

BBA 46102

RÉACTIONS D'OXYDO-RÉDUCTION AU NIVEAU DES MEMBRANES CYTOPLASMIQUES ET MÉSOSOMIQUES DE *BACILLUS SUBTILIS*

CLAUDE FREHEL^a, BERNARD FERRANDES^b ET ANTOINETTE RYTER^a

^aService de Photomicrographie de l'Institut Pasteur et Service de Génétique cellulaire de l'Institut Pasteur et du Collège de France, Paris et ^bLaboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences de Paris, Paris (France)

(Reçu le 23 novembre, 1970)

SUMMARY

*Oxido-reduction reactions on the level of cytoplasmic membranes and mesosomes of *Bacillus subtilis**

The location of oxido-reduction sites detectable by means of potassium tellurite has been studied in *Bacillus subtilis*. This salt deposits in the form of needles clearly visible under electron microscopy. Their number and size depend on the substrate and are proportional to the respiratory measurements. These needles are exclusively located on the cytoplasmic membrane and never inside the mesosomes. Their location remains the same during protoplast formation and mesosome uncoiling. This indicates that the methods used in protoplast formation which lead to the separation of mesosomes and cytoplasmic membranes do not produce important changes in the location of respiratory enzymes.

INTRODUCTION

Depuis la découverte d'importantes invaginations membranaires chez les bactéries Gram positif désignées sous le nom de mésosomes, des recherches ont été faites pour savoir si ces organelles, localisés dans des endroits de la cellule où, apparemment, les besoins énergétiques sont importants¹⁻³ sont le siège préférentiel de phénomènes d'oxydo-réduction.

Les essais de localisation des sites d'oxydo-réduction au microscope électronique ont été faits en utilisant le tellurite de potassium et des sels de tétrazolium. Les résultats de ces études cytochimiques, résumés dans le Tableau I, montrent que les phénomènes d'oxydo-réduction se situent aussi bien dans la membrane cytoplasmique que dans les mésosomes. Toutefois, on constate une localisation prépondérante de ces sites, soit dans les membranes cytoplasmiques, soit dans les mésosomes, selon le réactif utilisé et parfois même, pour un même réactif, selon les auteurs. Ainsi, les sels de tétrazolium se déposent en abondance sur les membranes mésosomiques et parfois sur certaines portions de la membrane cytoplasmique. En revanche, les différents auteurs ayant utilisé le tellurite de potassium ont observé que celui-ci est réduit sous forme d'aiguilles le long de la membrane cytoplasmique^{5, 8, 10, 12, 15}; de plus, certains auteurs décrivent la présence d'un fin dépôt granulaire à l'intérieur des mésosomes^{5, 10, 15}.

TABLEAU I

LOCALISATION CYTOCHIMIQUE DES SITES D'ACTIVITÉ OXYDO-RÉDUCTRICE CHEZ DIFFÉRENTES BACTÉRIES

Microorganisme	Colorant employé	Marquage réalisé sur des cellules		Lieu de dépôt du réactif réduit	Réf.
		Dans le milieu de culture	Récoltées et mises en présence de substrat		
<i>B. subtilis</i>	TTC	+		m.m.	4
	Tellurite	+		m.m., m.c.	5
	TNBT		+ Succinate	m.m.	6
	TNBT		+ Succinate	m.m., m.c.	7
	Tellurite	+		m.c.	8
<i>B. megaterium</i>	TNBT		+ Succinate	m.m., m.c.	9
<i>Fusobacterium polymorphum</i>	Tellurite	+		m.c., m.m.	10
	TTC, NBT		+ Succinate	m.m.	11
<i>Listeria monocytogenes</i>	Tellurite	+		m.c.	12
	TTC, NBT	+		m.m.	12
<i>Listeria monocytogenes</i>	NBT		Étude <i>in vitro</i> en présence de NADH lactate, succinate	Réduction du colorant plus élevé dans m.m. que dans m.c.	13
<i>Lactobacillus casei</i>	TNBT		Mannitol	m.c., m.m.	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	TNBT, NBT	+		m.c., m.m.	15
	Tellurite	+		m.c., m.m.	

Abréviations: TTC, chlorure de triphenyltetrazolium; NBT, chlorure de nitrobluetetrazolium; TNBT, chlorure de tetranitrobluetetrazolium; m.c., membranes cytoplasmiques; m.m., membranes mésosomiques.

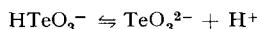
Ces résultats divergents illustrent les difficultés d'application des techniques cytochimiques qui sont dues vraisemblablement aux nombreux facteurs intervenant au cours des manipulations: conditions d'expériences, fixation, déshydratation, inclusion.

Des techniques de séparation des membranes cytoplasmiques et des membranes mésosomiques mises au point ces dernières années semblent fournir un moyen d'investigation beaucoup plus précis pour déterminer la localisation des enzymes respiratoires^{13, 16-19, 22}. Ces techniques qui diffèrent un peu d'un laboratoire à l'autre, comportent toutes la transformation des cellules bactériennes en protoplastes, qui permet le déroulement des tubules mésosomiques.

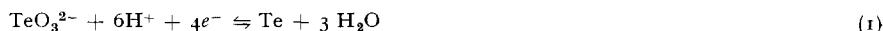
Ce processus correspond à un bouleversement profond de la cellule bactérienne et peut entraîner une perte d'activité ou des changements dans la localisation des sites d'oxydo-réduction. A la suite de l'analyse enzymatique effectuée sur des fractions membranaires et mésosomiques chez *Bacillus subtilis*²², il nous a paru important de vérifier si la localisation des sites d'oxydo-réduction ne change pas au cours de la transformation des bactéries en protoplastes.

Cette étude a été faite au moyen du tellurite de potassium qui est réduit sous forme d'aiguilles de tellure, facilement détectables au microscope électronique. Chez les cellules animales, ce réactif se dépose exclusivement sur les crêtes mitochondriales²⁰. C'est pourquoi nous l'avons utilisé comme marqueur de l'activité respiratoire. Aucune donnée expérimentale ne permet de dire à quel niveau de la chaîne respiratoire il est réduit; nous avons cependant tenté une estimation théorique de son potentiel d'oxydo-réduction et de son site d'action.

L'acide tellureux (H_2TeO_3) est un diacide faible dont le second pK (7.74) correspond à l'équilibre:



L'incubation des bactéries en présence de tellurite de potassium ayant été réalisée à pH 7, on doit s'intéresser aux deux ions HTeO_3^- et TeO_3^{2-} donnant lieu à l'équilibre ci-dessus. Les réactions d'oxydo-réduction associées à ces deux ions sont alors²¹



Les potentiels d'oxydo-réduction E_0 se déduisant de ces réactions sont¹⁹: (1) $E_0 = 0.827 - 0.0886 \text{ pH} + 0.0148 \log [\text{TeO}_3^{2-}]$; (2) $E_0 = 0.713 - 0.0737 \text{ pH} + 0.0148 \log [\text{HTeO}_3^-]$. Dans les conditions expérimentales utilisées (pH 7 à 37°) le potentiel d'oxydo-réduction de ces deux ions est environ de +0.20 V.

Un tel potentiel permet donc de penser que la réduction du tellurite de potassium se produira dans la chaîne respiratoire au niveau des flavoprotéines et des quinones.

Dans ce travail, nous étudierons tout d'abord la corrélation quantitative existant entre l'activité respiratoire de la bactérie et le nombre d'aiguilles de tellure formées. Nous suivrons ensuite la localisation des aiguilles de tellure au cours de la formation des protoplastes et discuterons ces résultats en les comparant avec les analyses enzymatiques effectuées sur les fractions membranaires²².

MATÉRIEL ET MÉTHODES

(I) Techniques bactériologiques

La souche utilisée est la souche *B. subtilis* Marburg (SMY). Les bactéries sont cultivées à 37° sous agitation vigoureuse, dans un bouillon nutritif Difco²³ ou en milieu à l'extrait de levure additionné de glucose²². Les protoplastes sont préparés par action de lysozyme (20–200 µg/ml selon les expériences) sur les bactéries en suspension dans un milieu synthétique de composition suivante: K_2HPO_4 10.5 g; KH_2PO_4 3.5 g; NH_4Cl 0.5 g; saccharose 0.5 M; eau bidistillée 1000 ml.

(II) Traitement des bactéries ou des protoplastes par le tellurite de potassium

Dans tous les types d'expériences, les échantillons sont incubés, sans agitation, à 37°, en flacon bien rempli et bouché, en présence de 0.05 % de tellurite de potassium.

(a) Chez les bactéries en croissance exponentielle, le tellurite de potassium est ajouté directement dans le milieu de culture (bouillon nutritif Difco).

Pour étudier l'importance du dépôt de tellure en fonction de différents substrats

de respiration, les bactéries sont mises à jeûner dans un tampon phosphate pendant 30 min à température ambiante sous vigoureuse agitation. Elles sont ensuite centrifugées et remises en suspension dans un tampon phosphate exempt de substrat ou additionné de l'un des substrats suivants: NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M; succinate de sodium $2 \cdot 10^{-2}$ M; glucose $5 \cdot 10^{-2}$ M; hydrolysat de caséine 0.5 %; extrait de levure 0.5 %.

Ces différents échantillons sont incubés pendant 30 min à 37° en présence de 0.5 % de tellurite de potassium.

(b) *Marquage au tellurite avant la formation des protoplastes.* Les bactéries cultivées en bouillon nutritif, sont traitées 30 min au tellurite de potassium dans les conditions précédemment décrites. Elles sont ensuite centrifugées et transformées en protoplastes. Les échantillons sont prélevés à 0, 10 et 20 min et fixés à la glutaraldéhyde.

(c) *Marquage pendant la plasmolyse et la formation des protoplastes.* Les bactéries sont centrifugées, mises en suspension dans le milieu synthétique utilisé pour la formation des protoplastes ou dans du bouillon nutritif additionné de saccharose 0.5 M, contenant 0.05 % de tellurite de potassium. Après 30 min de contact avec le tellurite de potassium, on ajoute 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lysozyme et l'on fixe des échantillons à 0, 10 et 30 min.

(d) *Marquage après la formation des protoplastes.* Les protoplastes une fois formés en milieu synthétique ou en bouillon additionné de saccharose reçoivent 0.05 % de tellurite de potassium et sont fixés après 30 min.

(e) *Marquage des fractions membranaires.* Les fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques brutes (FC et FM) sont obtenues selon la technique décrite dans la réf. 22. Les membranes, resuspendues en tampon phosphate additionné ou non de NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M, sont incubées en flacons bouché à 37° en présence de 0.05 % de tellurite de potassium pendant 30 min à 2 h. Elles sont ensuite déposées sur des grilles porte-objet puis recouvertes d'une goutte de phosphotungstate de sodium 2 % puis séchées.

III. Techniques de microscopie électronique

(a) *Observation des bactéries entières.* Les bactéries préalablement traitées au tellurite de potassium sont étalées sur boîtes collodionnées²⁵, fixées aux vapeurs de formol et recueillies sur les grilles. L'observation au microscope électronique permet une estimation du nombre et de la taille des aiguilles de tellure.

(b) *Contraste négatif.* 0.4 ml de l'échantillon à observer est mélangé à 0.1 ml de glutaraldéhyde 5 % tamponnée à pH 6. Après 5 min de fixation, une grille porte-objet est déposée à la surface de cette suspension, rapidement étanchée puis posée à la surface d'une solution de phosphotungstate de sodium 1 % et séchée de nouveau.

(c) *Coupes.* Les échantillons sont centrifugés. Le culot est mis en suspension dans du milieu complexe additionné d'agar 2 %. Pour les protoplastes, on ajoute du saccharose 0.5 M afin de conserver l'hypertonie du milieu. Une fois solidifié, l'agar est découpé en petits cubes qui sont fixés à la glutaraldéhyde 5 % en tampon véronal pH 6 pendant une nuit, puis laissés deux heures dans l'acétate d'uranyle et déshydratés à l'acétone avant d'être inclus dans l'araldite. La fixation au tétraoxyde d'osmium n'a pas été utilisée, car elle fait disparaître la plupart des aiguilles de tellure. De même, nous avons évité l'inclusion au Vestopal qui décolore les blocs et fait dis-

paraître les aiguilles. Les coupes, faites au microtome Porter Blum, sont contrastées à l'acétate d'uranyl et examinées au microscope Siemens Elmiskop I.

(IV) *Mesures de la consommation d'oxygène*

Les vitesses de consommation d'oxygène ont été mesurées par méthode polarographique à l'aide d'une électrode de Clark (oxygraph Gilson). Les mesures sont réalisées à 30° dans un mélange contenant: 4 ml de tampon phosphate $5 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7, préincubé à 30° et saturé d'air filtré sur filtre Seitz; 0.1 ou 0.2 ml d'une suspension bactérienne contenant de l'ordre de 500 μg poids sec de bactéries; 0.1 ml de solution de substrat.

(V) *Le dosage des protéines*

Il a été réalisé par la méthode de LOWRY *et al.*²⁶. La courbe étalon a été établie à chaque dosage, à l'aide d'une solution mère de lysozyme de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

RÉSULTATS

Dans les conditions d'expérience et de fixation employées, le tellurite de potassium est réduit sous forme de petites aiguilles de tellure que l'on distingue facilement au microscope électronique.

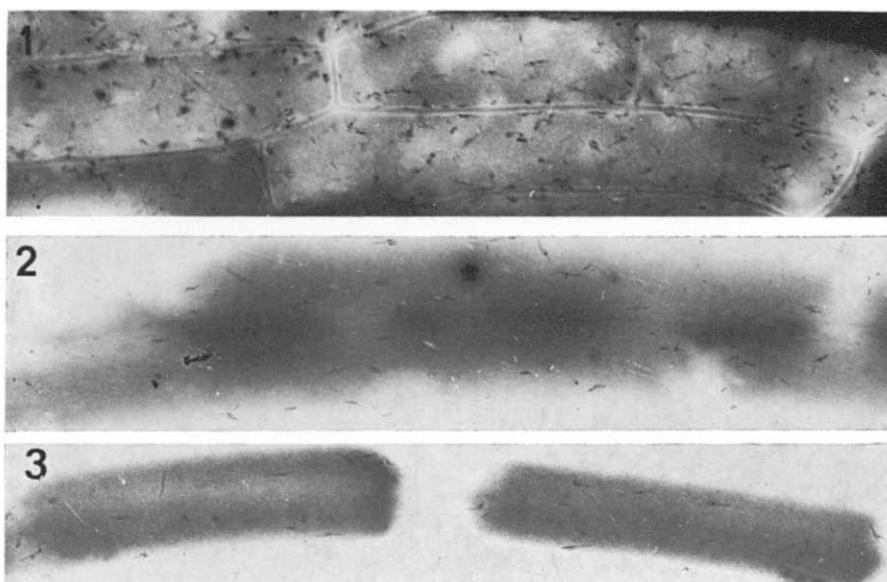


Fig. 1. Bactéries traitées au tellurite de potassium en bouillon nutritif et examinées *in toto*. $\times 19000$.

Figs. 2-7. Bactéries examinées *in toto* après avoir jeûné, puis traitées au tellurite de potassium en présence de différents substrats. $\times 19000$.

Fig. 2. Aucun substrat n'a été ajouté. Quelques aiguilles de tellure sont cependant formées.

Fig. 3. Addition de succinate. Aucun changement par rapport au témoin sans substrat.

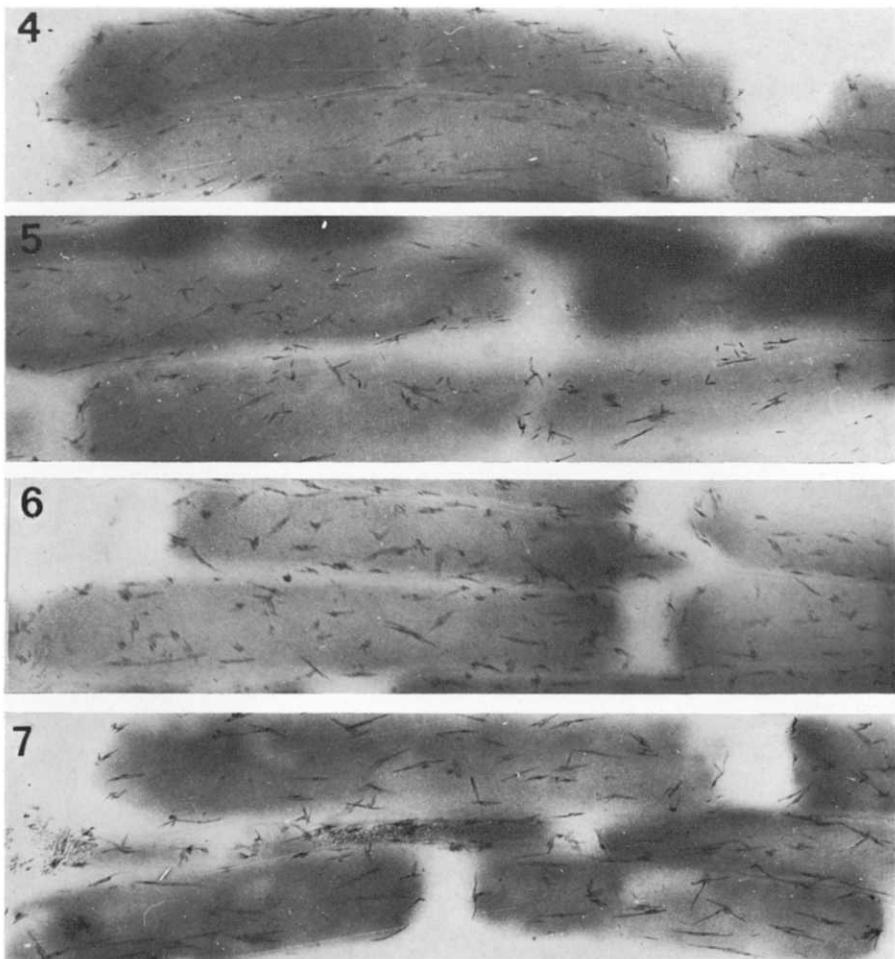


Fig. 4. Addition de glucose.

Fig. 5. Addition d'hydrolysat de caséine.

Fig. 6. Addition d'extrait de levure.

Fig. 7. Addition de NADH. Le nombre et la taille des aiguilles augmentent nettement après addition des quatre derniers substrats (Figs. 4-7). Les aiguilles sont toujours associées en petits amas. Ces derniers sont dispersés de façon homogène sur toute la surface des cellules.

(I) *Etude comparative entre la réduction du tellurite et la respiration cellulaire*

(a) *Réduction du tellurite.* Les bactéries ont été d'abord examinées *in toto*, afin de comparer le nombre et la taille des aiguilles suivant la composition du milieu d'incubation (Figs. 1-7). Dans les deux expériences réalisées, le nombre moyen d'aiguilles par bactérie a été établi pour chaque échantillon sur une cinquantaine de bactéries.

Les bactéries mises en présence de tellurite dans leur milieu de croissance, portent après 30 min d'incubation une trentaine d'aiguilles (Fig. 1). Les bactéries,

épuisées de leurs réserves endogènes puis mises en contact avec du tellurite en absence de substrat, présentent encore une vingtaine d'aiguilles de taille très réduite (Fig. 2), bien que la respiration endogène des bactéries, mesurée par polarographie soit pratiquement nulle, l'addition de succinate n'augmente ni le nombre, ni la taille des aiguilles (Fig. 3). Il est probable que cette absence de réaction est due à une pénétration très lente du succinate, ou à une absence du système de dégradation du succinate²³. La présence de glucose ou d'hydrolysat de caséine provoque la formation de 30-40 aiguilles de taille plus importante (Figs. 4 et 5). Enfin, si l'on ajoute du NADH ou de l'extrait de levure les aiguilles sont à la fois plus nombreuses (60-70) et plus longues (Figs. 6 et 7). Des incubations prolongées jusqu'à 45 ou 60 min augmentent la taille des aiguilles sans en augmenter le nombre. Le Tableau II présente à titre d'exemple les chiffres précis d'une des expériences réalisées.

TABLEAU II

ÉTUDE DE LA FORMATION DES AIGUILLES DE TELLURE CHEZ DES BACTÉRIES ÉPUISÉES DE LEURS RÉSERVES ENDOGÈNES PUIS MISES EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS

Substrat ajouté	Nombre de bactéries examinées	Nombre total d'aiguilles	Nombre d'aiguilles par bactérie
Succinate	50	1150	23 ± 3
Casamino-acides	50	1150	23 ± 3
Glucose	42	1340	32 ± 3
NADH	55	2250	41 ± 4
Extrait de levure	42	2440	58 ± 4
	48	3140	65 ± 4

(b) *Mesure de la respiration cellulaire.* La vitesse de respiration de *B. subtilis* maintenu dans son milieu de culture est de $Q_{O_2} = 240 \pm 20 \mu\text{l/h}$ et mg de poids sec. Si, au cours de la mesure, on ajoute de l'extrait de levure à raison de 0.5 % (p/v), la valeur de Q_{O_2} s'élève à 390 ± 25 (résultats obtenus sur huit cultures différentes). Ces mesures se faisant par méthode polarographiques dans un espace de temps très court (moins de 1/10 du temps de génération), il s'agit bien de vitesse de respiration pratiquement indépendante de l'augmentation de la masse cellulaire. Notons que CHAIX *et al.*²⁸ ont obtenu des chiffres analogues avec la souche *B. subtilis* 3610.

Afin d'apprécier la vitesse de respiration de la cellule de *B. subtilis* en fonction de différents substrats nous avons tenté de réduire la respiration endogène des bactéries, soit par lavage, soit par carence de 30 min. Le Tableau III résume les résultats obtenus. La respiration des bactéries, récoltées mais non lavées, est élevée; l'accélération de cette respiration n'est possible qu'avec de l'extrait de levure. Par contre, des lavages répétés ou un jeûne de 30 min, abaissent cette respiration endogène, sans altérer toutefois la capacité des bactéries à dégrader les substrats ajoutés. On observe une augmentation nette de la vitesse de respiration des bactéries carencées, surtout après addition d'extrait de levure ou de NADH. L'augmentation enregistrée est plus faible après addition d'hydrolysat de caséine et de glucose. En revanche, il n'a jamais été possible d'accélérer la respiration endogène de *B. subtilis* en utilisant le succinate comme substrat. La parfaite concordance entre les mesures de respiration et le dépôt

TABLEAU III

VARIATION DES VITESSES DE RESPIRATION (Q_{O_2} , $\mu l/h$ ET mg POIDS SEC) DE CELLULES DE *B. subtilis* À L'ÉTAT NON PROLIFÉRANT, APRÈS CULTURE SUR MILIEU À L'EXTRAIT DE LEVURE ADDITIONNÉ DE GLUCOSE

Les valeurs indiquées sont des valeurs moyennes, obtenues avec 8 cultures différentes. L'écart à la moyenne a été de 10-15 %.

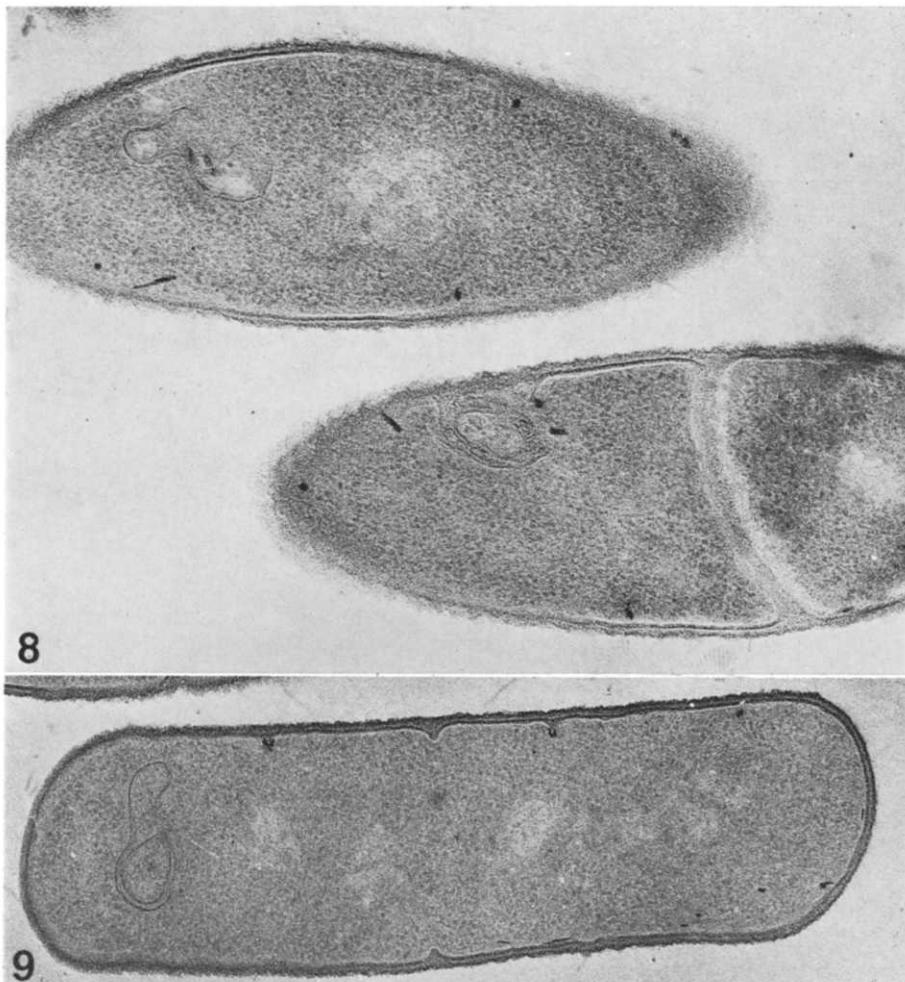
<i>Cellules de B. subtilis</i> récoltées	<i>Substrat, respiration sur</i>	Q_{O_2}
Non lavées	—	150
	Extrait de levure 0.5 %	225
	Glucose $5 \cdot 10^{-2}$ M	—
	Casamino-acides 0.5 %	—
Lavées 1 fois	—	80
	Extrait de levure 0.5 %	170
	Glucose $5 \cdot 10^{-2}$ M	102
	Casamino-acides 0.5 %	62
Lavées 2 fois	—	30
	Extrait de levure 0.5 %	170
	Glucose $5 \cdot 10^{-2}$ M	96
	Casamino-acides 0.5 %	60
Carence de 30 min	—	40
	Extrait de levure 0.5 %	140
	Glucose $5 \cdot 10^{-2}$ M	100
	Casamino-acides 0.5 %	90
	Succinate $2 \cdot 10^{-2}$ M	40
	NADH $2.5 \cdot 10^{-4}$ M	165

de tellure formé selon le substrat ajouté montre que le tellurite de potassium rend compte d'une réaction d'oxydo réduction liée à la respiration.

(II) Localisation des aiguilles de tellure sur coupes

(a) *Etude faite sur des bactéries en croissance ou mises en présence de divers substrats.* L'examen des coupes de bactéries traitées au tellurite de potassium dans leur milieu de croissance (bouillon nutritif) révèle toujours un nombre très restreint d'aiguilles. Ceci n'a d'ailleurs rien de surprenant puisque le volume cellulaire contenu dans une coupe ne représente qu'une petite fraction du volume total (entre 1/15 et 1/50 selon le plan de la coupe par rapport au grand axe de la bactérie). La détermination de la localisation des aiguilles de tellure nécessite donc l'examen d'un grand nombre de coupes. Il ressort de cet examen que la plupart des aiguilles sont localisées sur la face interne de la membrane cytoplasmique (Figs. 8 et 9). Quelques unes sont situées sur la membrane qui forme la poche mésosomique (Figs. 9 et 10) mais il est très exceptionnel d'en rencontrer à l'intérieur des mésosomes.

Une détermination quantitative du nombre des aiguilles présentes sur 78 coupes bactériennes, dont 28 présentaient un mésosome, montra que sur les 237 aiguilles dénombrées, 213 se trouvaient sur la membrane cytoplasmique, 21 étaient localisées sur la membrane formant la poche mésosomique et que 3 seulement ont été observées à l'intérieur de mésosomes. Dans les conditions expérimentales utilisées, aucun dépôt



Figs. 8-10. Coupes de cellules de *B. subtilis* traitées pendant 30 min au tellure de potassium. Les aiguilles se sont déposées sur la face interne de la membrane cytoplasmique et souvent sur la membrane formant la poche mésosomique. En revanche, on ne trouve pas d'aiguille de tellure à l'intérieur des mésosomes. Fig. 8 $\times 55000$. Fig. 9 $\times 40000$. Fig. 10 $\times 65000$.

granulaire identique à celui signalé par VAN ITERSON ET LEENE⁵ ne s'est formé à l'intérieur des mésosomes.

L'addition de différent substrats (NADH, succinate, de sodium, glucose, hydrolysat de caséine, extrait de levure) ne modifie pas la localisation des aiguilles de tellure, contrairement aux observations faites par Nermut en contraste négatif (communication personnelle). D'ailleurs, cette localisation éventuelle d'aiguilles de tellure dans les mésosomes est difficile à faire, car après 30 min de jeûne (même sous vigoureuse agitation), les mésosomes sont souvent altérés et disparaissent en grande partie (Fig. 11).

(b) *Etude faite sur des protoplastes.* Les études précédentes²⁹⁻³¹ ont montré que l'introduction de *B. subtilis* en milieu hypertonique provoque l'ouverture de la poche

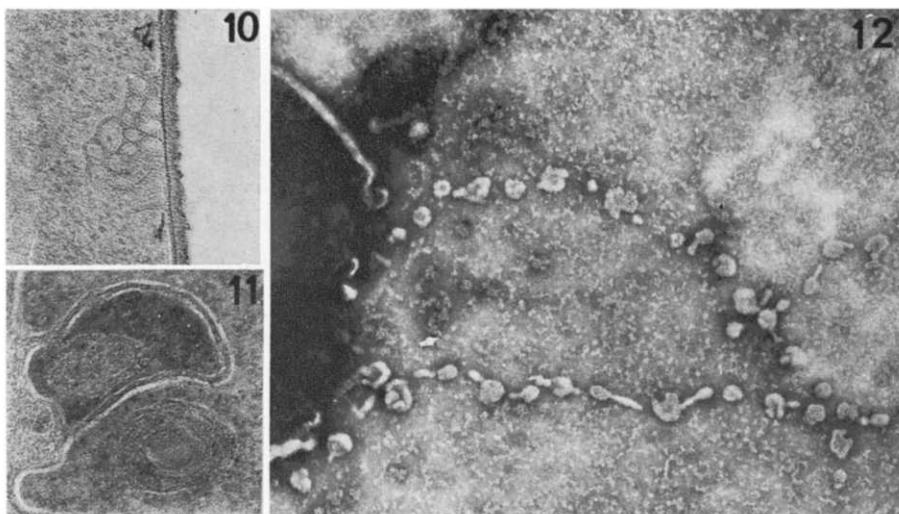


Fig. 11. Mésosome d'une cellule de *B. subtilis* ayant jeûné pendant 45 min en tampon phosphate. Il ne contient plus ni tubules ni vésicules. $\times 45000$.

Fig. 12. Protoplasme de *B. subtilis* observé en contraste négatif. Il s'est lysé au cours de la préparation et les vésicules des tubules mésosomiques se sont séparées et ont éclatées. $\times 30000$.

TABLEAU IV

LOCALISATION DES AIGUILLES AU COURS DE LA FORMATION DE PROTOPLASTES

Localisation des aiguilles	Addition de tellurite		
	Avant la formation de protoplastes (Fig. 13)	Pendant la formation de protoplastes (Fig. 14)	Après la formation de protoplastes (Fig. 15)
Membrane cytoplasmique	+	+	+
Membrane mésosomique	—	—	—
Cytoplasme (amas d'aiguilles)	—	+	+

mésosomique et la sortie des tubules mésosomiques. Ainsi, les bactéries plasmolysées et les protoplastes ne contiennent jamais de mésosomes intracytoplasmiques mais portent des tubules mésosomiques externes. Examinés en contraste négatif³², les tubules mésosomiques se présentent généralement sous l'aspect d'un chapelet de petites vésicules. Ces vésicules paraissent assez fragiles, se séparent les unes des autres, se déforment et éclatent facilement sous l'effet de choc osmotique (Fig. 12). C'est pourquoi, les tubules mésosomiques isolés et purifiés se présentent presque toujours sous l'aspect de vésicules isolées, souvent gonflées et parfois même éclatées (Fig. 18)²².

L'addition de tellurite de potassium avant, pendant ou après la formation des protoplastes a conduit aux observations résumées dans le Tableau IV et illustrées par les Figs. 13-16. Dans toutes les conditions de marquage utilisées, les aiguilles se forment le long de la membrane cytoplasmique. Dans de nombreux cas, les aiguilles sont situées près du point d'insertion des tubules mésosomiques (Figs. 15 et 16), mais

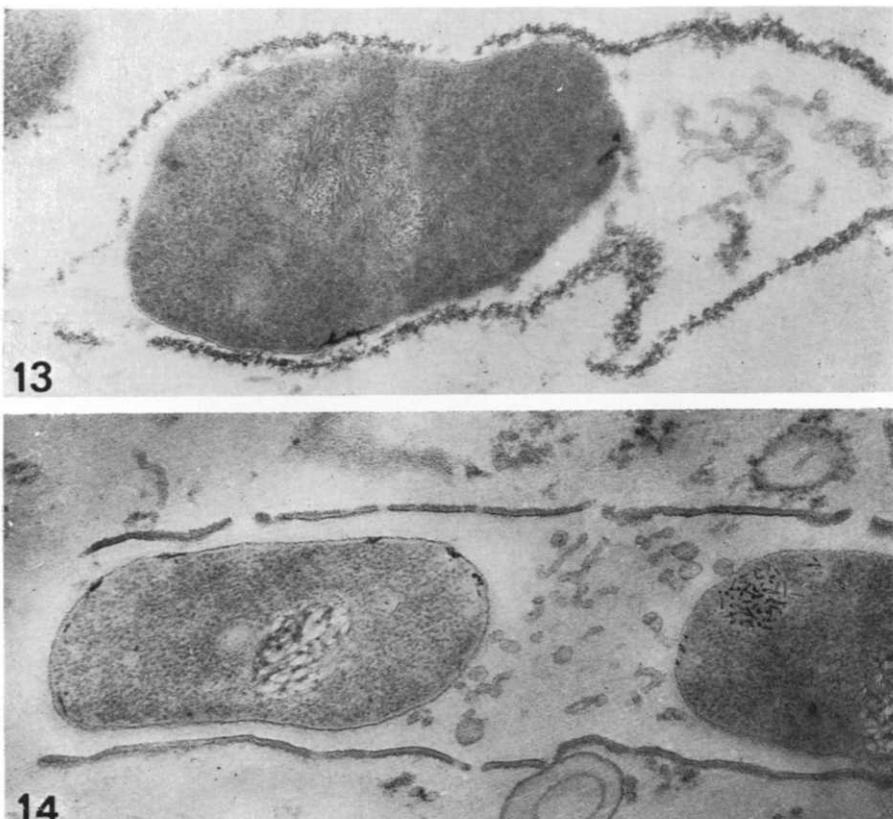
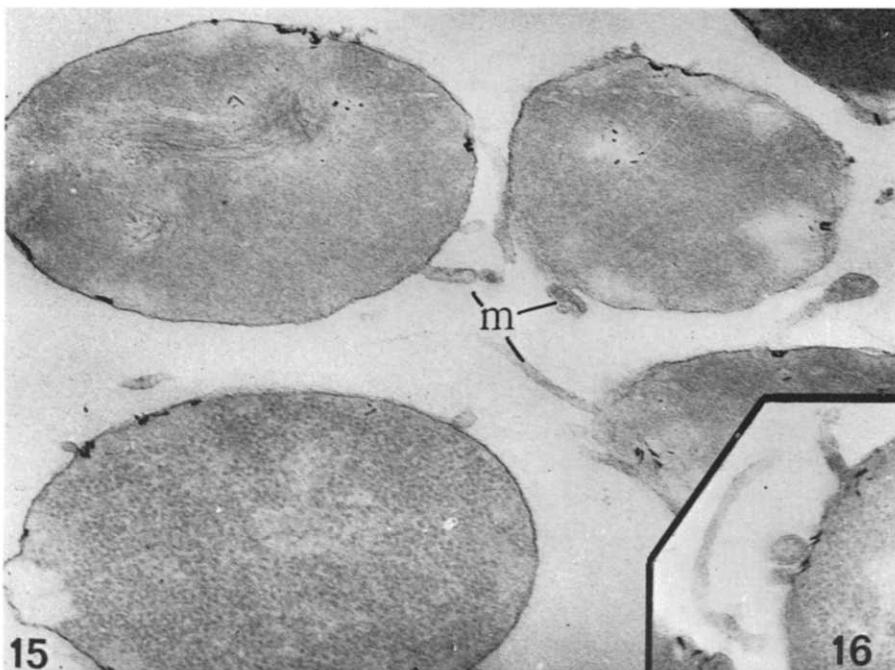


Fig. 13. Cellule de *B. subtilis* traitée au tellurite de potassium sous sa forme bacillaire puis transformée en protoplaste. Les aiguilles de tellure sont situées sur la membrane cytoplasmique et notamment près du site d'insertion de tubules mésosomiques, mais les tubules mésosomiques eux-mêmes ne portent jamais d'aiguilles de tellure. $\times 60000$.

Fig. 14. Cellule de *B. subtilis* traitée au tellurite de potassium pendant la plasmolyse et l'action du lysozyme. Les aiguilles de tellure se sont déposées sur la membrane cytoplasmique et non sur les tubules mésosomiques déroulés. Un amas d'aiguilles est visible dans le cytoplasme de la cellule de droite. $\times 50000$.

les tubules mésosomiques eux-mêmes ne portent jamais d'aiguilles quelque soit le moment où ce marquage a eu lieu.

Cependant, lorsque le marquage au tellurite est fait en milieu hypertonique, c'est-à-dire pendant la formation des protoplastes ou après leur formation, les bactéries plasmolysées ou les protoplastes contiennent des amas d'aiguilles à l'intérieur du cytoplasme, dans des régions périphériques dépourvues de ribosomes (Fig. 14). Ces régions cytoplasmiques ne peuvent en aucun cas correspondre à des mésosomes, d'une part parce que les cellules plasmolysées et les protoplastes ne contiennent jamais de mésosomes intracytoplasmiques et d'autres part parce que ces régions ne présentent jamais la structure vésiculaire ou tubulaire des mésosomes. L'existence de ces amas d'aiguilles de tellure, déjà signalée par KAWATA *et al.*³³ chez des protoplastes de *Bacillus megaterium*, n'a jamais été observée chez des bactéries marquées en milieux



Figs. 15 et 16. Protoplastes de *B. subtilis* traités au tellurite de potassium après leur formation. Les aiguilles se trouvent sur la membrane cytoplasmique mais jamais sur les tubules mésosomiques déroulés (m). Sur la Fig. 16 on voit de nombreuses aiguilles qui se sont formées près du point d'insertion des tubules mésosomiques. Fig. 15 $\times 45000$. Fig. 16 $\times 50000$.

hypo- ou isotonique. Il semble donc que l'introduction des bactéries en milieu hypertonique entraîne le déplacement d'enzymes d'oxydo-réduction de la membrane vers le cytoplasme. Ce déplacement d'enzymes semble toutefois assez faible si l'on se réfère au contrôle d'activité NADH déshydrogénase effectué dans la fraction cytoplasmique soluble.²²

Si la formation des protoplastes est faite en présence de saccharose 1 M au lieu de 0.5 M, la localisation des aiguilles de tellure est la même, mais les aiguilles sont plus petites et moins nombreuses. L'influence de l'hypertonie du milieu sur l'activité respiratoire de la bactérie est également illustrée par les mesures effectuées à l'oxygraph Gilson (Fig. 19). Cet abaissement respiratoire est probablement dû aux profonds remaniements que subit la membrane cytoplasmique dont la surface diminue considérablement lorsque les bactéries sont introduites en milieu hypertonique. Ces remaniements doivent être d'autant plus importants que l'hypertonie du milieu est élevée.

(III) *Marquage au tellurite de potassium des fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques brutes*

La fraction membranaire cytoplasmique brute se présente en contraste négatif sous l'aspect de fragments membranaires de tailles variées, mais généralement assez grands auxquels sont mêlés quelques tubules mésosomiques ou de petites vésicules (Fig. 17)²². Après incubation à 37° pendant 1-2 h en présence de tellurite de potassium



Fig. 17. Fraction membranaire cytoplasmique brute marquée pendant 2 h au tellurite de potassium en présence de NADH puis examinée en contraste négatif. Les aiguilles de tellure se sont formées sur les membranes cytoplasmiques et non sur les petites vésicules ou les fragments de tubules mésosomiques contaminant cette fraction. $\times 30000$.

et de NADH, les gros fragments membranaires portent tous des aiguilles de tellure; toutefois le nombre des aiguilles paraît nettement inférieur à celui observé *in vivo* malgré un temps d'incubation plus prolongé. En revanche, on ne trouve presque jamais d'aiguilles sur les tubules mésosomiques ou les petites vésicules.

La fraction membranaire mésosomique brute est constituée d'un grand nombre de tubules mésosomiques et de petites vésicules et d'un nombre plus ou moins élevé de fragments membranaires cytoplasmiques²². Lorsque cette fraction est mise en présence de NADH et de tellurite, les aiguilles de tellure qui se forment sont toujours localisées en grande majorité sur les membranes cytoplasmiques (Fig. 18). Bien qu'il soit impossible de faire une véritable étude quantitative, car il n'existe pas de point de référence quant aux surfaces membranaires examinées, nous pouvons affirmer toutefois que 90 % des aiguilles observées dans les deux expériences réalisées sont déposées sur les gros fragments membranaires et que 10 % seulement sont situés sur de petites vésicules dont il est impossible d'identifier l'origine. La présence de flagelles sur quelques unes d'entre elles indique cependant que certaines des vésicules marquées au tellure correspondent à de petits fragments de membranes cytoplasmiques et non à des vésicules mésosomiques.

Comme nous l'avons déjà signalé pour la fraction membranaire cytoplasmique,

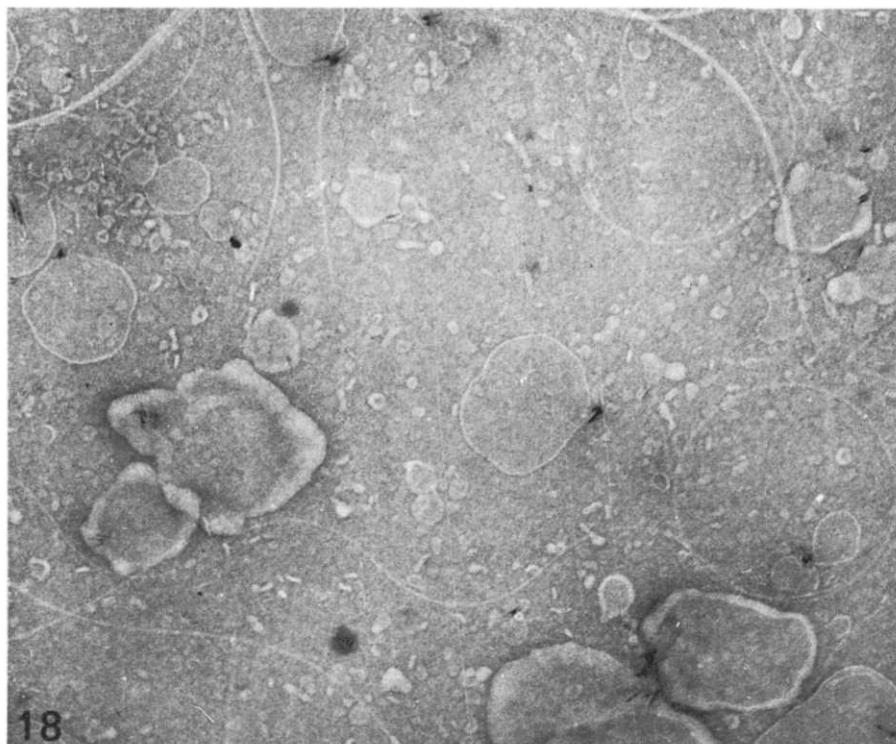


Fig. 18. Fraction mésosomique brute marquée au tellurite de potassium pendant 2 h en présence de NADH puis examinée en contraste négatif. Les quelques aiguilles de tellure visibles sont situées sur les gros fragments membranaires cytoplasmiques contaminant cette fraction. Il est exceptionnel d'en trouver sur les tubules mésosomiques et les petites vésicules qui composent cette fraction. $\times 30000$.

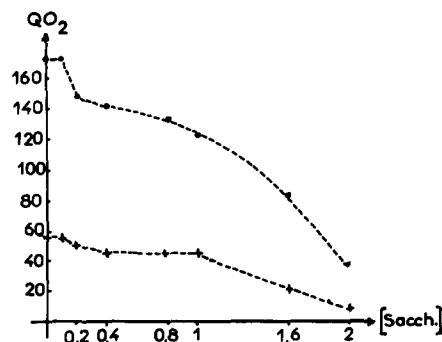


Fig. 19. Effet de l'hypertonicité du milieu sur la vitesse de respiration de *B. subtilis* SMY. +---+, variation de la vitesse de respiration endogène; ●-●, variation de la vitesse de respiration en présence d'une solution d'extrait de levure 0.5%. $QO_2 = \mu\text{l de } O_2 \text{ consommé par h et par mg de poids sec.}$

le nombre des aiguilles n'est jamais aussi élevé sur les fragments membranaires que sur les bactéries marquées *in vivo*. Cette diminution de la capacité des membranes de réduire le tellurite de potassium est probablement due au traitement qu'elles ont

subi lors de leur séparation; il est également vraisemblable que les conditions de réaction ne sont pas identiques à celles existant à l'intérieur des bactéries vivantes.

En plus de la formation des aiguilles de tellure, il se forme toujours dans les deux types de fractions membranaires un précipité très grossier offrant l'aspect de petites sphères denses aux électrons de 0.01μ de diamètre agrégées les unes aux autres. Ce précipité semble se former dans le milieu de réaction et ne s'associer ni aux membranes cytoplasmiques ni aux mésosomes. Il semble toutefois résulter d'une réaction enzymatique car il n'apparaît que lorsque NADH est ajouté à la suspension de membranes et de tellurite. Pour l'instant, la formation de ce précipité qui paraît tout à fait différente de celle des aiguilles de tellure reste inexplicable.

DISCUSSION

Cette étude montre tout d'abord que la formation d'aiguilles de tellure reflète l'activité respiratoire de la bactérie, puisque le nombre et la taille des aiguilles sont proportionnels à la consommation de O_2 mesurée dans l'oxygraph de Gilson.

La localisation des aiguilles de tellure sur la membrane cytoplasmique semble indiquer que l'activité respiratoire de la bactérie est essentiellement située sur cette enveloppe. En revanche, l'absence quasi totale d'aiguilles sur les tubules mésosomique indique que ces structures membranaires ne jouent pas un rôle prépondérant dans la respiration. Ces conclusions sont entièrement confirmées par l'analyse enzymatique des fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques effectuées chez *B. subtilis*^{22, 34}. Ces résultats sont également en accord avec l'analyse enzymatique entreprise chez d'autres bactéries Gram positif^{13, 18, 19}.

Comme nous l'avons vu, la localisation des aiguilles de tellure ne change pas au cours de la formation des protoplastes quelque soit le moment où le marquage a lieu. Elle persiste également dans les fractions membranaires. On peut donc affirmer que la technique d'isolement des mésosomes et des membranes cytoplasmiques, nécessitant la transformation des bactéries en protoplastes, ne provoque pas de changement dans la localisation des enzymes respiratoires et que les mesures d'activité enzymatique effectuées sur ces fractions reflètent assez exactement la situation existant *in vivo*.

Si l'ensemble des études enzymatiques faites chez diverses bactéries Gram positif indiquent que les mésosomes ne jouent pas de rôle important dans la respiration^{13, 18, 19, 22} il reste à déterminer le type de réactions d'oxydo-réduction que beaucoup d'auteurs ont observé à l'aide de diverses techniques cytochimiques (voir Tableau I). Bien que l'utilisation de ces techniques soit délicate et que les conditions d'expérimentation puissent en fausser parfois l'interprétation, il paraît hors de doute que les mésosomes sont le siège de réactions d'oxydo-réduction. Il n'est pas impossible qu'elles soient associées à la présence de certains cytochromes que FERRANDES ET CHAIX³⁵ et LUBOCHINSKI ET BURGER³⁶ ont trouvé dans la fraction mésosomique et non dans la fraction membranaire cytoplasmique.

RÉSUMÉ

Cette étude porte sur la localisation des sites d'oxydo-réduction chez *Bacillus subtilis* détectables au moyen du tellurite de potassium. Ce sel se dépose sous forme de petites aiguilles visibles au microscope électronique. Leur taille et leur nombre

varient en fonction du substrat et restent proportionnels aux mesures de respiration. Ces aiguilles se déposent exclusivement sur la membrane cytoplasmique et jamais à l'intérieur des mésosomes. Cette localisation ne change pas au cours de la formation des protoplastes et du déroulement des tubules mésosomiques. Ceci indique que la technique de séparation des mésosomes et des membranes cytoplasmiques qui comporte la formation de protoplastes, n'entraîne pas de changements importants dans la localisation des enzymes respiratoires.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Professeurs F. Jacob et P. Chaix pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail et Monsieur J. C. Bénichou pour son aide technique.

Ce travail a bénéficié de l'aide du Centre National de la Recherche scientifique, de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique et de National Institute of Health.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 P. C. FITZ-JAMES, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 8 (1960) 507.
- 2 W. VAN ITERSON, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9 (1961) 183.
- 3 A. M. GLAERT ET D. A. HOPWOOD, *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7 (1960) 488.
- 4 L. VANDERWINKEL ET R. G. E. MURRAY, *J. Ultrastruct. Res.*, 7 (1962) 185.
- 5 W. VAN ITERSON ET W. LEENE, *J. Cell Biol.*, 20 (1964) 361.
- 6 W. LEENE ET W. VAN ITERSON, *J. Cell Biol.*, 27 (1965) 237.
- 7 A. SEDAR ET R. M. BURDE, *J. Cell Biol.*, 27 (1965) 53.
- 8 A. RYTER, *Folia Microbiol.*, 12 (1967) 283.
- 9 J. YAMAGUCHI, F. ARIJI ET F. FUKUSHI, *4th Intern. Congr. Electron Microscop.*, Tokyo, R. Vyeda Maruzen Co., 1966, 249.
- 10 A. TAKAGI, K. UHEYAMA ET M. UEDA, *Yonaga Acta Med.*, 7 (1963) 18.
- 11 A. TAKAGI, K. UHEYAMA ET M. UEDA, *J. General Exptl. Microbiol.*, 9 (1963) 287.
- 12 T. KAWATA ET T. INOUE, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 11 (1965) 115.
- 13 B. K. GHOSH ET R. G. E. MURRAY, *J. Bacteriol.*, 97 (1969) 426.
- 14 J. P. BROWN, M. EDWARDS ET P. J. VANDERMARK, *Can. J. Microbiol.*, 14 (1968) 823.
- 15 I. H. TORJAN ET L. N. KATZ, *Acad. Sci. SSSR*, 37 (1968) 1039.
- 16 P. C. FITZ-JAMES, *Protides of Biological Fluids*, Vol. 15, Elsevier, Amsterdam, 1967, p. 301.
- 17 B. FERRANDES, P. CHAIX ET A. RYTER, *Compt. Rend.*, 263 (1966) 1632.
- 18 D. A. REAVELEY ET H. J. ROGERS, *Biochem. J.*, 113 (1969) 67.
- 19 M. G. SARGENT, B. K. GHOSH ET J. O. LAMPEN, *J. Bacteriol.*, 96 (1968) 1329.
- 20 R. J. BARNETT ET G. E. PALADE, *Histochem. Cytochem.*, 6 (1958) 1.
- 21 M. POURBAIX, *Atlas d'Équilibre Electrochimique à 25°C*, Gauthier-Villars, Paris.
- 22 B. FERRANDES, C. FREHEL ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 292.
- 23 A. RYTER, *Ann. Inst. Pasteur*, 108 (1965) 40.
- 24 B. FERRANDES, *Thèse de 3ème cycle Faculté des Sciences*, Paris, 1968.
- 25 E. KELLENBERGER, *Symp. Bacteriol. Cytol. Suppl. Rediconti Inst. Sup. San.*, (1953) 45.
- 26 O. M. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET A. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 27 J. SZULMAJSTER, *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 46 (1964) 443.
- 28 P. CHAIX, A. LORTHOIS ET I. ISSALY, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 151.
- 29 A. RYTER ET F. JACOB, *Ann. Inst. Pasteur*, 107 (1964) 384.
- 30 A. RYTER ET O. LANDMAN, *J. Bacteriol.*, 88 (1964) 457.
- 31 P. FITZ-JAMES, *J. Bacteriol.*, 87 (1965) 1483.
- 32 A. RYTER, C. FREHEL ET B. FERRANDES, *Compt. Rend.*, 265 (1967) 1265.
- 33 T. KAWATA, T. SALL ET D. MUDD, *J. Bacteriol.*, 79 (1960) 459.
- 34 C. FREHEL, A. RYTER, B. FERRANDES ET P. CHAIX, *4th European Conf. Electron Microscop.*, Rome, 1968, Tipografia Poliglotta vaticana, p. 441.
- 35 B. FERRANDES ET P. CHAIX, en préparation.
- 36 B. LUBOCHINSKI ET M. M. BURGER, en préparation.