubées pendant 45 min à 30° C dans des solutions contenant 0.05 M ($\triangle$), 0.10 M ($\blacktriangle$), 0.20 M ($\blacksquare$), et 1 M ($\bullet$) NaCl (pH final 8.7). La pression osmotique des solutions est ajustée à 1 M par KCl. Le transport d'AIB est mesuré après 30 sec.
(voir p. 83)



Acide aminé non radioactif	% inhibition			
	20 μ M		500 μ M	
	0.5 min	1 min	0.5 min	1 min
glycine	74	68	95	96
L-alanine	48	23	97	97
AIB	42	37	92	93
L-méthionine	18	15	64	59
L-isoleucine	4	10	12	10
L-leucine	0	2	17	21
L-phénylalanine	2	3	27	21
L-valine	0	2	8	9

Tableau 14. Compétition pour le transport d'AIB avec divers acides aminés non radioactifs ^a.

^a Les bactéries sont incubées pendant 20 min à 30°C en solution 1 M NaCl. Les acides aminés (20 ou 500 μ M) sont ensuite ajoutés en même temps que le (¹⁴C)AIB. Le transport d'AIB est mesuré après 0.5 et 1 min. En l'absence d'acide aminé compétitif, le transport d'AIB est de 8.8 et 14.7 nmol/mg à 0.5 et 1 min respectivement.

tions (analogue/ (^{14}C) AIB) est de 25/1, le transport d'AIB est pratiquement totalement inhibé en présence de glycine, L-alanine et AIB non radioactifs. A forte concentration, la méthionine inhibe aussi le transport d'AIB. Ces résultats suggèrent que l'AIB partage le même système de transport que la glycine et la L-alanine.

2. Antiport Na^+/H^+ .

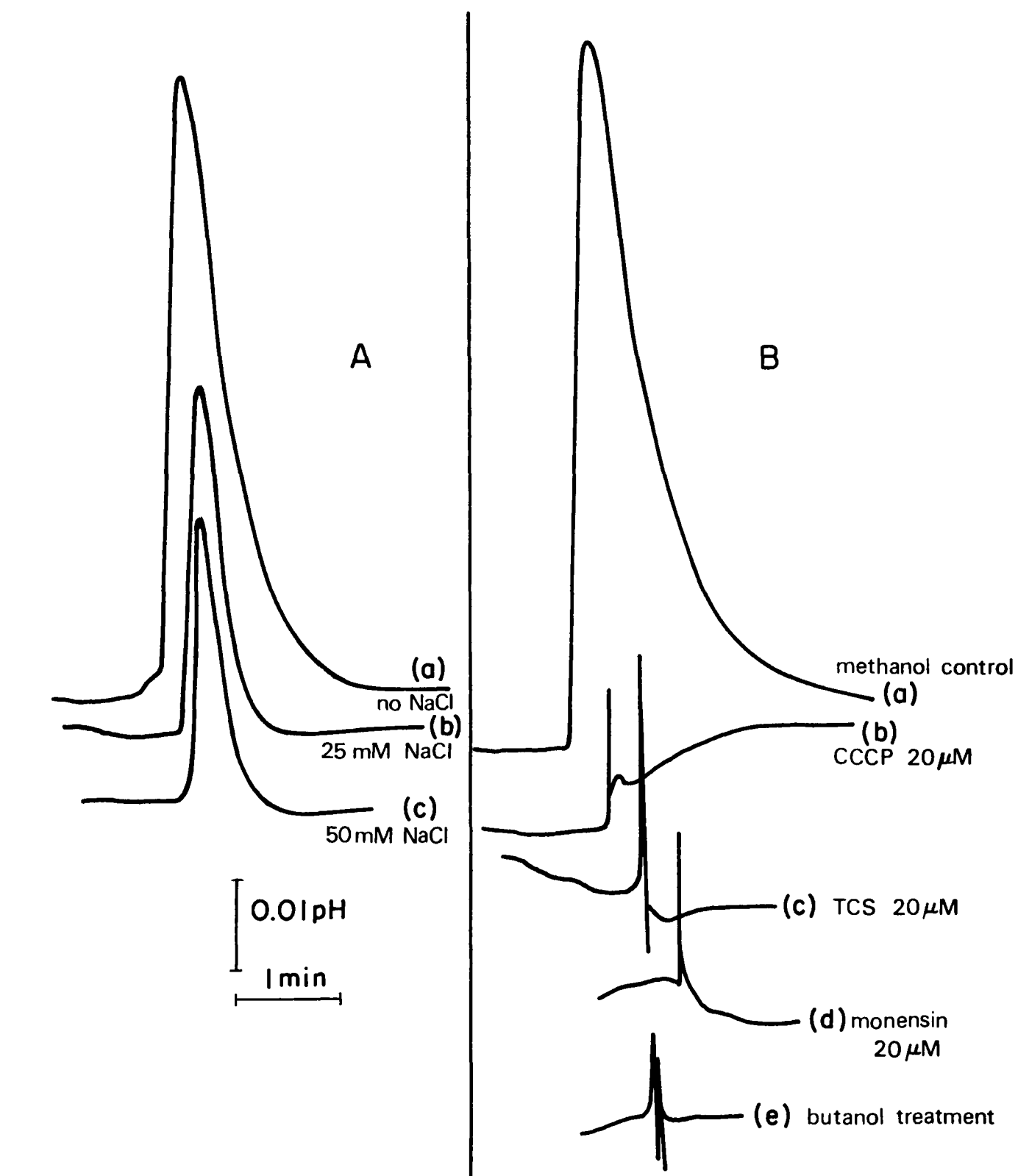
1. mise en évidence:

Les bactéries sont incubées dans une solution contenant 1 M KCl pour éviter leur lyse (Christian et Ingram, 1959) et garder la même pression osmotique que celle de leur milieu de culture. Il a par ailleurs été montré que la chaîne respiratoire de *V. costicola* est aussi fonctionnelle à 1 M KCl qu'à 1 M NaCl (voir Tableau 11).

Quand les bactéries sont équilibrées anaérobiquement à pHo 7.5 ($\Delta\text{pH} = 0$, voir Figure 11), une pulsion d'oxygène provoque une rapide acidification du milieu. Quand tout l'oxygène apporté est consommé, les protons sont réabsorbés par les bactéries et le pH extérieur revient à sa valeur initiale (Figure 20 A). Le milieu d'incubation contient aussi KSCN. Les ions SCN^- librement perméables peuvent rapidement compenser les charges créées par les mouvements ioniques à travers la membrane et par là, éviter

Figure 20. Influence de NaCl et d'inhibiteurs sur l'efflux de protons liés à la respiration de *Vibrio costicola*^a.

^a Un flux d'oxygène est injecté dans une suspension bactérienne en solution anaérobie 1 M KCl (pH 7.5) ayant subi divers traitements (voir texte).



le développement d'un potentiel de membrane appréciable (Mitchell et Moyle, 1969 b). Aucune acidification du milieu extérieur en réponse à une injection d'oxygène ne peut être observée lorsque les bactéries sont préalablement traitées par les ionophores CCCP, TCS et monensine, ou par le butanol à 85°C. Par contre, une incubation des bactéries en présence de méthanol (le solvant des ionophores) permet aussi d'observer l'acidification du milieu en réponse à une pulsion d'oxygène (Figure 20 B). Ces résultats indiquent que *Vibrio costicola* peut utiliser l'énergie de la respiration pour éjecter des protons à pH 7.5. Des résultats identiques (non montrés) sont obtenus lorsque l'expérience est réalisée à pH₀ 8.8 en solution 1 M KCl.

Si les bactéries sont incubées en conditions anaérobiques en présence de NaCl, une pulsion d'oxygène provoque une plus faible réponse dans l'acidification du milieu et le taux de déclin est accéléré. Les temps de demi-réaction pour le retour du pH₀ à sa valeur initiale sont 3.2 sec (sans NaCl), 1.8 sec (25 mM NaCl), et 1.4 sec (50 mM NaCl) (Figure 20 A). Ces résultats suggèrent qu'un antiport soit couplé avec une expulsion de Na⁺. Le taux de l'activité de l'antiport augmente en fonction de la concentration en Na⁺ jusqu'à une valeur maximale de 40 mM NaCl. *V. costicola* étant une bactérie strictement aérobique, il est supposé qu'aucun gradient de Na⁺ n'est établi par les bactéries en conditions anaérobiques (West et Mitchell, 1974; Niven et MacLeod, 1978).

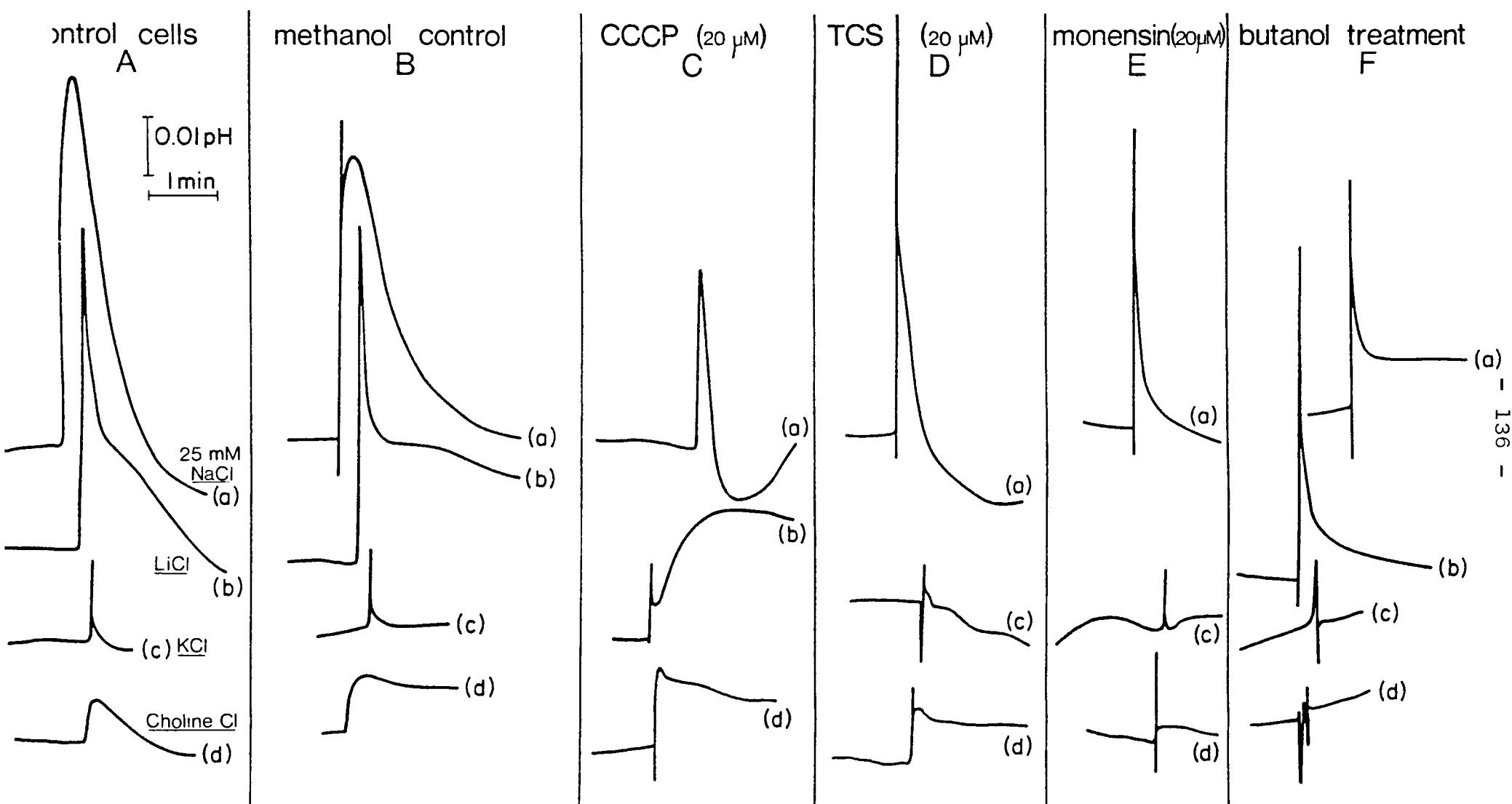
Cet antiport Na^+/H^+ peut aussi être mis en évidence en injectant dans une suspension de bactéries gardées en conditions anaérobiques en solution 1 M KCl (sans NaCl) une solution anaérobique de NaCl (Figure 21 A). Dans ces conditions d'anoxie, la chaîne respiratoire des bactéries ne fonctionne pas et l'entrée présumée de Na^+ par le biais de l'antiport Na^+/H^+ s'accompagne d'une éjection de protons. L'antiport Na^+/H^+ semble bien spécifique aux ions Na^+ puisque l'injection de solutions anaérobiques de KCl, LiCl, ou Choline-Cl n'induit aucune acidification du milieu.

La mise en évidence de l'antiport Na^+/H^+ est complétée par l'étude d'inhibiteurs. Lorsque les bactéries sont traitées par les ionophores, aucune acidification du milieu n'a lieu en réponse à l'injection de solution anaérobique de NaCl, KCl, LiCl, ou Choline-Cl. Par contre une acidification peut être observée après incubation des bactéries en présence de méthanol, indiquant que ce sont ces découplants qui agissent sur l'activité de l'antiport Na^+/H^+ et non leur solvant (Figure 21 B-E).

Cette étude de l'antiport en conditions anaérobiques est aussi contrôlée en utilisant des bactéries traitées par le butanol à 85°C. Aucune injection anaérobique de NaCl, KCl, LiCl ou Choline-Cl ne provoque d'acidification du milieu (Figure 21 F). Des résultats identiques (non montrés) sont obtenus lorsque l'expérience est réalisée à pH 8.8.

Figure 21. Effet d'ionophores et du butanol sur l'antiport Na^+/H^+ a.

^a Les bactéries en solution anaérobique 1 M KCl (pH 7.5) sont soumises à une injection de diverses solutions anaérobiques (25 mM NaCl, LiCl, KCl, ou Choline Cl) après avoir été incubées en présence d'ionophores ou de butanol (voir texte).



2. rôle dans la régulation du pHi:

L'effet de NaCl sur l'accumulation de méthylamine a été étudié sur les bactéries placées en conditions aérobiques et anaérobiques (Tableau 15). Comme attendu d'après les résultats de la Figure 9, la méthylamine n'est pas accumulée à pHo voisin de la neutralité, que les bactéries soient en solution 1 M NaCl ou KCl, à l'air ou sous atmosphère d'azote. Par contre, une large accumulation de méthylamine peut être observée à pH 8.6 lorsque les bactéries sont incubées en présence de NaCl, à la fois dans des conditions aérobiques et anaérobiques, et pratiquement aucune accumulation ne peut être détectée pour celles incubées en solution KCl. Ces résultats apportent une évidence pour un rôle de l'antiport dans la régulation du pH cytoplasmique dans des conditions de pHo alcalins.

3. croissance de *V. costicola* en fonction de pHo:

Que sa respiration (voir Figure 13), son potentiel de membrane (voir Figure 11) présentent une activité optimale à pH compris entre 8.5 et 9.0, qu'un antiport Na^+/H^+ contribue à la régulation de son pHi dans des conditions de pHo alcalins (voir Tableau 15) laissent supposer que *V. costicola* puisse se développer à pH alcalin. Des expériences de culture en fermenteur sont donc réalisées dans des conditions contrôlées de pH. La Figure 22 montre

Phase gazeuse	Solution saline	pH _o	pH _i	ΔpH
Azote	KCl	7.11	7.11	0 ^b
	KCl	8.58	7.95	0.63
	NaCl	7.00	7.00	0
	NaCl	8.63	7.53	1.10
Air	KCl	6.98	6.98	0
	KCl	8.58	8.58	0
	NaCl	6.93	6.93	0
	NaCl	8.64	7.77	0.87

Tableau 15. Effet de NaCl sur le pH_i de *Vibrio costicola* ^a.

^a *Vibrio costicola* est incubé sous atmosphère d'azote ou en conditions aérobiques, en solution 1 M KCl ou 1 M NaCl (pH 7 ou 8.7). Le pH_i des bactéries est déterminé par accumulation de (¹⁴C) méthylamine.

^b ΔpH n'est pas détecté avec la méthylamine.

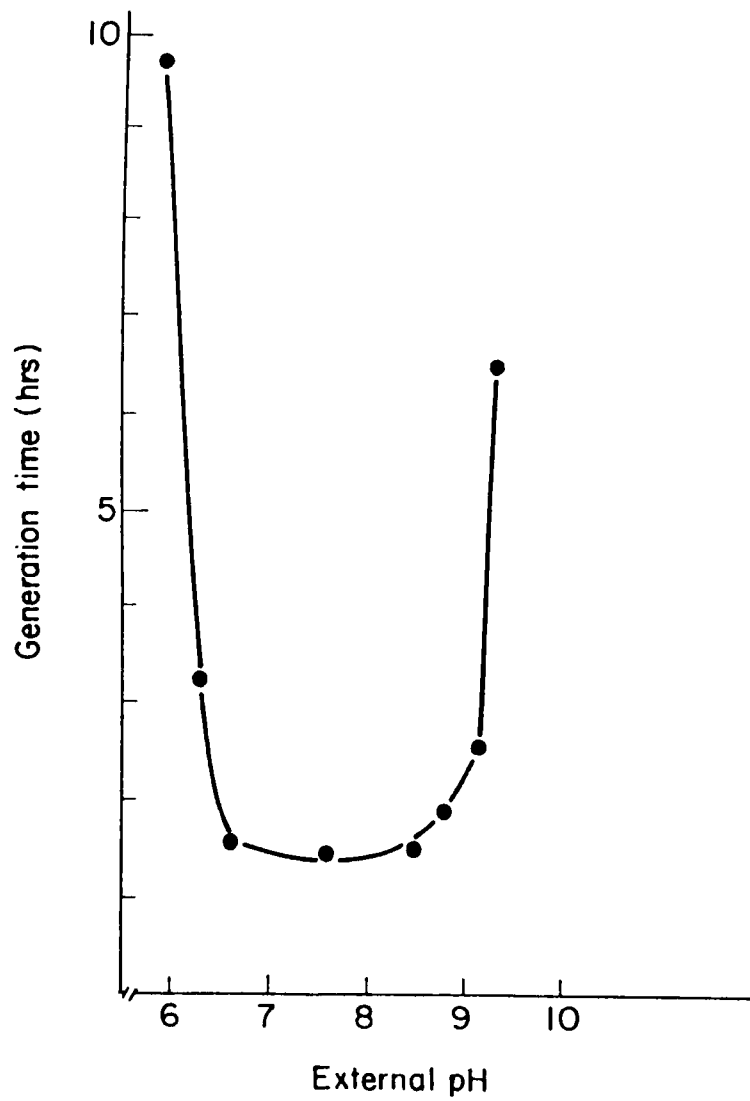


Figure 22. Culture de *Vibrio costicola* en fonction du pH extérieur ^a.

^a *V. costicola* est cultivé en fermenteur à divers pH extérieurs, sur le milieu complexe 1 % PPT + 1 M NaCl.

qu'en fait *V. costicola* peut se développer de manière optimale sur une large échelle de pH allant de 6.5 jusqu'au pH alcalin 9.0.

3. Tolérance de *Vibrio costicola* aux fortes concentrations de NaCl.

Vibrio costicola est une bactérie halophile modérée qui peut se développer sur une vaste échelle de concentrations en NaCl (environ 0.2 - 3.5 M). Forsyth et Kushner (1970) ont montré chez *Vibrio costicola* et *Paracoccus halodenitrificans*, une autre bactérie halophile modérée, que cette croissance en présence d'un si large rang de concentrations en NaCl n'est pas le fait d'une sélection d'organismes plus ou moins résistants au sel mais résulte d'une adaptation individuelle. Un mécanisme d'adaptation possible est que les bactéries forment des enzymes et structures dont la réponse au sel est influencée par la concentration en NaCl du milieu de culture. Pour tester cette hypothèse, la membrane cellulaire est le siège privilégié puisqu'elle est en contact direct avec le milieu extérieur et qu'en dépit des incertitudes concernant la composition et l'état des ions intracellulaires, le milieu extérieur peut être parfaitement connu. Le système de transport d'AIB chez *V. costicola* fut choisi (Kushner, 1980).

1. effet de la concentration en NaCl du milieu de culture sur l'halotolérance du transport d'AIB:

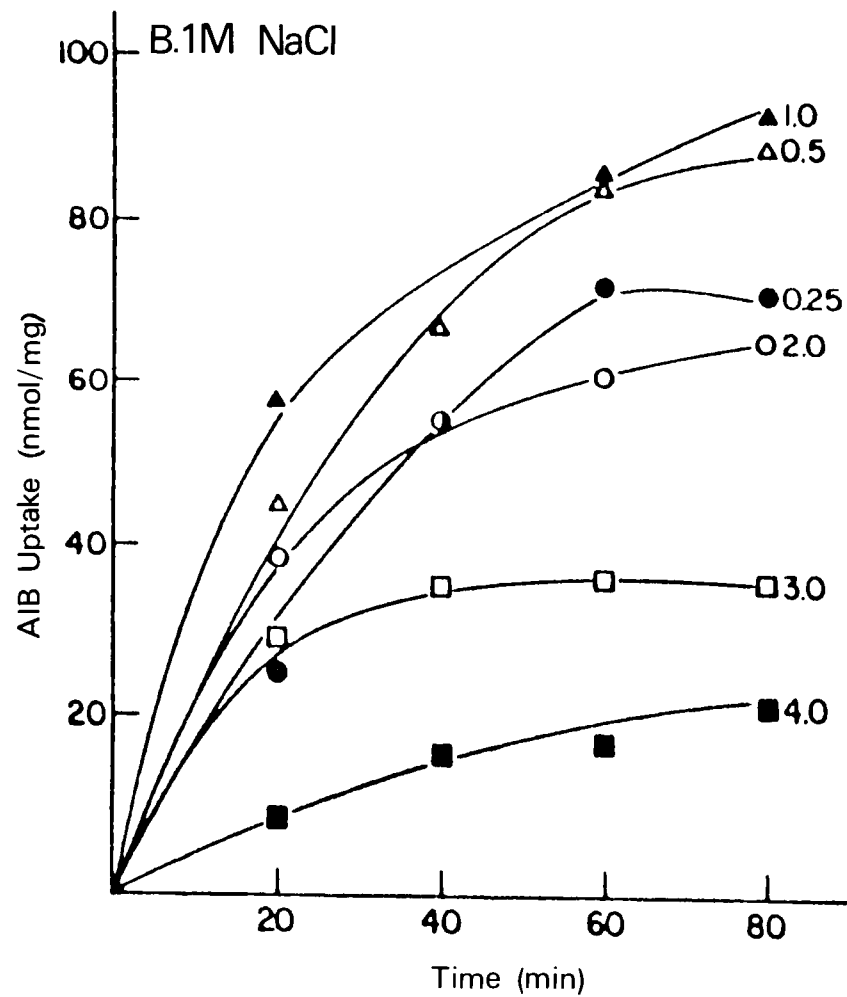
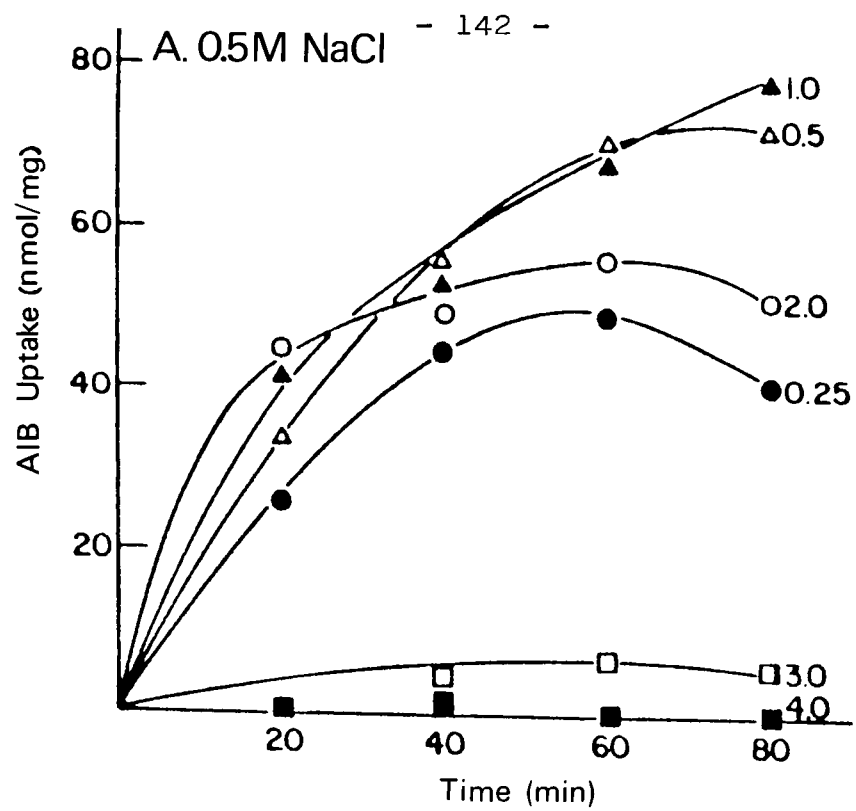
a) accumulation d'AIB:

L'activité du transport d'AIB en présence de concentrations variées de NaCl est comparée entre les bactéries cultivées sur le milieu complexe 1 % PPT contenant soit 0.5 M NaCl, soit 1 M NaCl. Lorsque les bactéries sont cultivées en présence de 0.5 M NaCl (Figure 23 A), leur transport d'AIB est optimal en présence de 0.5 et 1 M NaCl, décroît à 2 M NaCl et est fortement inhibé à 3 M NaCl. Pratiquement plus d'AIB n'est accumulé par les bactéries à 4 M NaCl. Les bactéries cultivées à 1 M NaCl (Figure 23 B) présentent aussi une activité de transport optimale à 0.5 et 1 M NaCl qui diminue à 2 M NaCl. Par contre, à 3 M et même 4 M NaCl, ces bactéries gardent encore une bonne aptitude à transporter l'AIB. En présence de 0.25 M NaCl, le transport d'AIB est presque aussi grand que dans les conditions optimales (0.5 et 1 M NaCl), et de manière similaire pour les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl.

Le transport d'AIB des bactéries cultivées à 2 M NaCl répond de manière identique à celui des bactéries cultivées à 1 M NaCl, avec un transport en présence de 4 M NaCl relativement plus élevé (résultats non montrés).

Figure 23. Effet de la concentration en NaCl sur le transport d'AIB ^a.

^a Les bactéries cultivées et lavées en solution 0.5 M (A) ou 1 M (B) NaCl sont transférées dans des solutions salines contenant diverses concentrations en NaCl et (¹⁴C)AIB (pH 7.2). L'accumulation d'AIB est mesurée en fonction du temps.



b) efflux d'AIB:

Le transport actif des composés à travers une membrane est formé de deux phénomènes opposés: leur entrée dans la cellule et leur efflux (Maloney *et al.*, 1975). Tout comme sa caractérisation, (section 1 des "Résultats", p 97-132), la réponse au sel du transport d'AIB est essentiellement étudiée dans le sens de l'accumulation de l'AIB dans les cellules. Mais l'effet des fortes concentrations en NaCl a aussi été étudié sur l'efflux de l'AIB des bactéries de la manière suivante:

Les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl sont tout d'abord placées dans des solutions salines 0.5 et 1 M NaCl respectivement, et leur accumulation d'AIB est mesurée. Des cristaux de NaCl sont ensuite rapidement ajoutés à ces suspensions bactériennes pour augmenter la concentration en NaCl de leur milieu jusqu'à 3 ou 4 M NaCl et la mesure du transport d'AIB est poursuivie. La Figure 24 montre que l'augmentation de la concentration en NaCl du milieu dans lequel les bactéries sont en train d'accumuler l'AIB provoque un efflux immédiat de l'AIB. De manière réciproque à l'expérience précédente mesurant l'incorporation de l'AIB (voir Figure 23), les bactéries cultivées à 1 M NaCl gardent une meilleure aptitude à retenir l'AIB lorsqu'elles sont transférées à 3 et 4 M NaCl que celles cultivées à 0.5 M NaCl.

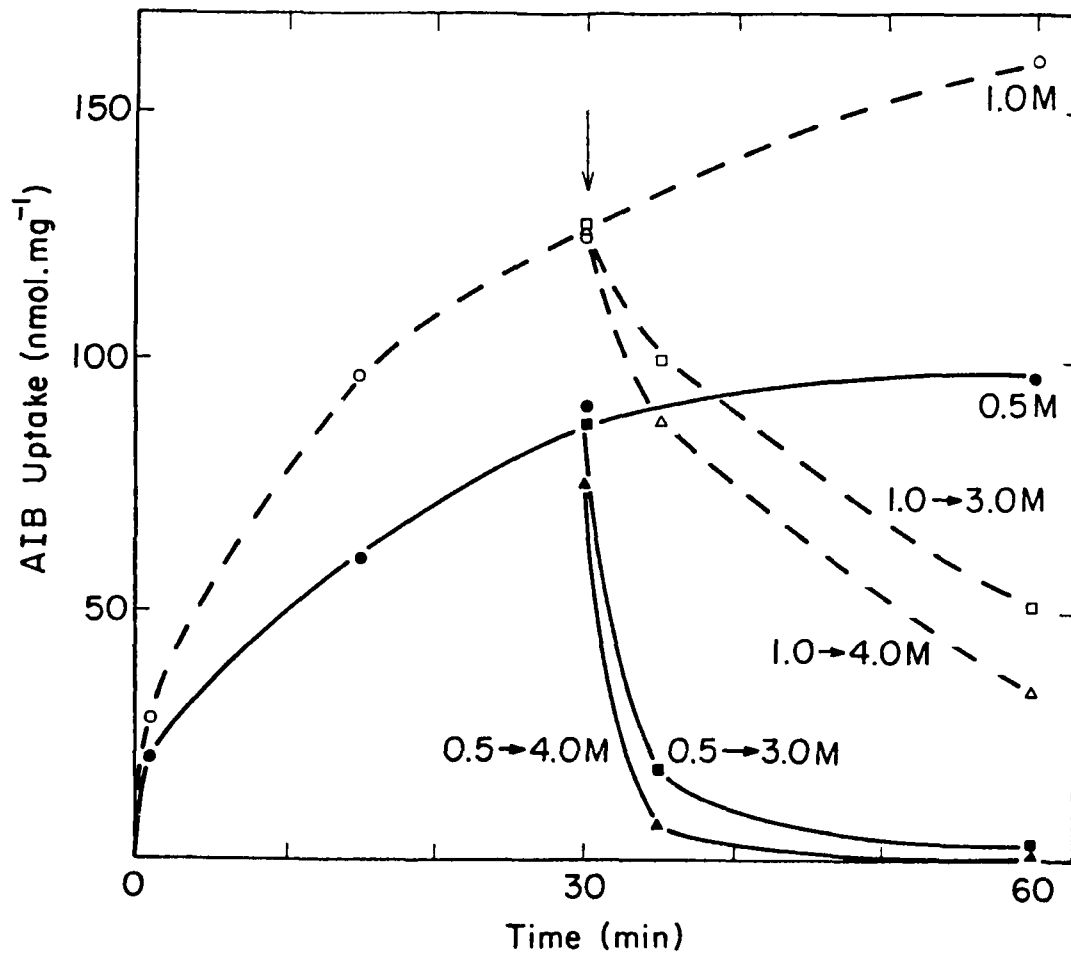


Figure 24. Effet des fortes concentrations en NaCl sur l'efflux d' AIB ^a.

^a Le transport d'AIB est mesuré sur les bactéries cultivées et lavées à 0.5 M (■, ▲, ●) ou 1 M (□, △, ○) NaCl, (pH 7.2). A t = 30 min, des cristaux de NaCl sont ajoutés pour ajuster les concentrations finales à 3 M (■, □) ou 4 M (▲, △) NaCl, et le transport d'AIB est mesuré pendant 30 autres minutes.

2. effet du pH extérieur sur l'halotolérance du transport d'AIB:

Que le transport d'AIB soit mesuré dès que les bactéries sont transférées dans les solutions (pH 7.2) contenant différentes concentrations en NaCl (0.5, 1, 3, ou 4 M) (voir Figure 23) ou après 45 min d'incubation dans ces solutions à 30°C (Tableau 16), il existe toujours la même différence notable dans l'halotolérance à 3 et 4 M NaCl entre les bactéries cultivées à 0.5 M et celles cultivées à 1 M NaCl. Par ailleurs, le transport d'AIB étant optimal à un pH compris entre 8.5 et 9.0 (voir Figure 12), l'effet des différentes concentrations en sel sur le transport d'AIB est aussi étudié à pH 8.75. Ainsi, lorsque les bactéries sont cultivées à 0.5 M NaCl, le transport d'AIB est plus actif à pH 8.75 qu'à pH 7.2 en présence de 0.5 M, 1 M et même 3 M NaCl. Par contre, en présence de 4 M NaCl, un pH extérieur de 8.75 n'a pratiquement aucun effet activateur sur le transport d'AIB, comparé à l'activité du transport à pH 7.2. Lorsque les bactéries sont cultivées à 1 M NaCl, le transport d'AIB est stimulé à pH 8.75 en présence de 1 M et même 3 M NaCl par rapport à l'activité observée à pH 7.2. En présence de 4 M NaCl, le transport d'AIB n'est pas sensible au pH extérieur.

Concentration en NaCl (M)		Transport d'AIB (nmol/mg)			
Croissance	Essai	pH 7.20		pH 8.75	
		1 min	30 min	1 min	30 min
0.5	0.5	12.3	69.5	17.2	83.2
	1	9.6	60.9	16.9	73.3
	3	1.3	2.3	1.6	2.9
	4	0.4	0.1	0.5	0.3
1	1	15.9	88.9	24.0	107.4
	3	2.1	9.7	3.7	18.3
	4	1.3	5.2	1.2	5.1

Tableau 16. Effet du pH extérieur sur l'halotolérance du transport d'AIB ^a.

^a Les bactéries sont incubées pendant 45 min à 30°C dans les solutions salines contenant 0.5, 1, 3, ou 4 M NaCl (pH 7.2 ou 8.75) avant d'initier le transport d'AIB.

3. étude cinétique du transport d'AIB en relation avec
l'halotolérance:

La détermination des paramètres cinétiques du transport d'AIB sur les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl révèle que la constante K_t de transport est du même ordre de grandeur entre les 2 cultures (Tableau 17; Figure 25). Ces résultats suggèrent que la différence observée dans l'halotolérance du transport d'AIB entre les bactéries cultivées à 0.5 M et celles cultivées à 1 M NaCl ne réside pas dans une modification de l'affinité de la protéine de transport pour l'AIB pendant la croissance des bactéries à différentes concentrations en NaCl.

Le transfert des bactéries cultivées à 0.5 M NaCl dans une solution contenant 1 M NaCl, et inversement celui des bactéries cultivées à 1 M NaCl dans une solution contenant 0.5 M NaCl n'induit que de faibles changements dans les paramètres cinétiques du système de transport. Lorsque les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont transférées à 3 M NaCl, l'affinité de la protéine de transport pour l'AIB n'est pas modifiée mais la vitesse de transport (V_{max}) est fortement diminuée.

Concentration en NaCl (M)		Kt (μ M)	V _{max} (nmol/min/mg)
Croissance	Essai		
0.5	0.5	7.62 $\pm$ 0.29	14.10 $\pm$ 0.85 (2) ^b
	1	12.24 $\pm$ 1.81	15.87 $\pm$ 0.29 (2)
1	0.5	14.07 $\pm$ 0.77	31.46 $\pm$ 0.52 (2)
	1	19.75 $\pm$ 4.73	40.95 $\pm$ 6.86 (5)
	3	24.19 $\pm$ 7.36	3.18 $\pm$ 0.42 (3)

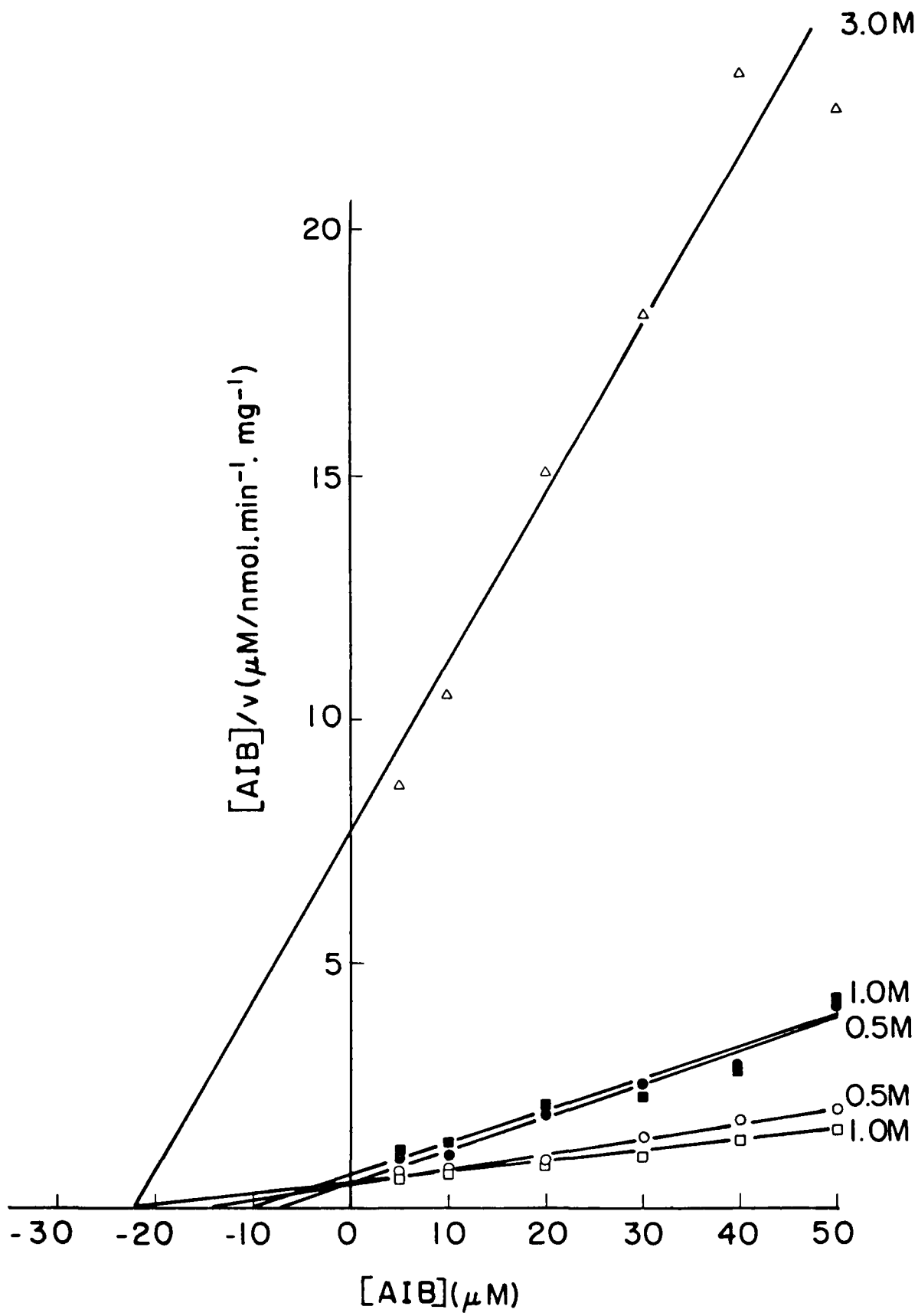
Tableau 17. Effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB ^a.

^a Les bactéries cultivées à 0.5 ou 1 M NaCl sont incubées pendant 45 min à 30°C dans les solutions salines montrées (pH 8.7). Le transport d'AIB est mesuré après 30 sec.

^b Les résultats sont la moyenne d'expériences indépendantes dont le nombre est donné entre parenthèses $\pm$ erreur standard.

Figure 25. Courbes représentatives typiques de l'effet de NaCl sur les paramètres cinétiques du transport d'AIB en relation avec son halotolérance ^a.

^a Les bactéries cultivées à 0.5 M (●, ■) et 1 M (○, □, △) NaCl sont incubées pendant 45 min à 30°C dans des solutions contenant 0.5 M (●, ○), 1 M (■, □) ou 3 M (△) NaCl (pH 8.7). Le transport d'AIB est mesuré après 30 sec.



4. étude du développement de l'halotolérance du transport d'AIB:

L'approche par laquelle la comparaison de la tolérance à 3 et 4 M NaCl du transport d'AIB entre les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl est étudiée consiste à déterminer quelles conditions particulières d'incubation permettent aux bactéries cultivées à 0.5 M NaCl de développer un système de transport d'AIB aussi halotolérant que celui observé chez les bactéries cultivées sur le même milieu complexe mais avec 1 M NaCl.

Les résultats de plusieurs expériences (Tableau 18) montrent que l'halotolérance du système de transport d'AIB peut être développée en 2 h (ou plus) en transférant les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl dans le milieu de culture complexe PPT contenant 1 M NaCl, même en présence de chloramphénicol, suggérant que le développement de l'halotolérance du système d'AIB ne requiert pas la synthèse de nouvelle protéine. Une incubation des bactéries dans la solution saline 1 M NaCl n'induit pas ce développement, même en présence de glucose (substrat métabolisé par les bactéries, voir Figure 8), ou de NH_4Cl . Par contre, l'addition simultanée de glucose + NH_4Cl en solution saline 1 M NaCl stimule le développement de l'halotolérance du système de transport d'AIB. Cette stimulation n'est pas observée en solution 1 M KCl, même en présence de glucose + NH_4Cl . Ces résultats suggèrent que pour le développement de la tolérance au sel du système de transport d'AIB,

Tableau 18. Effet de divers milieux d'incubation sur le développement de la tolérance à 4 M NaCl du transport d'AIB chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl ^a.

^a *Vibrio costicola* est cultivé en milieu PPT (0.5 %) avec 0.5 M NaCl jusqu'en phase exponentielle (0.2 à 0.4 mg poids sec/ml). Les bactéries sont ensuite diluées avec un volume égal de milieu de culture 0.5 % PPT contenant 0.5 M NaCl (essai 1) et 1.5 M NaCl (essai 2). Dans l'essai 3, les bactéries sont lavées 2 fois en solution saline 0.5 M NaCl (pH 7.2) et incubées en solution 1 M NaCl ou 1 M KCl (pH 7.2) avec ou sans substrat. Aux temps indiqués, les bactéries sont lavées en solution 1 M NaCl et le transport d'AIB est effectué comme Figure 23.

^b accumulation d'AIB (nmol/mg) mesurée après 60 min.

^c accumulation relative à 4 M NaCl exprimée en % de celle à 1 M NaCl.

Essai	Milieu d'incubation	Temps (h)	Transport d'AIB	
			1.0 M ^b NaCl	4.0 M ^c NaCl
1	0.5 M NaCl + 0.5 % PPT	0	30	0
		7.5	61	1
2	1.0 M NaCl + 0.5 % PPT	0	18	0
		2	19	10
		4	31	30
		6	33	52
	1.0 M NaCl + 0.5 % PPT + chloramphénicol(100µg/ml)	2	49	19
		4	52	16
		6	33	42
	1.0 M NaCl	0	21	0
		4.5	16	8
		1.0 M NaCl + 0.2 M NH ₄ Cl	13	6
		1.0 M NaCl + 0.1 M glucose	38	7
		1.0 M NaCl + 0.1 M glucose + 0.2 M NH ₄ Cl	19	28
	1.0 M KCl + 0.1 M glucose + 0.2 M NH ₄ Cl	4.5	7	0

les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl requièrent une incubation dans une solution contenant spécifiquement 1 M NaCl et des substrats particuliers.

Suite à ces résultats, d'autres expériences sont réalisées, consistant à cultiver les bactéries à 0.5 M NaCl et les incuber dans des solutions salines contenant 0.5 M ou 1 M NaCl (pH 7.2) et divers substrats et tester ensuite le transport d'AIB en présence de 1, 3, et 4 M NaCl. Les résultats (Tableau 19) montrent que les bactéries peuvent développer plus facilement la tolérance du système de transport à 3 M NaCl qu'à 4 M NaCl. Ainsi, après une simple incubation de 2 heures dans une solution saline 1 M NaCl ne contenant pas de substrat, les bactéries peuvent transporter l'AIB en présence de 3 M NaCl, mais elles restent inhibées à 4 M NaCl. Une incubation en présence de substrats complexes (PPT, acides aminés ou extraits de levures) pendant 2 heures cause une forte stimulation du transport d'AIB à 3 et 4 M NaCl. Le glycérol et le saccharose, bien que métabolisés (voir Figure 8) n'induisent pas le développement de l'halotolérance du transport d'AIB à 3 et 4 M NaCl. Par contre la bétaine, substrat non utilisé par les bactéries (voir Figure 8) stimule fortement le développement de l'halotolérance du transport d'AIB à 3 et 4 M NaCl lorsque les bactéries sont incubées à 1 M NaCl. Aucune halotolérance du transport d'AIB n'est développée à 4 M NaCl lorsque les bactéries sont incubées en présence de

Tableau 19. Effet de divers milieux d'incubation sur le développement de la tolérance à 3 et 4 M NaCl du transport d'AIB chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl ^a.

- ^a Les bactéries sont cultivées à 0.5 M NaCl et lavées en solution 0.5 M NaCl (pH 7.2). Elles sont ensuite incubées (100 ml, 0.2 à 0.3 mg poids sec/ml) à 30°C en solution saline contenant 0.5 M ou 1 M NaCl (pH 7.2) en présence de chloramphénicol (100 µg/ml), et avec ou sans substrat. Aux temps indiqués, les bactéries sont lavées 2 fois en solution saline de même concentration en NaCl que celle d'incubation et le transport d'AIB est effectué comme Figure 23, mais l'AIB est ajouté après 45 min d'incubation des bactéries en solution 1 M, 3 M, ou 4 M NaCl (pH 7.2).
- ^b Le transport d'AIB est mesuré après 30 min. L'accumulation à 3 et 4 NaCl est exprimée en % de celle à 1 M NaCl.

Essai	Milieu d'incubation	Temps (h)	Transport relatif d'AIB ^b	
			3 M NaCl	4 M NaCl
1	0.5 M NaCl	2	5	3
	1 M NaCl	2	21	3
	1 M NaCl + 1 % PPT	2	63	17
	1 M NaCl + 1 %	2	56	27
	casamino-acids			
	1 M NaCl + 1 %	2	74	16
	extrait de levure			
2	0.5 M NaCl	4	1	0
	1 M NaCl	4	14	1
	1 M NaCl + 0.2 M NH ₄ Cl	4	14	3
	1 M NaCl + 0.1 M glucose	4	32	3
	1 M NaCl + 0.1 M glucose	4	64	7
	+ 0.2 M NH ₄ Cl			
3	0.5 M NaCl	4	1	1
	1 M NaCl	4	21	4
	1 M NaCl + 10 % glycérol	4	21	1
	1 M NaCl + 10 %	4	27	5
	saccharose			
4	0.5 M NaCl	2	1	0
	0.5 M NaCl + 1 mM bétaine	2	13	1
	1 M NaCl	2	15	1
	1 M NaCl + 1 mM bétaine	2	40	52
5	1 M NaCl	2	15	0
	1 M NaCl + 50 mM bétaine	2	82	32
	1 M NaCl + 50 mM choline	2	2	0
	1 M NaCl + 50 mM	2	4	0
	éthanolamine			

bétaine en solution contenant seulement 0.5 M NaCl, et l'halotolérance à 3 M NaCl n'est que faiblement améliorée. La bétaine agit à faible concentration (1 mM), et une plus forte augmentation dans le milieu d'incubation (50 mM) stimule davantage l'halotolérance du transport à 3 M NaCl, mais pas à 4 M NaCl. La choline, l'éthanolamine, analogues structuraux de la bétaine, n'ont aucun effet stimulateur sur l'halotolérance du transport d'AIB, que ce soit à 3 ou 4 M NaCl.

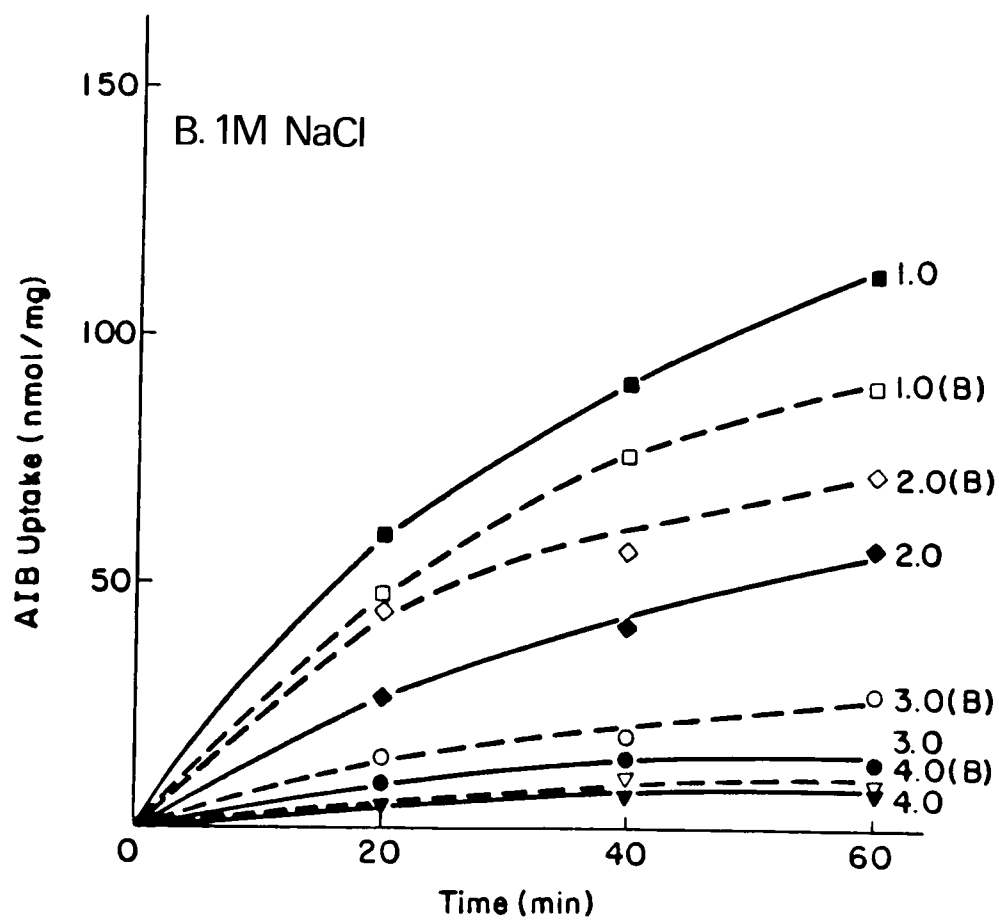
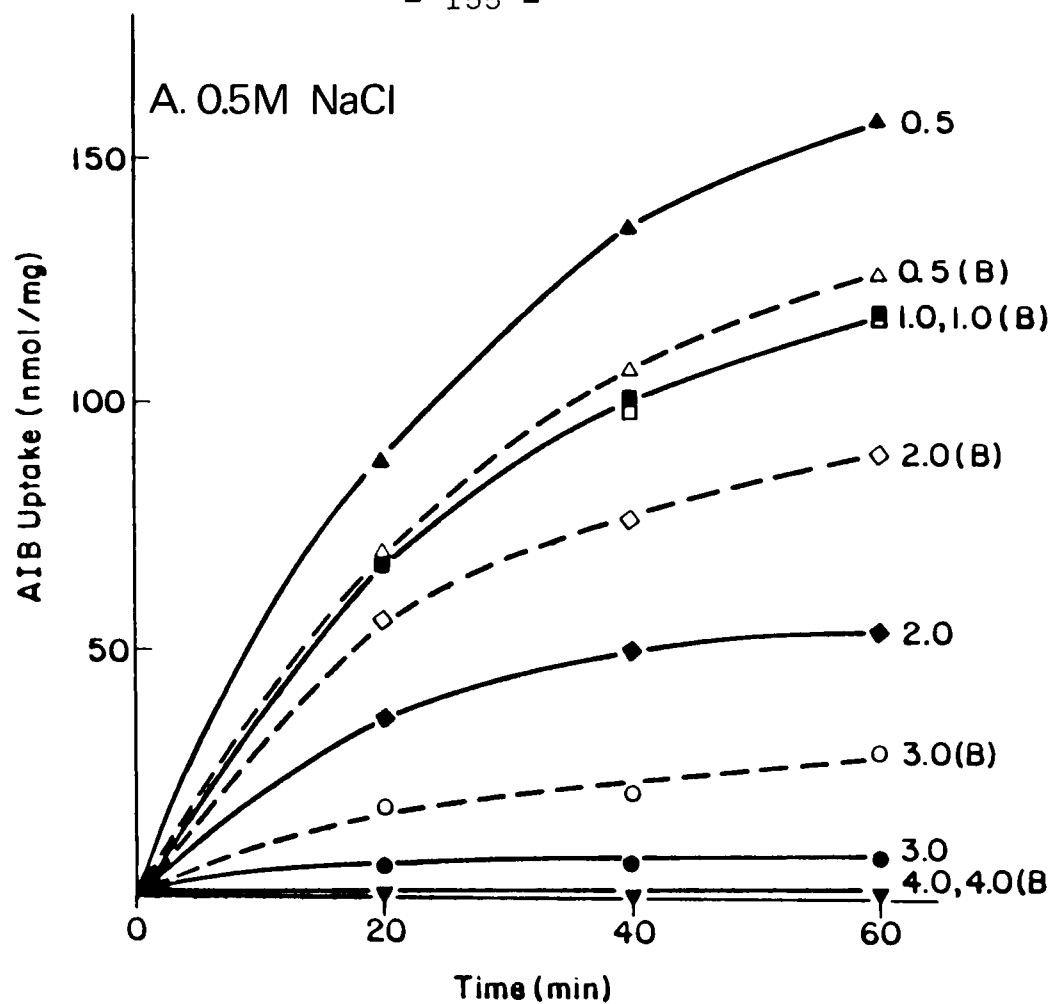
Le transport d'AIB est aussi comparé entre les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl et transférées dans différentes concentrations en NaCl en présence de bétaine (100 mM). La Figure 26 montre que la bétaine a un effet stimulateur sur le transport d'AIB en présence de 2 et 3 M NaCl, mais pas à 4 M NaCl. A plus faibles concentrations de NaCl (0.5 et 1 M), la bétaine a un effet inhibiteur. Aucune différence significative n'est à noter dans l'effet de la bétaine entre les cultures 0.5 et 1 M NaCl.

5. étude de la perte de l'halotolérance du transport d'AIB:

Les expériences précédentes montrent que le système de transport d'AIB des bactéries cultivées à 0.5 M NaCl peut devenir tolérant à 3 et 4 M NaCl sans faire intervenir la synthèse de nouvelle protéine par incubation de 2 ou 4 heures en solution contenant spécifiquement 1 M NaCl et des substrats complexes tels PPT, acides aminés ou extraits de levures, ou des substrats

Figure 26. Effet de la bétaine sur le transport d'AIB en présence de diverses concentrations en NaCl ^a.

^a Les bactéries cultivées et lavées à 0,5 M (A) et 1 M (B) NaCl sont incubées pendant 45 min à 30°C dans 0.5 M ($\triangle$, $\blacktriangle$), 1 M ($\square$, $\blacksquare$), 2 M ($\diamond$, $\blacklozenge$), 3 M ($\circ$, $\bullet$) et 4 M (∇ , $\blacktriangledown$) NaCl en absence ou en présence de bétaine (B) (100 mM). Le (^{14}C)AIB est ensuite ajouté et le transport d'AIB est mesuré en fonction du temps.



particuliers tels glucose + NH_4Cl ou bétaine. Mais si le développement de l'halotolérance du transport d'AIB des bactéries requiert 2 heures d'incubation (ou plus), c'est très rapidement que le système de transport d'AIB des bactéries cultivées à 1 M NaCl devient sensible en présence de 4 M NaCl, puisque 2 lavages des bactéries en solution 0.5 M NaCl ou KCl suffisent. (Tableau 20). Par contre, même après une incubation de 4 heures en solution 0.5 M NaCl, le système de transport d'AIB des bactéries cultivées à 1 M NaCl n'est pas plus sensible en présence de 3 M NaCl que celui des bactéries ayant été incubées en solution 1 M NaCl.

6. relation entre l'halotolérance du transport d'AIB et la pression osmotique interne des bactéries:

Christian et Ingram (1959) ont mis en évidence que *V. costicola* lyse lorsqu'il est transféré en solution aqueuse ne contenant pas de sels minéraux et que la valeur du point de lyse des bactéries dépend de la concentration en NaCl à laquelle elles sont cultivées. Ces observations suggèrent que le point de lyse des bactéries puisse être un indice de leur concentration en solutés internes où, à un faible point de lyse correspondrait une faible pression osmotique interne.

Des expériences sont réalisées pour établir si le développement de la tolérance à 3 et 4 M NaCl du système de transport d'AIB observé chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl et incubées

Essai	Milieu d'incubation	Transport relatif d'AIB ^b	
		3 M NaCl	4 M NaCl
1	1 M NaCl	-	23
	0.5 M NaCl	-	1
	1 M KCl	-	16
	0.5 M KCl	-	1
2	1 M NaCl	26	14
	0.5 M NaCl	33	1

Tableau 20. Effet de diverses solutions sur la perte de la tolérance au sel du transport d'AIB des bactéries cultivées à 1 M NaCl ^a.

^a Dans l'essai 1, les bactéries sont lavées 2 fois en solution saline NaCl ou KCl (0.5 ou 1 M) (pH 7.2) avant d'être transférées dans les solutions salines 1M ou 4 M NaCl (pH 7.2) contenant (¹⁴C)AIB. Le transport d'AIB est mesuré comme Figure 23, après 60 min.

Dans l'essai 2, les bactéries sont lavées 2 fois en solution 1 M NaCl (pH 7.2). Elles sont ensuite incubées pendant 4 h en solution NaCl (0.5 ou 1 M) en présence de chloramphénicol et traitées dans les mêmes conditions que Tableau 19.

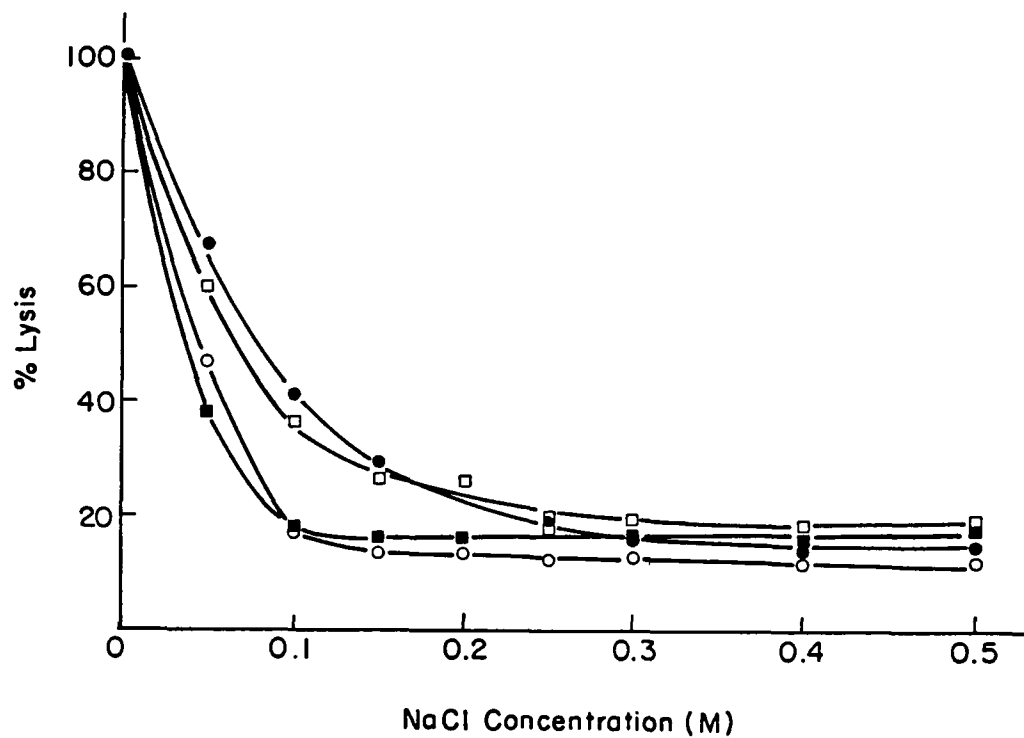
^b L'accumulation à 3 et 4 M NaCl est exprimée en % de celle à 1 M NaCl.

à 1 M NaCl dans des conditions déjà décrites (voir Tableau 19) s'accompagne d'une augmentation de la pression osmotique interne des bactéries, évaluée par une variation dans la valeur du point de lyse des bactéries, et inversement pour les bactéries cultivées à 1 M NaCl dont le transport d'AIB devient sensible aux concentrations de 3 et 4 M NaCl. La Figure 27 montre que les bactéries cultivées en présence de 0.5 M NaCl ont un point de lyse à 0.065 M NaCl alors que celles cultivées à 1 M NaCl commencent à lyser dès 0.13 M NaCl. Lorsque les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl sont incubées pendant 2 heures dans le milieu complexe contenant 1 % PPT + 1 M NaCl, elles lysent à une concentration en NaCl plus élevée (0.105 M NaCl) que celles restées en solution 1 % PPT + 0.5 M NaCl, et inversement, lorsque les bactéries cultivées à 1 M NaCl sont transférées dans le milieu complexe 1 % PPT + 0.5 M NaCl, elles ont un point de lyse plus faible (0.070 M NaCl) que si elles restent dans le milieu 1 % PPT + 1 M NaCl. Par ailleurs, les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl et transférées à 1 M NaCl développent un système de transport d'AIB halotolérant, et le système de transport d'AIB de celles cultivées à 1 M NaCl et transférées à 0.5 M NaCl devient sensible aux fortes concentrations de NaCl (Figure 27).

Ces résultats suggèrent qu'il existe une corrélation entre l'augmentation de la pression osmotique interne des bactéries et le développement d'un système de transport halotolérant. Toutefois, le développement de la tolérance à 3 et 4 M NaCl du système de

Figure 27. Détermination du point de lyse ^a.

- ^a Les bactéries cultivées à 0.5 ou 1 M NaCl sont incubées 2 h en solution saline 0.5 ou 1 M NaCl contenant 1 % PPT et 100 µg/ml chloramphénicol (pH 7.2), et traitées dans les mêmes conditions que Tableau 19. Le point de lyse des bactéries est déterminé par mesure de l'absorption du surnageant des solutions à 260nm. L'accumulation d'AIB à 3 et 4 M NaCl est exprimée en % de celle à 1 M NaCl.



Concentration en NaCl (M)				Transport relatif d'AIB	
	Croissance	Essai	Lyse	3 M NaCl	4 M NaCl
■	0.5	0.5	0.065	24	3
□	0.5	1	0.105	64	24
○	1	0.5	0.070	26	3
●	1	1	0.130	38	20

transport d'AIB par incubation des bactéries en présence de bétaine (1 mM) (Tableau 19, essai 4) ne s'accompagne pas de variations sensibles dans la valeur du point de lyse des bactéries (résultats non montrés).

7. étude microscopique:

Une étude microscopique est réalisée sur les bactéries après leur culture à 0.5 et 1 M NaCl et après leur transfert dans les solutions salines contenant de fortes concentrations en NaCl pour déterminer si l'augmentation de la pression osmotique externe induit des changements morphologiques, par exemple au niveau de la membrane des bactéries.

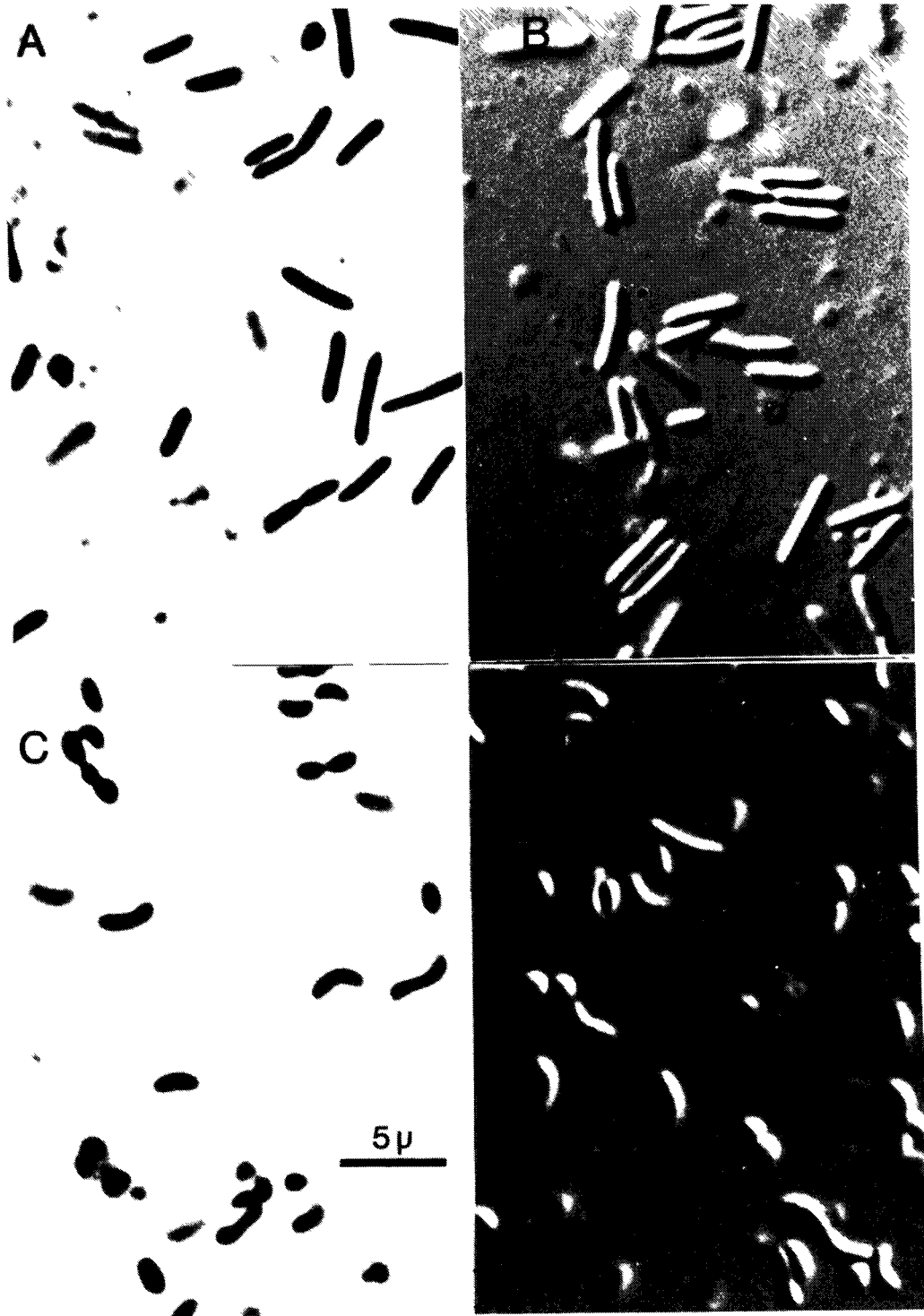
a) morphologie des cultures:

Dans sa concentration en NaCl de croissance optimale (1 M) (Forsyth et Kushner, 1970), *V. costicola* se présente sous forme de petits bacilles aux extrémités arrondies, sans flagelles, en forme de virgules (Figure 28 C,D). Ces bacilles, isolés ou en chaînes ont une taille moyenne de (1.5 à 3) μ x (0.1 à 0.2) μ . Cultivé sur milieu contenant 0.5 M NaCl, *V. costicola* se présente sous forme de bâtonnets aux extrémités arrondies, sans flagelles, mais plus droits et plus longs (Figure 28 A,B). La taille moyenne de ces bacilles est de (2.5 à 3.5) μ x (0.1 à 0.2) μ .

Figure 28. Microscopie optique de *Vibrio costicola* cultivé sur milieu complexe 1 % PPT contenant 0.5 M (A, B) ou 1 M (C, D)

NaCl.

(A et C: Microscopie en contraste de phase; B et D: interférences de Nomarski)



b) observations cytologiques:

L'examen des sections très fines montre que *V. costicola* cultivé à 0.5 M NaCl (Figure 29) et 1 M NaCl (Figure 30) et incubé en solution saline de même concentration en sel que celle de culture a la structure typique des bactéries Gram-négatif (Costerton *et al.*, 1974).

Le transfert des bactéries cultivées à 0.5 M NaCl en solution 1 M NaCl n'induit pas de choc osmotique et les bactéries gardent leur structure intacte (Figure 29). Par contre, l'incubation des bactéries cultivées à 0.5 M et 1 M NaCl dans des solutions salines de 3 et 4 M NaCl induit de remarquables changements morphologiques au niveau de la paroi cellulaire: elle est parfois endommagée, et dans tous les cas elle est décollée de la membrane cytoplasmique, augmentant considérablement l'espace périplasmique. Le cytoplasme garde sa structure granulaire et le nucléoïde fibrillaire est toujours présent au centre de la bactérie.

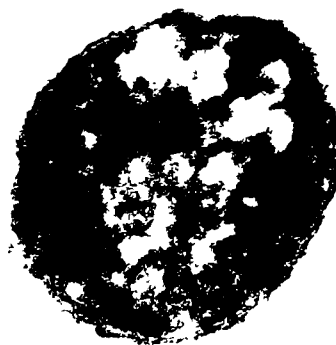
Ces résultats mettent en évidence que les variations de concentration ionique induisent une plasmolyse des bactéries, mais la réponse morphologique des bactéries n'est pas différente entre les cultures à 0.5 et 1 M NaCl.

Figure 29. Micrographie de *Vibrio costicola* cultivé sur milieu complexe contenant 0.5 M NaCl et incubé en solution saline contenant 0.5 M (A), 1 M (B), 3 M (C) ou 4 M (D) NaCl.

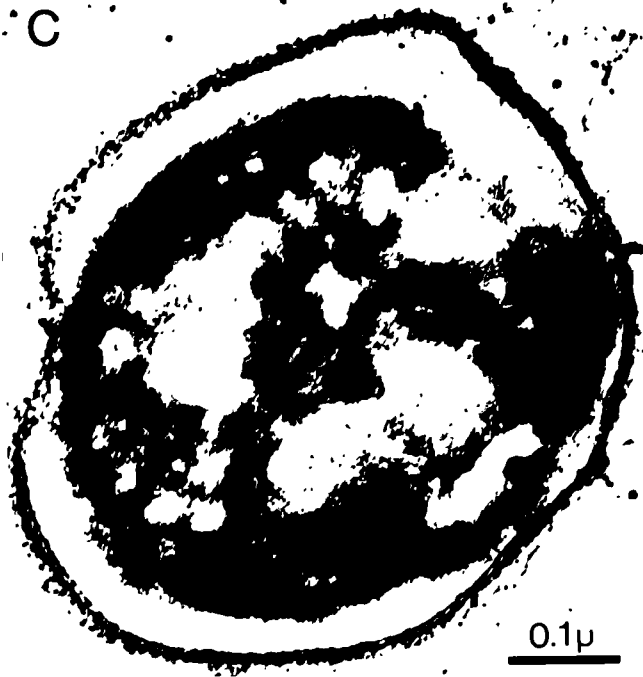
A



B



C



D

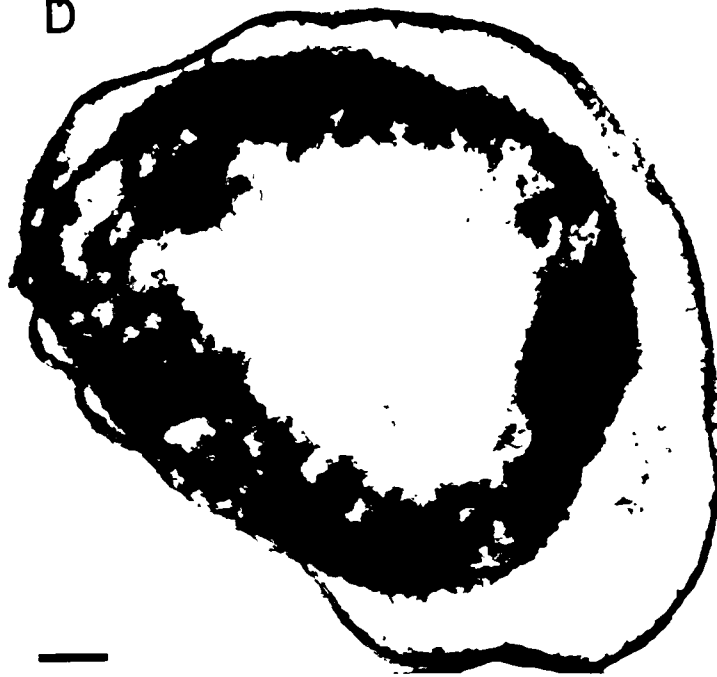
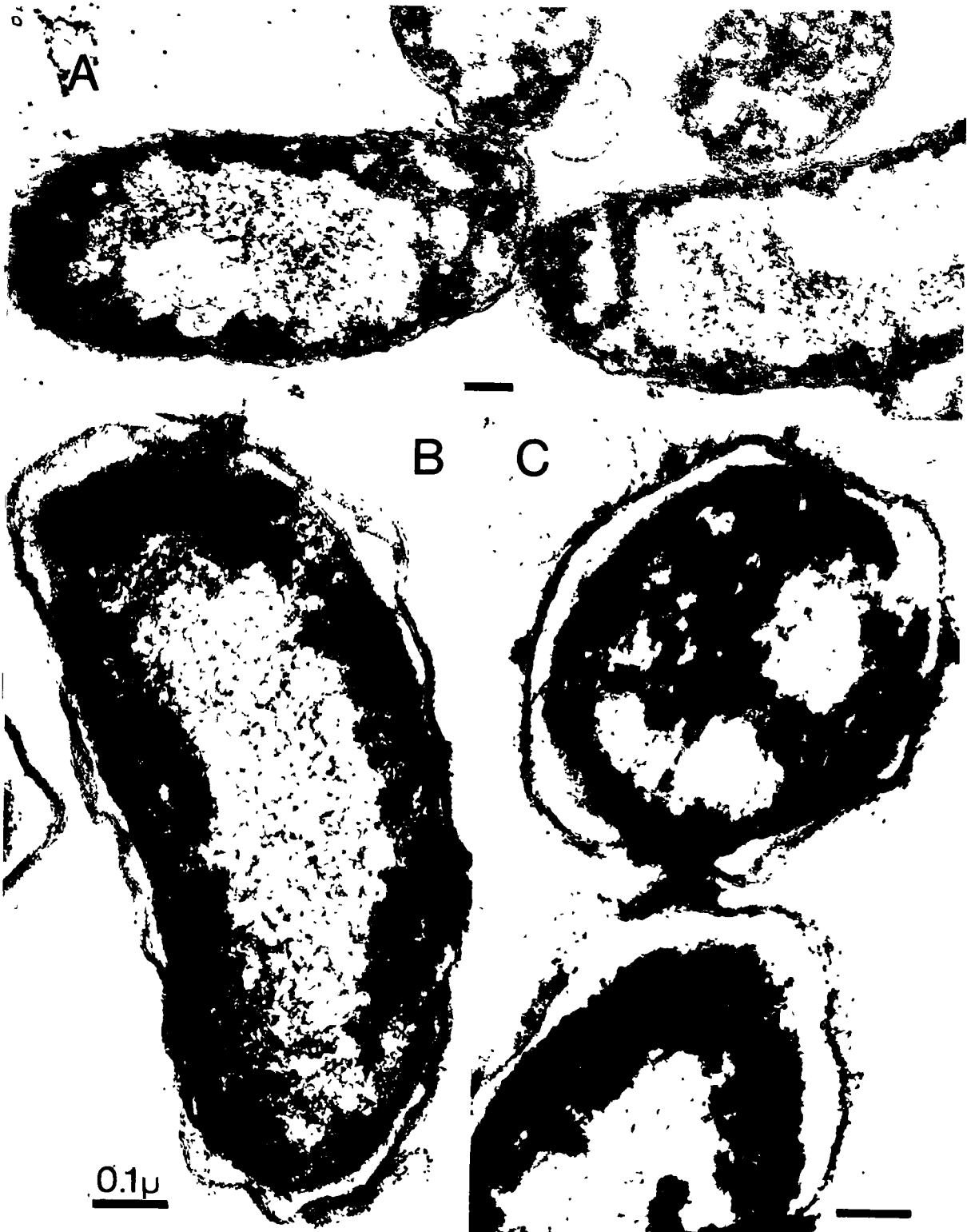


Figure 30. Micrographie de *Vibrio costicola* cultivé sur milieu complexe contenant 1 M NaCl et incubé en solution saline contenant 1 M (A), 3 M (B) ou 4 M (C) NaCl.



8. effet des fortes concentrations en NaCl sur la consommation d'oxygène et la teneur en ATP:

L'activité respiratoire et la teneur en ATP des bactéries en présence de fortes concentrations en NaCl ont également été comparées entre les cultures 0.5 et 1 M NaCl.

La mesure de la consommation d'O₂ révèle que la respiration endogène des bactéries cultivées à 0.5 M NaCl est plus inhibée à 4 M NaCl (87 % d'inhibition par rapport à 1 M NaCl) que celle des bactéries cultivées à 1 M NaCl (73 % d'inhibition) (Tableau 21). De même, les bactéries cultivées à 1 M NaCl gardent une plus grande capacité à oxyder le glucose et le succinate en présence de 4 M NaCl que celles cultivées à 0.5 M NaCl, mais pas le glycérol. Bien que la chaîne respiratoire soit aussi un système enzymatique membranaire, cette différence d'inhibition de l'activité respiratoire entre les cultures 0.5 et 1 M NaCl n'est cependant pas aussi forte que celle observée dans le transport d'AIB où l'accumulation à 4 M NaCl est pratiquement nulle chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl. Une telle différence d'inhibition se retrouve par contre au niveau de la teneur en ATP des cellules puisqu'après 45 min d'incubation en présence de fortes concentrations en NaCl (3 et 4 M), les bactéries ayant été cultivées en présence de 0.5 M NaCl perdent une grande partie de leur ATP, alors que celles ayant été cultivées en présence de 1 M NaCl en possèdent encore plus de 70 % (Tableau 21).

Concentration en NaCl (M)		Consommation d'O ₂ (µg O ₂ /min/mg)				Teneur en ATP (µg/mg)
Croissance	Essai	Endogène	Glucose	Succinate	Glycérol	
0.5	0.5	1.14±0.14	1.66±0.03	4.44±0.13	2.60±0.22	7.58
	1.0	0.78±0.09	1.14±0.01	3.82±0.07	2.24±0.09	9.05
	3.0	0.17±0.02	0.13±0.01	0.17±0.02	0.54±0.11	3.22
	4.0	0.10±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	0.31±0.05	0
1.0	1.0	0.74±0.02	1.04±0.04	3.74±0.15	1.46±0.07	10.06
	3.0	0.34±0.02	0.40±0.03	0.74±0.08	0.60±0.03	7.65
	4.0	0.20±0.02	0.26±0.03	0.26±0.03	0.44±0.05	7.51

Tableau 21. Effet des fortes concentrations en NaCl sur la consommation d'oxygène et la teneur en ATP des bactéries ^a.

^a Les bactéries cultivées à 0.5 ou 1 M NaCl sont transférées en solution saline contenant 0.5, 1, 3, ou 4 M NaCl (pH 7.2). C'est le taux initial de la respiration endogène et de l'oxydation des substrats (20 mM) qui est mesuré. Les résultats sont la moyenne de 2 expériences indépendantes ± déviation standard de la moyenne.
L'ATP est extrait après 45 min d'incubation à 30°C.

4. Discussion

Vibrio costicola est une bactérie halophile modérée qui requiert une concentration de 1 M NaCl pour une culture optimale (Forsyth et Kushner, 1970), et lyse en solution aqueuse (Christian et Ingram, 1959). La lyse peut être évitée en absence de NaCl en incubant les bactéries dans d'autres solutions salines contenant 1 M KCl, LiCl ou NH_4Cl . Les bactéries peuvent aussi continuer à respirer (respiration endogène et oxydation d'éthanol) dans ces solutions et même synthétiser de l'ATP en solution 1 M KCl en présence d'éthanol, suggérant que ni la chaîne respiratoire, ni l'ATPase de *V. costicola* ne requièrent les ions Na^+ pour leur activité. Par contre, au moins 3 fonctions dépendent spécifiquement des ions Na^+ . Ce sont:

- (1) l'accumulation d'AIB et le maintien d'AIB à l'intérieur des cellules;
- (2) la formation et le maintien de $\Delta\psi$;
- (3) la régulation du pH interne en milieu alcalin par l'activité d'un antiport Na^+/H^+ .

Les ions Li^+ ne peuvent pas substituer les ions Na^+ à ces fonctions et sont même inhibiteurs de $\Delta\psi$ et du transport d'AIB. Toutes ces activités Na^+ -dépendantes, inactives en présence de KCl (1 M) peuvent être restaurées par transfert des bactéries dans une solution contenant 1 M NaCl, à un taux d'activité pratiquement identique à celui des bactéries restées en solution 1 M NaCl en ce qui concerne $\Delta\psi$ et le transport d'AIB, indiquant que

l'intégrité de la membrane est préservée en solution 1 M KCl.

Plusieurs lignes d'évidence montrent que le transport d'AIB de *V. costicola* est en étroite relation avec l'activité de la chaîne respiratoire, sous la dépendance énergétique de $\Delta\psi$:

- * le système de transport d'AIB et la chaîne respiratoire ont une activité optimale à pH 8.5-9.0, et $\Delta\psi$ a aussi sa plus grande valeur à pH alcalin (pH 9.0);

- * le transport d'AIB et $\Delta\psi$ présentent des réponses identiques à l'environnement ionique et à la présence d'inhibiteurs;

- * des variations dans l'amplitude de $\Delta\psi$ mesurées par la distribution de TPMP⁺ résultent en des changements correspondants dans le transport d'AIB.

La force protomotrice de *V. costicola* est mesurée en fonction du pH extérieur. A un pHo de 7.5, le potentiel chimique (60. Δ pH) disparaît, laissant $\Delta\psi$ (intérieur négatif) comme seule composante de Δp . Au-delà de pH 7.5, le gradient de pH est inversé (intérieur acide). Sous ces conditions (pH 8.5-8.8), $\Delta\psi$ est dissipé par les inhibiteurs de la respiration NEM et KCN, et par les protonophores TCS et CCCP. La sensibilité de $\Delta\psi$ à ces réactifs montre l'importance de l'efflux de protons par la respiration pour établir $\Delta\psi$.

Cet efflux de protons lié à la respiration a aussi été directement démontré par une acidification du milieu extérieur quand des bactéries gardées en solution anaérobie (1 M KCl) reçoivent une injection d'oxygène. Les résultats présentés furent obtenus à pH 7.5 où il n'y a pas de gradient de pH à travers la membrane avant la pulsion respiratoire. Des résultats similaires furent obtenus à pH alcalin (8.8). L'efflux de protons en réponse à l'activité respiratoire est inhibé par les ionophores TCS et CCCP aussi bien à pH 7.5 que 8.8. Cette inhibition n'est pas due à une inhibition de la respiration (voir Tableau 10, p 114), mais elle résulte de la réabsorption immédiate des protons après leur expulsion par la chaîne respiratoire activée par l'injection d'oxygène aux bactéries anaérobies. La monensine favorise aussi cette réabsorption de protons à pH 7.5, indiquant que chez *V. costicola*, elle puisse, comme les découplants, abolir le net efflux de protons en réponse à une injection d'oxygène et donc dissiper $\Delta\psi$ (Tableau 10, p 114).

L'intervention d'une source d'énergie additionnelle à $\Delta\psi$ pour le transport d'AIB de *V. costicola* est suggérée par le fait que des donneurs d'électrons et de faibles concentrations de DCCD stimulent le taux respiratoire et augmentent le transport d'AIB sans changer l'amplitude de $\Delta\psi$. Mais alors que l'addition d'alcools induit simultanément une synthèse d'ATP (Tableau 9, p 111), une diminution du taux d'ATP peut être observée en présence de faibles concentrations de DCCD (Figure 14, p 113), indiquant que l'ATP n'est pas la source d'énergie additionnelle intervenant dans le

transport d'AIB.

L'étude du transport d'AIB en réponse à des sources d'énergie induites artificiellement indique que la source d'énergie additionnelle est le potentiel chimique de Na^+ . Peu de transport d'AIB a lieu en réponse au gradient de Na^+ seul, mais le transport observé avec $\Delta\psi$ comme source d'énergie est augmenté par la présence supplémentaire du gradient de Na^+ (Figure 16, p 119). Que le gradient de protons ne soit pas impliqué dans l'accumulation d'AIB est aussi démontré par ces expériences: en effet, un changement de pH de 7.0 à 9.0 génère un gradient de pH transmembranaire, intérieur acide, qui devrait favoriser davantage l'exclusion de l'AIB plutôt que son accumulation.

L'antiport Na^+/H^+ identifié chez *V. costicola* peut convertir la force protomotrice établie par l'efflux de H^+ lié à la respiration en un gradient de Na^+ . Une telle interconversion de gradients électrochimiques par l'activité de l'antiport Na^+/H^+ a été montrée dans plusieurs microorganismes, dont *Halobacterium halobium* (Luisi *et al.*, 1980) et *Escherichia coli* (Beck et Rosen, 1979). Il a par ailleurs été démontré auparavant que *V. costicola* maintient une concentration cytoplasmique en K^+ supérieure à celle du milieu et une concentration cytoplasmique en Na^+ inférieure à celle du milieu (Christian et Waltho, 1962; Shindler *et al.*, 1977). En l'absence d'un ΔpH (intérieur alcalin),

l'énergie nécessaire à l'activité de l'antiport Na^+/H^+ est vraisemblablement $\Delta\psi$ (intérieur négatif) où la stoechiométrie de l'influx de H^+ par rapport à l'efflux de Na^+ doit être supérieure à 1. Un antiport électrogénique fonctionnant à pHo alcalins a été détecté dans des vésicules de *E. coli* (Schuldiner et Fishkes, 1978) et *H. halobium* (Lanyi et MacDonald, 1976).

La stimulation de l'activité respiratoire en réponse à une addition d'alcools peut être expliquée par une augmentation de la formation de NADH et de son oxydation. Par contre, chez la plupart des organismes, le DCCD ne stimule pas l'activité respiratoire (Linnett et Beechey, 1979). La stimulation de la respiration observée chez *V. costicola* en présence de faibles concentrations de DCCD suggère l'existence d'un contrôle de l'activité respiratoire par la concentration en ATP, ADP et P_i , comme chez *Paracoccus denitrificans* et les mitochondries (Erecinska et Wilson, 1982). Toutefois, aucune étude n'a encore été entreprise sur ce sujet chez *V. costicola*, et cette explication reste purement hypothétique.

Une augmentation du taux respiratoire, donc de l'efflux de protons, est supposée augmenter l'activité de l'antiport Na^+/H^+ , pour maintenir un pH cytoplasmique relativement constant, résultant en une augmentation du gradient de Na^+ . Cette augmentation du gradient de Na^+ peut être l'explication de la stimulation du

transport d'AIB en présence d'alcools et de DCCD ($\leq 40 \mu\text{M}$).

Chez *V. costicola*, une augmentation du taux respiratoire due à l'addition d'alcools ne s'accompagne jamais d'une augmentation de $\Delta\psi$. Ces résultats suggèrent que les bactéries maintiennent $\Delta\psi$ à sa plus grande valeur même dans des conditions de respiration endogène et que les protons additionnels expulsés par une stimulation de la chaîne respiratoire sont réincorporés soit par l'ATPase, soit par diffusion passive ou sont échangés de manière électroneutre par l'antiport Na^+/H^+ . Une synthèse d'ATP peut être observée lorsque les bactéries sont incubées en présence d'alcools. Un exemple d'échange électroneutre serait une stoechiométrie de l'efflux de 2 H^+ par la chaîne respiratoire couplé à un échange électrogénique de 3 H^+/Na^+ par l'antiport. En fait, même si cette stoechiométrie est hypothétique, il existe des conditions où le net flux de H^+ est une accumulation, puisque une alcalinisation du milieu peut être observée à la suite de l'injection d'une pulsion d'oxygène à une suspension anaérobie de bactéries en solution 1 M NaCl (pH 8.8) (résultats non montrés). Toutefois, la stoechiométrie de ces échanges doit être différente dans des conditions où $\Delta\psi$ est faible, puisqu'en général un efflux de protons couplé à un antiport cation/proton permet la formation de $\Delta\psi$ quand le pHo est plus alcalin que le pH cytoplasmique. Un tel mécanisme a été démontré chez *Bacillus alcalophilus* (Mandel *et al*, 1980), et proposé chez certaines

bactéries méthanogènes (Jarrell et Sprott, 1981), bactéries nitrifiantes (Kumar et Nicholas, 1983), et autres (Padan *et al.*, 1981).

Le transport d'AIB par un symport AIB/Na⁺ expliquerait l'influence du gradient chimique de Na⁺. Pour essayer de démontrer un cotransport AIB/Na⁺ chez *V. costicola*, les bactéries furent placées en conditions aérobiques dans un milieu contenant 0.9 M KCl + ²²Na⁺ (0.1 M, 1.6 µCi/mmol), et incubées 45 min à 30°C. Dès que l'AIB non radioactif (100 µM) fut ajouté à la suspension bactérienne, l'incorporation de ²²Na⁺ fut mesurée dans un intervalle de temps compris entre 0.5 et 10 min. Aucune accumulation significative de ²²Na⁺ ne fut cependant obtenue. Cet échec peut être dû à la concentration externe en Na⁺ trop élevée, résultant en une trop faible activité spécifique du ²²Na⁺. Stock et Roseman (1971) mirent en évidence un cotransport TNG/Na⁺ chez *Salmonella typhimurium* par la même technique de filtration, mais en utilisant une concentration externe en Na⁺ de 2 mM (Activité spécifique 0.1 µCi/µmol). Toutefois, l'étude cinétique du transport d'AIB chez *V. costicola* suggère que la concentration en Na⁺ de 100 mM utilisée soit nécessaire pour avoir une accumulation substantielle d'AIB. D'autre part, les bactéries établissent un gradient de Na⁺ à travers la membrane cytoplasmique par l'activité de l'antiport Na⁺/H⁺ en présence de 1 M NaCl, et il est vraisemblable que même en présence de

100 mM NaCl, l'antiport Na^+/H^+ expulse les ions Na^+ dès leur cotransport avec l'AIB.

Que l'AIB ne soit pas accumulé par les bactéries ou qu'il ne soit pas maintenu à l'intérieur des cellules en l'absence de Na^+ pourrait être simplement la conséquence de ce que le potentiel de membrane, source d'énergie du transport, requiert lui-même les ions Na^+ pour sa formation et son maintien. Cependant des études cinétiques révèlent que les ions Na^+ interviennent aussi au niveau de la protéine de transport et 2 effets peuvent être distingués:

* A faible concentration ($50 \text{ mM} < [\text{Na}^+] < 200 \text{ mM}$), les ions Na^+ jouent un rôle de cofacteur, augmentant l'affinité apparente de la protéine de transport pour l'AIB sans affecter la vitesse maximale V_{max} . Cette propriété est commune à de nombreux systèmes de transports dépendants de Na^+ , bien que pour certains, les ions Na^+ n'aient pas d'effet sur l'affinité de la protéine de transport pour le substrat (voir Tableau 7, p 65).

* En présence de plus fortes concentrations de Na^+ ($0.2 \text{ M} < [\text{Na}^+] < 1 \text{ M}$), l'affinité de la protéine de transport pour l'AIB reste constante, mais la V_{max} double. Cet effet sur la V_{max} peut être expliqué par une augmentation de $\Delta\psi$, dont la formation et le maintien dépendent de la concentration en ions Na^+ .

Un tel double effet des ions Na^+ sur le système de transport

d'AIB a été mis en évidence chez *Alteromonas haloplanktis* (Wong *et al.*, 1969). Les résultats obtenus dans le transport d'AIB de *V. costicola* en réponse à des sources d'énergie artificielles montrant que le transport d'AIB puisse dépendre de $\Delta\psi$ sans l'intervention du gradient de Na^+ suggèrent que l'AIB et les ions Na^+ forment un complexe ternaire (protéine, AIB, Na^+) avec la protéine de transport, comme chez *A. haloplanktis* (Sprott *et al.*, 1975), et que l'AIB et les ions Na^+ sont cotransportés comme complexe chargé positivement en réponse à $\Delta\psi$ (intérieur négatif) (Figure 31).

De plus, en développant $\Delta\psi$, les bactéries peuvent expulser les ions H^+ à l'extérieur de la cellule et établir un gradient de Na^+ par l'activité de l'antiport Na^+/H^+ . Bien qu'aucun transport d'AIB ne puisse être observé en réponse à la seule application du gradient de Na^+ comme source d'énergie, le rôle de ce gradient ne peut pas être négligé puisque sa présence aux côtés de $\Delta\psi$ stimule le taux d'accumulation d'AIB. Ces résultats suggèrent que de l'énergie additionnelle est formée par le gradient électrochimique de Na^+ et qu'elle contribue au transport du complexe Na^+/AIB , mais qu'elle est insuffisante à elle seule pour diriger le transport d'AIB. Chez *E. coli*, Cohn et Kaback (1980) ont suggéré que le gradient de Na^+ augmente l'affinité de la protéine pour le TMG sur la face externe de la membrane et que $\Delta\psi$ (intérieur négatif) facilite la translocation du complexe ternaire chargé positivement vers l'intérieur;

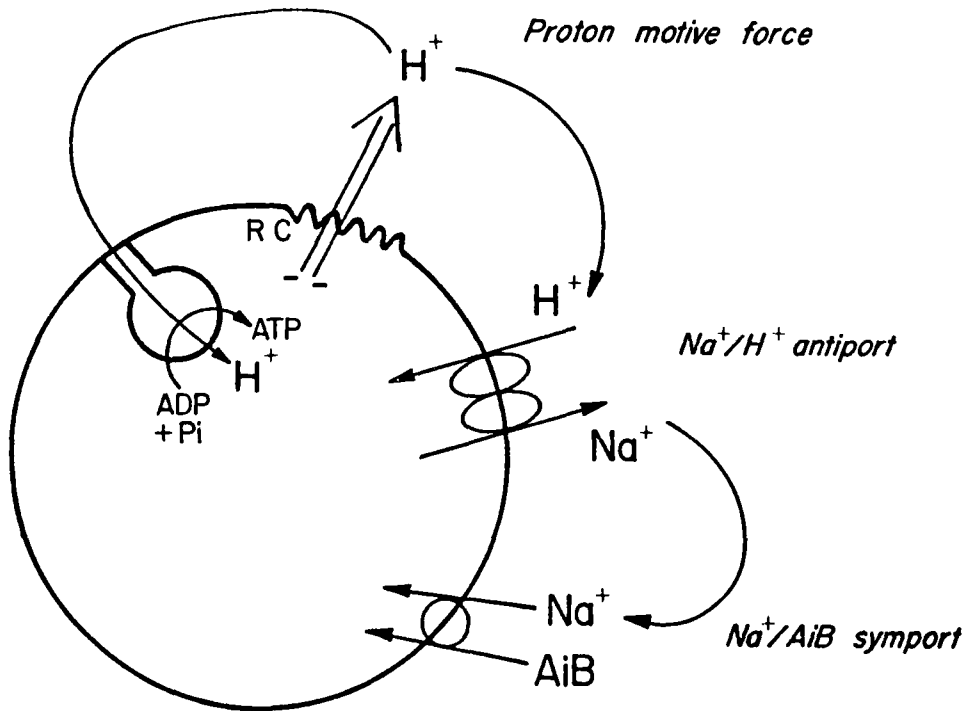


Figure 31. Modèle pour le transport d'AIB chez *V. costicola* ^a.

- ^a. La chaîne respiratoire éjecte des protons créant une force protomotrice constituée uniquement de $\Delta\psi$ en pH alcalin. Les protons sont réabsorbés soit par le complexe ATPase et permettent la synthèse d'ATP, soit par l'antiport Na^+/H^+ . L'AIB est transporté probablement par un symport avec les ions Na^+ , en réponse à $\Delta\psi$ (intérieur négatif) et au gradient de Na^+ .

et chez *Chromatium vinosum*, 2 sites distincts de fixation des ions Na^+ ont été proposés: l'un de faible affinité qui affecte l'affinité apparente de la protéine pour l'AIB et requiert un gradient de Na^+ pour être effectif, et l'autre de forte affinité qui fixe les ions Na^+ devant être cotransportés avec l'AIB (Pettitt *et al.*, 1982).

Des études sur les membranes intactes et les protéines solubilisées suggèrent que les substrats traversent les membranes au travers de canaux localisés à l'intérieur de protéines intégrales, généralement dimériques (Klingenberg, 1981). Des études génétiques supportent l'hypothèse de la composition des protéines en sous-unités. Ainsi, il a été mis en évidence qu'une seule mutation sur le chromosome de *E. coli* (Zilberstein *et al.*, 1982 a, b) et de *Bacillus alcalophilus* (Guffanti *et al.*, 1981) affecte tous les systèmes dépendants d'un gradient de Na^+ , suggérant que ces systèmes de transport comportent une sous-unité responsable de la translocation de Na^+ qui est codée par le même locus et qui est commune à tous les systèmes et une autre sous-unité transportant les substrats spécifiques qui est codée par différents gènes et qui est individuelle à chaque système. Cette hypothèse qui avait été proposée par Hong (1977) à propos des systèmes substrats/ H^+ chez *E. coli* devrait être aussi considérée chez *V. costicola* si d'autres systèmes de transport dépendants de Na^+ sont identifiés chez cette bactérie.

Les paramètres cinétiques du transport d'AIB de *V. costicola* sont $K_t = 20 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 41 \text{ nmol/mg poids sec}$, lorsque les bactéries sont cultivées à 1M NaCl. L'étude du transport d'AIB en présence d'autres acides aminés non radioactifs montrent que l'accumulation d'AIB est inhibée en présence de L-alanine, glycine ou L-méthionine. Bien que des études cinétiques soient nécessaires pour mieux établir la compétitivité de ces acides aminés avec l'AIB, le système de transport emprunté par l'AIB chez *V. costicola* ressemble au système de transport de l'AIB trouvé chez la bactérie marine *Alteromonas haloplanktis* (Fein et MacLeod, 1975). Chez d'autres bactéries dont *Streptococcus pyogenes* (Reizer et Panos, 1982), une espèce de *Bacillus* alcalophile (Kitada et Horikoshi, 1977), ou encore *Chromatium vinosum* (Pettitt *et al.*, 1982), ainsi que chez certaines cellules animales (voir revues Eddy, 1981; Kilberg, 1982), il a aussi été mis en évidence que l'AIB est accumulé par le système de transport de la L-alanine. Jusqu'à présent, la purification des protéines d'origine bactérienne impliquées dans le transport d'alanine n'a été abordée que sur la bactérie thermophile PS3 (Hirata *et al.*, 1977), et *Bacillus subtilis* (Kusaka et Kanai, 1978) et que ce soit du point de vue de leur fonctionnement ou de leur structure, peu d'informations sont actuellement connues sur ces protéines de transport.

En plus de son rôle dans le couplage de l'énergie, une autre fonction possible pour l'antiport Na^+/H^+ est la régulation du pH intracellulaire (Padan *et al.*, 1981; Booth et Kroll, 1983). Les résultats montrent que *V. costicola* placé en milieu alcalin, en conditions aérobiques ou anaérobiques, maintient un pH intérieur plus près de la neutralité en présence de Na^+ qu'en son absence. Non sans relation avec la présence de cet antiport, les bactéries présentent une bonne capacité à se développer en milieu alcalin. D'après la classification de Padan *et al.* (1981), *V. costicola* est une bactérie neutrophile puisqu'elle se développe sur une échelle de pH variant entre 5.5 et 9.0. Son optimum est compris entre 6.5 et 9.0, au cours duquel le pH_i varie de 7.25 à 7.9. $\Delta\Psi$ augmente considérablement sur cette échelle de pH. En couplant l'activité de l'antiport Na^+/H^+ à $\Delta\Psi$, l'organisme est capable de bien s'adapter en pH alcalin malgré un ΔpH inversé (intérieur acide). Récemment, par l'utilisation de mutants, Zilberstein *et al.* (1982 a,b) ont clairement mis en évidence le rôle de l'antiport Na^+/H^+ dans l'aptitude de *E. coli* à se développer en milieu alcalin.

L'antiport Na^+/H^+ n'est cependant qu'un élément contribuant à la régulation du pH cytoplasmique. Un antiport K^+/H^+ a aussi été impliqué chez *E. coli* (Plack et Rosen, 1980), mais le mécanisme de régulation du pH_i reste jusqu'à présent inconnu, et en particulier le rôle d'anions (HCO_3^- , Cl^-) dans la régulation reste encore inexploré (voir Raven et Smith, 1982; Booth et Kroll, 1983).

Tout récemment, Tokuda et Unemoto (1983) ont observé que *V. costicola* (NCMB 701) peut se développer sur milieu complexe à pH alcalin en présence de CCCP et qu'un flux d'oxygène dans une suspension de bactéries anaérobiques en solution 1 M NaCl (pH 8.5) provoque une alcalinisation du milieu en présence de CCCP mais une acidification en présence de TPP^+ et en absence de CCCP. Ces résultats leur suggérèrent que les bactéries éjectent des ions H^+ par la chaîne respiratoire, mais qu'elles peuvent aussi éjecter des ions Na^+ à pH alcalin en l'absence de circulation de H^+ .

V. costicola NRCC 37001 semble par contre nécessiter la circulation de H^+ pour survivre, puisque les découplants CCCP et TCS ont un effet inhibiteur sur $\Delta\psi$ et le transport d'AIB à pH 8.8 (Tableau 10, p.114). Toutefois, des expériences complémentaires furent réalisées pour étudier davantage l'effet du CCCP et TCS sur la physiologie de cette bactérie:

A pH alcalin, *V. costicola* NRCC 37001 se développe sur milieu complexe 1% PPT + 1 M NaCl avec un temps de génération de 1.36 h. L'addition de CCCP (5 μM) à ce milieu de culture ne perturbe pas la croissance des bactéries, mais le temps de génération augmente à 1.8 h en présence de 20 μM CCCP et les bactéries ne se développent pas en présence de 50 μM CCCP. Lorsque le TCS (5, 20 ou 50 μM) est utilisé à la place du CCCP, aucune croissance n'a lieu. Il est maintenant bien établi que le CCCP puisse réagir avec les groupements sulfhydryls (Kaback *et al.*, 1974; Jarrell et Sprott,

1983 b). La formation de liaisons du CCCP avec certains composants du milieu complexe pourrait être la cause de la croissance des bactéries en présence de 5 ou 20 μM CCCP. En fait, lorsque les bactéries sont placées dans un milieu de culture synthétique (pH 8.5) avec 5 μM CCCP, elles ne se développent pas du tout (Résultats non montrés).

Lorsque les bactéries sont placées en solution anaérobie (comme décrit Figure 20) en présence de 1 M NaCl, l'injection d'oxygène provoque une acidification du milieu, à pH 6.5; mais une alcalinisation à pH 8.7. En présence de CCCP ou TCS, aucune acidification du milieu n'a lieu à pH 6.5, mais une faible alcalinisation du milieu peut encore être détectée à pH 8.7 (Résultats non montrés).

Une méthode plus directe pour déterminer sans équivoque si *V. costicola* NRCC 37001 possède une pompe à Na^+ primaire serait d'éliminer l'activité de l'antiport Na^+/H^+ , soit par l'action d'un inhibiteur spécifique, soit par mutation. L'amiloride et dérivés ont récemment été identifiés comme inhibiteurs du système d'échange Na^+/H^+ chez les cellules eucaryotes (Vigne *et al.*, 1983), mais aucun inhibiteur n'est jusqu'à présent connu pour inhiber l'antiport Na^+/H^+ chez les procaryotes. Par contre, des mutants défectifs dans l'activité de l'antiport Na^+/H^+ de *E. coli* (Zilberstein *et al.*, 1980) et de *Bacillus alcalophilus* (Krulwich *et al.*, 1979) ont déjà été isolés.

Le système de transport d'AIB de *V. costicola* est un système très halotolérant, dont l'halotolérance dépend de la concentration en NaCl du milieu de culture des bactéries. Ainsi, les bactéries cultivées en présence de 1 M NaCl peuvent bien transporter l'AIB en présence de 3 M et même 4 M NaCl (= "bactéries tolérantes"), alors que celles cultivées sur le même milieu complexe mais en présence de 0.5 M NaCl sont sensibles à 3 M NaCl et ne transportent presque plus d'AIB à 4 M NaCl (= "bactéries sensibles"). Ces différents effets des fortes concentrations en NaCl sur le transport d'AIB furent initialement mis en évidence à pH 7.2. La même différence d'halotolérance du transport d'AIB entre les bactéries cultivées à 0.5 M et celles cultivées à 1 M NaCl peut être observée à pH 8.75, pH optimal de l'accumulation de l'AIB lorsque le transport est mesuré à la même concentration en NaCl que celle du milieu de culture des bactéries (0.5 ou 1 M).

Les paramètres cinétiques du transport d'AIB sont du même ordre de grandeur chez les bactéries cultivées à 0.5 M et chez celles cultivées à 1 M NaCl ($K_t = 8 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 14 \text{ nmol/min/mg poids sec}$ chez les bactéries sensibles; $K_t = 20 \mu\text{M}$ et $V_{\text{max}} = 41 \text{ nmol/min/mg poids sec}$ chez les bactéries tolérantes). Par contre, bien que le paramètre K_t reste constant, la V_{max} du transport d'AIB des bactéries cultivées à 1 M NaCl en présence de 3 M NaCl est fortement diminuée. Ces résultats suggèrent que la différence d'halotolérance du transport d'AIB entre les bactéries sensibles

et tolérantes ne réside pas dans une différence de l'affinité de la protéine de transport pour l'AIB pendant la culture des bactéries à 0.5 et 1 M NaCl, et que les fortes concentrations en NaCl ne diminuent pas le transport d'AIB en modifiant l'affinité de la protéine de transport pour son substrat.

V. costicola acquiert le phénotype d'halotolérance au cours de sa culture dans un milieu contenant 1 M NaCl, mais cette halotolérance peut être développée chez les bactéries cultivées à 0.5 M NaCl en les incubant dans le milieu complexe contenant 1 M NaCl, même en présence de chloramphénicol, un inhibiteur de la synthèse des protéines, suggérant que ces bactéries sensibles possèdent les protéines nécessaires pour devenir tolérantes aux fortes concentrations en NaCl.

La recherche du développement de l'halotolérance des bactéries sensibles, mis en évidence par la capacité des bactéries à transporter l'AIB à 3 ou 4 M NaCl, révèle que la présence de 1 M NaCl dans le milieu d'incubation (contenant aussi 0.1 M glucose et 0.2 M NH_4Cl) est capitale, puisqu'au bout de 4.5 h, ces bactéries peuvent accumuler de l'AIB en présence de 4 M NaCl, alors que celles ayant été incubées dans le même milieu synthétique mais en présence de 1 M KCl restent inhibées. Ce manque d'adaptation des bactéries incubées en solution 1 M KCl peut être expliqué en considérant que *V. costicola* ne peut ni maintenir,

ni développer $\Delta\Psi$ en absence des ions Na^+ et suggèrent que le développement de l'halotolérance requiert cette forme d'énergie.

Les conditions dans lesquelles *V. costicola* développe ou perd le phénotype d'halotolérance à 3 ou 4 M NaCl peuvent être résumées de la façon suivante:

* Une simple incubation en solution saline contenant 1 M NaCl suffit aux bactéries sensibles pour qu'elles deviennent résistantes à 3 M NaCl. D'autre part, les bactéries cultivées à 1 M NaCl et incubées en solution 0.5 M NaCl ne perdent cette résistance à 3 M NaCl.

* L'addition d'un mélange nutritif complexe (PPT, acides aminés, extraits de levure), ou de substances particulières (bétaine) au milieu d'incubation 1 M NaCl est nécessaire aux bactéries sensibles pour qu'elles développent une tolérance à 4 M NaCl. Par ailleurs, les bactéries cultivées à 1 M NaCl perdent cette halotolérance à 4 M NaCl par simple lavage en solution 0.5 M NaCl.

Les variations du point de lyse des bactéries en fonction de la concentration en NaCl de leur milieu de culture (Christian et Ingram, 1959; Figure 27, p 159) suggèrent que *V. costicola* accumule certaines substances qui, restant libres dans le cytoplasme, augmentent sa pression osmotique interne et le rendent moins susceptibles aux fortes concentrations en NaCl. Shindler *et al.* (1977) ont trouvé que les concentrations intracellulaires de

V. costicola en Na^+ et K^+ augmentent lorsque la concentration en NaCl du milieu augmente, mais actuellement aucune information n'indique si ces ions restent libres dans le cytoplasme et jouent le rôle de soluté compatible défini par Brown (1976) comme ils le font chez les bactéries halophiles extrêmes (Lanyi, 1974).

Il a été démontré chez plusieurs bactéries, dont *Vibrio alginolyticus* (Unemoto et Hayashi, 1979) et *Halomonas elongata* (Vreeland *et al.*, 1983) que leur concentration en acides aminés libres (en particulier glutamate et proline) augmente quand la concentration en NaCl de leur milieu de culture augmente (voir Tableau 4, p 19). De nombreuses plantes halophytes et non halophytes utilisent aussi la proline comme soluté compatible (Jefferies, 1980; Wyn Jones, 1980). La détermination de la composition en acides aminés cytoplasmiques en fonction de la concentration en NaCl du milieu de culture pourrait apporter des informations essentielles dans l'élucidation du mécanisme d'adaptation au sel de *V. costicola*. L'utilisation d'un milieu de culture défini, ne contenant pas d'acides aminés (par exemple le milieu SGP+ glucose, p 81) éviterait en outre l'ambiguïté de savoir si les acides aminés accumulés résultent de leur transport ou de leur biosynthèse.

Il a aussi été suggéré que certaines molécules, telle la proline ou la bétaine, puissent stabiliser les groupements hydrophobes des biopolymères (Schobert, 1977). *V. costicola* ne peut pas utiliser la bétaine comme seule source de carbone et d'azote,

mais les bactéries sensibles peuvent devenir halotolérantes en présence de faible concentration de bétaine (1 mM). Shkedy-Vinkler et Avi-Dor (1975) ont montré que la bétaine peut stimuler la respiration du succinate et d'autres substances chez la bactérie halophile Ba 1 en présence de fortes concentrations en sel et proposé qu'elle agisse en désensibilisant la chaîne respiratoire à l'effet de l'hyperosmolarité. Le rôle joué par la bétaine comme soluté compatible, bien établi chez les plantes (Wyn Jones, 1980; Jefferies, 1980), devient de plus en plus connu chez les bactéries, (Le Rudulier et Bouillard, 1983; Galinski et Trüper, 1982), mais son mode d'action n'est pas encore déterminé avec précision.

Parallèlement à cette étude, Peleg *et al.* (1980) observèrent que la bactérie halophile modérée Ba 1 transporte la proline en solution saline contenant 1.5 M NaCl (+ 0.5 M KCl) lorsqu'elle est cultivée en milieu contenant 1.5 M NaCl (+ 0.5 M KCl) et ne développe pas cette halotolérance lorsqu'elle est cultivée sur le même milieu, mais en présence de 50 mM NaCl (+ 50 mM KCl). Les auteurs démontrèrent qu'il n'y avait pas de changement au niveau protéique ou lipidique de la membrane entre les 2 cultures, et attribuèrent la différence observée dans l'halotolérance entre ces 2 cultures à la plasmolyse des bactéries cultivées à faible concentration en NaCl et transférées en solution 2 M sel.

L'examen de *V. costicola* en microscopie électronique révèle

aussi une contraction de la membrane cytoplasmique l'éloignant de la membrane cellulaire chez les bactéries transférées à 3 M et 4 M NaCl, mais les micrographes ne permettent pas de déceler de différence dans le degré de plasmolyse entre les bactéries sensibles et tolérantes après leur transfert en solution à forte concentration en NaCl. Une plasmolyse cellulaire a aussi été observée chez *Halomonas elongata* lorsque les bactéries cultivées à faible concentration en NaCl sont transférées dans des solutions hyperosmotiques (Martin *et al.*, 1983).

La chaîne respiratoire de *V. costicola* est un complexe multienzymatique étroitement lié à la membrane (Unemoto et Hayashi, 1980), dont l'activité est profondément affectée par les fortes concentrations en NaCl. Ainsi, les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl gardent une activité respiratoire endogène à 4 M respectivement de 13 % et de 27 % par rapport à celle qu'elles ont à 1 M NaCl.

La diminution de l'activité respiratoire en réponse aux fortes concentrations en NaCl peut être partiellement compensée à la fois chez les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl par leur oxydation du glycérol. Par contre, le glucose et le succinate ne modifient pas la respiration des bactéries sensibles et n'activent que faiblement celle des bactéries tolérantes en présence de 3 et 4 M NaCl.

Ces résultats laissent supposer qu'une étape de transport sensible au sel puisse être impliquée avant l'oxydation du glucose et du succinate, comme mis en évidence chez *Alteromonas haloplanktis* (Droniuk et MacLeod, en préparation), alors que la membrane de *V. costicola*, comme celle de très nombreuses bactéries (Lin, 1976), soit librement perméable au glycérol. Des différences similaires entre l'oxydation du glycérol et d'autres substrats (glucose, saccharose) à faible a_w ont aussi été observées chez *Salmonella oranienburg* (Christian, 1955 b). Une étude avec d'autres organismes incapables d'utiliser le glycérol ou avec des systèmes respiratoires isolés permettrait d'approfondir l'explication proposée pour ces observations.

Une condition pour que les bactéries deviennent halotolérantes est qu'elles soient capables de transporter les ions Na^+ au travers la membrane cytoplasmique à un rythme beaucoup plus élevé que celui qui leur est nécessaire pour vivre dans un environnement peu salé (Lanyi, 1982). Les ions Na^+ peuvent entrer dans le cytoplasme soit par diffusion (Michels *et al.*, 1981), soit au travers de canaux spécifiques, modèle proposé par Booth et Kroll (1983). Leur excrétion se fait toujours contre leur gradient de concentrations et requiert de l'énergie. La chaîne respiratoire de *V. costicola* éjecte des protons à travers la membrane et ce flux de protons conduit à la formation de $\Delta\Psi$ en milieu alcalin en présence de Na^+ . La formation de $\Delta\Psi$ est capitale à la survie

des bactéries dans un milieu de forte concentration en Na^+ , car c'est l'énergie de $\Delta\psi$ qui active l'antiport Na^+/H^+ permettant aux bactéries de maintenir une faible concentration intracellulaire de Na^+ .

Les bactéries cultivées à 1 M NaCl gardent à 4 M NaCl une activité respiratoire endogène double de celle des bactéries cultivées à 0.5 M NaCl. La différence d'halotolérance entre les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl peut être expliquée sur la différence dans l'inhibition de leur respiration endogène en milieu hyperosmotique. En effet, en ayant une respiration endogène différente, donc des taux d'efflux de H^+ différents, les bactéries sensibles et tolérantes développent un potentiel de membrane de valeur différente les rendant plus ou moins aptes à garder une concentration intracellulaire en Na^+ compatible avec leurs activités cellulaires. Bien que les expériences d'halotolérance sur la respiration des bactéries aient été réalisées à pH 7.2, c'est-à-dire à un pH_0 où l'efflux de protons lié à l'activité respiratoire conduit à la formation de ΔpH et $\Delta\psi$, l'énergie contenue dans ΔpH (14 mV) est négligeable devant celle de $\Delta\psi$ (126 mV).

$\Delta\psi$ étant aussi la source d'énergie pour le transport d'AIB, la différence dans l'accumulation d'AIB à 3 et 4 M NaCl entre les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl peut être due à la différence dans le potentiel de membrane qu'elles sont capables de développer à 3 et 4 M NaCl.

Les valeurs de $\Delta\Psi$ chez les bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl en présence des fortes concentrations en NaCl n'ont cependant pas pu être mesurées précisément, une raison pour que les résultats obtenus ne soient pas reproductibles pouvant être l'augmentation du taux de liaisons non spécifiques du TPMP⁺ en présence de ces fortes concentrations en NaCl.

L'étude cinétique sur le transport d'AIB supporte cependant l'hypothèse de l'effet des fortes concentrations en Na⁺ au niveau énergétique du transport puisqu'en présence de 3 M NaCl, l'affinité de la protéine de transport d'AIB ne change pas mais la $V_{\max}$ diminue. Par ailleurs, les bactéries tolérantes peuvent maintenir une concentration en ATP en présence de 3 et 4 M NaCl bien supérieure à celle des bactéries sensibles. Conformément à la théorie chemiosmotique de P. Mitchell (1966) mettant en évidence l'étroite relation énergétique entre l'activité respiratoire, la PMF, et l'activité de l'ATPase (voir p 50), cette observation confirme l'hypothèse où le maintien de $\Delta\Psi$ est une étape déterminante dans l'halotolérance des bactéries.

Comme chez de nombreuses bactéries, la composition en lipides membranaires de *V. costicola* varie avec la concentration en NaCl du milieu de culture. Ainsi, sa concentration en phospholipides chargés négativement augmente lorsqu'il est cultivé entre 0.5 et 3 M NaCl (Hanna, K., C. Bengis-Garber, D.J. Kushner, M. Kogut, and M. Kates, soumis). Toutefois, aucun changement significatif

n'a lieu entre les cultures 0.5 et 1 M NaCl, suggérant que le développement de l'halotolérance de *V. costicola* entre 0.5 et 1 M NaCl ne fait pas intervenir des changements dans la composition en lipides membranaires. Les interactions physiques entre les ions Na^+ et les lipides peuvent cependant être influencées par la concentration externe en NaCl et modifier l'activité des enzymes membranaires puisque la conformation des protéines fonctionnelles et leurs interactions dans la membrane sont en partie dépendantes de la viscosité des lipides (Singer et Nicolson, 1972). Ainsi, il a été trouvé chez l'algue halotolérante *Dunaliella primolecta* qu'une augmentation de la concentration en sel diminue la fluidité de la membrane (Fontana et Haug, 1982). Des études physiques directes sur la membrane des bactéries cultivées à 0.5 et 1 M NaCl devraient permettre de mieux connaître de mécanisme du développement de l'halotolérance chez *V. costicola*.

5. Bibliographie

- Addanki, S., F.D. Cahill, et J.F. Sotos. 1968. Determination of intramitochondrial pH and intramitochondrial-extramitochondrial pH gradient of isolated heart mitochondria by the use of 5,5-dimethyl-2,4 oxazolidinedione. J. Biol. Chem. 243:2337-2348.
- Aitken, D.M., et A.D. Brown. 1972. Properties of halophil nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-specific isocitrate dehydrogenase. Biochem. J. 130:645-662.
- Anderson, C.B., et L.D. Witter. 1982. Glutamine and proline accumulation by *Staphylococcus aureus* with reduction in water activity. Appl. Environm. Microbiol. 43:1501-1503.
- Anderson, R.R., R. Menzel, et J.M. Wood. 1980. Biochemistry and regulation of a second L-proline transport system in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 141:1071-1076.
- Ariel, M., et N. Grossowicz. 1974. Enhancement of transport in *Micrococcus lysodeikticus* by sodium ions. Biochim. Biophys. Acta. 352:122-126.
- Baas-Becking, L.G.M. 1931. Historical notes on salt and salt-manufacture. Scientific Monthly 32:434-446.
- Bagnara, A.S., et L.R. Finch. 1972. Quantitative extraction and estimation of intracellular nucleoside triphosphates of *Escherichia coli*. Anal. Biochem. 45:24-34.
- Bakker, E.P. 1979. Ionophore antibiotics. In "Antibiotics" vol. V part 1, Mechanism of action of antibacterial agents. (F.E. Hahn, ed.) pp 67-97. Springer Verlag Berlin.
- Bakker, E.P. 1982. Membrane potential in a potassium transport-negative mutant of *Escherichia coli* K 12. Biochim. Biophys. Acta. 681:474-483.
- Bakker, E.P., et W.E. Mangerich. 1981. Interconversion of components of the bacterial proton motive force by electrogenic potassium transport. J. Bacteriol. 147:820-826.
- Bayley, S.T., et D.J. Kushner. 1964. The ribosomes of the extremely halophilic bacterium *Halobacterium cutirubrum*. J. Mol. Biol. 9:654-669.
- Beck, J.C., et B.P. Rosen. 1979. Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*: properties of the sodium/proton antiporter. Arch. Biochem. Biophys. 194:208-214.

- Ben-Amotz, A., et M. Avron. 1978. On the mechanism of osmoregulation in *Dunaliella*. In "Energetics and structure of halophilic microorganisms". (S.R. Caplan, et M. Ginzburg, eds) pp 529-541. Elsevier, Amsterdam.
- Ben-Amotz, A., et M. Avron. 1980. Osmoregulation in the halophilic algae *Dunaliella* and *Asteromonas*. In "Genetic engineering of osmoregulation". (D.W. Rains, R.C. Valentine, et A. Holländer, eds) pp 91-99. Plenum Press, New York.
- Ben-Amotz, A., et M. Avron. 1982. The potential use of *Dunaliella* for the production of glycerol, β carotene and high protein-feed. In "Biosaline research: a look to the future". (A. San Pietro, ed) pp 207-214. Plenum Press, New York.
- Ben-Amotz, A., et M. Avron. 1983. Accumulation of metabolites by halotolerant algae and its industrial potential. Ann. Rev. Microbiol. 37:95-119.
- Bengis-Garber, C., et D.J. Kushner. 1981. Purification and properties of 5' nucleotidase from the membrane of *Vibrio costicola*, a moderate halophilic bacterium. J. Bacteriol. 146:24-32.
- Benyoucef, M., J-L. Rigaud, et G. Leblanc. 1982. Cation transport mechanisms in *Mycoplasma mycoides* var. Capri cells: The nature of link between K^+ and Na^+ transport. Biochem. J. 208:539-547.
- Bhattacharyya, P., et E.M. Barnes. 1978. Proton-coupled sodium uptake by membrane vesicles from *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Chem. 253:3848-3851.
- Bloch, M.R. 1963. The social influence of salt. Scientific American 209:89-98.
- Bonner, S., M.J. Mann, A.A. Guffanti, et T.A. Krulwich. 1982. Na^+ /solute symport in membrane vesicles from *Bacillus alcalophilus*. Biochim. Biophys. Acta. 679:315-322.
- Booth, I.R., et R.G. Kroll. 1983. Regulation of cytoplasmic pH (pHi) in bacteria and its relationship to metabolism. Biochemical Society Transactions 11:70-72.
- Borowitzka, L.J., S. Demmerle, M.A. Mackay. et R.S. Norton. 1980. Carbon-13 nuclear magnetic resonance study of osmoregulation in a blue-green alga. Science 210:650-651.

- Borowitzka, L., D.S. Kessly, et A.D. Brown. 1977. The salt relations of *Dunaliella*. Further observations on glycerol production and its regulation. *Arch. Microbiol.* 113:131-138.
- Bouillard, L., et D. Le Rudulier. 1983. Nitrogen fixation under osmotic stress: enhancement of nitrogenase biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* by glycine betaine. *Physiol. Veg.* 21: 447-457.
- Britten, R.J., et F.T. McClure. 1962. The amino acid pool in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 26:292-335.
- Brown, A.D. 1964. Aspects of bacterial response to ionic environment. *Bacteriol. Rev.* 28:296-329.
- Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40: 803-846.
- Brown, A.D. 1978. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Phys.* 17:181-242.
- Brown, A.D., et L.J. Borowitzka. 1979. Halotolerance of *Dunaliella*. In "Biochemistry and Physiology of Protozoa" vol 1 (M. Levandowsky, et S.H. Hutner, eds) pp 139-190. Academic Press, New York.
- Brown, A.D., et A. Duong. 1982. State of water in extremely halophilic bacteria: heat of dilution of *Halobacterium halobium*. *J. Membr. Biol.* 64:187-193.
- Brown, A.D., et M. Edgley. 1980. Osmoregulation in yeast. In "Genetic engineering of osmoregulation " (D.W. Rains, R.C. Valentine, et A. Holländer, eds) pp 75-90. Plenum Press, New York.
- Brown, A.D., et J.M. Sturtevant. 1980. State of water in extremely halophilic bacteria: freezing transitions of *Halobacterium halobium* observed by differential scanning calorimetry. *J. Membr. Biol.* 54:21-30.
- Brown, C.M., et S.O. Stanley. 1972. Environment-mediated changes in the cellular content of the pool constituents and their associated changes in cell physiology. *J. Appl. Chem. Biotechn.* 22:363-389.
- Brown, F.F., I. Sussman, M. Avron, et H. Degani. 1982. NMR studies of glycerol permeability in lipid vesicles, erythrocytes and the alga *Dunaliella*. *Biochim. Biophys. Acta.* 690:165-173.

- Brown, I.I., M.Y. Galperin, A.N. Glagolev, et V.P. Skulachev. 1983. Utilization of energy stored in the form of Na^+ and K^+ ion gradients by bacterial cells. *Eur. J. Biochem.* 134:345-349.
- Brummett, T.B., et G.W. Ordal. 1977. Inhibition of amino acid transport in *Bacillus subtilis* by uncouplers of oxidative phosphorylation. *Archiv. Biochem. Biophys.* 178:368-372.
- Buckel, W., et R. Semmler. 1982. A biotin-dependent sodium pump: glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*. *FEBS Lett.* 148:35-38.
- Buckel, W., et R. Semmler. 1983. Purification, characterisation and reconstitution of glutaconyl-CoA decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria. *Eur. J. Biochem.* 136:427-434.
- Burcik, E. 1950. Über die Beziehungen zwischen Hydratur und Wachstum bei Bakterien und Hefen. *Arch. Mikrobiol.* 15:203-235.
- Byerrum, R.U., C.S. Sato, et C.D. Ball. 1956. Utilization of betaine as a methyl group donor in tobacco. *Plant. Physiol.* 31:374-377.
- Chan, K., O.C. Leung, et L.H. Lee. 1979. Influence of temperature on ionic sparing effect and cell-associated cations in the moderate halophile *Micrococcus varians* var *halophilus*. *Microbios* 24:81-91.
- Christian, J.H.B. 1955 a. The influence of nutrition on the water relations of *Salmonella oranienburg*. *Aust. J. Biol. Sci.* 8:75-82.
- Christian, J.H.B. 1955 b. The water relations of growth and respiration of *Salmonella oranienburg* at 30°C. *Aust. J. Biol. Sci.* 8: 490-497.
- Christian, J.H.B., et J.M. Hall. 1972. Water relations of *Salmonella oranienburg*: accumulation of potassium and amino acids during respiration. *J. Gen. Microbiol* 70:497-506.
- Christian, J.H.B., et M. Ingram. 1959. Lysis of *Vibrio costicola* by osmotic shock. *J. Gen. Microbiol.* 20:32-42.
- Christian, J.H.B., et J.A. Waltho. 1962. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 65:506-508.

- Christian, J.H.B., et J.A. Waltho. 1964. The composition of *Staphylococcus aureus* in relation to the water activity of the growth medium. J. Gen. Microbiol. 35:205-213.
- Christian, J.H.B., et J.A. Waltho. 1966. Water relations of *Salmonella oranienburg*, stimulation of respiration by amino acids. J. Gen. Microbiol. 43:343-355.
- Clayson, D.H.F., et R.M. Blood. 1957. Food perishability: The determination of the vulnerability of food surfaces to bacterial infection. J. Sci. Food Agric. 8:404-414.
- Cobb, A.D., et D.B. Knaff. 1983. L-aspartate transport in the photosynthetic bacterium *Chromatium vinosum*. Arch. Biochem. Biophys. 255:86-94.
- Cohn, D.E., et H.R. Kaback. 1980. Mechanism of the melibiose porter in membrane vesicles of *Escherichia coli*. Biochemistry 19:4237-4243.
- Collins, S.H., et W.A. Hamilton. 1976. Magnitude on the proton motive force in respiring *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 126:1224-1231.
- Cook, G.M.W. 1976. Techniques for the analysis of membrane carbohydrates. In "Biochemical analysis of membranes " (A.H. Eddy, ed) pp 283-351. London Chapman and Hall, John Wiley & Sons, Inc, New York.
- Cope, F.W., et R. Damadian. 1970. Cell potassium by 39K spin echo nuclear magnetic resonance. Nature (Lond.) 228:76-77.
- Corry, J.E.L. 1973. The water relations and heat resistance of microorganisms. Prog. Ind. Microbiol. 12:73-108.
- Costerton, J.W., J.M. Ingram, et K.J. Cheng. 1974. Structure and function of the cell envelope of Gram-negative bacteria. Bacteriol. Rev. 38:87-110.
- Crane, R.K. 1977. The gradient hypothesis and other models of carrier-mediated active transport. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 78:99-159.
- Csonka, L.N. 1980. The role of proline in response to osmotic stress in *Salmonella typhimurium*: selection of mutants with increased osmotolerance as strains which over-produce L-proline. In "Genetic engineering of osmoregulation. Impact on plant productivity for food, chemicals and energy". (D.W. Rains, R.C. Valentine , et A. Holländer, eds), pp 35-52. Plenum Publishing Corp. New York.

- Csonka, L.N. 1981 a. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. Mol. Gen. Genet. 182:82-86.
- Csonka, L.N. 1981 b. The role of proline in osmoregulation in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. In "Trends in the biology of fermentations for fuels and chemicals " (A. Holländer, R. Rabson, P. Rogers, A. San Pietro, R.C. Valentine, et R. Wolfe, eds) pp 533-542. Plenum Publishing Corp. New York.
- Csonka, L.N. 1982. A third L-proline permease in *Salmonella typhimurium* which functions in media of elevated osmotic strength. J. Bacteriol. 151:1433-1443.
- Curtain, C.C., F.D. Looney, D.L. Regan, et N.M. Ivancic. 1983. Changes in the ordering of lipids in the membrane of *Dunaliella* in response to osmotic pressure changes. Biochem. J. 213: 131-136.
- Dendinger, S.M., et J.E. Brenchley. 1980. Temperature-sensitive glutamate deshydrogenase mutant of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 144:1043-1047.
- Dimroth, P. 1982. The generation of an electrochemical gradient of Na^+ ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na^+ -activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*. Eur. J. Biochem. 121:443-449.
- Drapeau, G.R., T.I. Matula, et R.A. MacLeod. 1966. Nutrition and metabolism of marine bacteria. XV Relation of Na^+ -activated transport to the Na^+ requirement of a marine pseudomonad for growth. J. Bacteriol. 92:63-71
- Dulaney, E.L., D.D. Dulaney, et E.L. Rickes. 1968. Factors in yeast extract which relieve growth inhibition of bacteria in defined medium of high osmolarity. Dev. Ind. Microbiol. 9: 260-269.
- Eagon, R.G., et L.S. Wilkerson. 1972. A potassium-dependent citric acid transport system in *Aerobacter aerogenes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46:1944-1950.
- Eddy, A.A., 1981. The amino acid pumps of living cells. Sci. Prog. Oxford 67:245-270.
- Edgley, M., et A.D. Brown. 1983. Yeast water relations: Physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. J. Gen. Microbiol. 129: 3453-3463.

- Epstein, E., J.D. Norlyn, D.W. Rush, R.W. Kingsbury, D.B. Kelley, G.A. Cunningham, et A.F. Wrona. 1980. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science* 210:399-404.
- Epstein, W., et L.A. Laimins. 1980. Potassium transport in *Escherichia coli*: diverse systems with common control by osmotic forces. *Trends Biochem. Sciences* 5:21-23.
- Epstein, W., et S.G. Schultz. 1965. Cation transport in *Escherichia coli*. V Regulation of cation content. *J. Gen Physiol.* 49: 221-234.
- Erecinska, M., et D.F. Wilson. 1982. Regulation of cellular energy metabolism. *J. Membr. Biol.* 70:1-14.
- Evans, R.W., M. Kates, M. Ginzburg, et B.Z. Ginzburg. 1982. Lipid composition of halotolerant algae *Dunaliella parva* Lerche and *Dunaliella tertiolecta*. *Biochim. Biophys. Acta* 712:186-195.
- Falk, M., K.A. Hartman, et R.C. Lord. 1963. Hydration of deoxyribonucleic acid. III A spectroscopic study of the effect of hydration on the structure of deoxyribonucleic acid. *J. Amer. Chem. Soc.* 85:391-393.
- Fein, J.E., et R.A. MacLeod. 1975. Characterization of neutral amino acid transport in a marine pseudomonad. *J. Bacteriol.* 124:1177-1190.
- Fontana, D.R., et A. Haug. 1982. Effects of sodium chloride on the plasma membrane of halotolerant *Dunaliella primolecta*: an electron spin resonance study. *Arch. Microbiol.* 131:184-190
- Forsyth, M.P., et D.J. Kushner. 1970. Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* 16:253-261.
- Frank, L., et I. Hopkins. 1969. Sodium-stimulated transport of glutamate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 100:329-336.
- Frasca, J.M., et V.R. Parks. 1965. A routine technique for double-staining ultra-thin sections using uranyl and lead salts. *J. Cell. Biol.* 25:157-161.
- Fried, A., A. Tietz, A. Ben-Amotz, et W. Eichenberger. 1982. Lipid composition of the halotolerant alga *Dunaliella bardawil*. *Biochim. Biophys. Acta* 713:419-426.

- Galinski, E.A., et H.G. Trüper. 1982. Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. FEMS Microbiol. Lett. 13:357-360.
- Gibbons, N.E. 1969. Isolation, growth, and requirements of halophilic bacteria. Methods in Microbiology 3B:169-183.
- Ginzburg, M., L. Sachs, et B.Z. Ginzburg. 1971. Ion metabolism in a *Halobacterium*. 11 Ion concentrations in cells at different levels of metabolism. J. Membr. Biol. 5:78-101.
- Gochnauer, M.B., et D.J. Kushner. 1969. Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. Can. J. Microbiol. 15: 1157-1165.
- Gochnauer, M.B., et D.J. Kushner. 1971. Potassium binding, growth and survival of an extremely halophilic bacterium. Can. J. Microbiol. 17:17-23.
- Gochnauer, M.B., G.G. Leppard, P. Komaratat, M. Kates, T. Novitsky, et D.J. Kushner. 1975. Isolation and characterization of *Actinopolyspora halophila*, gen. et sp. nov., an extremely halophilic actinomycete. Can. J. Microbiol. 21:1500-1511.
- Goldman, M., R.H. Deibel, et C.F. Niven. 1963. Interrelationship between temperature and sodium chloride on growth of lactic acid bacteria isolated from meat-curing brines. J. Bacteriol. 85:1017-1021.
- Golubic, S. 1980. Halophily and halotolerance in cyanophytes. Origins of Life 10:169-183.
- Goto, K., H. Hirata, et Y. Kagawa. 1980. A stable Na^+/H^+ antiporter of thermophilic bacterium SP3. J. Bioenerg. Biomembranes 12: 297-308.
- Gould, G.W., et J.C. Measures. 1977. Water relations in single cells. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 278B:151-166.
- Greene, R.V., et J.K. Lanyi. 1979. Proton movements in response to a light-driven electrogenic pump for sodium ions in *Halobacterium halobium* membranes. J. Biol. Chem. 254:10986-10994.
- Guffanti, A.A. 1983. ATP-dependent Na^+/H^+ antiport activity in *Bacillus alcalophilus* requires generation of an electrochemical gradient of protons. FEMS Microbiol. Lett. 17:307-310.
- Guffanti, A.A., D.E. Cohn, H.R. Kaback, et T.A. Krulwich. 1981. Relationship between the Na^+/H^+ antiporter and Na^+ /substrate symport in *Bacillus alcalophilus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1481-1484.

- Guffanti, A.A., P. Susman, R. Blanco, et T.A. Krulwich. 1978. The protonmotive force and α -aminoisobutyric acid transport in an obligately alkalophilic bacterium. *J. Biol. Chem.* 253: 708-715.
- Gustafsson, L. 1979. The ATP pool in relation to the production of glycerol and heat during growth of the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 120:15-23.
- Gustafsson, L., et B. Norkrans. 1976. On the mechanism of salt tolerance: production of glycerol and heat during growth of *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 110:177-183.
- Halpern, Y.S., H. Barash, S. Dover, et K. Druck. 1973. Sodium and potassium requirements for active transport of glutamate by *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 114:53-58.
- Hamaide, F., D.J. Kushner, G.D. Sprott. 1983. Proton motive force and Na^+/H^+ antiport in a moderate halophile. *J. Bacteriol.* 156: 537-544.
- Hammes, G.G. (ed) 1982. Enzyme catalysis and regulation (chapter 3) Academic Press, New York.
- Harold, F.M., K.H. Altendorf, et H. Hirata. 1974. Probing membrane transport mechanisms with ionophores. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 235:149-160.
- Harold, F.M., et D. Papineau. 1972 a. Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis*.1 The membrane potential. *J. Membr. Biol.* 8:27-44.
- Harold, F.M., et D. Papineau. 1972 b. Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis*.11 Proton and sodium extrusion. *J. Membr. Biol.* 8:45-62.
- Hasan, S.M., et T. Tsuchiya. 1977. Glutamate transport driven by an electrochemical gradient of sodium ion in membrane vesicles of *Escherichia coli* B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78: 122-128.
- Heefner, D.L. 1982. Transport of H^+ , K^+ , Na^+ , and Ca^{++} in *Streptococcus*. *Mol. Cell. Biochem.* 44:81-106.
- Heefner, D.L., et F.M. Harold. 1982. ATP-driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 2790-2802.

- Heefner, D.L., H. Kobayashi, et F.H. Harold. 1980. ATP-linked sodium transport in *Streptococcus faecalis*. II Energy coupling in everted membrane vesicles. J. Biol. Chem. 255: 11403-11407.
- Higa, A.I., et J.J. Cazzulo. 1978. The adenosine triphosphatase from the moderate halophile *Vibrio costicola*. FEMS Microbiol. Lett. 3:157-160.
- Hilpert, W., et P. Dimroth. 1982. Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a Na⁺ gradient. Nature (Lond.) 296:584-585.
- Hirata, H., F.C. Kosmakos, et A.F. Brodie. 1974. Active transport of proline in membrane preparations from *Mycobacterium phlei*. J. Biol. Chem. 249:6965-6970.
- Hirata, H., N. Sone, M. Yoshida, et Y. Kagawa. 1977. Isolation of the alanine carrier from the membranes of a thermophilic bacterium and its reconstitution into vesicles capable of transport. J. Supramol. Struct. 6:77-84.
- Hong, J.S. 1977. An *ecf* mutation in *Escherichia coli* pleiotropically affecting energy coupling in active transport but not generation or maintenance of membrane potential. J. Biol. Chem. 252:8582-8588.
- Hoshino, T., et M. Kageyama. 1979. Sodium-dependent transport of L-leucine in membrane vesicles prepared from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 137:73-81.
- Hua, S.T., V.Y. Tsai, G.M. Lichens, et A.T. Noma. 1982. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. strain WR 110 in response to sodium chloride salinity. Appl. Environm. Microbiol. 44: 135-140.
- Hurst, A., A. Hugues, et R. Pontefract. 1980. Mechanism of the temperature protective effect of salts on *Staphylococcus aureus*. Can. J. Microbiol. 26:511-517.
- Imhoff, J.F., H.G. Sahl, G.S.H. Soliman, et H.G. Trüper. 1979. The Wadi Natrum: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. Geomicrobiology Journal 1:219-234.

- Imhoff, J.F., et H.G. Trüper. 1977. *Ectothiorhodospira halochloris* sp. nov., a new extremely halophilic phototrophic bacterium containing bacteriochlorophyll b. Arch. Microbiol. 114:115-121.
- Ishida, Y., A. Nakayama, et H. Kadota. 1974. Temperature-salinity effects upon the growth of marine bacteria. In "Effect of the ocean environments on microbial activities". (R.R. Colwell, et R.Y. Morita, eds) pp 80-91. University Park Press, Baltimore.
- Jarrell, K.F., et G.D. Sprott. 1981. The transmembrane electrical potential and intracellular pH in methanogenic bacteria. Can. J. Microbiol. 27:720-728.
- Jarrell, K.F., et G.D. Sprott. 1983 a. Measurement and significance of the membrane potential in *Methanobacterium bryantii*. Biochim. Biophys. Acta 725:280-288.
- Jarrell, K.F., et G.D. Sprott. 1983 b. The effects of ionophores and metabolic inhibitors on methanogenesis and energy-related properties of *Methanobacterium bryantii*. Arch. Biochem. Biophys. 225:33-41.
- Jefferies, R.L. 1980. The role of organic solutes in osmoregulation in halophytic higher plants. In "Genetic engineering of osmoregulation" (D.W. Rains, R.C. Valentine, et A. Hollander, eds), pp 135-154. Plenum Press, New York.
- Jennings, D.H. 1983. Some aspects of the physiology and biochemistry of marine fungi. Biol. Rev. 58:423-459.
- Jinks, D.C., J.R. Silvius, et R.N. McElhaney. 1978. Physiological role and membrane lipid modulation of the membrane-bound (Mg^{++} , Na^{+})-adenosine triphosphatase activity in *Acholeplasma laidlawii*. J. Bacteriol. 136:1027-1036.
- Kaback, H.R., et T.F. Deuel. 1969. Proline uptake by disrupted membrane preparation from *Escherichia coli*. Arch. Biochem. Biophys. 132:118-129.
- Kaback, H.R., J.P. Reeves, S.A. Short, et F.J. Lombardi. 1974. Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. XVIII The mechanism of action of carbonylcyanide m-chlorophenylhydrazone. Arch. Biochem. Biophys. 160:215-222.
- Kahane, S., M. Marcus, H. Barash, Y.S. Halpern, et H.R. Kaback. 1975. Sodium-dependent glutamate transport in membrane vesicles of *Escherichia coli* K-12. FEBS Lett. 56:235-239.

- Kakimoto, D., K. Okita, et M. Inai. 1974. Mineral requirements of marine bacteria. In "Effects on the ocean environment of microbial activities (R.R. Colwell, et R.Y. Morita, eds), pp 16-37. University Park Press, Baltimore.
- Kao, O.H.W., D.S. Berns, et W.R. Town. 1973. The characterization of C-phycoerythrin from an extremely halotolerant blue-green alga, *Coccochloris elabens*. Biochem. J. 131:39-50.
- Karzanov, V., et R.N. Ivanovsky. 1980. Sodium-dependent succinate uptake in the purple bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. Biochim. Biophys. Acta 598:91-99.
- Kashket, E.R. 1979. Active transport of thallous ions by *Streptococcus lactis*. J. Biol. Chem. 254:8129-8131.
- Kashket, E.R. 1981 a. Proton motive force in growing *Streptococcus lactis* and *Staphylococcus aureus* under aerobic and anaerobic conditions. J. Bacteriol. 146:369-376.
- Kashket, E.R. 1981 b. Effects of aerobiosis and nitrogen source on the proton motive force in growing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* cells. J. Bacteriol. 146:377-384.
- Kashket, E.R., et S.L. Barker. 1977. Effects on potassium ions on the electrical and pH gradients across the membrane of *Streptococcus lactis* cells. J. Bacteriol. 130:1017-1023.
- Kashket, E.R., A.G. Blanchard, et W.C. Metzger. 1980. Proton motive force during growth of *Streptococcus lactis* cells. J. Bacteriol. 143:128-134.
- Kauss, H. 1969. Osmoregulation mit α -Galaktosylglyzeriden bei *Ochromonas* und Rotalgen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 82:115-125.
- Kilberg, M.S. 1982. Amino acid transport in isolated rat hepatocytes. J. Membr. Biol. 69. 1-12.
- Kitada, M., et K. Horikoshi. 1977. Sodium ion-stimulated α -[1-¹⁴C] aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic *Bacillus* species. J. Bacteriol. 131:784-788.
- Kitada, M., et K. Horikoshi. 1980 a. Further properties of sodium ion stimulated α -[1-¹⁴C] aminoisobutyric acid uptake in alkalophilic *Bacillus* sp. J. Biochem. 87:1279-1284.
- Kitada, M., et K. Horikoshi. 1980 b. Sodium-ion stimulated amino acid uptake in membrane vesicles of alkalophilic *Bacillus* No8-1. J. Biochem. 88:1757-1764.

- Klingenberg, M. 1981. Membrane protein oligomeric structure and transport function. *Nature (Lond.)* 290:449-454.
- Kodama, T., et S. Taniguchi. 1977. Sodium controlled coupling of respiration to energy linked functions in *Pseudomonas stutzeri*. *J. Gen. Microbiol.* 98:503-510.
- Kollman, V.H., J.L. Hanners, R.E. London, E.G Adame, et T.E. Walker. 1979. Photosynthetic preparation and characterization of ^{13}C labeled carbohydrates in *Agmenellum quadruplicatum*. *Carbohydr. Res.* 73:193-202.
- Koujima, I., H. Hayashi, K. Tomochika, A. Okabe, et Y. Kanemasa. 1978. Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration. *Appl. Environm. Microbiol.* 35:467-470.
- Koyama, N., A. Kiyomiya, et Y. Nosoh. 1976. Na^+ -dependent uptake of amino acids by an alkalophilic *Bacillus*. *FEBS Lett.* 72: 77-78.
- Kremer, B.P. 1981. Aspects of carbon metabolism in marine macroalgae. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 19:41-94.
- Krulwich, T.A., A.A. Guffanti, R.F. Bornstein, et J. Hoffstein. 1982. A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB. *J. Biol. Chem.* 257: 1885-1889.
- Krulwich, T.A., K.G. Mandel, R.F. Bornstein, et A.A. Guffanti. 1979. A non-alkalophilic mutant of *Bacillus alcalophilus* lacks the Na^+/H^+ antiporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91:58-62.
- Kumar, S., et D.J.D. Nicholas. 1983. Proton electrochemical gradients in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *J. Bacteriol.* 154:65-71.
- Kusaka, I., et K. Kanai. 1978. Purification and characterization of alanine carrier isolated from H-proteins of *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 83:307-311.
- Kusaka, I., et K. Kanai. 1979. Characterization of glutamate transport system in hydrophobic protein (H protein) of *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 552:492-498.
- Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. In "Microbiol life in extreme environments" (D.J. Kushner, ed) pp 318-368. Academic Press, London.

- Kushner, D.J. 1980. Extreme environments. In "Contemporary microbial ecology" (D.C. Ellwood, M.J. Lathan, J.N. Hedger, et J.M. Lynch, eds), pp 29-54. Academic Press Inc, London.
- Kushner, D.J., F. Hamaide, et R.A. MacLeod. 1983. Development of salt-resistant active transport in a moderately halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 153:1163-1171.
- Laimins, L.A., D.B. Rhoads, et W. Epstein. 1981. Osmotic control of *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:464-468.
- Lanyi, J.K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bact. Rev.* 38:272-290.
- Lanyi, J.K. 1979. The role of Na^+ in transport processes of bacterial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 559:377-397.
- Lanyi, J.K. 1982. The role of membranes and transport in the salt tolerance of halobacteria. *Environm. Sci. Res.* 23:303-314.
- Lanyi, J.K., et R.E. MacDonald. 1976. Existence of electrogenic hydrogen ion/sodium ion antiport in *Halobacterium halobium* cell envelope vesicles. *Biochemistry* 15:4608-4614.
- Lanyi, J.K., et B. Schobert. 1983. Effects of chloride and pH on the chromophore and photochemical cycling of halorhodopsin. *Biochemistry.* 22:2763-2769.
- Lanyi, J.K., et M.P. Silverman. 1972. The state of binding of intracellular K^+ in *Halobacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.* 18:993-995.
- Lanyi, J.K., et M.P. Silverman . 1979. Gating effects in *Halobacterium halobium* membrane transport. *J. Biol. Chem.* 254:4750-4755.
- Larsen, H. 1962. Halophilism. In "The bacteria", vol 4 (I.C. Gunsalus, et R.Y. Stanier, eds), pp297-342. Academic Press New York.
- Le Rudulier, D., et L. Bouillard. 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl. Environm. Microbiol.* 46:152-159.
- Le Rudulier, D., et R.C. Valentine. 1982. Genetic engineering in agriculture: osmoregulation. *Trends Biochem. Sci.* 7:431-433.

- Le Rudulier, D., S.S. Yang, et L.N. Csonka. 1981. Proline overproduction enhances nitrogenase activity under osmotic stress in *Klebsiella pneumoniae*. In "Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen" (J.M. Lyons, R.C. Valentine, D.A. Phillips, D.W. Rains, et R.C. Huffaker, eds) pp 173-179 . Plenum Publishing Corp. New York.
- Le Rudulier, D., S.S. Yang, et L.N. Csonka. 1982. Nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* during osmotic stress: effect of exogenous proline or a proline overproducing plasmid. *Biochim. Biophys. Acta* 719:273-283.
- Lin, E.C.C. 1976. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 30:535-578.
- Linnett, P.E., et R.B. Beechey. 1979. Inhibitors of the ATP synthetase system. *Methods Enzymol.* 55:472-518.
- Lochhead, A.G. 1934. Bacteriological studies on the red discoloration of salted hides. *Can. J. Res.* 10:275-286.
- Lopilato, J., T.Tsuchiya, et T.H. Wilson. 1978. Role of Na⁺ and Li⁺ in thiomethylgalactoside transport by the melibiose transport system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 134:147-156.
- Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9:409-414.
- Luisi, B.F., J.K. Lanyi, et H.J. Weber. 1980. Na⁺ transport via Na⁺/H⁺ antiport in *Halobacterium halobium* envelope vesicles. *FEBS Lett.* 117:354-358.
- MacDonald, R.E., R.V. Greene, et J.K. Lanyi. 1977. Light-activated amino acid transport systems in *Halobacterium halobium* envelope vesicles: role of chemical and electrical gradients. *Biochemistry* 16:3227-3235.
- MacDonald, R.E., J.K. Lanyi, et R.V. Greene. 1977. Sodium-stimulated glutamate uptake in membrane vesicles of *Escherichia coli*: the role of ion gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:3167-3170.
- MacLeod, R.A. 1968. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria. In "Advances in microbiology of the sea" (M.R. Droop, et E.J.F. Wood, eds), vol 1 pp 95-126 Academic Press, New York.
- MacLeod, R.A., P. Thurman, et H.J. Rogers. 1973. Comparative transport activity of intact cells, membrane vesicles, and mesosomes of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 113:329-340.

- Makemson, J.C., et J.W. Hastings. 1979. Glutamate functions in osmoregulation in a marine bacterium. *Appl. Environm. Microbiol.* 38:178-180.
- Maloney, P.C., E.R. Kashket, et T.H. Wilson. 1975. Methods for studying transport in bacteria. In "Methods in membrane biology", vol 5 (E.Korn, ed) pp 1-49. Plenum Publishing Corp., New York.
- Mandel, K.G., A.A. Guffanti, et T.A. Krulwich. 1980. Monovalent cation/proton antiporters in membrane vesicles from *Bacillus alcalophilus*. *J. Biol. Chem.* 255:7391-7396.
- Marshall, B.J., D.F. Ohye, et J.H.B. Christian. 1971. Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. *Appl. Microbiol.* 21:363-364.
- Martin, E.L., T. Duryea-Rice, R.H. Vreeland, L. Hilsabeck, et C. Davis. 1983. Effects of NaCl on the uptake of α - $[^{14}\text{C}]$ amino-isobutyric acid by the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Can. J. Microbiol.* 29:1424-1429.
- Masui, M., et S. Wada. 1973. Intracellular concentrations of Na^+ , K^+ and Cl^- of a moderately halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol.* 19:1181-1186.
- Matches, J.R., et J. Liston. 1972. Effects of incubation temperature on the salt tolerance of *Salmonella*. *J. Milk Food Technol.* 35:39-44.
- Matheson, A.T., G.D. Sprott, I.J. MacDonald, et H. Tessier. 1976. Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics, internal salt concentration, and morphology. *Can. J. Microbiol.* 22:780-786.
- Measures, J.C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature (Lond.)* 257:398-400.
- Michel, H., et D. Oesterhelt. 1976. Light-induced changes of the pH gradient and the membrane potential in *Halobacterium halobium*. *FEBS Lett.* 65:175-178.
- Michels, P.A.M., K.J. Hellingwerf, J.S. Lolkema, I. Friedberg, et W.N. Konings. 1981. Effects of the medium composition on the components of the electrochemical proton gradient in *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Arch. Microbiol.* 130:357-361.
- Miner, K.M., et L. Frank. 1974. Sodium-stimulated glutamate transport in osmotically shocked cells and membrane vesicles of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 117:1093-1098.

- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature (Lond.)* 191:144-191.
- Mitchell, P. 1966. Chemiosmotic coupling in oxydative and photo-synthetic phosphorylation. *Biol. Rev.* 41:445-502.
- Mitchell, P. 1979. Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction: a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur. J. Biochem.* 95:1-20.
- Mitchell, P., et J. Moyle. 1967. Respiration-driven proton translocation in rat liver mitochondria. *Biochem. J.* 105: 1147-1162.
- Mitchell, P., et J. Moyle. 1969 a. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 7:471-484.
- Mitchell, P., et J. Moyle. 1969 b. Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 9:149-155.
- Mitchell, W.J., I.R. Booth, et W.A. Hamilton. 1979. Quantitative analysis of proton-linked transport systems. Glutamate transport in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 184:441-449.
- Morishita, H. 1980. Specific requirement of Na⁺ for growth and macromolecular synthesis of a slightly halophilic marine bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. In "Saline Environment" (H. Morishita, et M. Masui, eds) pp 93-109. Japanese Conference on Halophilic Microbiology.
- Niiya, S., Y. Moriyama, M. Futai, et T. Tsuchiya. 1980. Cation coupling to melibiose transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 144:192-199.
- Nissenbaum, A. 1975. The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microbial Ecol.* 2:139-161.
- Niven, D.F., et R.A. MacLeod. 1978. Sodium ion/proton antiport in a marine bacterium. *J. Bacteriol.* 134:737-743.
- Niven, D.F., et R.A. MacLeod. 1980. Sodium ion-substrat symport in a marine bacterium. *J. Bacteriol.* 142:603-607.
- Norberg, P., J.G. Kaplan, et D.J. Kushner. 1973. Kinetics and regulation of the salt-dependent aspartate transcarbamylase of *Halobacterium cutirubrum*. *J. Bacteriol.* 113:680-686.

- Norkrans, B. 1966. Studies on marine occurring yeasts: growth related to pH, NaCl concentration and temperature. Arch. Mikrobiol. 54:374-392.
- Norton, R.S., M.A. Mackay, et L.J. Borowitzka. 1982. The physical state of osmoregulatory solutes in unicellular algae. Biochem. J. 202:699-706.
- Novitsky, T.J., et D.J. Kushner. 1975. Influence of temperature and salt concentration on the growth of a facultatively halophilic "*Micrococcus*" sp. Can. J. Microbiol. 21:107-110.
- Novitsky, T.J., et D.J. Kushner. 1976. *Planococcus halophilus* sp. nov., a facultatively halophilic coccus. J. Syst. Bact. 26: 53-57.
- Ørskov, S.L. 1948. Experiments on active and passive permeability of *Bacillus coli communis*. Acta Path. Microbiol. Scand. 25: 277-283.
- Padan, E., D. Zilberstein, et H. Rottenberg. 1976. The proton electrochemical gradient in *Escherichia coli* cells. Eur. J. Biochem. 63:533-541.
- Padan, E., D. Zilberstein, et S. Schuldiner. 1981. pH homeostasis in bacteria. Biochim. Biophys. Acta 650:151-166.
- Patel, G.B., et B.J. Agnew. 1981. A simple apparatus for measuring the E_h of anaerobic media. Can. J. Microbiol. 27:853-855.
- Peleg, E., A. Tietz, et I. Friedberg. 1980. Effects of salts and ionophores on proline transport in a moderately halophilic halotolerant bacterium. Biochim. Biophys. Acta 596:118-128.
- Pettitt, C.A., V.L. Davidson, A. Cobb, et D.B. Knaff. 1982. Sodium dependent α -aminoisobutyrate transport by the photo-synthetic purple sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. Arch. Biochem. Biophys. 216:306-313.
- Pitt, J.I. 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In "Water relations of foods" (R.B. Duckworth, ed) pp 273-307, Academic Press, London.
- Pitt, J.I., et J.H.B. Christian. 1968. Water relations of xerophilic fungi isolated from prunes. Appl. Microbiol. 161: 1853-1858.

- Plack, R.H., et B.P. Rosen. 1980. Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 255:3824-3825.
- Post, F.J. 1977. The microbial ecology of the Great Salt Lake. Microbial Ecol. 3:143-165.
- Pugh, E.L., M.K. Wassef, et M. Kates. 1971. Inhibition of fatty acid synthetase in *Halobacterium cutirubrum* and *Escherichia coli* by high salt concentrations. Can. J. Biochem. 49: 953-958.
- Rafaeli-Eshkol, D. 1968. Studies on halotolerance in a moderately halophilic bacterium: effect of growth conditions on salt resistance of the respiratory system. Biochem. J. 109:679-685.
- Rafaeli-Eshkol, D., et Y. Avi-Dor. 1968. Studies on halotolerance in a moderately halophilic bacterium: effect of betaine on salt resistance of the respiratory system. Biochem. J. 109: 687-691.
- Rains, D.W. 1979. Salt tolerance of plants: strategies of biological systems. In "The biosaline concept" (A. Holländer, J.C. Aller, E. Epstein, A. San Pietro, et O.R. Zaborsky, eds) pp 47-67. Plenum Publishing Corp. New York.
- Rains, D.W., L. Csonka, D. Le Rudulier, T.P. Croughan, S.S. Yang, S.J. Stavarek, et R.C. Valentine. 1982. Osmoregulation by organisms exposed to saline stress: physiological mechanisms and genetic manipulation. In "Biosaline research: a look to the future " (A. San Pietro, ed) pp 283-302. Plenum Press, New York.
- Ratzkin, B., et J. Roth. 1978. Cluster of genes controlling proline degradation in *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 133:744-754.
- Raven, J.A., et F.A. Smith. 1982. Solute transport at the plasma-lemma and the early evolution of cells. Biosystems 15:13-26.
- Rayman, M.K., T.C.Y. Lo, et B.D. Sanwal. 1972. Transport of succinate in *Escherichia coli* 11 Characteristics of uptake and energy coupling with transport in membrane preparations. J. Biol. Chem. 247:6332-6339.
- Raymond, J.C., et W.R. Sistr  m. 1969. *Ectothiorhodospira halophila*: A new species of a halophilic photosynthetic bacterium. Arch. Mikrobiol. 69:121-126.
- Reenstra, W.W., L. Patel, H. Rottenberg, et H.R. Kaback. 1980. Electrochemical proton gradient in inverted membrane vesicles from *Escherichia coli*. Biochemistry 19:1-9.

- Reizer, J., et C. Panos. 1982. Transport of α -aminoisobutyric acid by *Streptococcus pyogenes* and its derived L-form. J. Bacteriol. 149:211-220.
- Reynolds, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol. 17:208-212.
- Ring, K., H. Ehle, et B. Foit. 1976. Effects of alkali ions on the active transport of neutral amino acids into *Streptomyces hydrogenans*. Biochim. Biophys. Acta 433:615-629.
- Risk, M., R. Gelber, S. Knock, et R.C. Wood. 1982. Osmoregulatory mechanisms of the mesohalophilic Dead Sea bacterium Ba 1. In "Biosaline research: a look to the future" (A. San Pietro, ed) pp 539-544. Plenum Publishing Corp. New York.
- Rodier, J. 1971. L'analyse chimique et physicochimique de l'eau-eaux naturelles-eaux résiduares. 4ième édition, Dunod, Paris.
- Rottenberg, H. 1975. The measurement of transmembrane electrochemical proton gradients. Bioenergetics 7:61-74.
- Rottenberg, H. 1979. The measurement of membrane potential and Δ pH in cells, organelles and vesicles. Methods Enzymol. vol LV (64) 547-569.
- Sadler, M., M. McAninch, R. Alico, et L.I. Hochstein. 1980. The intracellular Na^+ and K^+ composition of the moderately halophilic bacterium *Paracoccus halodenitrificans*. Can. J. Microbiol. 26:496-502.
- Sakazaki, R. 1969. Halophilic *Vibrio* infections. "Food borne infections and intoxications" (H. Riemann, ed) Academic Press, New York.
- San Pietro, A. (ed) 1982. Biosaline research: a look to the future Plenum Press, New York.
- Schobert, B. 1977. Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? J. Theor. Biol. 68:17-26.
- Schobert, B., et J.K. Lanyi. 1982. Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. J. Biol. Chem. 257:10306-10313.
- Schobert, B., et H. Tschesche. 1978. Unusual solution properties of proline and its interaction with proteins. Biochim. Biophys. Acta 541:270-277.
- Schuldiner, S., et H. Fishkes. 1978. Sodium-proton antiport in isolated membrane vesicles of *Escherichia coli*. Biochemistry 17:706-711.

- Scott, W.J. 1953. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30°C. Aust. J. Biol. Sci. 6:549-564.
- Scott, W.J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. Adv. Food Res. 7:83-127.
- Shieh, H.S. 1966. Further studies on the oxidation of betaine by a marine bacterium, *Achromobacter cholinophagum*. Can. J. Microbiol. 12:299-302.
- Shio, I., R. Miyajima, et N. Kashima. 1973. Na⁺-dependent transport of threonine in *Brevibacterium flavum*. J. Biochem. 73: 1185-1193.
- Shindler, D.B. 1976. Physiological and enzymatic aspects of moderately halophilic microorganisms. Thèse de pH D, Université d'Ottawa.
- Shindler, D.B., R.W. Wydro, et D.J. Kushner. 1977. Cell-bound cations of the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. J. Bacteriol. 130:698-703.
- Shioi, J.I., S. Matsuura, et Y. Imae. 1980. Quantitative measurements of proton motive force and motility in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 144:891-897.
- Shkedy-Vinkler, C., et Y. Avi-Dor. 1975. Betaine-induced stimulation of respiration at high osmolarities in a halotolerant bacterium. Biochem. J. 150:219-226.
- Shporer, M., et M.M. Civan. 1977. Pulsed nuclear magnetic resonance study of ³⁹K within Halobacteria. J. Membr. Biol. 33:385-400.
- Singer, S.J., et G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. Science 175:720-731.
- Skulachev, V.P. 1978. Membrane-linked energy buffering as the biological function of Na⁺/K⁺ gradient. FEBS Lett. 87: 171-179.
- Smith, F.B. 1938. An investigation of a taint in rib bones of bacon. The determination of halophilic *Vibrios* (N. spp). Proc. R. Soc. Queensland 49:29-52.
- Sorensen, E.N., et B.P. Rosen. 1980. Effects of sodium and lithium ions on the potassium ion transport systems of *Escherichia coli*. Biochemistry 19:1458-1462.
- Sprott, G.D., J.P. Drozdowski, E.L. Martin, et R.A. MacLeod. 1975. Kinetics of Na⁺-dependent amino acid transport using cells and membrane vesicle of a marine pseudomonad. Can. J. Microbiol. 21:43-50.

- Sprott, G.D., et K.F. Jarrell. 1981. K^+ , Na^+ , and Mg^{++} content and permeability of *Methanospirillum hungatei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Can. J. Microbiol. 27: 444-451.
- Sprott, G.D., et R.A. MacLeod. 1974. Nature of the specificity of alcohol coupling to L-alanine transport into isolated membrane vesicles of a marine pseudomonad. J. Bacteriol. 117: 1043-1054.
- Stanley, P.E., et S.G. Williams. 1969. Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. Analyt. Biochem. 29:381-392.
- Stanley, S.O., et D.Y. Morita. 1968. Salinity effect on the maximal growth temperature of some bacteria isolated from marine environments. J. Bacteriol. 95:169-173.
- Stevenson, J. 1966. The specific requirement for sodium chloride for the active uptake of α -glutamate by *Halobacterium salinarium*. Biochem. J. 99:257-260.
- Stewart, L.M.D., et I.R. Booth. 1983. Na^+ involvement in proline transport in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 19: 161-164.
- Stock, J., et S. Roseman. 1971. A sodium-dependent sugar co-transport system in bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun. 44: 132-138.
- Stoeckenius, W., R.H. Lozier, et R.A. Bogomolni. 1979. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. Biochim. Biophys. Acta 505:215-278.
- Tanaka, K., S. Niiya, et T. Tsuchiya. 1980. Melibiose transport in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 141: 1031-1036.
- Tanford, C. 1980. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. 2nd edition John Wiley & Sons N.Y.
- Taras, M.J., A.E. Greenberg, R.D. Hoak, et M.C. Rand (eds). 1971. Standards methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation.
- Tempest, D.W., et J.L. Meers. 1968. The influence of NaCl concentration of the medium on the potassium content of *Aerobacter aerogenes* and on the interrelationships between potassium, magnesium, and ribonucleic acid in the growing bacteria. J. Gen. Microbiol. 54:319-325.

- Tempest, D.W., J.L. Meers, et C.M. Brown. 1970 a. Influence of environment on the content and composition of microbial free amino acids pools. J. Gen. Microbiol. 64:171-185.
- Tempest, D.W., J.L. Meers, et C.M. Brown. 1970 b. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a Hitherto unknown route. Biochem. J. 117:405-407.
- Tesone, S., A. Hugues, et A. Hurst. 1981. Salt extends the upper temperature limit for growth of food-poisoning bacteria. Can. J. Microbiol. 27:970-972.
- Thompson, J., et R.A. MacLeod. 1971. Functions of Na⁺ and K⁺ in the active transport of α -aminoisobutyric acid in a marine pseudomonad. J. Biol. Chem. 246:4066-4074.
- Thompson, J., et R.A. MacLeod. 1973. Na⁺ and K⁺ gradients and α -aminoisobutyric acid transport in a marine pseudomonad. J. Biol. Chem. 248:7106-7111.
- Thompson, J., et R.A. MacLeod. 1974. Specific electron donor-energized transport of α -aminoisobutyric acid and K⁺ into intact cells of a marine pseudomonad. J. Bacteriol. 117:1055-1064.
- Tokuda, H., et H.R. Kaback. 1977. Sodium-dependent methyl 1-thio β -D galactopyranoside transport in membrane vesicles isolated from *Salmonella typhimurium*. Biochemistry 16:2130-2136.
- Tokuda, H., M. Sugasawa, et T. Unemoto. 1982. Roles of Na⁺ and K⁺ in α -aminoisobutyric acid transport by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem. 257:788-794.
- Tokuda, H., et T. Unemoto. 1982. Characterization of the respiration-dependent Na⁺ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. J. Biol. Chem. 257:10007-10014.
- Tokuda, H., et T. Unemoto. 1983. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na⁺ pump functions. J. Bacteriol. 156:636-643.
- Troller, J.A. 1983. Water activity measurements with a capacitance manometer. J. Food Science 48:739-741.
- Troller, J.A., et J.H.B. Christian. 1978. Water activity and food. Academic Press, New York.
- Tsuchiya, T., S.M. Hasan, et J. Raven. 1977 a. Glutamate transport driven by an electrochemical gradient of sodium ions in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 131:848-853.

- Tsuchiya, T., J. Raven, et T.H. Wilson. 1977 b. Co-transport of Na^+ and methyl- β -D-thiogalactopyranoside mediated by the melibiose transport system of *Escherichia coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 76:26-31.
- Tsuchiya, T., et K. Takeda. 1979 a. Calcium/proton and sodium/proton antiport systems in *Escherichia coli*. J. Biochem. 85:943-951.
- Tsuchiya, T., et K. Takeda. 1979 b. Extrusion of sodium ions energized by respiration and glycolysis in *Escherichia coli*. J. Biochem. 86:225-230.
- Tsuchiya, T., et T.H. Wilson. 1978. Cation-sugar cotransport in the melibiose transport system of *Escherichia coli*. Membr. Biochem. 2:63-79.
- Tyler, B. 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. Ann. Rev. Biochem. 47:1127-1162.
- Unemoto, T., et M. Hayashi. 1979. Regulation of internal solute concentrations of marine *Vibrio alginolyticus* in response to external sodium chloride concentration. Can. J. Microbiol. 25:922-926.
- Unemoto, T., et M. Hayashi. 1980. Role of Na^+ in the respiratory chain of marine *Vibrio alginolyticus*. In "Saline environment" (H. Morisita, et M. Masui, eds) pp 39-49. Japanese Conference on Halophilic Microbiology.
- Unemoto, T., M. Hayashi, et K. Terao. 1977. Lysis of halophilic *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio costicola* induced by chaotropic anions. Biochim. Biophys. Acta 500:425-431.
- Van Thienen, G.M., P.W. Postma, et K. Van Dam. 1978. Na^+ -dependent methyl β -thiogalactoside transport in *Salmonella typhimurium*. Biochim. Biophys. Acta 513:395-400.
- Vigne, P., C. Frelin, E.J. Cragoe Jr, et M. Lazdunski. 1983. Ethyl-isopropyl-amiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for the inhibition of the Na^+/H^+ exchange system in various cell types. Biochem Biophys. Res. Commun. 116:86-90.
- Vreeland, R.H., B.D. Mierau, C.D. Litchfield, et E.L. Martin. 1983. Relationship of the internal solute composition to the salt tolerance of *Halomonas elongata*. Can. J. Microbiol. 29:407-414.

- Wagner, G., R. Hartmann, et D. Oesterhelt. 1978. Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. Eur. J. Biochem. 89:169-179.
- Walker, B.L., et F.A. Kummerow. 1964. Erythrocyte fatty acid composition and apparent permeability to non-electrolytes. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115:1099-1103.
- Weakley, B.S. 1981. A beginner's handbook in biological transmission electron microscopy. Churchill Livingstone Edinburgh.
- West, I.C. 1980. Energy coupling in secondary active transport. Biochim. Biophys. Acta 604:91-126.
- West, I.C., et P. Mitchell. 1974. Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli*. Biochem. J. 144:87-90.
- Winkler, L.W. 1888. The determination of dissolved oxygen in water. Berlin Deutsch. Chem. Gesellsch. 21:2843-2854
- Woese, C.R. 1981. Archaeobacteria. Scient. Amer. 244:98-122.
- Wong, P.T.S., J. Thompson, et R.A. MacLeod. 1969. Nutrition and metabolism of marine bacteria XVII Ion-dependent retention of α -aminoisobutyric acid and its relation to Na^+ dependent transport in a marine pseudomonad. J. Biol. Chem. 244:1016-1025.
- Wood, J.M. 1981. Genetics of L-proline utilization in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 146:895-901.
- Wyn-Jones, R.G. 1980. An assessment of quaternary ammonium and related compounds as osmotic effectors in crop plants. In "Genetic engineering of osmoregulation" (D.W. Rains, R.C. Valentine, et A. Holländer, eds), pp 155-170, Plenum Press, New York.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowler, et G.N. Somero. 1982. Living with water-stress: evolution of osmolyte systems. Science 217:1214-1222.
- Yap, S.F., et S.T. Lim. 1983. Response of *Rhizobium* sp. UMKL 20 to sodium chloride stress. Arch. Microbiol. 135:224-228.
- Yelton, M.M., S.S. Yang, S.A. Edie, et S.T. Lim. 1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast-growing strain of *Rhizobium japonicum*. J. Gen. Microbiol. 129:1537-1547.

- Yopp, J.H., D.M. Miller, et D.R. Tindall. 1978. Regulation of intracellular water potential in the halophilic blue-green alga *Aphanothece halophytica* (Chroococcales). In "Energetics and structure of halophilic microorganisms" (S.R. Caplan, et M. Ginzburg, eds) pp 619-624 Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- Zilberstein, D., V. Agmon, S. Schuldiner, et E. Padan. 1982 a. The sodium/proton antiporter is part of the pH homeostasis mechanism in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 257:3687-3691.
- Zilberstein, D., I.J. Ophir, E. Padan, et S. Schuldiner. 1982 b. Na⁺ gradient-coupled porters of *Escherichia coli* share a common subunit. J. Biol. Chem. 257:3692-3696.
- Zilberstein, D., E. Padan, et S. Schuldiner. 1980. Single locus in *Escherichia coli* governs growth in alkaline pH and on carbon sources whose transport is sodium dependent. FEBS Lett. 116:177-180.

Annexe

1. Kushner, D.J. F. Hamaide, and R.A. MacLeod. 1983.
Development of salt-resistant active transport in a
moderately halophilic bacterium.
J. Bacteriol. 153:1163-1171.

2. Hamaide, F., D.J. Kushner, and G.D. Sprott. 1983.
Proton motive force and Na^+/H^+ antiport in a moderate
halophile.
J. Bacteriol. 156:537-544.

Development of Salt-Resistant Active Transport in a Moderately Halophilic Bacterium

D. J. KUSHNER,^{1*} FRANCETTE HAMAIDE,¹ AND R. A. MACLEOD²

Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Ontario K1N 6N5, Canada,¹ and Department of Microbiology, Macdonald Campus of McGill University, Ste. Anne de Bellevue, Quebec H9X 1C0, Canada²

Received 16 August 1982/Accepted 29 November 1982

The moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola* accumulates α -aminoisobutyric acid (AIB) by active transport. Substantial amounts of Na^+ ions are needed for this transport. This is not due to an ionic requirement for respiration; cells respire as well as KCl as in NaCl but do not transport AIB in KCl. In cells grown in the presence of 1.0 or 2.0 M NaCl, AIB transport took place in higher NaCl concentrations than in cells grown in the presence of 0.5 M NaCl. The latter cells developed salt-resistant transport when they were exposed to 1.0 M NaCl in the presence of chloramphenicol and other antibiotics that inhibit protein synthesis. Two levels of salt-resistant transport were observed. One level (resistance to 3.0 M NaCl) developed in 1.0 M NaCl without the addition of nutrients, did not seem to require an increase in internal solute concentration, and was not lost when cells grown in 1.0 M NaCl were suspended in 0.5 M NaCl. The second level (resistance to 4.0 M NaCl) developed in 1.0 M NaCl only when nutrients were added, may have required an increased internal solute concentration, and was lost when 1.0 M NaCl-grown cells were suspended in 0.5 M NaCl or KCl. Among the substances that stimulated the development of salt-resistant AIB transport, betaine was especially active. Furthermore, direct addition of betaine permitted cells to transport AIB at higher NaCl concentrations. High salt concentrations inhibited endogenous respiration to a lesser extent than AIB transport, especially in 0.5 M NaCl-grown cells. Thus, these concentrations of salt did not inhibit AIB transport by inhibiting respiration. However, oxidation of glucose and oxidation of succinate were at least as sensitive to high salt concentrations as AIB transport, suggesting that a salt-sensitive transport step(s) is involved in the oxidation of these substrates.

Moderately halophilic bacteria can grow over a wide range of NaCl concentrations, roughly from 0.5 to 3.0 M (9). For two species, *Vibrio costicola* and *Micrococcus halodenitrificans* (now *Paracoccus halodenitrificans*), this ability does not seem to be due to the selection of more or less salt-resistant populations (4). As has been pointed out previously (9), the ability to grow over a wide range of salt concentrations could mean that cells possess enzymes or structures that can function at these concentrations or that cells can form enzymes or structures with different salt responses, depending on the NaCl concentration at which they grow. In the few studies that have been carried out, however, growth at different salt concentrations did not lead to the formation of enzymes (9), ribosomes (19), or protein-synthesizing systems (20; M. Kogut and W. Madira, unpublished data) with different salt responses.

All of these studies were concerned with intracellular proteins. It is not certain what the intracellular environments of the organisms studied are, but they are certainly different from the external environment, and they may be much lower in ionic concentrations (9, 20).

Uncertainties about the internal environment may be partly avoided by transport studies. At least some of the transport system is in direct contact with the external medium. We studied some characteristics of the transport system for α -aminoisobutyric acid (AIB) in a moderate halophile, *V. costicola*. The ionic requirements of this system were characterized, and the response of this system to high concentrations of NaCl was studied. We found that the salt tolerance of transport changes after growth in the presence of different NaCl concentrations or even after exposure to different concentrations of NaCl or other salts under conditions in which

no growth occurs. Mechanisms that may account for these findings were considered and explored

MATERIALS AND METHODS

V. costicola NRCC 37001 and the methods used for maintaining this bacterium have been described previously (6, 16). Growth and incubation were carried out at 25°C in shaken Erlenmeyer flasks (usually 125 ml) containing 0.2 volume of growth medium. This medium (proteose peptone tryptone medium [PPT]) contained 0.5% Bacto-Peptone (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), 0.5% tryptone (Difco), and different concentrations of NaCl (usually 0.5 or 1.0 M). In some experiments the concentration of the nutrient material was doubled without any change in the results obtained.

Preliminary experiments showed that AIB transport (measured in 1.0 M salts, in which the rate was maximal for cells grown in 0.5 or 1.0 M NaCl [see below]) increased about 60% from the exponential phase of growth to just before the stationary phase and then remained fairly constant. Accordingly, for the experiments described here, cells were harvested just before the stationary phase, usually after 16 h of growth, at a cell density of about 1 mg (dry weight) per ml.

For transport experiments, cells were usually washed twice with a solution containing 0.5 or 1.0 M NaCl (according to the NaCl concentration in the growth medium), 8 mM KCl, 0.5 mM MgSO₄, 0.2 mM KH₂PO₄, and 50 mM Tris buffer (pH 7.2). (Such solutions are designated 0.5 or 1.0 M salts, if higher NaCl concentrations were used, solutions are designated according to the NaCl concentrations as 2.0 M salts, etc.) Cells were then suspended in the same solution to a density of about 3 mg (dry weight) per ml. To measure transport, 100-μl portions of a cell suspension were added to 50-ml Erlenmeyer flasks containing 4.9 ml of salts of the concentrations indicated below and 200 μM [1-¹⁴C]AIB (0.5 μCi/μmol). The flasks were shaken at 25°C, and at intervals 0.5-ml samples of the suspension were filtered through Amicon microporous filters (25 mm pore size, 0.45 μm) and washed with 5.0 ml of the corresponding salts solution. The filters were placed in scintillation vials containing 10 ml of Aquasol cocktail (New England Nuclear Corp.), and radiation was determined by scintillation counting.

In experiments in which the ionic requirements for transport were studied, the compositions of the washing and suspending media were changed as described below.

Respiration was measured with an O₂ electrode (Biological Oxygen Monitor, Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, Ohio).

All experiments were repeated several times, and results were consistent. Typical experiments are described below. In several experiments, duplicate samples were removed to measure AIB uptake, results usually agreed within 5%.

RESULTS

Cationic requirements for AIB transport. *V. costicola*, which requires NaCl for growth, also

requires this compound for AIB transport. In solutions in which NaCl was replaced by KCl no AIB transport took place. Transport increased with Na⁺ concentration (Fig. 1). No transport took place in CsCl or NH₄Cl (data not shown).

Evidence for active transport of AIB. No transport occurred when cells were incubated under anaerobic conditions in tubes gassed with N₂. Addition of glucose (2.5 mM) caused only a 10% stimulation of AIB uptake. However, the cells showed measurable endogenous respiration (see below), which presumably provided sufficient energy. Most transport experiments were carried out without addition of glucose or other substrates. All of the cell-bound radioactive material could be extracted by exposing cells to water at 100°C for 10 min. Chromatographic studies, in which we used two different solvent systems (*n*-butyl alcohol-acetic acid-water and phenol-water) as described by Drapeau et al. (3) for *Alteromonas haloplanktis* (previously designated marine pseudomonad B16), showed that the cell-bound AIB moved to the same positions as pure AIB.

These experiments suggested that cell-bound AIB is free in the cytoplasm in an unchanged condition. Estimates based on a calculation of

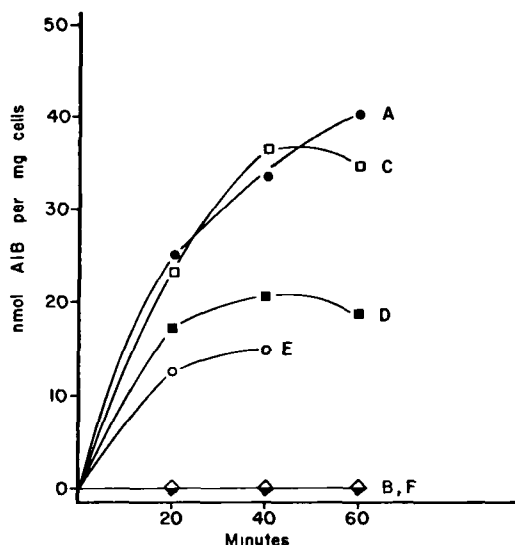


FIG. 1. Ionic requirements for AIB transport in *V. costicola*. Cells grown in 0.5% PPT containing 1.0 M NaCl were washed, and transport was measured, in different solutions. In addition to the major salts, solutions contained KCl, MgSO₄, Tris buffer, and NaH₂PO₄ (line A) or KH₂PO₄ (lines B through F), as described in the text. Line A, 1.0 M NaCl; line B, 1.0 M KCl; line C, 0.9 M NaCl + 0.1 M KCl; line D, 0.5 M NaCl + 0.5 M KCl; line E, 0.9 M KCl + 0.1 M NaCl; line F, 0.99 M KCl + 0.01 M NaCl. In other experiments, transport was as great in the absence of K⁺ ions as in the presence of K⁺ ions.

cell water as 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein showed that at least a 200-fold concentration of AIB in cell water took place. Together with the evidence that energy is needed for AIB uptake, these results confirm that active transport is involved in AIB uptake in *V. costicola*, as it is in a number of other bacteria.

Effect of NaCl concentration in the growth medium on the salt response of AIB transport. Figure 2 shows the effects of different NaCl concentrations on AIB transport by cells grown in media containing either 0.5 or 1.0 M NaCl. Cells grown at the lower salt concentration (Fig. 2A) transported AIB best at 0.5 to 1.0 M NaCl and still transported AIB at 2.0 M NaCl. Transport almost disappeared in 3.0 M NaCl and did disappear in 4.0 M NaCl. In other experiments, in which we used larger numbers of cells, we found that occasionally cells grown in 0.5 M NaCl had about 3% as much AIB uptake after 1 h in 4.0 M NaCl as in 1.0 M NaCl, but never more than this.

In contrast, cells grown in 1.0 M NaCl (Fig. 2B) took up considerable amounts of AIB in 3.0 M NaCl and even in 4.0 M NaCl, although maximum uptake still occurred between 0.5 and 1.0 M. The relative response to a lower NaCl concentration (0.25 M) was the same in both kinds of cells. At still lower concentrations, cells lysed, and transport could not be measured. AIB transport in cells grown in 2.0 M NaCl responded to different NaCl concentrations in a manner similar to AIB transport in 1.0 M-grown cells, with somewhat higher relative transport in 4.0 M NaCl (data not shown).

In the experiments described above, cells were subjected to sudden large osmotic changes. We were not certain whether the observed changes in the ability to transport AIB at the highest NaCl concentrations represented inhibition or destruction of the transport system. To distinguish between these possibilities, cells grown, washed, and suspended in 0.5 or 1.0 M NaCl were centrifuged and suspended in 4.0 M salts for 30 min. These cells were then centrifuged and suspended in 1.0 M salts, and their AIB transport was compared with transport of the original suspension in 1.0 M salts. We found (data not shown) that all of these rather drastic changes in the osmotic environments of the cells reduced the AIB transport in 1.0 M salts for cells grown in the lower or higher NaCl concentration by only about 10%. Thus, the transport system had not been destroyed, and the results shown in Fig. 2 represent true inhibition by the higher salt concentrations.

Development of salt-resistant transport. We thought that it was possible that the more salt-resistant transport in cells grown at the higher NaCl concentration might be due to the forma-

tion of a new protein(s) involved in transport. Accordingly, we carried out experiments on the development of salt resistance (as measured by the ability to transport AIB in 3.0 or 4.0 M salts) in cells grown in 0.5 M NaCl and then transferred to different media containing 1.0 M NaCl.

The results of several experiments (Table 1) showed that the appearance of resistance to the highest salt concentration occurred gradually, requiring 2 h or more. The most striking observation was that development of resistance took

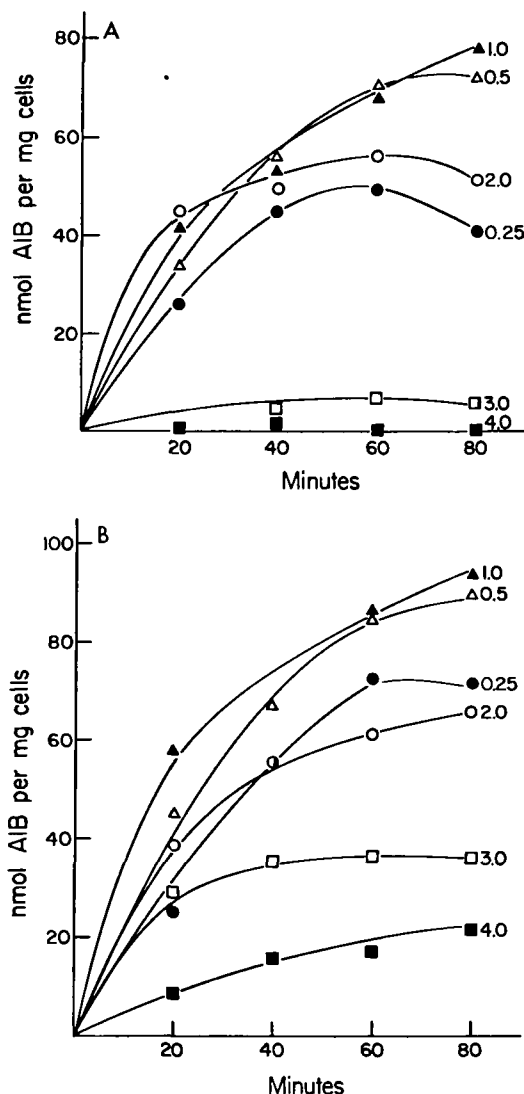


FIG. 2. Effect of NaCl concentration on AIB transport in *V. costicola*. (A) Cells grown in 0.5% PPT containing 0.5 M NaCl. (B) Cells grown in 0.5% PPT containing 1.0 M NaCl. Cells were washed in 0.5 M salts (A) or 1.0 M salts (B). The NaCl concentrations in which transport was measured are shown by the curves.

TABLE 1. Development of transport resistant to 4 M NaCl in cells grown in 0.5 M NaCl and incubated in other salts^a

Expt	Incubation medium	Time (h)	AIB uptake ^b	
			1.0 M NaCl	4 M NaCl
1	0.5 M NaCl + PPT	0	30	0
		7.5	61	1
2	1.0 M NaCl + PPT	0	18	0
		2	19	10
		4	31	30
	1.0 M NaCl + PPT + chloramphenicol	6	33	52
		2	49	19
		4	52	16
3	1.0 M salts	6	33	42
		0	21	0
	1.0 M salts + NH ₄ Cl	4.5	16	8
		4.5	13	6
	1.0 M salts + glucose	4.5	38	7
		4.5	19	28
	1.0 M KCl + glucose + NH ₄ Cl	4.5	7	0

^a Exponential cultures (0.2 to 0.4 mg [dry weight] per ml) in 0.5 M NaCl containing PPT were diluted with equal volumes of 0.5 M NaCl containing PPT and 1.5 M NaCl containing PPT in experiments 1 and 2, respectively. In experiment 3, washed cells were incubated in the media indicated. Final concentrations: PPT, 0.5%; glucose, 0.1 M; NH₄Cl, 0.2 M; chloramphenicol, 100 µg/ml. Medium containing 1.0 M KCl also contained 0.4 mM MgSO₄, 0.2 mM KH₂PO₄, and 50 mM Tris buffer (pH 7.2). All cell suspensions were shaken at 25°C. At the times shown, cells were washed and suspended in 1.0 M salts, and transport was measured as in the experiment shown in Fig. 2.

^b Uptake in nanomoles per milligram (dry weight) at 60 min for 1.0 M NaCl and relative uptake at 4 M NaCl expressed as a percentage of uptake at 1 M NaCl.

place in the presence of chloramphenicol concentrations that quite effectively blocked growth and have been shown to inhibit protein synthesis (6). Therefore, formation of a salt-resistant transport system does not depend on protein synthesis. In a defined salts medium, neither glucose nor NH₄Cl alone stimulated development of resistance to 4.0 M salts, but the two compounds together did have a stimulatory effect. No resistance developed in cells incubated in 0.5 M NaCl or in 1.0 M KCl, even if nutrient medium was added.

We also found that transport resistant to 4.0 M salts developed in the presence of streptomycin and erythromycin. However, a good deal of cell lysis occurred during long-term incubation with these antibiotics; perhaps because of this, the final level of activity obtained was low, even in the optimal salt concentration (1.0 M).

Nutrient requirements for development of salt-resistant transport were studied further. These experiments showed that cells grown in 0.5 M NaCl could develop resistance regards AIB transport much more easily to 3.0 M salts than to 4.0 M salts (Table 2). Thus, exposure of cells grown in 0.5 M NaCl to 1.0 M salts alone caused transport to become resistant to 3.0 M salts, but not to 4.0 M salts. Adding different complex nutrients (PPT, Casamino Acids, or yeast extract) for short periods caused a striking increase in resistance of transport to 3.0 M salts. In fact, sometimes the level of resistance was greater than the level in cells grown in 1.0 M NaCl. The active amino acids in the Casamino Acid mixture have not been identified yet. Individual amino acids (proline, L-glutamate, L-me-

TABLE 2. Effect of medium constituents on development of transport resistant to 3 and 4 M salts^a

Expt	Incubation medium	Time (h)	Relative AIB uptake ^b	
			3 M salts	4 M salts
1	0.5 M salts	2	5	3
	1.0 M salts	2	21	3
	1.0 M salts + 1% PPT	2	63	17
	1.0 M salts + 1% Casamino Acids	2	56	27
	1.0 M salts + 1% yeast extract	2	74	16
2	0.5 M salts	4	0.5	0
	1.0 M salts	4	14	0.8
	1.0 M salts + 0.2 M NH ₄ Cl	4	14	3
	1.0 M salts + 0.1 M glucose	4	32	3
	1.0 M salts + 0.1 M glucose + 0.2 M NH ₄ Cl	4	64	7
3	0.5 M salts	2	1	0
	0.5 M salts + 1 mM betaine	2	13	0.8
	1.0 M salts	2	15	1
	1.0 M salts + 1 mM betaine	2	40	52
4	1.0 M salts	2	15	0
	1.0 M salts + 50 mM betaine	2	82	32
	1.0 M salts + 50 mM choline	2	2	0.1
	1.0 M salts + 50 mM ethanolamine	2	4	0

^a Experiments were carried out as described in Table 1, footnote a.

^b AIB uptake was measured after 30 min in 1.0, 3.0, and 4.0 M salts. The treatments shown had no consistent large effects on uptake in 1.0 M salts. Relative uptake values in 3.0 and 4.0 M salts are expressed as percentages of uptake in 1.0 M salts.

TABLE 3. Effect of betaine on AIB transport at different NaCl concentrations^a

NaCl conc (M)		AIB uptake (nmol/mg [dry wt] of cells)	
Growth	Experimental	Control	+ Betaine (100 mM)
0.5	0.5	158	126
	1.0	119	119
	2.0	54	90
	3.0	8	30
	4.0	0.1	0.3
1.0	1.0	112	89
	2.0	56	72
	3.0	13	26
	4.0	6	8

^a AIB uptake was measured after 60 min of incubation. Measurements at 20 and 40 min showed similar effects of betaine. The growth medium contained 1% PPT and 0.5 or 1.0 M NaCl.

thionine, and DL-alanine) added to 1.0 M salts together with 0.1 M glucose did not increase transport resistance to 3.0 M salts. Glycerol and sucrose had no stimulatory effect on the development of salt-resistant transport when they were added to 1.0 M NaCl (data not shown).

Betaine, a substance whose involvement with salt tolerance in moderate halophiles is becoming increasingly apparent (see below), greatly stimulated development of salt-resistant transport. The chemically related compounds choline and ethanolamine did not. On the contrary, less resistance developed, even to 3.0 M salts, in the presence of these compounds than in their absence (Table 2).

Next, we performed experiments to determine whether direct addition of some of the substances tested in the experiments shown in Table 2 had any effect on AIB transport in different salt concentrations. We found (Table 3) that betaine stimulated AIB transport in 2.0 and 3.0 M salts but not in 4.0 M salts. At lower salt concentrations betaine inhibited AIB transport. Choline, ethanolamine, and the amino acids shown in Table 2 did not affect AIB transport when they were added directly to cells exposed to different salt concentrations (data not shown).

Loss of salt-resistant transport. AIB transport resistant to the highest salt concentration developed slowly when cells grown in the presence of 0.5 M NaCl were incubated in solutions containing 1.0 M NaCl. In contrast, this resistance was quickly lost when cells grown in the presence of 1.0 M NaCl were put into lower salt concentrations. Table 4 shows that this loss occurred in 0.5 M NaCl or 0.5 M KCl, but not in 1.0 M NaCl. In 1.0 M KCl, some resistance was lost, but not all. In the experiments shown in Table 4, cells

were washed twice, but in other experiments a single wash gave the same results. However, as Table 4 also shows, cells grown in 1.0 M NaCl and then exposed to 0.5 M NaCl lost little of their ability to transport AIB in 3.0 M salts.

Correlation of salt-resistant transport with internal solute concentrations. Although all of the internal solutes of *V. costicola* have not been accounted for, we thought that some index of the internal solute concentrations in *V. costicola* cells might be obtained by measuring the salt concentrations required to prevent lysis, as was done by Christian and Ingram (1). We measured lysis both by the loss of turbidity (optical density at 650 nm) and by the release of UV (260 nm)-absorbing substances from the cells; the latter method was found to be more precise for determining the salt concentration at which lysis occurred. Figure 3 shows the method used to calculate this lysis point and also shows that cells grown in the presence of 1.0 M NaCl had a higher lysis point than cells grown in the presence of 0.5 M NaCl, as expected (1).

When cells grown in the presence of 0.5 M NaCl were incubated in 1.0 M NaCl containing PPT for 2 h or more, the lysis point increased substantially, usually twofold or more. When cells grown in the presence of 0.5 M NaCl were incubated in 1.0 M salts with or without glucose and ammonium chloride (as in Table 1), the lysis point remained unchanged in some experiments; in others, it rose 50 to 70%. When cells grown in 1.0 M NaCl were diluted in 0.5 M salts, the lysis point decreased about 30%.

Even when there was no increase in the lysis point, cells incubated in 1.0 M salts developed

TABLE 4. Loss of salt-resistant transport by cells grown in 1.0 M NaCl^a

Expt	Incubation medium	Relative AIB uptake ^b	
		3 M salts	4 M salts
1	1.0 M salts		23
	0.5 M salts		0.7
	1.0 M KCl		16
	0.5 M KCl		0.8
2	1.0 M salts	26	14
	0.5 M salts	33	1

^a In experiment 1, cells were washed twice and suspended in salts solution before being assayed for AIB transport in 1.0, 3.0, and 4.0 M salts. The salts and KCl solutions used were the same as those used in the experiments shown in Table 1. AIB uptake was measured after 60 min. In experiment 2, cells were incubated for 4 h in the incubation medium, and AIB uptake was measured after 30 min.

^b Relative uptake values in 3.0 and 4.0 M salts are expressed as percentages of uptake in 1.0 M salts.

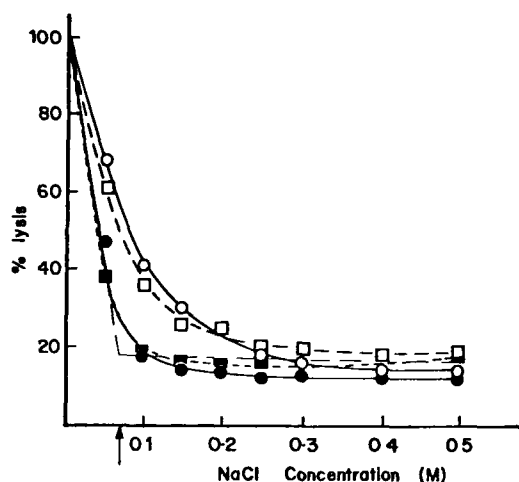


FIG 3 Measurement of lysis point values. Cells grown in 1% PPT containing 0.5 or 1.0 M NaCl were washed in the same salt concentration as the growth medium, incubated for 2 h in 1% PPT containing 0.5 or 1.0 M NaCl, washed in the same salt concentration as the incubation medium, and suspended in different NaCl concentrations. Lysis was determined by the release of UV (260 nm)-absorbing material, 100% lysis was defined as the lysis occurring in distilled water. The lysis point was defined as the point of intersection of extensions of the descending and stationary curves, such an extension is shown on one curve of the graph. Symbols: ■ cells grown in 0.5 M NaCl and incubated in 0.5 M NaCl (lysis point, 0.065 M), □, cells grown in 0.5 M NaCl and incubated in 1.0 M NaCl (lysis point, 0.105 M), ● cells grown in 1.0 M NaCl and incubated in 0.5 M NaCl (lysis point, 0.070 M), ○, cells grown in 1.0 M NaCl and incubated in 1.0 M NaCl (lysis point, 0.13 M).

transport resistant to 3.0 M salts, but not to 4.0 M salts. Our experiments, in which we used an admittedly crude method for estimating internal solute concentrations, suggested that higher internal solute concentrations are needed for re-

sistance to 4.0 M salts than for resistance to 3.0 M salts.

Effects of salts on respiration of *V. costicola*. We thought that high salt concentrations or the lack of Na^+ ions might inhibit transport by interfering with the energy supply. Accordingly, the effects of different salts on respiration were measured.

Table 5 shows the effects of different salt concentrations on the respiration of cells grown in 0.5 or 1.0 M NaCl. Endogenous respiration was somewhat more sensitive in the former cells than in the latter. Thus, for cells grown in 0.5 M NaCl, the endogenous respiration in 4.0 M salts was 13% of the endogenous respiration in 1.0 M salts, for cells grown in 1.0 M NaCl, the corresponding value was 27%. This difference is less striking than the difference in AIB transport, which was virtually eliminated by 4.0 M salts in 0.5 M NaCl grown cells. This suggests that the highest salt concentration does not act primarily by inhibiting respiration.

These experiments also showed (Table 5) that there was a large difference in the salt sensitivity of respiration of substrates by the two kinds of cells. The higher salt concentrations had much stronger inhibitory effects on respiration (as measured by the difference between respiration in the presence of the substrate and endogenous respiration) of glucose and succinate by cells that had been grown at the lower salt concentration than on respiration by cells that had been grown at the higher salt concentration. In 3.0 M salts and possibly in 4.0 M salts, some oxidation of glucose and succinate occurred in the 1.0 M NaCl grown cells but not in the 0.5 M NaCl-grown cells. Glycerol oxidation was about equally salt sensitive in the two kinds of cells.

Table 5 also shows that endogenous respiration and respiration of substrates (with the exception of succinate) were approximately the same in 1.0 M KCl as in 1.0 M NaCl. Thus, the inability of cells to transport AIB in 1.0 M KCl

TABLE 5 Effect of salts on respiration of *V. costicola*

Concn of NaCl in growth medium (M)	Experimental conditions	Respiration (μg of O_2 used per min per mg [dry wt]) ^a			
		Endogenous	Glucose	Succinate	Glycerol
0.5	0.5 M NaCl	1.14 $\pm$ 0.14	1.66 $\pm$ 0.03	4.44 $\pm$ 0.13	2.60 $\pm$ 0.22
	1.0 M NaCl	0.78 $\pm$ 0.09	1.14 $\pm$ 0.01	3.82 $\pm$ 0.07	2.24 $\pm$ 0.09
	3.0 M NaCl	0.17 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02	0.54 $\pm$ 0.11
	4.0 M NaCl	0.10 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.05
1.0	1.0 M NaCl	0.74 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.04	3.74 $\pm$ 0.15	1.46 $\pm$ 0.07
	3.0 M NaCl	0.34 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.08	0.60 $\pm$ 0.03
	4.0 M NaCl	0.20 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.05
	1.0 M KCl	0.86 $\pm$ 0.02	1.11 $\pm$ 0.09	2.33 $\pm$ 0.15	1.69 $\pm$ 0.20

^a Mean results of two experiments are shown $\pm$ standard deviation of the mean. Endogenous values were not subtracted from oxidation rates in the presence of substrates. Cells (0.20 to 0.25 mg [dry weight] per ml) were assayed in the salt solution shown supplemented with 20 mM D-glucose, sodium succinate, or glycerol.

(Fig. 1) was not due to a failure of the cells to respire.

DISCUSSION

Transport studies with *V. costicola* and other halophilic and salt-tolerant microorganisms may prove to be valuable for studying mechanisms of salt tolerance, which have generally attracted less attention than mechanisms of salt requirement.

V. costicola has an active transport system for AIB, which requires substantial concentrations of Na^+ ions. Endogenous respiration in these bacteria, which provides energy for transport, takes place as well in 1.0 M KCl as in 1.0 M NaCl and may not require Na^+ ions. (The possibility that small amounts of NaCl present as contaminants in KCl are needed for respiration has not been excluded.) Drapeau and MacLeod (2) found that the Na^+ requirement for AIB transport in *A. haloplanktis* (*Pseudomonas* B16) was considerably higher than the Na^+ requirement for respiration. In this organism, as in *V. costicola*, the Na^+ requirement for transport is not primarily due to the effect of this ion on respiration. Niven and MacLeod (14) showed that there is a sodium ion-proton antiport system in *A. haloplanktis*, which is involved in the transport of K^+ ions and presumably other substances. We suspect that such a system also exists in *V. costicola*.

AIB transport in *V. costicola* is very salt tolerant. It is little affected by 2.0 M NaCl and may still continue in 3.0 and 4.0 M NaCl. One of our major findings is that the response to higher salt concentrations changes according to the salt concentration at which the cells are grown. This was one of the first examples within one microorganism of adaptation of a physiological process to growth at different salt concentrations (10).

Differences in salt tolerance of transport seem to be correlated with differences in salt tolerance of growth in other microorganisms. Lindman (11, 12) recently showed that more salt-tolerant yeast species could transport glucosamine at higher NaCl concentrations than less salt-tolerant species.

While our work was in progress, Peleg et al. (15) reported that cells of the moderately halophilic, halotolerant bacterium *Ba₁* grown in 2.0 M salt could transport proline at considerably higher salt concentrations than cells grown in 0.2 M salt. These authors suggested that transport inhibition by high salt concentrations in the latter cells was due to plasmolysis and supported this with electron micrographs.

Preliminary electron microscope studies with *V. costicola* have shown that considerable plasmolysis occurs when cells grown in 0.5 or 1.0 M

NaCl are placed in 3.0 or 4.0 M salts. However, the degree of plasmolysis seemed to be the same for the cells grown in low and high salt concentrations. We considered the possibility that plasmolysis damaged the transport system, but found that this did not occur.

An adaptation of AIB transport to growth of *Halomonas elongata* in different NaCl concentrations has been found very recently (E. Martin, T. Duryea, R. Vreeland, L. Hilsabeck, and C. Davis, unpublished data). This type of microbial adaptation may be widespread.

Probably our own most interesting finding is that salt-resistant transport develops in non-growing cells by a process that apparently does not involve protein synthesis; this development occurs in a few hours and is not inhibited by chloramphenicol or other antibiotics. We distinguished two levels of resistance, resistance to 3.0 M NaCl and resistance to 4.0 M NaCl. The first level developed in 0.5 M NaCl-grown cells when these cells were placed in 1.0 M NaCl alone, was not always accompanied by increased levels of intracellular solutes, as measured by lysis point experiments, and was not lost when 1.0 M NaCl-grown cells were placed in 0.5 M NaCl. The second, higher level of resistance developed more slowly, required nutrients in addition to 1.0 M NaCl, was quickly lost when 1.0 M NaCl-grown cells were placed in 0.5 M NaCl or KCl, and seemed to require an increased level of intracellular solutes.

We are considering the possibility that resistance to the highest NaCl concentration (4.0 M) is due to an overall increased concentration of intracellular solutes. We still do not know what these solutes are. Shindler et al. (16) found that the levels of Na^+ and K^+ ions increased with the external Na^+ concentration of the growth medium, to give values roughly equal to this concentration; however, there is some doubt that these ions exist as free ions in the cytoplasm (9, 20). In certain microorganisms the levels of internal polyols and amino acids increase with increasing external salt concentration (9, 13, 18). We have found no polyols in *V. costicola* and no consistent changes in concentrations of free amino acids at different external salt concentrations (K. Hanna and D. J. Kushner, unpublished data).

Could one or a few solutes be especially important in the development of salt-resistant transport? Betaine is of special interest here; we found that this substance was very effective in the development of salt-resistant AIB transport (Table 2). Furthermore, simply adding betaine stimulated transport of AIB at high salt concentrations, although betaine inhibited such transport at lower salt concentrations (Table 3).

Betaine seems to be involved in salt tolerance

in other bacteria. Shkedy-Vinkler and Avi-Dor (17) have shown that betaine can stimulate respiration of succinate and other substances by the halophilic bacterium Ba₁ in high salt concentrations. (However, we are not certain whether this is an effect on respiration or an effect on transport [see below].) Very recently Galinski and Trüper (5) found that intracellular betaine concentrations varied directly with the NaCl concentration of the growth medium for the halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*.

We still cannot explain the easy acquisition of resistance to 3.0 M NaCl. Our results could suggest that a gradual increase in salt concentration (i.e., from 0.5 to 1.0 to 3.0 M) is less inhibitory than a direct increase from 0.5 to 3.0 M. If this were so, however, we would expect that resistance to 3.0 M NaCl would be lost when 1.0 M NaCl-grown cells were placed in 0.5 M NaCl. This did not occur.

In the experiments on AIB transport described above, cells were incubated without added substrate and obtained the necessary energy from endogenous respiration. The highest NaCl concentrations permitted cells grown in the presence of 0.5 M NaCl to respire. Of course, this does not prove that this respiration generated energy in a form that could be used for transport; in fact, the cells no longer transported AIB.

Oxidation of glucose and oxidation of succinate were at least as sensitive to high salt concentrations as AIB transport was. This was especially evident in the 0.5 M NaCl-grown cells, in which high salt concentrations completely inhibited oxidation of these substrates, although they did not completely inhibit endogenous respiration. This suggests that transport may be involved in respiration of these substrates. In *A. haloplanktis*, it has been shown that oxidation of a number of substrates is Na⁺ dependent, primarily because this ion is needed for the transport of these substrates (R. Droniuk and R. A. MacLeod, manuscript in preparation). Further experiments on the energetics of transport by *V. costicola* at different salt concentrations are now being carried out.

We have also considered the possibility that salt-resistant transport is associated with changes in membrane composition. Lipids do change in a number of halophilic bacteria when they are grown in different salt concentrations (7, 8). However, Peleg et al. (15) found no changes in lipid composition or in lipid-to-protein ratios in membranes of strain Ba₁ grown in high or low concentrations. We have found that growing *V. costicola* in higher salt concentrations leads to a decrease in the proportion of phosphatidylethanolamine and an increase in the

proportions of phosphatidylglycerol and cardiolipin (M. Kogut, M. Kates, K. Hanna, and D. J. Kushner, unpublished data). The system described above should permit us to investigate the relationship, if any, between lipid composition and salt-resistant transport.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to D J K and R A M. Part of this work was carried out at the Macdonald Campus of McGill University while D J K was on sabbatical leave from the University of Ottawa.

LITERATURE CITED

- 1 Christian, J. H. B., and M. Ingram. 1959 Lysis of *Vibrio costicola* by osmotic shock. *J Gen Microbiol* 20:32-42.
- 2 Drapeau, G. R., and R. A. MacLeod. 1963 Na⁺-dependent active transport of α-aminoisobutyric acid into cells of a marine pseudomonad. *Biochem Biophys Res Commun* 12:111-115.
- 3 Drapeau, G. R., T. I. Matula, and R. A. MacLeod. 1966 Nutrition and metabolism of marine bacteria. XV Relation of Na⁺-activated transport to the Na⁺ requirement of a marine pseudomonad for growth. *J Bacteriol* 92:63-71.
- 4 Forsyth, M. P., and D. J. Kushner. 1970 Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria. *Can J Microbiol* 17:825-828.
- 5 Galinsky, E. A., and H. G. Trüper. 1982 Betaine, a compatible solute in the extremely halophilic phototrophic bacterium *Ectothiorhodospira halochloris*. *FEMS Microbiol Lett* 13:357-360.
- 6 Hipkiss, A., D. Armstrong, and D. J. Kushner. 1980 Protein turnover in a moderately halophilic bacterium. *Can J Microbiol* 26:196-203.
- 7 Kanemasa, Y., T. Yoshioka, and H. Hayashi. 1972 Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim Biophys Acta* 280:444-450.
- 8 Komarata, P., and M. Kates. 1975 The lipid composition of a halotolerant species of *Staphylococcus epidermidis*. *Biochim Biophys Acta* 398:464-484.
- 9 Kushner, D. J. 1978 Life in high salt and solute concentrations. halophilic bacteria, p. 317-368. In D. J. Kushner (ed.), *Microbial life in extreme environments*. Academic Press, Inc., London.
- 10 Kushner, D. J. 1980 Extreme environments, p. 29-54. In D. C. Ellwood, M. J. Latham, J. N. Hedger, and J. M. Lynch (ed.), *Contemporary microbial ecology*. Academic Press, Inc., London.
- 11 Lindman, B. 1981 D-Glucosamine uptake by yeasts differing in halotolerance. *FEMS Microbiol Lett* 10:379-382.
- 12 Lindman, B. 1981 Effect of NaCl on the kinetics of D-glucosamine uptake in yeasts differing in halotolerance. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* 47:297-306.
- 13 Measures, J. C. 1975 Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature (London)* 257:398-400.
- 14 Niven, D. F., and R. A. MacLeod. 1978 Sodium ion-proton antiport in a marine bacterium. *J Bacteriol* 134:737-743.
- 15 Peleg, E., A. Tietz, and I. Friedberg. 1980 Effects of salts and ionophores on proline transport in a moderately halophilic halotolerant bacterium. *Biochim Biophys Acta* 596:118-128.
- 16 Shindler, D. B., R. M. Wydro, and D. J. Kushner. 1977 Cell-bound cations of the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola*. *J Bacteriol* 130:698-703.
- 17 Shkedy-Vinkler, C., and Y. Avi-Dor. 1975 Betaine induced stimulation of respiration at high osmolarities in a

- halotolerant bacterium *Biochem J* 150:219-226
- 18 Unemoto, T., and M. Hayashi. 1979 Regulation of internal solute concentrations of marine *Vibrio alginolyticus* in response to external NaCl concentration *Can J Microbiol* 25:922-926
- 19 Wydro, R. M., M. Kogut, and D. J. Kushner. 1975 Salt response of the ribosomes of a moderately halophilic bacterium *FEBS Lett* 60 210-215
- 20 Wydro, R. M., W. Madara, T. Hiramatsu, M. Kogut, and D. J. Kushner. 1977 Salt-sensitive *in vitro* protein synthesis by a moderately halophilic bacterium *Nature (London)* 269:824-825

Proton Motive Force and Na^+/H^+ Antiport in a Moderate Halophile†

FRANCETTE HAMAIDE,¹ DONN J. KUSHNER,¹ AND G. DENNIS SPROTT^{2*}

Department of Biology, University of Ottawa, Ottawa, Canada K1N 6N5¹ and Division of Biological Sciences, National Research Council of Canada, Ottawa, Canada K1A 0R6²

Received 31 May 1983/Accepted 24 August 1983

The influence of pH on the proton motive force of *Vibrio costicola* was determined by measuring the distributions of triphenylmethylphosphonium cation (membrane potential, $\Delta\psi$) and either dimethyloxazolidinedione or methylamine (osmotic component, ΔpH). As the pH of the medium was adjusted from 5.7 to 9.0, the proton motive force steadily decreased from about 170 to 100 mV. This decline occurred, despite a large increase in the membrane potential to its maximum value at pH 9.0, because of the loss of the pH gradient (inside alkaline). The cytoplasm and medium were of equal pH at 7.5; membrane permeability properties were lost at the pH extremes of 5.0 and 9.5. Protonophores and monensin prevented the net efflux of protons normally found when an oxygen pulse was given to an anaerobic cell suspension. A Na^+/H^+ antiport activity was measured for both Na^+ influx and efflux and was shown to be dissipated by protonophores and monensin. These results strongly favor the concept that respiratory energy is used for proton efflux and that the resulting proton motive force may be converted to a sodium motive force through Na^+/H^+ antiport (driven by $\Delta\psi$). A role for antiport activity in pH regulation of the cytosol can also explain the broad pH range for optimal growth, extending to the alkaline extreme of pH 9.0.

Vibrio costicola is a moderately halophilic bacterium which requires 1 M NaCl for optimal growth (13) and lyses in media of low osmotic strength (9). Lysis can be prevented by salts other than NaCl, but there is a specific Na^+ requirement for carrier-mediated transport (24). Understanding the specific requirement for Na^+ in transport requires knowledge of the electrochemical ion gradients in *V. costicola*.

A transmembrane proton motive force ($\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$) may be established in various microorganisms by proton efflux by using respiratory energy, light energy in photosynthetic organisms or extreme halophiles, or the energy from ATP hydrolysis (15, 36), resulting in a membrane potential ($\Delta\psi$, interior negative) and an osmotic component (ΔpH , interior alkaline) such that in millivolts, $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} = \Delta\psi - 60 \cdot \Delta\text{pH}$, at 30°C (30). Energy may be released from the osmotic component by proton-symport mechanisms in medium more acidic than the internal pH (pH_i); at a higher pH of the medium (pH_0), the cytosol is more acidic than the medium, so $\Delta\psi$ must compensate for the inverse pH gradient.

In certain bacteria, a sodium motive force may be formed by several mechanisms, resulting from the outward-directed movement of Na^+

First, the energy of the proton motive force may be converted to a sodium motive force through Na^+/H^+ antiport activity as found in *Alteromonas haloplanktis* (33), *Halobacterium halobium* (26), alkalophilic bacilli (29), *Mycoplasma mycoides* (6), and others, including *Escherichia coli* (4, 44) (for a review, see reference 25). In addition to a role in energy coupling, antiport activity may be involved in regulation of cytosolic pH (34). Second, in *Klebsiella aerogenes*, efflux of Na^+ through the membrane is driven by the Na^+ -requiring membrane-bound enzyme oxaloacetate decarboxylase (12). The methylmalonyl-coenzyme A decarboxylase of *Micrococcus lactilyticus* (14, 18) and the glutaconyl-coenzyme A decarboxylase from the anaerobe *Acidaminococcus fermentans* (8) appear to have similar properties. Third, a Na^+ -stimulated ATPase activity may be linked to Na^+ efflux, as in *M. mycoides* (5, 6), *Acholeplasma laidlawii* (20), and *Streptococcus faecalis* (17). Fourth, in *Vibrio alginolyticus* in alkaline medium, a Na^+ efflux system driven directly by respiration (without intermediary H^+ efflux) and insensitive to protonophores can establish a sodium motive force and $\Delta\psi$ (43). As a final example, halorhodopsin was considered to be an outward-directed Na^+ pump in *H. halobium* but is now identified as a light-driven inward-directed chloride

† National Research Council of Canada paper no. 22690.

pump (38) The sodium gradient in *H. halobium* is thus established solely through Na^+/H^+ antiport activity (38)

As part of a larger study on the energetics of Na^+ -dependent carrier-mediated transport and salt tolerance in *V. costicola* (24), we measured the effect of pH_0 on the proton motive force and identified a Na^+/H^+ antiport activity We present evidence here that the antiporter is involved in regulation of the cytosolic pH

MATERIALS AND METHODS

Bacterial cultures. *V. costicola* NRCC 37001 was grown in 500-ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml of medium and was shaken on a rotary shaker at 30°C The growth medium included 1% (wt/vol) Difco Proteose Peptone no. 3 (Difco Laboratories, Detroit Mich.), 1% (wt/vol) tryptone (Difco), and 1.0 M NaCl (final pH 7.6) (13)

At the end of the exponential phase of growth (16 to 18 h), bacteria at a cell density of 1 to 1.5 mg (dry weight) per ml were washed twice with a salt solution of 1.0 M NaCl, 8 mM KCl, 0.4 mM MgSO_4 , 0.2 mM KH_2PO_4 , and 50 mM Tris-hydrochloride buffer (final pH 7.2) and were suspended in this solution to the densities indicated For salt solutions of different pH values, MES [2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid]-KOH (50 mM) was used for pH values lower than 7.6, and Tris-hydrochloride (50 mM) was used for pH values higher than 7.2

For investigating Na^+/H^+ antiport, bacteria were washed and incubated in 1 mM Tris (pH 7.5) containing 1.0 M KCl, 0.4 mM MgSO_4 , 0.2 mM KH_2PO_4 , and 50 mM KSCN The bacterial suspension (4 mg [dry weight] per ml) was stored on ice before being used, it could be kept like this for up to 6 h without any measurable change in activity

Measurement of intracellular volume. The space in a packed cell pellet penetrated by [^{14}C]inulin (0.2 mg/ml, 2.5 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$), [^3H]raffinose (0.1 mM, 0.54 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$), or [^{14}C]urea (0.1 mM, 1.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) was compared with the total space measured gravimetrically (28) Radioactive markers were added to 5 ml of bacterial suspension (about 2 mg [dry weight] per ml) in the salt solution used to wash the bacteria After 15 to 20 min of incubation at room temperature, tubes were centrifuged (10 min, 7,700 $\times g$), and the radioactivity of the extracts and supernatants was determined as described (19)

The dry weight of bacteria was determined after drying to constant weight at 62°C, ashing for 6 h at 550°C, and correcting for the weight of salt in the ashed material No difference in dry weight was found if cells were dried in a vacuum oven

Measurement of ΔpH . Intracellular pH was measured by the distribution between the intracellular space of the bacteria and the medium of a weak acid, [^{14}C]DMO (5,5-dimethyl 2,4-oxazolidinedione), or of a weak base [^{14}C]methylamine (37) Bacteria (1.1 mg [dry weight] per ml) were incubated with constant shaking at 30°C for 20 min in solutions of different pH values before adding either DMO (2.6 μM , 55.4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) at $\text{pH}_0 \leq 7.6$ or methylamine (8.92 μM , 56 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) at $\text{pH}_0 \geq 7.6$ After 20 min of further incubation, 1.5 ml samples of the bacterial suspension were centrifuged in a Microfuge (2 min 13,000 $\times g$), and the

pellets were extracted with 1 M HClO_4 The radioactivity of the extracts and that of the supernatants diluted 10 times with 1 M HClO_4 were determined in 5 ml of Aquasol Cells at pH_0 7.2 were incubated with urea (0.1 mM, 1.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) to determine the intracellular plus extracellular space in the cell pellets It was assumed that intracellular space would not change with pH_0 The pH of each supernatant was measured with an Orion digital pH meter pH_i was calculated for DMO by the formula of Mitchell et al. (32) with 6.3 as the pK_a of DMO (1), for methylamine, pH_i was calculated by the method of Maloney et al. (28) The ΔpH represents the difference between pH_i and the external pH

Measurement of $\Delta\psi$. $\Delta\psi$ was determined at 30°C by measuring the accumulation of a lipophilic cation, triphenylmethylphosphonium (TPMP⁺), in the presence of the anion tetraphenylboron (TPB⁻) The bacteria (0.5 mg [dry weight] per ml) were incubated for 20 min in the salt solution before the addition of [^3H]TPMP⁺ (10 μM , 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$) and 2 μM TPB⁻ Samples of 0.5 ml were then filtered on 0.45 μm Millipore filters (Millipore Corp., Bedford, Mass.) which had previously been soaked in 10 μM TPMP⁺ (41) and immediately washed with 5 ml of a solution identical to the incubation solution except that it contained no TPMP⁺ or TPB⁻ The results were erratic if the wash was omitted Nonspecific accumulations of TPMP⁺ by the cells and filter were corrected for by subtracting the counts associated with cells filtered immediately upon addition of [^3H]TPMP⁺ in the absence of TPB⁻ The filters were solubilized at least 12 h in 5 ml of Aquasol before radioactivity was measured $\Delta\psi$ was calculated from the Nernst equation, where $\Delta\psi = 60 \log (\text{TPMP}^+_{\text{in}}/\text{TPMP}^+_{\text{out}})$ (36) The total proton motive force was calculated by replacing $\Delta\psi$ and ΔpH by their values in the equation $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+} = \Delta\psi - Z\Delta\text{pH}$ where $Z = 60 \text{ mV}$ at 30°C (30)

Metabolic changes of different markers. Bacteria were incubated with labeled compounds for 20 min at the optimal pH for the accumulation of DMO (5.5) or methylamine (9.2), and with urea and raffinose as indicated above The bacteria were then centrifuged, and the supernatant (S₁) was retained The pellets were treated with 0.1 ml of *n*-butanol for 15 min at 80°C Next, 0.3 ml of water was added, and the mixture was held at 80°C for an additional 15 min (19) The suspension was recentrifuged, and the second supernatant (S₂) was removed The supernatants (S₁ and S₂) were examined by thin-layer chromatography as follows (i) Urea silica gel G, 250 μm thick (Mandel Scientific Co., Ltd., Rockwood, Ontario), solvent, chloroform-methanol-water (70:50:10, vol/vol) (ii) Raffinose silica gel 60, 250 μm thick (BDH Chemicals Canada, Ltd., Toronto, Ontario), previously treated with 4 g of NaHSO_3 in 80 ml of water and 120 ml of ethanol, dried in air, and activated at 100°C for 30 min (11), solvent, ethyl acetate-methanol-acetic acid-water (60:15:15:10, vol/vol) (iii) DMO silica gel G, 250 μm thick (Mandel), solvent, chloroform-methanol (90:10, vol/vol) (iv) Methylamine cellulose 100 μm thick (Brinkmann Instruments Canada Ltd., Rexdale, Ontario), solvent, isopropanol-ethanol-water-hydrochloride (75:75:45:5, vol/vol) The R_f values of authentic labeled compounds urea, raffinose, DMO, and methylamine were 0.62, 0.07, 0.77, and 0.57, respectively as shown by autoradiography

Evidence for Na^+/H^+ antiport. The reaction vessel described by Patel and Agnew (35) was connected via a gas-tight seal to a H^+ electrode. Two hypodermic needles inserted through the fluted butyl-rubber serum stopper of the sampling port permitted a continuous flow of N_2 to circulate through the reaction vessel. Bacterial suspensions were injected through the serum stopper (5 ml, 0.4 mg [dry weight] per ml), and 100 μg of carbonic anhydrase was added (33). Samples were stirred magnetically at room temperature for 30 to 60 min, during which the pH was adjusted to 7.5 by injections of oxygen-free HCl or KOH. This adjustment was done to obtain bacterial cells with minimal or no transmembrane pH difference.

Solutions added (50 μl) contained the test compound (KCl, choline chloride, NaCl, or LiCl) at 2.5 M, each prepared with 0.4 mM MgSO_4 and 0.2 mM KH_2PO_4 . The solutions were saturated with nitrogen or oxygen in closed 60-ml serum bottles, and the pH was adjusted with HCl or KOH to match the pH of the cell suspension.

Effects of the uncouplers CCCP (carbonylcyanide *m* chlorophenylhydrazone) and TCS (3,3',4',5-tetrachlorosalicylanilide) and that of monensin were studied by incubating the bacteria in their presence for 20 min at 30°C at a final concentration of 20 μM before placing the suspensions in the reaction vessel. Because *V. costicola* can use ethanol as a source of electrons in respiration, the inhibitors were added as methanolic solutions.

For a control, 20 μl of *n*-butanol was added to a 5 ml suspension of cells, which was then heated at 85°C for 30 min. Traces of DNase and RNase were added to reduce the viscosity before placing the treated cells in the reaction vessel.

Optimum pH for growth. *V. costicola* was grown in the complex medium already described with a NaCl content of 1 M and with 0.06% (wt/vol) polypropylene glycol as antifoam. A 3-liter water-jacketed vessel (Pegasus Industrial Specialties, Ltd., Scarborough, Ontario) containing 2 liters of medium was maintained at 30°C. Saturation of the medium with oxygen was ensured by supplying oxygen (100%) at 130 ml/min and dispersing with a Vibromixer (Pegasus). The pH was regulated automatically by injections of NaOH (2 N), with variations of less than 0.05 pH units. Inocula consisted of 20 ml of a late-logarithmic growth phase culture (24 mg, dry weight). Generation times were calculated from measurements of optical density at 660 nm measured hourly for 8 h. Separate growth curves were obtained for each pH tested.

Reagents. [$2\text{-}^{14}\text{C}$]DMO, [^{14}C]urea, [$\text{methyl-}^3\text{H}$]TPMP $^+$, [$\text{carboxyl-}^{14}\text{C}$]inulin, [^3H]raffinose, and Aquasol were purchased from New England Nuclear of Canada, Lachine, Quebec, Canada. [^{14}C]methylamine was supplied by Amersham, Oakville, Ontario, Canada. Carbonic anhydrase (2,100 U/mg), tetraphenylboron, DNase, RNase, and CCCP were from Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. TCS was from Fisher Scientific Co., Nepean, Ontario, Canada. Monensin was a gift from Eli Lilly Canada, Inc., Toronto, Ontario.

RESULTS

Intracellular volume. The effectiveness of different probes in estimating the intracellular vol-

ume of *V. costicola* was compared by measuring the space in a packed cell pellet to which a series of labeled compounds had access. As a reference, the total water space in the pellet was measured gravimetrically. Urea penetrated the cytoplasm completely, whereas both raffinose and inulin occupied about $59 \pm 7\%$ of the available space in the pellet. [^{14}C]urea penetrations gave less variable results than the gravimetric method and were preferred. Raffinose was chosen instead of inulin as a nonpermeant marker because it is a smaller molecule and may pass more freely through the outer membrane of *V. costicola*. Although raffinose and inulin gave comparable results after growth and suspension in solutions containing 1 M NaCl, raffinose may be preferred if the cytoplasmic membrane is shrunk from the outer wall, as happens upon suspension in 3 or 4 M NaCl solutions (24). Sucrose could not be used since *V. costicola* was able to grow with sucrose as the sole carbon and energy source (data not shown). The measurement of intracellular volume calculated from the difference between the space available to urea and raffinose was $1.81 \pm 0.22 \mu\text{l}/\text{mg}$ (dry weight, nine separate measurements).

Thin-layer chromatography of supernatants and cell extracts revealed that urea, raffinose, methylamine, and DMO (used in a later section) were not metabolized. We also found that *V. costicola* was incapable of utilizing inulin as a growth substrate.

Proton motive force. When cells were incubated in air, both components of $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ were affected by the pH_0 of the medium (Fig. 1). The chemical potential ($60 \cdot \Delta\text{pH}$) declined to 0 as pH_0 was increased to 7.5, whereas $\Delta\psi$ steadily increased to a maximum value of 160 to 170 mV at pH_0 9.0. Respiration rates were highest also at pH_0 9.0 (manuscript in preparation). However, this increase in $\Delta\psi$ was insufficient to compensate for the loss of the pH gradient (inside alkaline), and the total $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ declined from 168 to 95 mV as the pH_0 was adjusted from 5.5 to 9.0. *V. costicola* is capable of maintaining a fairly constant pH_i , which increased from 6.9 to 8.0 when the pH_0 was raised from 5.1 to 9.2.

Accumulation of the weak acid, DMO, or the weak base, methylamine, takes place over a wide range of pH_0 . *V. costicola* lyses at pH_0 values below 5.0 and greater than 9.5; lysis is manifested by an immediate clearing of the turbid suspension. At pH_0 7.5, when the pH gradient is 0 according to methylamine distribution, a small amount of DMO uptake occurs (equivalent to 120% penetration). This low level of uptake is probably caused by nonspecific binding of the label.

Measurements of $\Delta\psi$ were conducted with TPMP $^+$ in the presence of a hydrophobic anion,

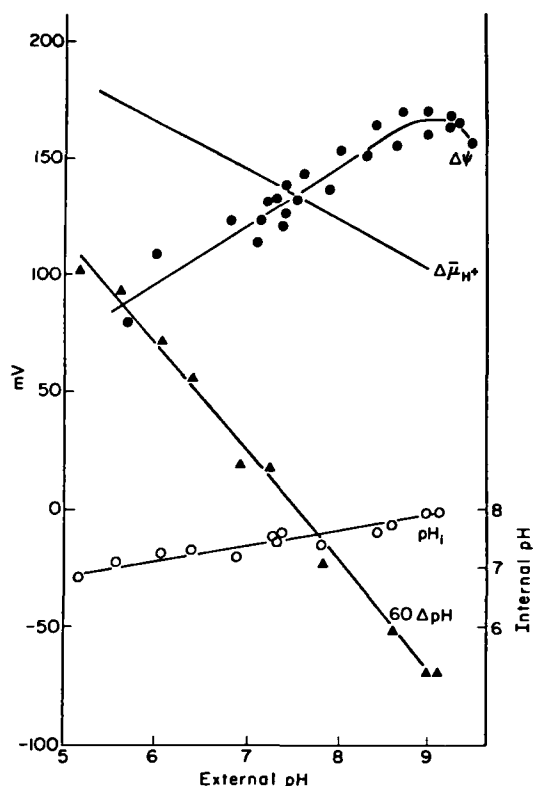


FIG 1 Influence of pH_0 on the proton motive force of *V. costicola*. $\Delta\psi$ was measured with $[^3H]TPMP^+$ plus TPB^- , and ΔpH was measured with $[^{14}C]DMO$ and $[^{14}C]$ methylamine as described in the text. The composition of the buffer systems (which contain 1 M NaCl) is described in the text. The chemical potential ($60 \Delta pH$) and $\Delta\psi$ were summed to calculate $\Delta\mu_{H^+}$ in mV.

TPB⁻ The anion promoted an initial rapid uptake of $TPMP^+$, but in the steady state (10 to 20 min) almost no effect of tetraphenylboron was evident (data not shown). Certain bacteria require the counterion for the uptake of $TPMP^+$ (19, 21), others do not (16). Tetraphenylphosphonium was not used because it gave very high nonspecific binding as determined by rapid filtrations after mixing of cells and label. Separate experiments showed that uptake of ^{86}Rb in valinomycin-treated cells (3) could not be used to measure $\Delta\psi$ since valinomycin appears to be ineffective with *V. costicola* (results not shown).

Inhibitor effects on $\Delta\psi$. Inhibition of respiration in this obligate aerobe by KCN (10 mM) or *N*-ethylmaleimide (10 mM) caused a dramatic decline in $\Delta\psi$ (80 to 92% inhibitions). The ionophores (20 μM) nigericin, monensin, CCCP, and TCS caused inhibitions in $\Delta\psi$ after 20-min treatments of 97, 60, 68, and 72%, respectively (manuscript in preparation). All of these effects were measured with a pH_0 of 8.5 to 8.8.

Na⁺/H⁺ antiport. *V. costicola* can use the energy of respiration for proton efflux at alkaline pH_0 . When the bacteria were incubated anaerobically in a solution containing 1.0 M KCl to prevent lysis (9) and to maintain equal osmolarity to the growth medium, an oxygen pulse was followed by a rapid acidification of the medium (Fig. 2). The incubation medium also contained KSCN. The freely permeable SCN^- ions can rapidly compensate for the charge created by movement of ions across the membrane and thus prevent the development of an appreciable $\Delta\psi$ (31). As the oxygen was consumed, protons were reabsorbed by the bacteria, and the pH_0 returned to its original value. The acidification of the medium in response to an oxygen pulse was prevented by protonophores (CCCP, TCS), monensin, and butanol.

If, however, the bacteria were preincubated with NaCl before the oxygen pulse was given, a

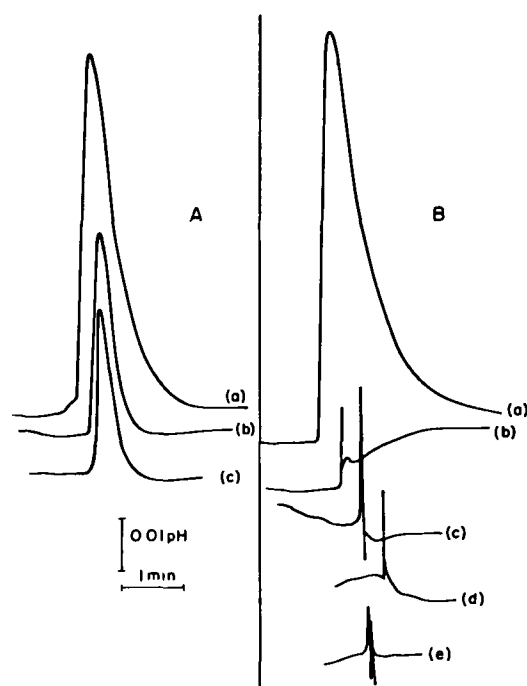


FIG 2 Influence of NaCl and inhibitors on respiration-linked proton efflux in *V. costicola*. Proton efflux was measured with a H^+ electrode as the increase in acidity resulting from injections of oxygen saturated 2.5 M KCl to anaerobic cell suspensions. (A) Anaerobic cell suspensions were incubated in salt solution (pH_0 7.5) containing 1 M KCl and either no NaCl (a), 25 mM NaCl (b), or 50 mM NaCl (c). (B) Anaerobic cell suspensions in the same salt solution (pH_0 7.5) containing 1 M KCl (but no NaCl) were preincubated 20 min at 30°C with inhibitors before the oxygen pulse: (a) methanol control, 47 mM; (b) CCCP, 20 μM ; (c) TCS, 20 μM ; (d) monensin, 20 μM ; (e) butanol treatment as described in the text.

smaller response which decayed more rapidly was noted. The half-times for decay (Fig 2A) were 3.2 s (curve a), 1.8 s (curve b), and 1.4 s (curve c) for NaCl concentrations of 0, 25, and 50 mM, respectively. Previously, it was shown that respiration rates were similar at external concentrations of NaCl of 0 and 1.0 M (24). These results suggest that a Na^+/H^+ antiporter is functioning, causing the reabsorption of protons coupled with an exit of Na^+ . The rate of antiport activity increased as a function of the concentration of Na^+ present in the anaerobic preincubation medium (no transmembrane Na^+ gradient is expected in anaerobic cells [33, 45]) to a maximum rate at 40 mM NaCl.

Na^+/H^+ antiport can also be demonstrated by injecting NaCl anaerobically into cells suspended in oxygen-free 1.0 M KCl (Fig 3A). In this case, the presumed influx of Na^+ was accompanied by a pronounced efflux of protons. The antiporter seems specific for Na^+ ions since little or no acidification of the medium occurred upon injections of LiCl, KCl, or choline chloride. Further convincing evidence for Na^+/H^+ antiport was provided by inhibitor studies (Fig 3C through E). After incubations of *V. costicola* with CCCP, TCS, or monensin, no appreciable NaCl-induced acidification of the medium occurred. Since the ionophores were injected as methanolic solutions, we showed as a control that the same quantitative results were obtained

in cell suspensions to which an equivalent amount of methanol was added (Fig 3B). Finally, the results with butanol-treated (killed) cells (Fig 3F) show that none of the responses was nonspecific or caused by pH mismatch of solutions.

A role for Na^+/H^+ antiport in regulation of the cytosolic pH was tested by measuring the effect of NaCl on the accumulation of methylamine (Table 1). At a pH_0 near neutrality, methylamine did not accumulate, as predicted from results shown in Fig 1. However, a large Na^+ -dependent accumulation of methylamine occurred at pH 8.6, supporting a role for the antiporter in acidifying the cytoplasm at alkaline pH_0 . Moreover, in aerobic cells similar data were obtained, although pH_i was somewhat more alkaline when respiration-driven H^+ efflux was occurring (Table 1).

Several of the observations made suggest that *V. costicola* should grow well in an alkaline medium. As predicted from measurements of respiration rates, $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, and the Na^+/H^+ antiporter, *V. costicola* grew at maximum rates over a wide range of pH_0 extending well into the alkaline range (Fig 4).

DISCUSSION

The results indicate that $\Delta\psi$ is greatest at alkaline pH_0 values (pH 9.0), when the pH

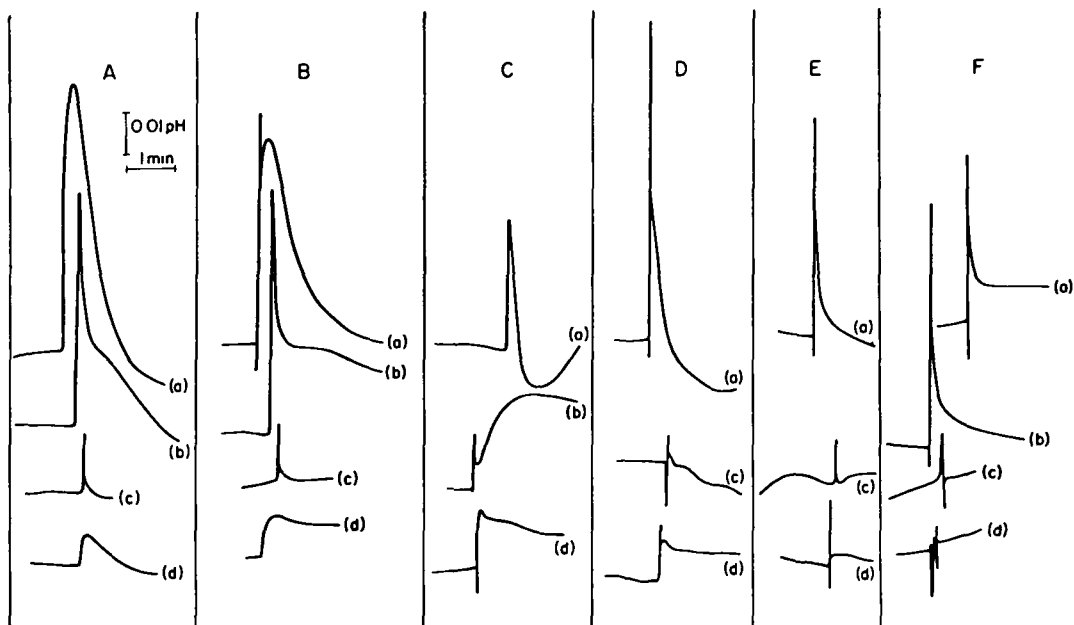


FIG 3 Effect of ionophores and butanol on Na^+/H^+ antiport in *V. costicola*. Proton efflux was measured with a H^+ electrode as an increase in acidity resulting from injections of 25 mM concentrations of NaCl (a) LiCl (b) KCl (c) or choline chloride (d) to anaerobic cells suspended in a salt solution of pH 7.5 (1 M KCl, no NaCl). (A) Control cells. (B) methanol control, 47 mM, (C) CCCP 20 μM , (D) TCS 20 μM , (E) monensin 20 μM , (F) butanol treatment (see legend to Fig 2).

TABLE 1. Effect of NaCl on pH_i of *V. costicola*^a

Gas phase	Salts medium	pH ₀	pH _i	ΔpH
Nitrogen	KCl	7.11	7.11	0 ^b
		8.58	7.95	0.63
	NaCl	7.00	7.00	0
		8.63	7.53	1.10
Air	KCl	6.98	6.98	0
		8.58	8.58	0
	NaCl	6.93	6.93	0
		8.64	7.77	0.87

^a *V. costicola* (10 mg [dry weight] of cells) was suspended in 5 ml of the salt solution described in the text and containing either 1 M NaCl or 1 M KCl (with NaCl omitted). After storage of the cell suspensions for 30 min under N₂ or air, [¹⁴C]methylamine uptake was allowed to occur for 20 min. Samples of 1.5 ml were centrifuged (13,000 × g, 2 min), and the distribution of radioactivity between the cells and medium was determined.

^b 0, ΔpH (inside acidic) was not detected with the methylamine probe.

gradient is reversed (inside acidic). We have shown separately (manuscript in preparation) that respiration rates are also greatest at pH₀ 9. Direct evidence for a respiration-linked efflux of protons was obtained by showing an increase in the acidity of the medium when anaerobic cells were given an oxygen pulse. This proton efflux in response to a respiratory pulse was sensitive to the protonophores CCCP and TCS, as well as monensin, as expected for reagents which abolish pH gradients. These results were obtained at such a pH₀ that no transmembrane pH gradient existed (before the respiratory pulse). In general, H⁺ efflux coupled to cation/proton antiport can account for establishment of Δψ when pH₀ is more alkaline than the cytoplasmic pH. Such a mechanism has been demonstrated for *Bacillus alcalophilus* (29) and proposed for certain methanogenic bacteria (19), nitrifying bacteria (23), and others (34).

The proton motive force of *V. costicola* was measured as a function of pH₀. At a pH₀ of 7.5, the chemical potential (60 ΔpH) disappeared (inside alkaline), leaving Δψ as the sole component of Δμ_H⁺. At pH₀ values above 7.5, the pH gradient reversed, becoming acidic inside. Under these conditions (pH₀ 8.5 to 8.8), Δψ was dissipated by protonophores, by inhibitors of respiration, and by monensin, which normally serves to facilitate Na⁺/H⁺ exchange (2). The sensitivity of Δψ to these reagents illustrates the importance of respiration-driven proton efflux in establishing Δψ.

A Na⁺/H⁺ antiporter was identified in *V.*

costicola, which may function to convert the Δμ_H⁺ established by respiration-linked H⁺ efflux to a sodium motive force. Such an interconversion of electrochemical ion gradients through Na⁺/H⁺ antiporter activity has been shown in several microorganisms, including *H. halobium* (27) and *E. coli* (4). Previously, it was shown that *V. costicola* maintains a cytoplasmic concentration of K⁺ above that in the medium and a cytoplasmic concentration of Na⁺ below that in the medium (10, 40). In the absence of a ΔpH (inside alkaline), the driving force for the Na⁺/H⁺ antiporter is likely to be Δψ, where the stoichiometry of H⁺ influx to Na⁺ efflux must be greater than 1. An electrogenic antiporter functioning at alkaline pH₀ has been detected in membrane vesicles of *E. coli* (39) and *H. halobium* (26), but direct evidence has not been obtained yet for *V. costicola*.

Energy coupling at alkaline pH₀ is different in *V. costicola* and *V. alginolyticus*. Both of these moderate halophiles have maximal Δψ at about pH₀ 9 (42). However, evidence has been presented that at alkaline pH₀, *V. alginolyticus* has a respiration-dependent primary Na⁺ extrusion system, which gives rise to Δψ and a Na⁺ chemical gradient (43). In contrast to these results, in *V. costicola* Δψ is very sensitive to protonophores, and Na⁺ does not stimulate rates of oxygen consumption greatly, not even at pH₀ 8.5 (this study and unpublished results). Thus, a primary respiration-linked proton efflux to establish Δμ_H⁺, coupled to Na⁺/H⁺ antiporter activity is required to explain the data for *V. costicola* adequately.

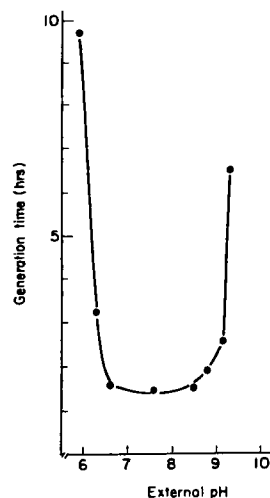


FIG. 4. Growth of *V. costicola* as a function of pH₀. Growth studies were conducted in a fermentor equipped with pH control, using the complex medium described in the text. Both pH and growth (optical density) were monitored hourly.

In addition to a role in energy coupling, a second function possible for antiporters is in the regulation of intracellular pH (34). Na^+/H^+ antiport has been most clearly implicated in studies of a non-alkalophilic mutant of *B. alcalophilus* (22) and in *E. coli* studies in which mutants defective in this activity are also unable to grow in alkaline medium (46, 47). Our results with *V. costicola* show that Na^+ is involved in pH regulation, which is correlated with an ability to grow optimally at pH_0 well into the alkaline range, i.e., with both aerobic and anaerobic cell suspensions maintained a more constant pH, in the presence of Na^+ than in its absence. Since some Na^+ always contaminates the Na^+ -depleted medium, these results are probably even less dramatic than what would be observed in the complete absence of Na^+ . The possibility has yet to be tested that *V. costicola* contains a K^+/H^+ antiporter, which has been implicated in pH homeostasis in *E. coli* (7).

V. costicola is a neutrophile according to the classification of Padan et al. (34) since it grows within the pH range of 5.5 to 9.0. The optimum pH_0 for growth extends from pH_0 6.5 to 9.0, during which the pH, increases from 7.25 to 7.9. The $\Delta\psi$ also increases dramatically. By coupling cation/proton antiport to $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$, the organism is capable of optimal growth into the alkaline pH range when the pH gradient is reversed (inside acidic). This, in addition to the known ability of *V. costicola* to grow over a wide range of salt concentrations (13), should provide well for its survival during changing environmental conditions.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported, in part, by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to D.J.K.

LITERATURE CITED

- Addanki, S., F. D. Cahill, and J. F. Sotos. 1968 Determination of intramitochondrial pH and intramitochondrial-extramitochondrial pH gradient of isolated heart mitochondria by the use of 5,5-dimethyl-2,4-oxazolidinedione J Biol Chem 243:2337-2348
- Bakker, E. P. 1979 Ionophore antibiotics, p 67-97 In F. E. Hahn (ed.), Antibiotics, vol. V, part I mechanism of action of antibacterial agents Springer-Verlag KG, Berlin.
- Bakker, E. P. 1982 Membrane potential in a potassium transport-negative mutant of *Escherichia coli* K-12 Biochim Biophys Acta 681:474-483.
- Beck, J. C., and B. P. Rosen. 1979 Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli* properties of the sodium/proton antiporter Arch Biochem Biophys 194:208-214
- Benyoussef, M., J.-L. Rigaud, and G. Leblanc. 1982 Cation transport mechanisms in *Mycoplasma mycoides* var. Capri cells Na^+ -dependent K^+ accumulation Biochem J 208:529-538
- Benyoussef, M., J.-L. Rigaud, and G. Leblanc. 1982 Cation transport mechanisms in *Mycoplasma mycoides* var. Capri cells: the nature of the link between K^+ and Na^+ transport Biochem J 208:539-547
- Brey, R. N., B. P. Rosen, and E. N. Sorensen. 1980 Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli* properties of the potassium/proton antiporter J Biol Chem 255:39-44
- Buckel, W., and R. Semmler. 1982 A biotin-dependent sodium pump glutamyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans* FEBS Lett 148:35-38
- Christian, J. H. B., and M. Ingram. 1959 Lysis of *Vibrio costicola* by osmotic shock J Gen Microbiol 20:32-42.
- Christian, J. H. B., and J. A. Waltho. 1962 Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria Biochim Biophys Acta 65:506-508
- Cook, G. M. W. 1976 Techniques for the analysis of membrane carbohydrates, p 283-351. In A H Eddy (ed.), Biochemical analysis of membranes Chapman & Hall, Ltd., London
- Dimroth, P. 1982 The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na^+ -activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes* Eur J Biochem 121:443-449.
- Forsyth, M. P., and D. J. Kushner. 1970 Nutrition and distribution of salt response in populations of moderately halophilic bacteria Can J Microbiol 16:253-261
- Galivan, J. H., and S. H. G. Allen. 1968 Methylmalonyl coenzyme A decarboxylase its role in succinate decarboxylation by *Micrococcus lactilyticus* J Biol Chem 243:1253-1261
- Harold, F. M. 1977 Membranes and energy transduction in bacteria Curr Top Bioenerg 6:83-149
- Harold, F. M., and D. Papineau. 1972 Cation transport and electrogenesis by *Streptococcus faecalis* I The membrane potential J Membr Biol 8:27-44
- Heefner, D. L. 1982 Transport of H^+ , K^+ , Na^+ and Ca^{++} in *Streptococcus* Mol Cell Biochem 44:81-106
- Hilpert, W., and P. Dimroth. 1982 Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a Na^+ gradient Nature (London) 296:584-585
- Jarrell, K. F., and G. D. Sprott. 1981 The transmembrane electrical potential and intracellular pH in methanogenic bacteria Can J Microbiol 27:720-728
- Jinks, D. C., J. R. Silvis, and R. N. McElhaney. 1978 Physiological role and membrane lipid modulation of the membrane-bound (Mg^{2+} , Na^+)-adenosine triphosphatase activity in *Acholeplasma laidlawii* J Bacteriol 136:1027-1036
- Kashket, E. R. 1979 Active transport of thallos ions by *Streptococcus lactis* J Biol Chem 254:8129-8131.
- Krulwich, T. A., A. A. Guffanti, R. F. Bornstein, and J. Hoffstein. 1982 A sodium requirement for growth, solute transport, and pH homeostasis in *Bacillus firmus* RAB J Biol Chem 257:1885-1889
- Kumar, S., and D. J. D. Nicholas. 1983 Proton electrochemical gradients in washed cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis* J Bacteriol 154:65-71
- Kushner, D. J., F. Hamaide, and R. A. MacLeod. 1983 Development of salt resistant active transport in a moderately halophilic bacterium J Bacteriol 153:1163-1171
- Lanyi, J. K. 1979 The role of Na^+ in transport processes of bacterial membranes Biochim Biophys Acta 559:377-397
- Lanyi, J. K., and R. E. MacDonald. 1976 Existence of electrogenic hydrogen ion/sodium ion antiport in *Halobacterium halobium* cell envelope vesicles Biochemistry 15:4608-4614
- Luisi, B. F., J. K. Lanyi, and H. J. Weber. 1980 Na^+ transport via Na^+/H^+ antiport in *Halobacterium halobium* envelope vesicles FEBS Lett 117:354-358
- Maloney, P. C., E. R. Kashket, and T. H. Wilson. 1975 Methods for studying transport in bacteria Methods Membr Biol 5:1-49
- Mandel, K. G., A. A. Guffanti, and T. A. Krulwich. 1980 Monovalent cation/proton antiporters in membrane vesicles from *Bacillus alcalophilus* J Biol Chem 255:7391-7396

- 30 Mitchell, P. 1966 Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation *Biol Rev Camb Philos Soc* 41:445-502
- 31 Mitchell, P., and J. Moyle. 1969 Translocation of some anions cations and acids in rat liver mitochondria *Eur J Biochem* 9:149-155
- 32 Mitchell, W. J., I. R. Booth, and W. A. Hamilton. 1979 Quantitative analysis of proton-linked transport systems glutamate transport in *Staphylococcus aureus* *Biochem J* 184:441-449
- 33 Niven, D. F., and R. A. MacLeod. 1978 Sodium ion-proton antiport in a marine bacterium *J Bacteriol* 134:737-743
- 34 Padan, E., D. Zilberstein, and S. Schuldiner. 1981 pH homeostasis in bacteria *Biochim Biophys Acta* 650:151-166
- 35 Patel, G. B., and B. J. Agnew. 1981 A simple apparatus for measuring the E_h of anaerobic media *Can J Microbiol* 27:853-855
- 36 Rosen, B. P., and E. R. Kashket. 1978 Energetics of active transport, p. 559-620. In B. P. Rosen (ed.), *Bacterial transport*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- 37 Rottenberg, H. 1975 The measurement of transmembrane electrochemical proton gradients *Bioenergetics* 7:61-74
- 38 Schobert, B., and J. K. Lanyi. 1982 Halorhodopsin is a light-driven chloride pump *J Biol Chem* 257:10306-10313.
- 39 Schuldiner, S., and H. Fishkes. 1978 Sodium-proton antiport in isolated membrane vesicles of *Escherichia coli* *Biochemistry* 17:706-711
- 40 Shindler, D. B., R. M. Wydro, and D. J. Kushner. 1977 Cell-bound cations of the moderately halophilic bacterium *Vibrio costicola* *J Bacteriol* 130:698-703
- 41 Shiol, J.-I., S. Matsuura, and Y. Imae. 1980 Quantitative measurements of proton motive force and motility in *Bacillus subtilis* *J Bacteriol* 144:891-897
- 42 Tokuda, H., T. Nakamura, and T. Unemoto. 1981 Potassium ion is required for the generation of pH-dependent membrane potential and ΔpH by the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* *Biochemistry* 20:4198-4203
- 43 Tokuda, H., and T. Unemoto. 1982 Characterization of the respiration-dependent Na^+ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus* *J Biol Chem* 257:10007-10014
- 44 Tsuchiya, T., and K. Takeda. 1979 Calcium/proton and sodium/proton antiport systems in *Escherichia coli* *J Biochem* 85:943-951
- 45 West, I. C., and P. Mitchell. 1974 Proton/sodium ion antiport in *Escherichia coli* *Biochem J* 144:87-90
- 46 Zilberstein, D., V. Agmon, S. Schuldiner, and E. Padan. 1982 The sodium/proton antiporter is part of the pH homeostasis mechanism in *Escherichia coli* *J Biol Chem* 257:3687-3691
- 47 Zilberstein, D., I. J. Ophir, E. Padan, and S. Schuldiner. 1982 Na^+ gradient-coupled porters of *Escherichia coli* share a common subunit *J Biol Chem* 257:3692-3696