

BIOSYNTHÈSE INDUITE D'ARABOKINASE DANS LES PROTOPLASTES DE *BACILLUS SUBTILIS*

par

J. M. WIAME, R. STORCK ET E. VANDERWINKEL

Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Bruxelles et Service de Recherches du C.E.R.I.A.,
Bruxelles (Belgique)

On a décrit récemment différentes observations concernant la synthèse de protéines dans des cellules bactériennes endommagées, soit par une lyse obtenue au moyen de lysozyme¹, soit rompues par des ultrasons^{2,3}. L'intérêt de ces études est évident et une connaissance précise du matériel employé est très souhaitable.

Les travaux de WEIBULL⁴ apportent des précisions fondamentales en ce qui concerne la lyse de *Bacillus mégatherium* par le lysozyme en présence d'un protecteur osmotique tel que le saccharose, comme c'est le cas des études réalisées avec *Micrococcus lysodeikticus*^{1,4}. Les cellules de *Bacillus mégatherium* privées de leurs membranes prennent la forme de sphères que WEIBULL appelle "protoplastes".

Nous décrirons dans ce travail la préparation de protoplastes de *Bacillus subtilis* et nous montrerons que ceux-ci peuvent effectuer la synthèse induite d'un enzyme, l'arabokinase.

1. Préparation des protoplastes

La bactérie employée est la souche S⁺ de *Bacillus subtilis*. Elle est cultivée dans des conditions déjà décrites précédemment⁶, essentiellement sur un milieu minéral avec du glucose M/20 comme substrat carboné. Les bactéries sont récoltées en croissance à une densité optique de 0.9 (0.3 g bactéries sèches par litre). Les bactéries sont remises en suspension dans un tampon phosphate M/20 à pH 7.0 contenant du saccharose 0.5 M et 1 mg de lysozyme par ml. On ajoute 0.1% de yeast extract (Difco) dans tous les milieux où sont manipulés les bactéries et protoplastes, ce qui permet de réduire l'effet très marqué des lavages sur le métabolisme de cet organisme. On poursuit la lyse à 35° pendant 90

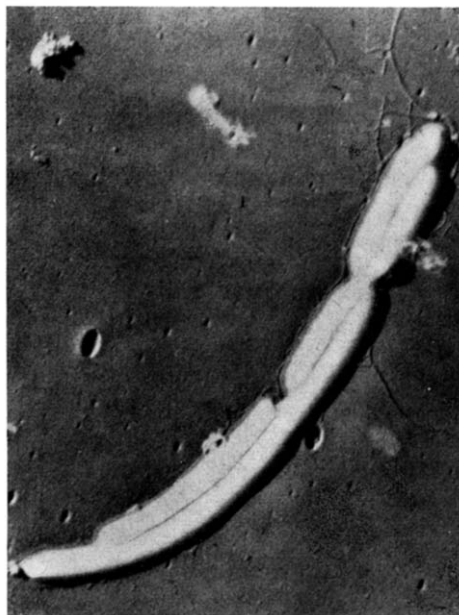


Fig. 1. *Bacillus subtilis* cellules intactes.
Grossissement 10,000 fois.

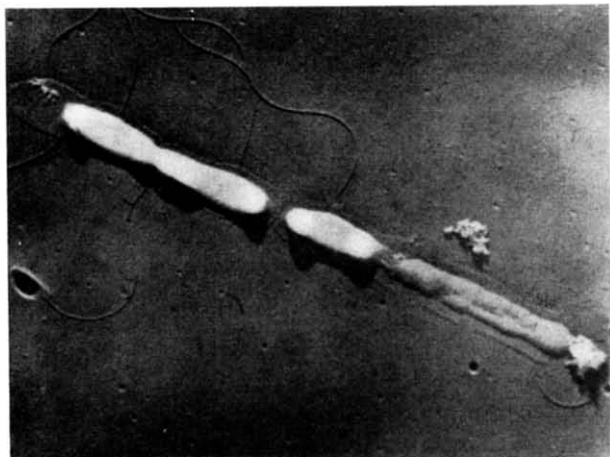


Fig. 2. *Bacillus subtilis* début de lyse. Grossissement 10,000 fois.

Fig. 3. *Bacillus subtilis* fin de lyse. Grossissement 10,000 fois.

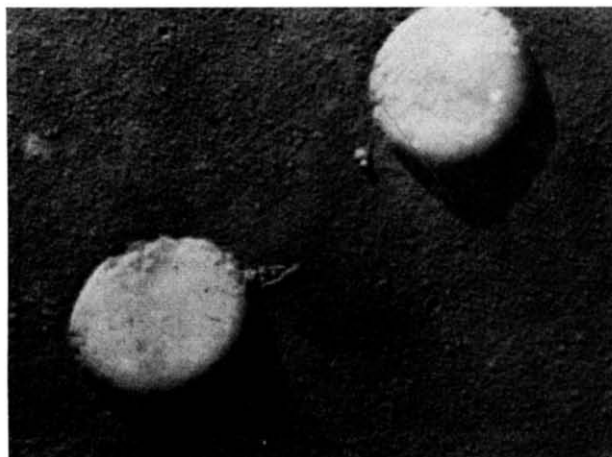
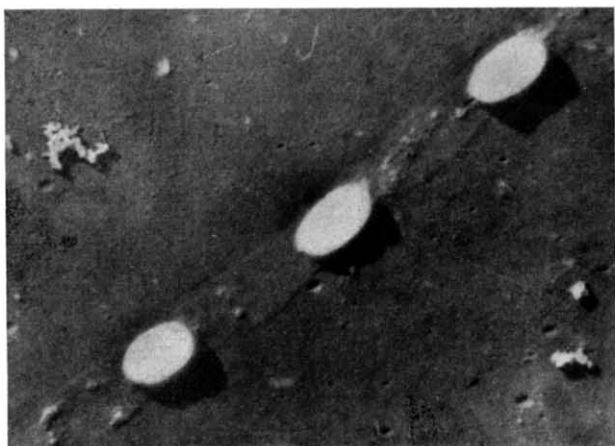


Fig. 4. *Bacillus subtilis* protoplastes libres. Grossissement 30,000 fois.

min. Elle peut être suivie au microscope à contraste de phase grâce aux changements de forme que prennent les cellules. Ces transformations ont été observées au microscope électronique.

Les filaments bactériens (Fig. 1) deviennent rapidement gram négatif et les corps cellulaires progressivement privés de leurs membranes se transforment graduellement en une série de corps sphériques, provisoirement retenus par les résidus de membrane (Figs. 2 et 3). Finalement, les protoplastes sphériques sont entièrement isolés les uns des autres (Fig. 4); ils retiennent éventuellement leurs flagelles (Fig. 5).

Ces protoplastes sont particulièrement bien définis, aisés à manipuler et apparemment plus résistants dans leur forme et leur physiologie que ceux obtenus avec d'autres organismes. En particulier, ils conservent une respiration très active pendant des temps prolongés (Fig. 7); ils montrent encore une respiration active après une conservation d'une nuit à $+2^{\circ}$.

La respiration disparaît entièrement lorsqu'ils sont mis en suspension dans un tampon sans protection osmotique. Dans ces conditions, les protoplastes sont vidés de la majeure partie de leur contenu, ils sont visibles au microscope électronique sous forme de disques plats correspondant aux "ghosts" de WEIBULL (Fig. 6).

Comme le saccharose est métabolisé par ces protoplastes, nous avons été amenés à rechercher un autre protecteur osmotique. Après différents essais comprenant des polyéthylènes de poids moléculaire allant de 300 à 3000, ainsi que du manitol et de l'inositol, la meilleure formule a été trouvée dans la protection par NaCl $M/2$ à $M/4$. La lyse est toujours effectuée dans le saccharose, de fortes concentrations en sel inhibant celle-ci.

2. Synthèse induite d'enzyme

Comme cela a été montré par MONOD⁷, le *Bacillus subtilis* ayant crû sur glucose ne peut utiliser des sucres tels que le L(+) arabinose qu'après une phase de latence (phénomène de diauxie). Nous avons pu effectivement démontrer que la souche utilisée dans ce travail contient, après croissance sur L(+) arabinose, une kinase absente dans les cellules ayant crû sur glucose, et capable de phosphoryler le L(+) arabinose ou, comme l'a montré LAMPEN⁸, de phosphoryler le L-ribulose résultant de l'isomérisation du L(+) arabinose.

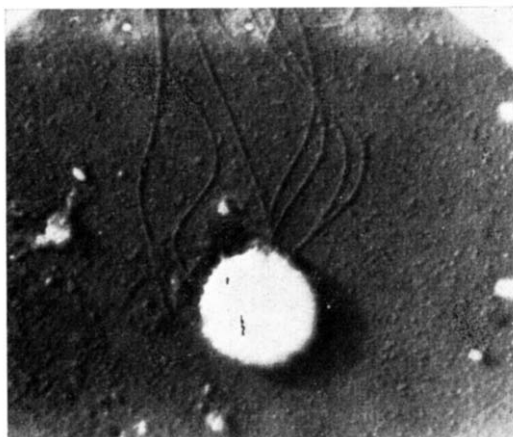


Fig. 5. *Bacillus subtilis* protoplaste libre et flagelles. Grossissement 22,000 fois.

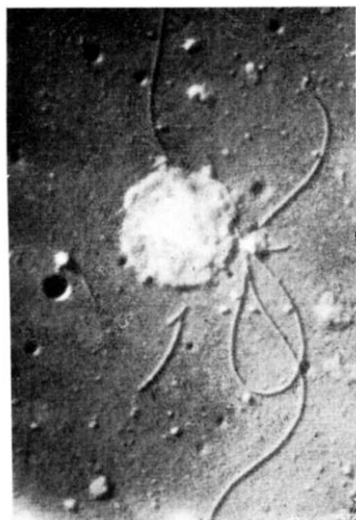


Fig. 6. *Bacillus subtilis* protoplaste lysé dans tampon. Grossissement 22,000 fois.

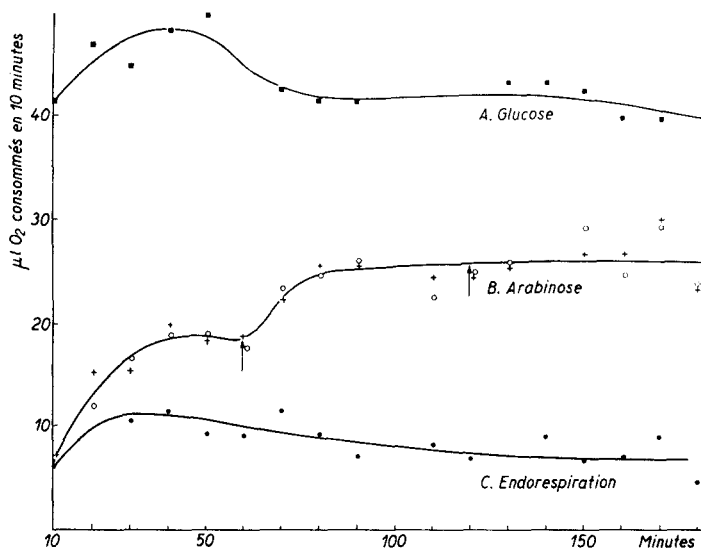


Fig. 7. Evolution de la vitesse de consommation d'oxygène d'une suspension de protoplastes de *Bacillus subtilis*, en fonction du temps, à 35° C. Les protoplastes sont mis en suspension dans NaCl $M/2$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $M/200$. Yeast extract 0.1 %. Courbe A = avec glucose $M/50$; Courbe B = arabinose $M/50$; Courbe C = sans substrat.

Nous avons suivi l'adaptation à l'utilisation du L(+) arabinose par les protoplastes, à la fois par leur respiration sur ce substrat et simultanément par la détermination de l'activité arabokinase d'extraits exempts de cellules. Les extraits bactériens, ainsi que les extraits de protoplastes, ont été préparés en traitant le matériel lyophilisé (p. ex. 0.15 g) par 5 ml d'un tampon bicarbonate $M/30$ à pH 7.7, additionné de citrate $M/60$ et, dans le cas de bactéries, de 30 mg de lysozyme pour 100 ml. L'extraction est poursuivie à 0° pendant 1 heure et un extrait clair est obtenu par centrifugation à 14,000 tours/min. L'activité kinasique de l'extrait a été mesurée par la méthode de COLOWICK ET KALCKAR, comme il fut décrit précédemment⁹ pour la triokinase.

On peut suivre sur la Fig. 7 l'évolution de la vitesse de consommation d'oxygène avec le L(+) arabinose et le glucose comme substrat. L'augmentation de la vitesse de respiration sur L(+) arabinose est très nette elle se fait en deux stades. La signification de ces deux stades nous échappe actuellement.

La respiration sur glucose est très active pendant les trois heures et varie peu. Parallèlement à cette expérience qui a été suivie manométriquement, on a réalisé une adaptation semblable sur 2.5 l d'une suspension de protoplastes dans un milieu identique avec aération intense et à 35°. A chacun des temps 0, 60 et 120 minutes, on a prélevé 1/3 de la suspension. Les protoplastes, après avoir été lavés deux fois avec NaCl 0.5 M , ont été lyophilisés pour être utilisés à un test d'arabokinase. Les résultats (Tableau I) montrent clairement l'apparition de l'activité kinasique en accord avec le test de respiration. Cette activité est du même ordre de grandeur que celle des bactéries entières adaptées à l'arabinose.

Après avoir terminé la rédaction de ce travail, nous avons eu connaissance de la possibilité de synthèse induite d'enzyme dans les protoplastes de *Bacillus mega-*

TABLEAU I

Substrats	Synthèse induite d'enzyme pendant les temps		
	0 min	60 min	120 min
	μl de CO ₂ dégagés en 1 heure		
ATP (10 μM)	24	19	28
ATP (10 μM) L(+)-arabinose (20 μM)	46	106	220
Activité kinasique	22	87	192

Dégagement de CO₂ résultant de l'activité de ATPase et de l'arabokinase de 2 ml d'extrait de protoplastes en tampon bicarbonate M/30 pH 7.7; NaF M/100, MgCl₂ M/100.

*therium*¹⁰ et de la possibilité de reproduction de bactériophages dans ces protoplastes¹¹, ainsi que dans ceux de *Bacillus subtilis*¹². Nous remercions les auteurs de ces travaux qui nous ont permis de lire leur manuscrit.

Nous tenons à remercier Madame Y. BOUILLON pour l'exécution des photographies prises au microscope électronique.

RÉSUMÉ

Les cellules de *Bacillus subtilis*, traitées par le lysozyme en présence de saccharose M/2, se transforment en "protoplastes" bien définis conservant une activité respiratoire importante, ainsi que la capacité de synthèse induite d'arabokinase.

Ce matériel semble particulièrement adapté à des études concernant la physiologie des protoplastes.

SUMMARY

Cells of *Bacillus subtilis*, treated with lysozyme in the presence of sucrose M/2, are transformed into well defined protoplasts. These protoplasts keep intact an important part of their respiration and the capacity of an induced synthesis of arabokinase.

This material seems particularly well adapted for studies concerning the physiology of protoplasts.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Lysozym, in Gegenwart von M/2 Saccharose behandelte *Bacillus subtilis*-Zellen verwandeln sich in wohldefinierte "Protoplaste", welche eine bedeutende Atmungsaktivität, sowie das Vermögen die induzierte Synthese von Arabokinase durchzuführen, beibehalten.

Dieses Material scheint sich besonders für das physiologische Studium der Protoplasten zu eignen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ G. LESTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5448.
- ² E. F. GALE AND J. P. FOLKES, *Proc. Biochem. J.*, 55 (1953) xi.
- ³ E. F. GALE AND J. P. FOLKES, *Nature*, 173 (1954) 1223.
- ⁴ C. WEIBULL, *J. Bacteriol.*, 66 (1953) 688.
- ⁵ M. BELJANSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 425.
- ⁶ J. M. WIAME ET R. STORCK, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 268.
- ⁷ J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Paris, Hermann, 1942.
- ⁸ J. O. LAMPEN, 126th Meeting Am. Chem. Soc., 44C (1954).
- ⁹ J. M. WIAME, S. BOURGEOIS ET R. LAMBION, *Nature*, 174 (1954) 37.
- ¹⁰ S. SPIEGELMAN, communication personnelle.
- ¹¹ STENT AND BRENNER, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- ¹² W. MUTSAARS, *Ann. Inst. Pasteur* (sous presse).

Reçu le 27 mai 1955