

FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION DES SYSTEMES MEMBRANAIRES CYTOPLASMIQUES ET MESOSOMIQUES DE *BACILLUS SUBTILIS*. ETUDE DE QUELQUES-UNES DE LEURS PROPRIETES OXYDO-REDUCTRICES ASSOCIEES A LA CHAINE RESPIRATOIRE

B. FERRANDES, C. FREHEL* ET P. CHAIN

Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Paris (France)

(Reçu le 17 mai, 1970)

SUMMARY

1. A method is described for the purification of cytoplasmic membranes and mesosomes from *Bacillus subtilis* cells. After removal of the walls by lysozyme in hypertonic medium, two fractions are first obtained: cytoplasmic membranes and mesosomic vesicles. These two rather impure fractions are further purified by centrifugation in a sucrose density gradient. The cytoplasmic membranes (Fraction 3C) and the mesosomes (Fraction 2M) obtained are pure, as observed by electron microscopy.

2. The NADH oxidase and succinate dehydrogenase activities are measured for all fractions. These activities are very low or absent from the mesosomes, whereas they are about 30 times higher in the cytoplasmic membranes.

3. Experiments have shown that the very low succinate dehydrogenase and succinate oxidase activities observed when *B. subtilis* is grown on glucose medium depends on the repression of the succinate dehydrogenase synthesis.

INTRODUCTION

Depuis la mise en évidence chez les bactéries Gram positives de l'existence de membranes mésosomiques^{1,2}, différents auteurs (Tableau I) ont essayé de les séparer des membranes cytoplasmiques en vue de rechercher quels systèmes métaboliques sont localisés dans l'un ou l'autre de ces deux types de membranes: systèmes de biosynthèse de la membrane³ et de la paroi⁴, système respiratoire⁵ et système d'excration d'enzymes exocellulaires⁶⁻⁸.

Les recherches effectuées jusqu'ici avec différentes souches bactériennes, à propos de la localisation de l'activité respiratoire dans l'un ou l'autre de ces deux types de membranes, n'ont pas donné de résultats définitifs; ils font seulement apparaître une répartition inégale de cette activité^{8,9,11,12}. L'incertitude de tels résultats doit être mise sur le compte des techniques de séparation des membranes cytoplasmiques et mésosomiques utilisées.

Abréviations: PMS, phénazine méthosulfate; DCIP, 2,6-dichlorophénol indophénol.

* Service de Photomicrographie de l'Institut Pasteur.

TABLEAU I

TECHNIQUES DE SÉPARATION DES MEMBRANES BACTÉRIENNES CYTOPLASMIQUES ET MÉSOSOMIQUES PROPOSÉES PAR DIFFÉRENTS AUTEURS

Microorganisme	Conditions de lyse de la paroi par le lysozyme			Séparation des fractions brutes FC et FM	Purification par gradient de densité à partir de :			Ref.
	Milieu	Mg ²⁺	Durée		Membranes totales	FC	FM	
<i>B. subtilis</i>	Saccharose 0.8 M	0	45 min 30°	+	—	—	—	5
<i>B. licheniformis</i>	Polyéthylène glycol 20 %	+	1-3 h 35°	+	—	—	—	9
	Saccharose 0.75 M	+	?	—	—	+	+	10
	Saccharose 0.5 M	+		+	—	—	—	11
<i>B. megaterium</i>	Saccharose 0.5 M	+	?	—	+	—	—	3
<i>L. monocytogenes</i>	Saccharose ?	+	?, 28°	—	+	—	—	12

La méthode de fractionnement de *Bacillus subtilis* que nous avions proposée en 1966 (ref. 5) ne permettant qu'une séparation relativement grossière des membranes cytoplasmiques et mésosomiques, nous avons été conduits à mettre au point, un procédé de purification de ces fractions brutes par sédimentation en gradient discontinu de densité. L'obtention de fractions membranaires purifiées a rendu possible l'étude des activités (NADH-oxydase, succino-déshydrogénase, succino-oxydase) leur étant respectivement associées. L'étude des enzymes hématiniques qu'elles contiennent fera l'objet d'une prochaine publication.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits utilisés

Lysozyme: Worthington Biochem. Corp.; désoxyribonucléase: Fluka; nicotinamide-adénine dinucléotide réduit (NADH): Boehringer; phénazine méthosulfate (PMS): Aldrich; 2,6-dichlorophénol indophénol (DCIP): Fluka; acétrizoate de méthylglucamine (Vasurix 50): Laboratoire Guerbet, 22 rue du Landy (93), Saint-Ouen, France.

Souche

B. subtilis Marburg SMY conservé par repiquage sur gélose inclinée¹³.

Composition des milieux de culture

- (a) Milieu liquide synthétique glucosé¹⁴.
- (b) Milieu liquide complexe: extrait de levure Difco, 5 g; mélange de sels minéraux¹⁵, 5 ml; tampon phosphate monopotassique, disodique 0.2 M, 7.2, qsp 1 l.
- (c) Milieu liquide complexe glucosé: identique au précédent mais additionné de 5 g/l de glucose.

Les précultures et cultures sont effectuées à 37°, en milieu liquide fortement aéré. Les précultures, ensemencées à partir des bactéries conservées sur milieu gélosé, sont réalisées dans des erlenmeyers de 2 l contenant 400 ml de milieu agité avec un barreau aimanté. Les cultures sont faites dans un récipient d'un volume de 20 l, contenant 15 l de milieu aéré à raison de 1 l d'air par litre de milieu et par minute et fortement agité à l'aide d'une turbine.

Taux de croissance

$\mu = 3$ sur milieu complexe glucosé; $\mu = 1.5$ sur milieu complexe; $\mu = 0.9$ sur milieu synthétique glucosé.

La récolte des bactéries est effectuée pendant la phase exponentielle de croissance ($A_{500 \text{ nm}} = 0.6$, spectrophotomètre Coleman Junior) à l'aide d'une centrifugeuse refroidie "Sharples continue" à air comprimé (25 000 tours/min, débit 25 l/h environ).

*Lyse de la paroi de *B. subtilis* par le lysozyme*

(1) En milieu hypotonique: la lyse est réalisée d'après la méthode précédemment décrite^{5, 15}. On obtient ainsi un homogénat H dont il est possible de séparer par sédimentation la totalité G (ghosts) des membranes.

(2) En milieu hypertonique: les bactéries récoltées sont resuspendues à raison de 10 mg poids sec/ml dans la solution suivante: tampon phosphate ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$) $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7.2, saccharose 0.5 M, lysozyme 0.2 mg/ml. Après 45 min d'incubation à 30°, toutes les bactéries sont transformées en protoplastes. La préparation est alors traitée de 2 façons différentes:

(a) Soit sédimentée 1 h à $78000 \times g$ (centrifugeuse Spinco, rotor 30); elle donne un culot de protoplastes et de mésosomes (P + M). Ce culot soumis à un choc osmotique en présence de désoxyribonucléase dans un tampon phosphate hypotonique $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7.2, donne par sédimentation de 1 h à $165000 \times g$ (Spinco, rotor 50 Ti), un culot de membranes totales (MT) ultérieurement lavées.

(b) Soit sédimentée 10 min à $15000 \times g$; elle donne un culot de protoplastes et un surnageant S1 contenant les mésosomes. Le culot de protoplastes soumis à un choc osmotique en présence de désoxyribonucléase donne la fraction (P lysée) qui, centrifugée 30 min à $78000 \times g$ (Spinco, rotor 30), permet d'obtenir la fraction membranaire cytoplasmique brute (FC) et le surnageant S2 correspondant au cytosol. Le surnageant S1 sédimenté 1 h à $78000 \times g$ donne la fraction membranaire mésosomique brute (FM). Le Schéma 1 résume l'ensemble de ces opérations.

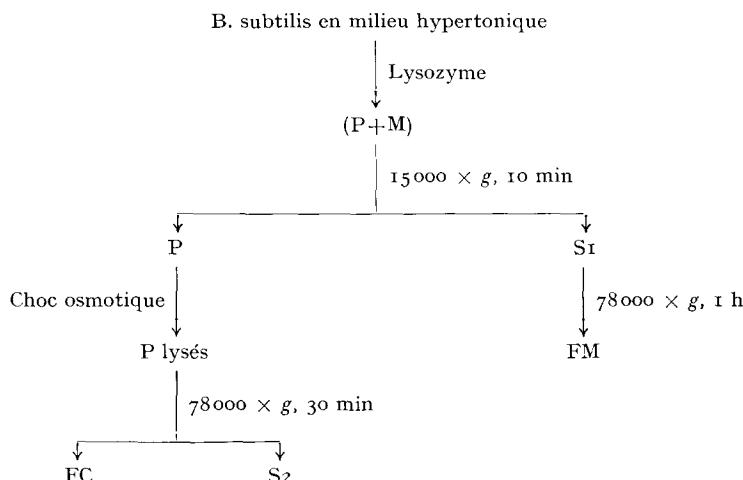
Conservation des fractions membranaires

A -20° , les fractions MT, FC, FM et S2 conservent les activités étudiées, sans perte importante, pendant environ un mois.

Centrifugation en gradient de densité

Les gradients discontinus de densité ($d = 1.10; 1.15; 1.20; 1.25$) sont effectués soit avec des solutions de Vasurix 50, soit avec des solutions de saccharose dans du tampon phosphate (monopotassique-disodique) $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7.2. Les gradients sont préparés en superposant dans chaque tube du rotor à godets oscillants SW 25.1 (Spinco), 7 ml de chacune des solutions par ordre de densités décroissantes, et enfin une prise d'essai d'environ 3 ml de la suspension membranaire à fractionner (soit 20

Schéma 1. Schéma d'obtention des fractions membranaires brutes FC (cytoplasmiques) et FM (mésosomiques) à partir de la cellule de *B. subtilis*. (P + M), protoplastes + mésosomes; FC, fraction membranaire cytoplasmique brute; FM, fraction membranaire mésosomique brute; S₂, cytosol.



à 40 mg de protéines). Les tubes sont centrifugés 4 h à 25 000 tours (90 000 \times g). Les différentes couches ainsi séparées sont prélevées à l'aide d'une seringue.

Etude morphologique

Les différentes fractions membranaires obtenues sont contrôlées au microscope électronique par la technique du contraste négatif¹⁶.

Activités enzymatiques

Les activités succino-déshydrogénase, succino-oxydase et NADH-oxydase sont mesurées à 30° sur les différents types de membranes obtenues. Les mesures spectrophotométriques ont été faites avec un appareil Spila Leres sur un volume final de 3 ml (trajet optique 1 cm).

(a) *L'activité succino-déshydrogénase* est mesurée d'après le changement d'absorption à 600 nm du DCIP. Les cuves contiennent: tampon phosphate 5 · 10⁻² M, pH 7.2, 2.1 ml; DCIP 3 · 10⁻⁴ M, 0.3 ml; succinate 0.2 M, 0.2 ml (cuve de mesure) ou tampon 0.2 ml (cuve de référence). Après une incubation de 10 min, sont ajoutés 0.2 ml de PMS (2 mg/ml) et 0.2 ml de la fraction enzymatique (0.05 mg de protéines). Le coefficient d'extinction du DCIP est $\epsilon = 18,8 \cdot 10^{-3} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{n mole}^{-1}$ (réf. 18). L'activité spécifique succino-déshydrogénase est exprimée en nmoles de DCIP réduites par min et par mg de protéines. Notons que le PMS rend le test spectrophotométrique 30 fois plus sensible.

(b) *Activités succino-oxydase et NADH-oxydase*: Les vitesses de consommation d'oxygène sont mesurées polarographiquement à l'aide d'une électrode de Clark (oxygraph Gilson). Dans 4 ml de tampon phosphate 5 · 10⁻² M, pH 7.2 (saturé d'air filtré sur filtre Seitz à 30°), sont ajoutés 0.5 mg (poids sec) de bactéries ou 1 mg de protéines, puis le substrat: succinate 10 mM ou NADH 0.5 mM. L'activité respiratoire (Q_{O_2}) est exprimée en natomes d'oxygène consommés par min et par mg de protéine.

En ce qui concerne l'activité NADH-oxydase elle a aussi été déterminée d'après la décroissance d'absorbance à 340 nm. Les cuves contiennent: tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7.2, 2.5 ml; NADH 2.5 mM, 0.3 ml (cuve de mesure) ou tampon 0.3 ml (cuve de référence). Après une incubation de 10 min, 0.2 ml de la fraction à étudier (0.1 mg de protéines) est ajoutée dans chacune des deux cuves. Le coefficient d'extinction de NADH est $\epsilon = 6.22 \cdot 10^6 \text{ cm}^2 \cdot \text{mole}^{-1}$ (réf. 17). Dans ce cas, l'activité spécifique NADH-oxydase est exprimée en nmoles de NADH oxydées par min et par mg de protéines.

Bilan de l'opération de purification des fractions membranaires brutes; degré de purification des fractions membranaires issues de cette opération

Le bilan de la purification d'une fraction membranaire brute peut se définir, pour une activité enzymatique donnée, comme le rapport entre la somme des activités totales des fractions séparées et l'activité totale de la fraction brute déposée sur le gradient.

Pour chaque fraction séparée par sédimentation en gradient de densité et pour chaque activité enzymatique étudiée, nous avons tenté d'apprécier un degré de purification en calculant le rapport entre l'activité spécifique de la fraction considérée et l'activité spécifique de la fraction brute initialement déposée sur le gradient.

Dosage des protéines

Méthode de LOWRY *et al.*¹⁹. La courbe étalon est établie pour chaque dosage à l'aide d'une solution mère de lysozyme à 500 µg/ml.

RÉSULTATS

*(I) Obtention de fractions membranaires cytoplasmiques ou mésosomiques brutes à partir de cellules de *B. subtilis**

Les bacilles ont été cultivés dans un milieu tel que leur taux de croissance soit particulièrement élevé (milieu complexe glucosé) pour avoir la possibilité de réaliser en une seule journée les fractionnements cellulaires et les dosages d'activités des différentes fractions. La lyse de la paroi²⁰ des bacilles a été obtenue par action du lysozyme.

*(1) Essais préliminaires mettant en évidence l'altération des membranes au cours de la lyse de la paroi de *B. subtilis* par le lysozyme en milieu hypotonique*

En 1961, PETIT¹⁵ a proposé une technique d'isolement des membranes totales G ("ghosts") de *B. subtilis* à partir de l'homogénat H des cellules traitées en milieu hypotonique par le lysozyme. Ces membranes sédimentent en 90 min à 15 000 $\times g$ et contiennent la totalité des cytochromes.

Le contrôle au microscope électronique⁵ a révélé que cette préparation membranaire G était constituée d'un mélange de fragments de membranes cytoplasmiques et de vésicules issues des tubules mésosomiques. L'activité spécifique et l'activité totale NADH-oxydase de l'homogénat H sont 30 fois plus faibles que les activités homologues de la bactérie entière (Tableau II). L'activité spécifique de la fraction membranaire G n'est que légèrement supérieure à celle de H.

Ces faits nous ont incités à examiner les variations de l'activité respiratoire et des caractères morphologiques des cellules de *B. subtilis* en fonction du temps de

TABLEAU II

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ NADH-OXYDASE (MESURÉE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE) DES DIFFÉRENTES FRACTIONS OBTENUES APRÈS LYSE DE *B. subtilis* EN MILIEU HYPOTONIQUE

L'activité spécifique est exprimée en nmoles de NADH oxydées par min et par mg de protéines.

Matériel	Activité spécifique	Activité totale
<i>B. subtilis</i>	550	64 300
Homogénat	19	2 220
Ghosts	45	490
Surnageant	18	1 880

TABLEAU III

VITESSE DE RESPIRATION (natomes O₂/min ET mg POIDS SEC) DE CELLULES DE *B. subtilis* AU COURS DE L'ACTION DU LYSOZYME EN MILIEU HYPO- OU HYPERTONIQUE (SACCHAROSE 0.8 M)

Après 45 min d'incubation en milieu hypertonique additionné de lysozyme, les cellules de *B. subtilis* sont totalement transformées en protoplastes.

Milieu de respiration	Milieu d'incubation				
	Sans lysozyme	Milieu hypotonique + lysozyme 5 min*	Milieu hypertonique + lysozyme 10 min*	25 min*	45 min*
Tampon phosphate	75	0	45	55	45
Tampon phosphate + extrait de levure 0.5 %	190	0	110	90	90

* Durée d'incubation à 30°.

contact avec le lysozyme en milieu hypotonique. Aussitôt après l'addition du lysozyme, on constate que la respiration du bacille est considérablement freinée et tend vers zéro en moins de 5 min (Tableau III). En revanche, la désintégration structurale des membranes n'est visible au microscope électronique qu'après 10 min; elle précède cependant de beaucoup la lyse complète de la paroi²¹. Ainsi le traitement de *B. subtilis* par le lysozyme en milieu hypotonique se révèle tout à fait impropre à l'obtention de membranes cytoplasmiques ou mésosomiques, puisque, dans ces conditions, l'intégrité morphologique et fonctionnelle de ces membranes n'est pas conservée.

(2) *Méthode de séparation des membranes cytoplasmiques et mésosomiques après traitement de la cellule de *B. subtilis* par le lysozyme en milieu hypertonique*

L'étude au microscope électronique montre que la lyse de la paroi des cellules de *B. subtilis* par le lysozyme effectuée en milieu hypertonique, évite l'altération morphologique des membranes cytoplasmiques limitant les protoplastes; elle montre d'autre part que les tubules mésosomiques sont libérés dans le milieu²¹.

Une séparation différentielle du mélange (protoplastes + mésosomes) (cf. techniques) permet d'obtenir une séparation grossière des membranes cytoplasmiques (FC) et mésosomiques (FM). Des micrographies électroniques des fractions membranaires brutes FM et FC sont données dans les Figs. 2 et 5. La fraction FC est constituée

de membranes cytoplasmiques encore assez largement contaminées par des tubules mésosomiques et par des flagelles. La fraction FM est constituée de petites vésicules résultant de la fragmentation des tubules mésosomiques; certains tubules, encore non fragmentés, restent accrochés à un morceau de membrane cytoplasmique. La contamination de la fraction FM par les membranes cytoplasmiques, est très variable d'une expérience à l'autre. La Fig. 2 correspond à une fraction particulièrement contaminée.

Après 45 min d'incubation en milieu hypertonique additionné de lysozyme, les cellules de *B. subtilis* conservent environ la moitié de leur activité respiratoire (Tableau III) et de leur activité NADH-oxydase initiales (Tableau IV).

Dans le Tableau IV sont indiquées aussi les moyennes des activités NADH-oxydase des fractions (P lysés), FC, FM et S2 obtenues lors de plusieurs expériences. On voit que la sédimentation des protoplastes et leur éclatement par choc osmotique n'entraîne pas une perte importante de l'activité NADH-oxydase par rapport à

TABLEAU IV

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ NADH-OXYDASE (MESURÉE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE) DES DIFFÉRENTES FRACTIONS OBTENUES APRÈS ACTION DU LYSOZYME SUR *B. subtilis* PLACÉ EN MILIEU HYPERTONIQUE

L'activité spécifique est exprimée en nmoles de NADH oxydées par min et par mg de protéines. Les résultats présentés ici représentent la moyenne de 6 expériences.

Matériel	Activité spécifique	Activité totale
<i>B. subtilis</i>	600	60 000
P + M	340	27 200
P lysés	230	18 500
FC	900	7 500
FM	100-200	600-1000
S2	11	900

TABLEAU V

ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE SUCCINO-DÉHYDROGÉNASE DES FRACTIONS MEMBRANAIRES CYTOPLASMIQUES OU MÉSOSOMIQUES BRUTES ET PURIFIÉES PAR SÉDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITÉ (SACCHAROSE)

L'activité est exprimée en nmoles de DCIP réduites par min et par mg de protéines; les résultats sont reproductibles à 10 % près. Bilan = (somme des activités totales des fractions)/(activité totale de la fraction initiale).

Fraction	Activité spécifique	Degré de purification	Fraction	Activité spécifique	Degré de purification
FC	150	1	FM	57	1
1C	0	—	1M	0	—
2C	230	1.5	2M	24	0.4
3C	655	4.4	3M	390	6.8
4C	515	3.4	4M	380	6.6
5C	410	2.7			
6C	380	2.6			
Bilan	100 %		Bilan	91 %	

(P + M). Le fractionnement du lysat des protoplastes donne une fraction soluble S₂, dont l'activité spécifique est extrêmement faible et une fraction membranaire FC dont l'activité spécifique est environ 4 fois supérieure à celle de (P lysés). Quant à l'activité spécifique de la fraction mésosomique brute FM (obtenue par sédimentation du surnageant Sr des protoplastes), elle est de 4.5 à 9 fois plus faible que celle de la fraction FC.

(II) *Purification des fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques brutes par séparation en gradient de densité; caractérisation morphologique des fractions purifiées*

Après avoir séparé les fractions brutes FC et FM, nous nous sommes proposés de les purifier en vue de mieux définir quelles activités étaient préférentiellement associées aux membranes cytoplasmiques et aux membranes mésosomiques.

Ces purifications ont été réalisées à partir de cellules de *B. subtilis* cultivées en milieu synthétique glucosé.

Les premiers essais de purification ont été effectués par centrifugation en gradient discontinu de densité de Vasurix 50 ($d = 1.10; 1.15; 1.20; 1.25$); les fractions obtenues étaient morphologiquement homogènes et le bilan des activités enzymatiques étudiées, satisfaisant. Cependant, ce procédé n'a pas été retenu car le Vasurix présente l'inconvénient d'absorber très fortement à $\lambda = 280$ nm et de réagir avec le réactif de Folin, ce qui rend impossible le dosage des protéines et le calcul des activités enzymatiques spécifiques.

Un gradient discontinu de saccharose ($d = 1.10; 1.15; 1.20; 1.25$) donne des zones de séparation reproductibles, identiques à celles obtenues en gradient de Vasurix, et ceci en un temps relativement court (4 h), compatible avec la fragilité des systèmes enzymatiques étudiés.

Chacune des zones de ces gradients a été examinée au microscope électronique.

Dans le cas du fractionnement de FM il y a toujours eu séparation en trois bandes dont deux bandes opalescentes principales: 2M et 3M (Fig. 1). D'après les examens au microscope électronique, la zone 2M (Fig. 3) paraît constituée essentiellement de vésicules plus ou moins gonflées et de tubules mésosomiques opaques aux électrons et de quelques rares fragments de membranes cytoplasmiques contaminantes. La zone 3M (Fig. 4) est constituée de quelques tubules mésosomiques et de fragments membraneux de très petites tailles, transparents aux électrons. La présence de flagelles fixées à certaines de ces vésicules indique qu'une partie de ces structures correspond à des fragments de membranes cytoplasmiques. La zone 4M, très faible, n'a

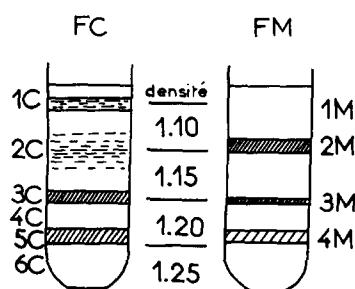
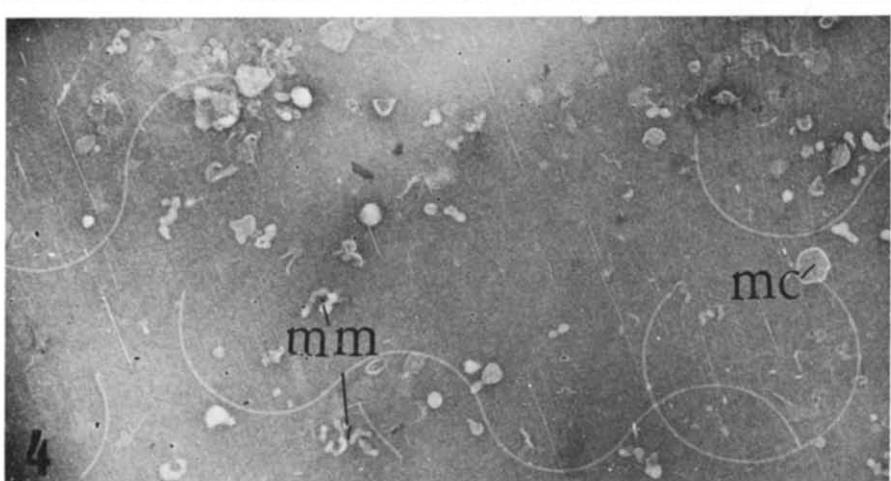
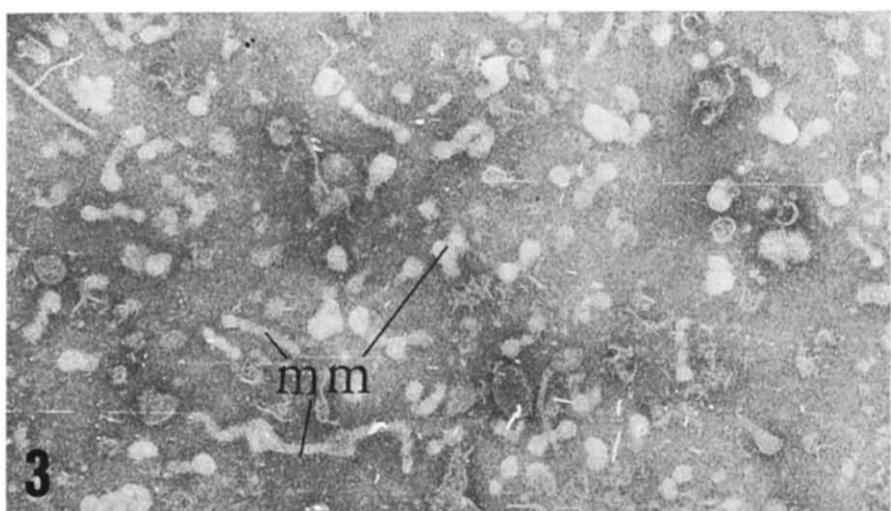
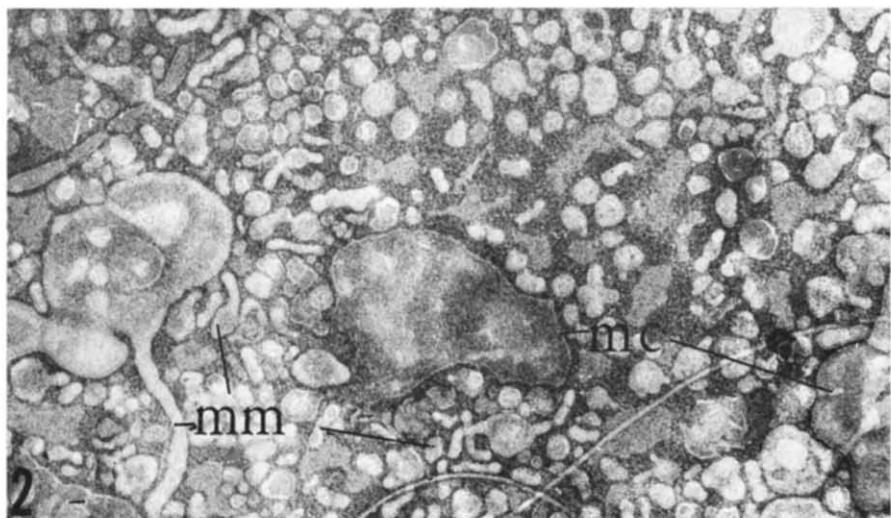


Fig. 1. Purification en gradient discontinu de densité (saccharose) des fractions brutes cytoplasmiques FC et mésosomiques FM isolées de *B. subtilis*.



pu être étudiée morphologiquement. L'examen au microscope électronique de la zone 1 M n'a révélé aucune structure.

Dans le cas du fractionnement de FC (Fig. 1) les observations au microscope électronique ont donné les résultats suivants. La zone 1C, qui se présente très nettement sous la forme d'un anneau jaune assez foncé, non opalescent, ne contient aucune structure. La zone 2C (Fig. 6) est constituée par des vésicules et des tubules mésosomiques contaminés par quelques membranes cytoplasmiques. La zone 3C (Fig. 7) est constituée par des membranes cytoplasmiques pratiquement pures, de taille et de forme régulière; de très rares tubules mésosomiques et quelques flagelles contaminent cette préparation. Les zones 4C, 5C et 6C contiennent des morceaux de membranes cytoplasmiques de taille et de forme variables (Fig. 8), très déchiquetées, sans aucune structure mésosomique. Enfin, le petit culot se formant lors de la purification de FC contient un mélange de structures très complexes.

On doit remarquer que, quelle que soit la fraction membranaire brute (cytoplasmique ou mésosomique) de départ, les membranes mésosomiques se trouvent toujours à la frontière des densités 1.10-1.15 et que les membranes cytoplasmiques flottent toujours sur la couche de densité 1.20. Cette différence de densité des membranes pourrait s'expliquer par le fait que le rapport lipides/protéines est plus élevé dans les membranes mésosomiques que dans les membranes cytoplasmiques. Les fractions membranaires très altérées dont la densité varie entre 1.20 et 1.25 correspondent à des fractions ayant perdu des quantités plus ou moins grandes de lipides.

Bilan protéique de la purification des membranes: Pour une quantité donnée de cellules de *B. subtilis*, on trouve que le rapport protéine FC/protéine FM = 5 à 10. Après purification de ces fractions brutes, la somme des quantités de protéines retrouvées dans les différentes zones de séparation, soit de FC, soit de FM, représente environ 80 à 85 % des protéines traitées. Compte tenu des observations au microscope électronique, on trouve que le rapport [protéines membranaires cytoplasmiques (3C + 4C + 5C + 6C + 3M + 4M)]/[protéines membranaires mésosomiques (2M + 2C)] varie de 1.5 à 2.

L'écart important existant entre ces deux rapports provient de ce que FC est notablement contaminé par des vésicules ou des tubules mésosomiques et par des protéines solubles (se séparant, lors du passage sur gradient, sous forme de l'anneau jaune foncé 1 C) alors que FM est relativement peu contaminé (que ce soit par des membranes cytoplasmiques ou par des protéines solubles adsorbées).

En conclusion il apparaît que la cellule de *B. subtilis* doit contenir, dans les conditions de culture employées, environ 2 fois plus de protéines membranaires cytoplasmiques que de protéines membranaires mésosomiques.

Figs. 2-4. Fractions membranaires de *B. subtilis* observées en contraste négatif. mc, membrane cytoplasmique; mm, membrane mésosomique; f, flagelle.

Fig. 2. Fraction membranaire mésosomique brute FM contenant des tubules mésosomiques et des fragments de membranes de tailles différentes. On peut observer un tubule (mm) encore attaché à un fragment de membrane (mc). $\times 47000$.

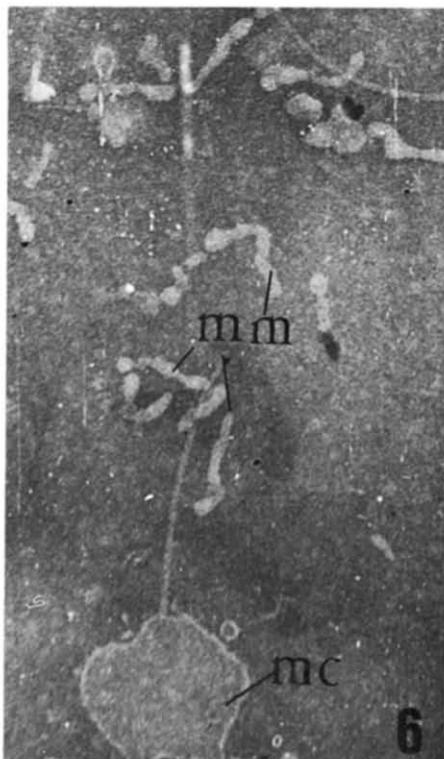
Figs. 3 et 4. Fractions obtenues par centrifugation de FM en gradient discontinu de saccharose.

Fig. 3. Zone 2M contenant uniquement des mésosomes, principalement sous forme de vésicules, on retrouve quelques tubules de faible longueur. $\times 66000$.

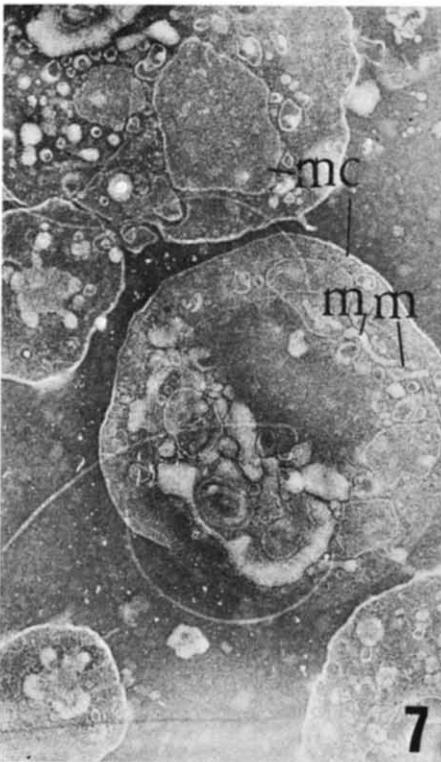
Fig. 4. Zone 3M contenant à la fois des vésicules mésosomiques et des fragments de membrane cytoplasmique. Sur certains fragments, un flagelle f est resté fixé. $\times 35000$.



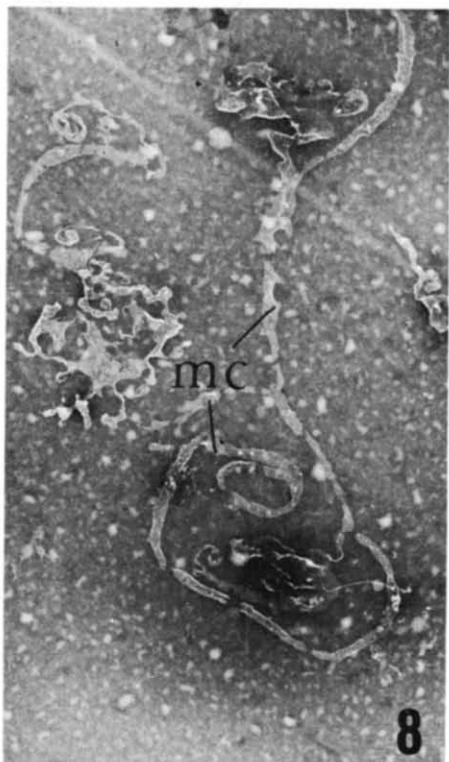
5



6



7



8

(III) Caractérisation biochimique des fractions obtenues

Les différentes fractions obtenues par séparation en gradient de densité ont été étudiées en ce qui concerne leurs activités succino-déshydrogénase, succino-oxydase et NADH-oxydase.

(1) Activités succino-déshydrogénase et succino-oxydase

(a) L'activité spécifique succino-déshydrogénase des fractions résultant de la purification de FC et FM est donnée dans le Tableau V. Les valeurs des bilans portant sur cette activité montrent qu'elle est très stable. Les activités spécifiques et les degrés de purification obtenus sont donc très significatifs.

La fraction 3C, ne contenant pratiquement que des membranes cytoplasmiques, a l'activité spécifique la plus élevée. Les fractions 4C, 5C et 6C (membranes cytoplasmiques déchiquetées) possèdent une activité succino-déshydrogénase un peu moindre que la fraction 3C. La fraction 2M, composée uniquement de membranes mésosomiques, a une activité spécifique 2 fois plus faible que la fraction initiale FM, et 30 fois plus faible que les membranes cytoplasmiques purifiées 3C. En revanche, la fraction 3M, contenant des membranes cytoplasmiques, a une activité spécifique 7 fois plus élevée que la fraction mésosomique brute FM dont elle est issue. Enfin, les fractions 1C et 1M ne possèdent aucune activité succino-déshydrogénase.

TABLEAU VI

ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES NADH-OXYDASE (MESURE POLAROGRAPHIQUE) ET SUCCINO-OXYDASE (natomes O₂/min et mg PROTÉINES) DE MEMBRANES TOTALES ISSUES DE CELLULES DE *B. subtilis* CULTIVÉES EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES SOURCES DE CARBONE

Milieu de culture	μ	NADH-oxydase	Succino-oxydase
Complexe	1.5	1960	67
Complexe glucose	3	2060	7
Synthétique glucose	0.9	830	7

(b) L'activité succino-oxydase (Tableau VI) des fractions membranaires brutes FC et FM, ou des membranes totales MT (issues de *B. subtilis* cultivé sur milieu glucosé synthétique ou complexe) étant extrêmement faible, elle ne peut être déterminée que sur une quantité importante de matériel (environ 5 mg de protéines). C'est la raison pour laquelle il ne nous a pas été possible de doser cette activité d'une façon précise

Figs. 5-8. Fractions membranaires de *B. subtilis* observées en contraste négatif. mc, membrane cytoplasmique; mm, membrane mésosomique.

Fig. 5. Fraction membranaire cytoplasmique brute FC contenant encore de nombreux tubules mésosomiques. La taille des membranes est en général de l'ordre de celle des protoplastes; les mésosomes se sont fragmentés mais on trouve encore de nombreux tubules. $\times 43000$.

Fig. 6. Fraction membranaire cytoplasmique FC contenant encore de nombreux tubules mésosomiques. La taille des membranes est en général de celle des protoplastes; les mésosomes se sont fragmentés mais on trouve encore de nombreux tubules. $\times 43000$.

Fig. 7. Zone 2C; membranes cytoplasmiques de tailles différentes associées à de rares mésosomes; il est quelquefois difficile de savoir si les tout petits fragments de membranes observés proviennent de la membrane cytoplasmique ou de vésicules mésosomiques éclatées. $\times 40000$.

Fig. 8. Zones 4C, 5C, 6C; membranes complètement déchiquetées formant quelquefois de longs rubans. $\times 20000$.

sur chacune des différentes zones des gradients de purification. Nos mesures montrent cependant que cette activité est répartie de la même façon que l'activité succino-déshydrogénase.

Il convient toutefois de noter que si *B. subtilis* a été cultivé en milieu complexe en absence de glucose, l'activité succino-oxydase des membranes totales augmente de 9 fois alors que l'activité NADH-oxydase ne varie pas (Tableau VI). Il apparaît donc que la présence de glucose dans le milieu de culture de *B. subtilis* exerce un effet répresseur sur la synthèse de la succino-déshydrogénase. Un effet répresseur du glucose s'exerçant sur la synthèse d'autres enzymes du cycle des acides tricarboxyliques a déjà été signalé²² et nous-même avons constaté cet effet répresseur en ce qui concerne l'aconitase, la fumarase et la malate-déshydrogénase.

(2) Activité NADH-oxydase

Si l'on dose simultanément cette activité sur un même matériel, aussitôt après sa sortie du congélateur (-20°), par les deux méthodes décrites au chapitre des techniques, on voit qu'il y a stoechiométrie entre la quantité de NADH déshydrogéné et la quantité d'oxygène consommé (Tableau VII). Si les dosages ne sont pas effectués simultanément, on ne retrouve plus la stoechiométrie des deux réactions. Etant donné que la valeur de chacune de ces deux activités déterminée sur un matériel conservé à $0-4^{\circ}$, diminue en fonction du temps, les écarts observés entre les deux types de mesure d'activité NADH-oxydase effectuées non simultanément sont à mettre sur le compte de l'altération des préparations membranaires.

TABLEAU VII

CONCORDANCE DES MESURES D'ACTIVITÉS NADH-OXYDASE EFFECTUÉES SIMULTANÉMENT PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE (nmoles NADH oxydées par min et mg protéines) ET PAR POLAROGRAPHIE (natomes O_2 /min et mg protéines) SUR DIFFÉRENTES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE *B. subtilis*

Fraction	Activité NADH-oxydase mesurée par	
	Spectrophotométrie	Polarographie
FC	830	860
FM	188	189
Membranes totales	1000	1040

Malgré l'instabilité de l'activité NADH-oxydase, nous avons essayé — en travaillant aussi rapidement que possible — de la doser systématiquement sur toutes les bandes des gradients de purification. Les résultats obtenus sont donnés dans le Tableau VIII. Pour les zones 1C et 1M, les deux activités spécifiques sont extrêmement faibles par rapport à celles des fractions initiales. Les fractions 2M (membranes mésosomiques purifiées) et 2C, ont des activités spécifiques très nettement inférieures à celles des fractions brutes initiales FM et FC. Malgré les pertes d'activités signalées plus haut, on voit clairement que l'activité de la fraction 3C est de 2 à 3 fois supérieure à celle de la fraction brute initiale FC. D'autre part, la zone 3M, issue de la fraction mésosomique brute FM, et contenant des membranes cytoplasmiques, présente une activité NADH-oxydase 5 à 6 fois plus élevée que FM. Quant aux fractions membranaires 4C, 5C et 6C, bien que correspondant à des membranes cytoplasmiques très altérées elles conservent des activités élevées.

TABLEAU VIII

ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES NADH-OXYDASE DES FRACTIONS MEMBRANAIRES CYTOPLASMIQUES OU MÉSOSOMIQUES BRUTES ET PURIFIÉES PAR SÉDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITÉ (SACCHAROSE)

AS_I: activité spécifique mesurée par spectrophotométrie; nmoles de NADH oxydées par min et par mg de protéines. AS_{II}: activité spécifique mesurée par polarographie; natomes O₂ consommés par min et par mg de protéines. DP_I et DP_{II}: degrés de purification correspondants. Bilan: cf. Tableau V. Les mesures spectrophotométriques et polarographiques de l'activité NADH-oxydase (moyenne de 3 expériences) n'ont pas été réalisées dans des conditions rigoureusement simultanées, ce qui explique l'absence de stoechiométrie. Ces résultats montrent cependant clairement, que la répartition des activités entre les différentes fractions, est la même.

Fraction	Activité NADH-oxydase				Fraction	Activité NADH-oxydase			
	AS _I	DP _I	AS _{II}	DP _{II}		AS _I	DP _I	AS _{II}	DP _{II}
FC	830	1	860	1	FM	188	1	189	1
1C	18	0.02	12	0.014	1M	30	0.16	43	0.23
2C	207	0.25	425	0.49	2M	64	0.34	90	0.48
3C	1650	2.0	2640	3.1	3M	1160	6.2	860	4.6
4C	1250	1.5	1740	2.0	4M	1800	9.6	1570	8.3
5C	1060	1.3	1660	1.9					
6C	900	1.1	1440	1.7					
Bilan	35 %		55 %		Bilan	91 %		81 %	

Il ressort de ces mesures que la fraction membranaire cytoplasmique la plus pure 3C est, en ce qui concerne cette activité, environ 30 fois plus active que la fraction membranaire mésosomique la plus pure 2M.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nous avons mis au point une méthode permettant de séparer et de purifier les membranes cytoplasmiques et les membranes mésosomiques de *B. subtilis* dans un bon état d'intégrité morphologique et fonctionnelle.

Comme nous l'avons expliqué, il a fallu éviter de faire agir le lysozyme en milieu hypotonique puisque, dans ces conditions, il provoque non seulement la dislocation des membranes, mais aussi une perte très importante et presque immédiate de l'activité respiratoire. Il semble en effet, qu'en milieu osmotiquement faible, l'intégrité des membranes (siège de l'activité respiratoire) est étroitement liée à l'intégrité de la paroi²³. En revanche, quand le lysozyme agit en milieu hypertonique, suivant la méthode proposée au chapitre des techniques, les structures membranaires restent dans un bon état d'intégrité morphologique et conservent une fraction importante de l'activité respiratoire. Il devient dès lors possible de séparer des fractions membranaires cytoplasmiques (FC) et mésosomiques (FM) morphologiquement bien distinctes; l'activité NADH-oxydase de FC étant de 5 à 10 fois supérieure à celle de FM.

La purification, par sédimentation en gradient discontinu de densité de saccharose, de ces deux fractions membranaires brutes a permis d'obtenir d'une part une fraction 3C constituée de membranes cytoplasmiques, morphologiquement très homogène, et d'autre part, une fraction 2M ne contenant que de petites vésicules issues de la fragmentation des tubules mésosomiques. Les mésosomes purifiés (2M) ont des activités succino-déshydrogénase et NADH-oxydase très faibles. Au contraire, les

activités des membranes cytoplasmiques purifiées (3C) sont de 3 à 5 fois supérieures à celles de la fraction brute FC et 30 fois supérieures à celles des mésosomes purifiés (2M). Ces résultats sont en accord avec l'étude spectrale de ces fractions établissant d'une part que les membranes mésosomiques sont riches en enzymes hématiniques (dont les caractères font l'objet d'une prochaine étude) et d'autre part que les membranes cytoplasmiques sont elles aussi riches en enzymes hématiniques*, en cytochrome ($a + a_3$) en particulier²⁴.

Ils sont également en accord avec ceux d'une étude cytochimique¹⁶, en présence de tellurite de potassium (qui semble être un bon réactif de la chaîne respiratoire²⁵) : les dépôts de tellure sont exclusivement localisés sur la membrane cytoplasmique et ne sont jamais observés au niveau des tubules mésosomiques, aussi bien dans le cas de coupes de cellules entières que dans le cas de coupes de protoplastes.

Les différents auteurs qui, jusqu'ici, ont tenté d'effectuer sur plusieurs types bactériens des séparations membranaires (Tableau I) parviennent aux mêmes conclusions générales. Toutefois, les méthodes de séparation qu'ils ont employées ne leur ont pas permis d'isoler les membranes mésosomiques et les membranes cytoplasmiques, bien individualisées du point de vue morphologique et enzymatique.

Utilisant une méthode voisine de celle que nous avions proposée⁵, ROGERS *et al.*⁹ ont obtenu, à partir de cellules de *Bacillus licheniformis*, des fractions membranaires brutes cytoplasmiques et mésosomiques. Ils trouvent, comme nous, que l'activité succino-déshydrogénase est associée à la fraction FC. Ultérieurement¹¹, leur tentative de purification à l'aide de gradients linéaires de densité (CsCl pour FM et saccharose pour FC) leur a donné, pour chaque fraction membranaire brute, deux sous-fractions respectivement situées aux deux mêmes valeurs de densité ($d = 1.25$ et $d > 1.26$) ne se distinguant clairement l'une de l'autre ni par leurs caractères morphologiques, ni par leurs activités enzymatiques spécifiques.

Certains auteurs^{3, 12} ont tenté de séparer les membranes cytoplasmiques des membranes mésosomiques, en une seule étape, à partir des membranes totales. Ainsi, GHOSH ET MURRAY¹² ont obtenu à partir de *Listeria monocytogenes* une fraction membranaire cytoplasmique et une fraction membranaire mésosomique apparemment peu contaminée du point de vue morphologique; cependant, la forte activité NADH-oxydase de la fraction mésosomique indique que son degré de purification est inférieur à celui que nous avons obtenu avec *B. subtilis*.

Enfin, il faut signaler qu'en 1968, SARGENT *et al.*⁸ ont mis au point une technique rapide et efficace de séparation, en petite quantité, des membranes mésosomiques et des protoplastes de *B. licheniformis*. Le fait que la différence entre les activités NADH-déshydrogénase de ces deux fractions est beaucoup plus grande que celle existant entre nos fractions FM et P lysés (Tableau IV) conduit à penser que la fraction membranaire mésosomique obtenue par ces auteurs est moins contaminée par des membranes cytoplasmiques que notre fraction FM.

En conclusion, la technique de séparation et de purification des membranes mésosomiques d'une part, et cytoplasmiques d'autre part, que nous avons mise au point sur *B. subtilis*, permet d'obtenir des fractions bien caractérisées morphologique-

* En effet, l'étude spectrale de très nombreuses fractions: FM, FC, 2M, 3M, 2C, 3C *etc...* nous a conduit à reconnaître que le spectre hématinique très peu accentué que nous avions enregistré pour FC (ref. 5), dépendait de l'inhomogénéité de la répartition des particules membranaires étalées entre deux lames sous une épaisseur de 0.4 mm.

ment et enzymatiquement. Il apparaît notamment que l'activité succino deshydrogénase des membranes cytoplasmiques purifiées est 30 fois plus grande que celle des membranes mésosomiques purifiées. L'étude de l'activité NADH-oxydase montre également, malgré la fragilité de cette activité, qu'elle est beaucoup plus élevée (de l'ordre de 30 fois) dans les membranes cytoplasmiques que dans les membranes mésosomiques.

RÉSUMÉ

1. A partir de la méthode de fractionnement de la cellule de *Bacillus subtilis* précédemment proposée⁵ permettant de séparer une fraction membranaire cytoplasmique FC et une fraction membranaire mésosomique FM, il a été mis au point une méthode de purification, par centrifugation en gradient discontinu de densité de saccharose, de chacune de ces deux fractions brutes. L'étude au microscope électronique des membranes cytoplasmiques (3C) et des membranes mésosomiques (2M) ainsi obtenues montre que ces préparations sont morphologiquement très homogènes.

2. Les membranes mésosomiques purifiées (2M) sont presque totalement dépourvues des activités succino-déshydrogénase et NADH-oxydase. Les membranes cytoplasmiques purifiées (3C), dont les activités sont nettement plus élevées que celles des fractions brutes FC et FM, possèdent des activités spécifiques 30 fois supérieures à celles des membranes mésosomiques purifiées (2M).

3. Les expériences réalisées ont donné l'occasion de constater que le niveau très faible des activités succino-déshydrogénase et succino-oxydase observées chez *B. subtilis* cultivé sur milieu glucosé, dépend de la répression de la synthèse de la succino-déshydrogénase.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide du C.N.R.S. (Equipe de Recherche Associée No. 172) et de l'aide du C.E.A. (Contrat No. 10225, II.B6).

BIBLIOGRAPHIE

- 1 A. M. GLAUERT ET D. A. HOPWOOD, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 6 (1959) 515.
- 2 P. C. FITZ-JAMES, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8 (1960) 507.
- 3 P. C. FITZ-JAMES, dans L. B. GUZE, *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms*, Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md., 1968, p. 124.
- 4 K. J. I. THORNE ET D. C. BARKER, *European J. Biochem.*, 11 (1969) 582.
- 5 B. FERRANDES, P. CHAIX ET A. RYTER, *Compt. Rend.*, 263 (1966) 1632.
- 6 M. G. SARGENT, B. K. GHOSH ET J. O. LAMPEN, *J. Bacteriol.*, 96 (1968) 1231.
- 7 B. K. GHOSH, M. G. SARGENT ET J. O. LAMPEN, *J. Bacteriol.*, 96 (1968) 1314.
- 8 M. G. SARGENT, B. K. GHOSH ET J. O. LAMPEN, *J. Bacteriol.*, 96 (1968) 1329.
- 9 H. J. ROGERS, D. A. REAVELEY ET I. D. J. BURDETT, dans H. PEETERS, *Proc. 15th Symp. Protides Biol. Fluids*, Elsevier, Amsterdam, 1967, p. 303.
- 10 D. A. REAVELEY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30 (1968) 649.
- 11 D. A. REAVELEY ET H. J. ROGERS, *Biochem. J.*, 113 (1969) 67.
- 12 B. K. GHOSH ET R. G. E. MURRAY, *J. Bacteriol.*, 97 (1969) 426.
- 13 P. CHAIX ET J. F. PETIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 66.
- 14 P. CHAIX ET J. F. PETIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 481.
- 15 J. F. PETIT, Thèse de Doctorat ès Sciences Naturelles, Paris, 1961.
- 16 C. FREHEL, B. FERRANDES ET A. RYTER, *Biochim. Biophys. Acta*, soumis.

- 17 S. CHAYKIN, *Biochemistry Laboratory Techniques*, Wiley, New York, 1966, p. 25.
- 18 D. G. BISHOP, L. RUTBERG ET B. SAMUELSON, *European J. Biochem.*, 2 (1967) 454.
- 19 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 20 C. WEIBULL, *J. Bacteriol.*, 66 (1953) 688.
- 21 A. RYTER, C. FREHEU ET B. FERRANDES, *Compt. Rend.*, 265 (1967) 1259.
- 22 J. SZULMAJSTER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 46 (1964) 443.
- 23 S. SHAH ET H. KING, *J. Gen. Microbiol.*, 44 (1966) 1.
- 24 B. FERRANDES ET P. CHAIX, en préparation.
- 25 R. J. BARNETT ET G. E. PALADE, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3 (1957) 577.

Biochim. Biophys. Acta, 223 (1970) 292-308