

SYSTEME CYTOCHROMIQUE DES MEMBRANES CYTOPLASMIQUES ET DES MEMBRANES MESOSOMIQUES DE *BACILLUS SUBTILIS*

B. FERRANDES ET P. CHAIN

Laboratoire de Chimie Biologique de l'Université Paris VI, Paris (France)

(Reçu le 26 juillet, 1971)

(Manuscrit révisé reçu le 25 octobre, 1971)

SUMMARY

*The cytochromes of cytoplasmic and mesosomal membranes of *Bacillus subtilis**

The cytoplasmic membranes and the mesosomal membranes of *Bacillus subtilis* were separated by means of a method previously described and it was shown that:

1. The cytoplasmic membranes contain exclusively the cytochromes α_{553} , α_{557} and α_{600} ($a + a_3$) and possess high NADH oxidase, succino-dehydrogenase, succino-oxidase and (ascorbate + *N,N,N',N'*-tetramethyl-1,4-phenylenediamine (TMPD)-oxidase activities.

2. The mesosomal membranes contain exclusively the cytochromes $\alpha_{548.5}$ and $\alpha_{561.5}$. Their succino-oxidase activity is practically nil; neither cytochrome is reducible by succinate. On the contrary, their NADH-oxidase and (ascorbate + TMPD)-oxidase activities are comparatively higher; both cytochromes can accept electrons from NADH and (ascorbate + TMPD).

INTRODUCTION

L'ensemble des recherches que nous poursuivons depuis plusieurs années¹⁻³, sur *Bacillus subtilis*, dans le but de connaître la répartition, dans les membranes cytoplasmiques ou mésosomiques, des cytochromes ($\alpha_{548.5}$; α_{553} ; α_{557} ; $\alpha_{561.5}$; $\alpha_{600} = a + a_3$) mis en évidence chez ce microorganisme⁴ et leurs rôles respectifs, nous a précédemment conduits:

A mettre au point une technique de séparation relativement grossière de fractions cytoplasmiques et mésosomiques brutes¹, et ensuite une technique de purification de ces fractions par séparation, en gradient de densité de saccharose². Cette seconde étape a permis d'obtenir des membranes mésosomiques et cytoplasmiques purifiées, morphologiquement et fonctionnellement bien distinctes².

Les expériences décrites dans le présent travail se rapportent à l'étude de la répartition des activités NADH-oxydase, succino-oxydase et (ascorbate + TMPD)-

Abbréviations: TMPD, *N,N,N',N'*-tetraméthyl-1,4-phenylenediamine; PMS, phénazine méthosulfate; DCIP, 2,6-dichlorophénol indophénol; HOQNO, 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxyde.

oxydase et de la répartition des cytochromes dans les fractions membranaires cytoplasmiques d'une part, et mésosomiques d'autre part, purifiées à partir de *B. subtilis*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Produits utilisés

Lysozyme, Worthington Biochem. Corp.; desoxyribonucléase, Fluka; nicotinamide-adénine dinucléotide réduit (NADH), Boehringer; succinate de sodium, Prolabo; L(+)-ascorbate de sodium, Fluka; N,N,N',N'-tetraméthyl-1,4-phénylénediamine (TMPD), Fluka; phénazine méthosulfate (PMS), Aldrich; 2,6-dichlorophénol indophénol (DCIP), Fluka; 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxyde (HQNO), Sigma.

Souche, conditions de culture

B. subtilis SMY a été cultivé sur milieu liquide complexe non-glucosé, suivant des conditions déjà décrites². Les cellules sont récoltées au cours de la phase exponentielle de croissance.

La préparation des fractions membranaires brutes

La préparation de la fraction cytoplasmique et de la fraction mésosomique et leur purification par centrifugation en gradient de densité ont été effectuées d'après la technique décrite précédemment².

Mesures des activités enzymatiques

Les activités NADH-oxydase, succino-oxydase et (ascorbate + TMPD)-oxydase sont mesurées polarographiquement selon les méthodes déjà décrites², et exprimées en natomes d'oxygène consommés par minute et par mg de protéines. Lors de l'emploi d'un inhibiteur, celui-ci a toujours été introduit dans la suspension de membranes avant l'addition du substrat. L'activité succino-déshydrogénase a été dosée par la méthode décrite².

Etude quantitative des propriétés spectrales

À température ordinaire; spectres de différence réalisés sur des suspensions particulières

Les spectres de différence (forme réduite contre forme oxydée) des différentes fractions membranaires, utilisées sous forme de suspensions (2 à 4 mg de protéines par ml), placées dans des cuves de 0,5 ou 1 cm de trajet optique, ont été enregistrées avec un spectrophotomètre LERES (type SPILA DMS). Les hémoprotéines, présentes dans ces membranes, sont, en général, à l'état oxydé. Si les hémoprotéines se trouvent à l'état réduit, on épouse les substrats endogènes en soumettant à un barbotage d'air la suspension membranaire.

Lors de chaque enregistrement, il est nécessaire d'établir d'abord la ligne de base (membranes oxydées/membranes oxydées). Puis le contenu de la cuve de mesure est réduit soit par le dithionite, soit par addition d'un substrat: NADH, succinate ou (ascorbate + TMPD). Dans la zone d'absorption des bandes γ des cytochromes, les spectres ont été enregistrés avec 50 % ou 20 % de transmission en utilisant les échelles d'expansion et, dans la zone des bandes β et α , avec 20 % et 10 % de transmission.

Une estimation quantitative des hémoprotéines n'est possible qu'après une soigneuse rectification, point par point, des spectres obtenus, par rapport à la ligne de base.

Quand l'estimation est faite à partir du spectre des bandes γ on détermine: dans le cas des cytochromes de type $(b + c)$, la différence d'absorption entre $\lambda = 427$ nm (pic γ d'absorption) et $\lambda = 470$ nm (point isobeste); dans le cas des cytochromes $(a + a_3)$, la différence d'absorption entre 443 et 470 nm.

L'estimation quantitative des hémoprotéines n'est pas toujours possible directement à partir de l'absorption des bandes α car les phénomènes de diffusion sont moins bien compensés. Pour procéder à cette estimation dans le cas des cytochromes $(b + c)$, $\alpha = 558$ nm, il est d'abord nécessaire de tracer une ligne de référence entre les absorptions à $\lambda = 540$ nm et $\lambda = 580$ nm, puis de mesurer la différence entre l'absorption à $\lambda = 558$ nm et cette droite de référence. Dans le cas des cytochromes $(a + a_3)$, $\alpha = 600$ nm, la ligne de référence est tracée entre $\lambda = 580$ nm et $\lambda = 625$ nm, puis on mesure la différence d'absorption entre $\lambda = 600$ nm et cette droite de référence.

L'absorption spécifique a été calculée en ramenant les différences indiquées ci-dessus au mg de protéine, pour un trajet optique de 1 cm.

A basse température

Les spectres à basse température des différentes fractions membranaires étudiées, ont été réalisés à l'aide du spectrophotomètre enregistreur LERES, suivant la technique décrite par LABBE ET CHAIX⁵. Le spectre d'absorption est enregistré en utilisant l'expanseur d'échelle sur la position 10 % de transmission (environ 0.05 A sur 20 cm de papier d'enregistrement). Les spectres des états d'équilibre piégés à basse température ("trapped steady state") ont été réalisés à l'aide du même matériel.

Sur le spectre des différentes fractions membranaires à l'état totalement réduit (dithionite), nous avons tenté d'estimer, d'une façon semi-quantitative chacun des cytochromes présents, en calculant l'absorption spécifique (hauteur/mg protéine) pour chacun des pics d'absorption ($\alpha_{548.5}$, α_{553} , α_{557} , $\alpha_{561.5}$, α_{600}) décelés à basse température chez *B. subtilis*.

Nous avons aussi calculé le pourcentage de réduction des différents cytochromes en présence de NADH, succinate, (ascorbate + TMPD), pendant l'état d'équilibre aérobie ou dans l'état anaérobie, en prenant pour référence la réduction totale obtenue en présence de dithionite.

Etudes spectrales avec un spectrophotomètre à double longueur d'onde: Amino-Chance: échelle de transmission 1 % ou 2 %

L'étude cinétique de réduction des cytochromes a été réalisée à 30°; la réaction est déclenchée par l'addition du substrat.

Bilan de purification des fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques brutes par séparation en gradient de densité; degré de purification des sous-fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques

Après purification des fractions cytoplasmiques ou mésosomiques par séparation sur gradient de saccharose, nous avons calculé, pour chaque activité enzymatique étudiée, l'activité spécifique et l'activité totale de chaque sous-fraction membranaire. Ceci nous a permis de déterminer le bilan de la purification². Pour chaque sous-fraction membranaire obtenue, nous avons également tenté d'apprécier un degré de purification. Le degré de purification correspond au rapport entre activité

spécifique, ou absorption spécifique, de la fraction considérée et activité spécifique, ou absorption spécifique, de la fraction brute dont elle est issue.

Le dosage des protéines a été effectué par la méthode de LOWRY *et al.*⁶ en utilisant le lysozyme comme protéine de référence.

RÉSULTATS

Nous avions précédemment établi que les fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques brutes préparées à partir de *B. subtilis* cultivé sur milieu glucosé (synthétique ou complexe), présentaient une activité succino-oxydase difficilement mesurable², et des activités (ascorbate + TMPD)-oxydase et succino-deshydrogénase très faibles.

Ayant constaté² que de telles activités deviennent beaucoup plus élevées quand les fractions membranaires cytoplasmiques et mésosomiques sont préparées à partir de *B. subtilis* cultivé sur un milieu complexe non-glucosé, toutes les expériences exposées dans ce mémoire se rapportent à des fractions membranaires issues de *B. subtilis* cultivé sur milieu complexe non-glucosé.

*Etudes de l'activité succino-deshydrogénase et de différentes activités oxydases de différentes fractions membranaires de *B. subtilis* cultivé sur milieu complexe non-glucosé*

Le Tableau I résume les résultats obtenus avec les fractions cytoplasmiques et mésosomiques brutes au cours de plusieurs expériences. On voit que l'activité spécifique NADH-oxydase de la fraction cytoplasmique est nettement plus élevée que celle de la fraction mésomiques (*cf.* réf. 2).

En revanche, les activités spécifiques succino-oxydase et (ascorbate + TMPD)-

TABLEAU I

COMPARAISON DES ACTIVITÉS SPÉCIFIQUES NADH-OXYDASE, SUCCINO-DESHYDROGÉNASE, SUCCINO-OXYDASE ET (ASCORBATE + TMPD)-OXYDASE DES FRACTIONS MEMBRANAIRES BRUTES CYTOPLASMIQUES (FC) ET MÉSOSOMIQUES (FM) ISSUES DE *B. subtilis* CULTIVÉ SUR MILIEU COMPLEXE NON-GLUCOSÉ

Les différentes activités oxydases sont exprimées en nanomoles d'oxygène consommés par minute et par mg de protéine. L'activité succino-deshydrogénase est exprimée en nmoles de DCIP réduites par min et par mg de protéines². Chacune des valeurs données dans ce tableau représente la moyenne de 3 mesures.

Activité	Exp.	Activité spécifique des fractions		Act. spéc. FC
		FC	FM	Act. spéc. FM
NADH-oxydase	1	1350	202	5.1
	2	1500	270	5.6
	3	1250	164	7.6
Succino-deshydrogénase	1	585	55 ²	1.1
	2	650	555	1.2
Succino-oxydase	1	25	31	0.8
	2	38	25	1.5
	3	25	37	0.7
(Ascorbate + TMPD)-oxydase	1	65	132	0.5
	2	82	120	0.7
	3	52	85	0.6

oxydase sont plus élevées dans la fraction mésosomique que dans la fraction cytoplasmique. Quant à l'activité spécifique succino-déshydrogénase, elle est à peu près la même pour les fractions cytoplasmiques et mésosomiques.

Une explication de ces résultats, apparemment contradictoires, méritait d'être recherchée en reprenant ces mesures sur des fractions membranaires cytoplasmiques ou mésosomiques purifiées par séparation en gradient de densité.

La répartition des différentes couches particulières obtenues après séparation en gradient de densité (tampon phosphate 5 mM, pH 7.2) de la fraction cytoplasmique ou mésosomique est schématisée (Fig. 1).

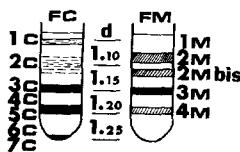


Fig. 1. Purification par centrifugation en gradient discontinu de densité des fractions brutes, cytoplasmiques (FC), et mésosomiques (FM), isolées de *B. subtilis*. Tampon phosphate 5 mM, pH 7.2, dans lequel sont dissoutes les quantités de saccharose nécessaires pour obtenir les différentes densités. Centrifugation de 2 h à 25 000 tours/min (rotor SW 25.1; 90 000 \times g).

Les images obtenues par microscopie électronique des différentes fractions séparées à partir de la fraction cytoplasmique sont analogues à celles réalisées précédemment² (cf. Fig. 2).

Parmi les fractions séparées à partir de la fraction mésosomique, la fraction mésosomique morphologiquement la plus homogène, est la fraction 2M. La présence de la bande 2M bis dont l'aspect morphologique a varié d'une expérience à l'autre, a toujours témoigné d'une meilleure séparation des différents types de membranes, c'est-à-dire d'une plus grande pureté de 2M.

TABLEAU II

ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE SUCCINO-OXYDASE DES FRACTIONS MEMBRANAIRES CYTOPLASMIQUES (C) OU MÉSOSOMIQUES (M) BRUTES OU PURIFIÉES PAR SÉPARATION EN GRADIENT DE DENSITÉ (SACCHAROSE)

Les activités spécifiques (act. spé.) sont exprimées en atomes d'oxygène consommés par min et par mg de protéine. DP, degré de purification; % act. totale, pourcentage d'activité totale;

$$\text{Bilan} = \frac{(\text{somme des activités totales des fractions obtenues})}{(\text{activité totale de la fraction initiale})}$$

Fraction FC	Act. spé. 25	DP 1	% 100 Act. totale	Fraction FM	Act. spé. 37	DP 1	% 100 Act. totale
2C	55	2.2	8.5	2M	7.5	0.2	2
3C	—	—	—	2M bis	34	0.92	6
3C	98	4	24.5	3M	102	2.7	69
4C	89	3.6	7	4M	—	—	—
5C	73	3	15.5				
6C	153*	6.2*	5*				
7C	38	1.5	39.5				
Bilan			100 %	Bilan			77 %

* Chiffre incertain; très faible quantité de protéines.

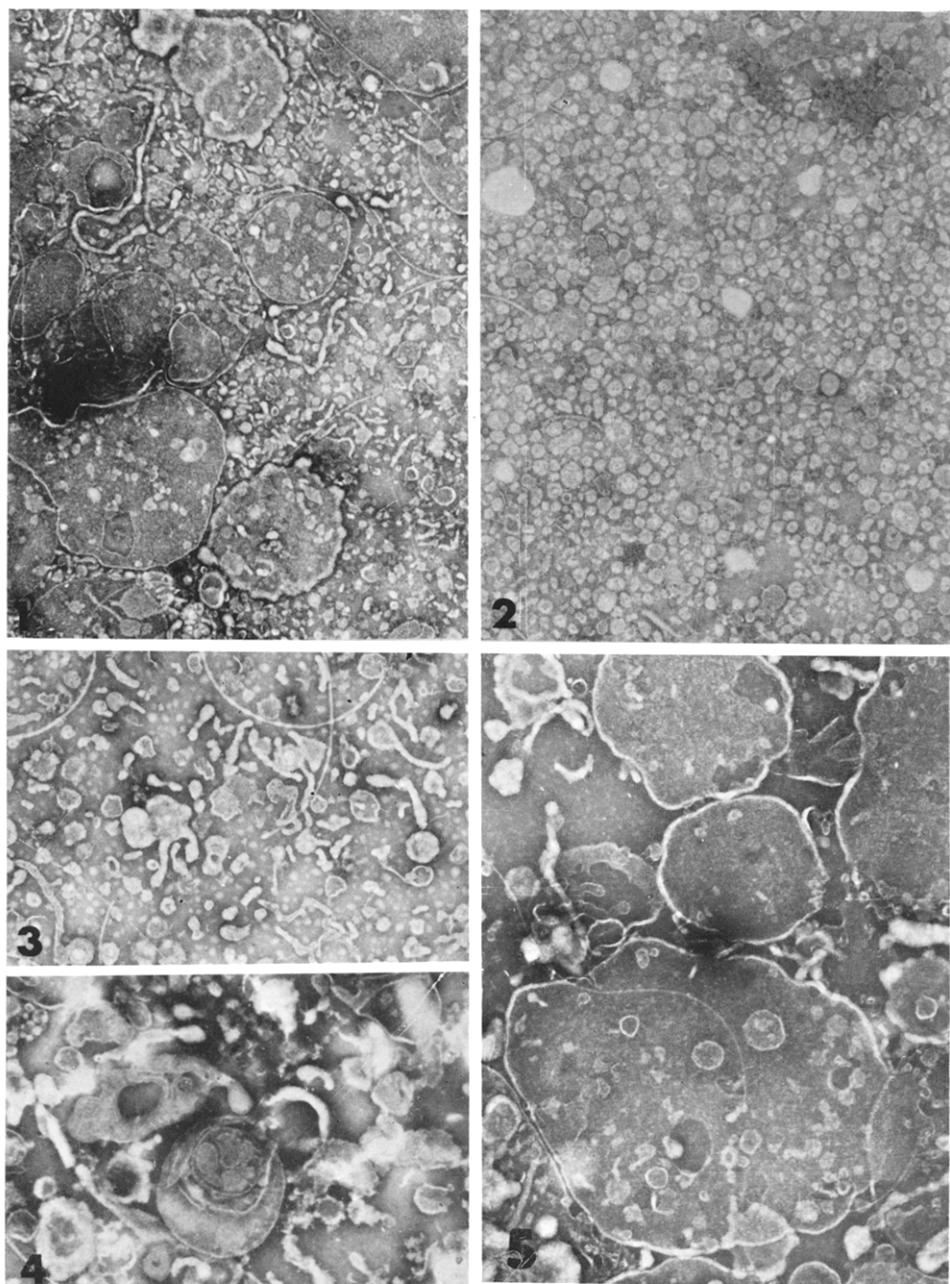


Fig. 2. Fractions membranaires de *B. subtilis* observées en contraste négatif. (1) Fraction membranaire mésosomal brûte (FM) contenant des tubules mésosomiques et des fragments de membranes cytoplasmiques. $\times 21000$. (2-5) Fractions obtenues par centrifugation de FM en gradient discontinu de densité de saccharose. (2) Zone 2M contenant des vésicules mésosomiques de tailles très homogènes, $\times 25900$. (3) Zone 2M bis contenant des tubules mésosomiques faiblement contaminés par des fragments de membranes cytoplasmiques, $\times 25900$. (4) Zone 2M bis contenant des tubules mésosomiques assez largement contaminés par des fragments de membranes cytoplasmiques, $\times 31500$. (5) Zone 3M contenant des membranes cytoplasmiques assez peu contaminées par des tubules mésosomiques, $\times 25900$.

L'activité NADH-oxydase (assez instable) et l'activité succinodeshydrogénase (très stable) se répartissent entre les différentes sous-fractions membranaires issues de la fraction cytoplasmique ou mésosomique, de façon homologue de celle précédemment observée².

La répartition de l'activité succino-oxydase dans les sous-fractions membranaires issues des fractions cytoplasmiques ou mésosomiques brutes, est donnée Tableau II.

La fraction mésosomique vésiculaire 2M (Fig. 2, 2) présente une activité spécifique succino-oxydase 5 fois moindre que celle de la fraction mésosomique. La fraction 2M bis (tubules mésosomiques faiblement contaminés par des fragments de membranes cytoplasmiques; compare Fig. 2, 3) présente une activité proche de celle de la fraction mésosomique. En revanche, la fraction 3M présente une activité spécifique 2,7 fois plus élevée que celle de la fraction mésosomique, et 14 fois plus élevée que celle de 2 M; elle contient 69 % de l'activité initiale (sur 77 % retrouvée).

Les fractions 3C et 5C présentent une activité spécifique respectivement 4 et 3 fois plus élevée que celle de la fraction cytoplasmique dont elles sont issues.

Le rapport entre l'activité spécifique succino-oxydase de la fraction membranaire cytoplasmique la plus active 3C et celle de la fraction membranaire mésosomique, la plus pure, 2M étant de 13, on peut penser que l'activité succino-oxydase est essentiellement localisée dans les membranes cytoplasmiques.

La répartition de l'activité (ascorbate + TMPD)-oxydase dans les sous-fractions issues de la fraction cytoplasmique ou mésosomique est donnée dans le Tableau III.

L'activité spécifique (ascorbate + TMPD)-oxydase de la Fraction 2M s'est toujours montrée relativement élevée: elle est environ 2 fois moindre que celle de la fraction mésosomique brute et 5 fois moindre que celle de la sous-fraction 3M. La fraction 3M présente une activité spécifique (ascorbate + TMPD)-oxydase nettement plus élevée que celle de la fraction mésosomique dont elle est issue; elle retient la plus forte proportion de l'activité totale initiale. L'activité spécifique et l'activité totale (ascorbate + TMPD)-oxydase de la fraction 2M bis sont, suivant le degré de contamination de cette fraction par des fragments de membranes cytoplasmiques, faibles ou élevées.

Dans les fractions 3C et 5C, les activités spécifiques (ascorbate + TMPD)-oxydase sont environ 3 fois plus élevées que celles de la fraction cytoplasmique brute initiale.

*Etudes à température ordinaire et à basse température des propriétés spectrales des différentes fractions membranaires de *B. subtilis**

L'étude des propriétés spectrales des fractions cytoplasmiques et mésosomiques brutes, à la température de l'azote liquide (cf. Figs. 3 et 5; Tableau IV), permet d'évaluer, dans la zone des bandes α , l'intensité d'absorption des différents cytochromes par rapport à l'intensité d'absorption de l'oxydase ($\alpha + \alpha_3$) $\lambda = 600$ nm: la fraction mésosomique est plus riche en cytochrome $\alpha_{548.5}$ et surtout en cytochrome $\alpha_{561.5}$ que la fraction cytoplasmique.

Une comparaison des absorptions spécifiques des différents cytochromes dans la fraction cytoplasmique et dans la fraction mésosomique (Tableaux V-VIII) montre que la fraction mésosomique est plus riche en cytochromes, et surtout en cytochrome-oxydase que la fraction cytoplasmique; ceci explique pourquoi les activités succino-

TABLEAU III

ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (ASCORBATE + TAMPID)-OXYDASE DES FRACTIONS MEMBRANAIRES CYTOPLASMIQUES (C) OU MÉSOSOMIQUES (M) BRUTES ET PURIFIÉES PAR SÉDIMENTATION EN GRADIENT DE DENSITÉ (SACCHAROSE)

Les activités spécifiques (act. spéc.) sont exprimées en atomes d'oxygène consommés par min et par mg de protéine. DP, degré de purification; % act. totale, pourcentage de l'activité totale; Bilan, défini au Tableau II. Malgré les différences enregistrées d'une expérience à l'autre dans les activités spécifiques des fractions brutes initiales, on voit que les degrés de purification des différentes fractions obtenues sont proches.

Fraction	Exp. 1			Exp. 2			Fraction			Exp. 1			Exp. 2		
	Act. spéc. DP			Act. spéc. DP			Act. spéc. DP			Act. spéc. DP			Act. spéc. DP		
	% Act. totale			% Act. totale			% Act. totale			% Act. totale			% Act. totale		
PC	82	1	100	52	1	100	FM	120	1	100	85	1	100		
1C	15	0.18	4.6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2C	141	1.7	5	60	1.15	4.5	2M	73	0.6	7	41	0.48	4		
3C	284	3.5	22.5	168	3.2	20	2M bis	282	2.35	30	87	1.0	6.5		
4C	398	4.9	10.3	181	3.5	7	3M	327	2.7	38	212	2.5	6.3		
5C	201	2.45	28.7	155	3	15.5	4M	—	—	—	—	—	—		
6C	318	3.9	6	187*	3.6*	3*									
7C	149	1.8	23	85	1.6	42.5									
Bilan				100.0'			Bilan	92.0'			75.0'		74.0'		

* Chiffre incertain; très faible quantité de protéines dans l'Expérience 3.

TABLEAU IV

COMPARAISON DES SPECTRES D'ABSORPTION À BASSE TEMPÉRATURE DES FRACTIONS MEMBRANAIRES BRUTES CYTOPLASMIQUES (FC) ET MÉSOSOMIQUES (FM) OBTENUS, AU COURS DE 4 EXPÉRIENCES, À PARTIR DE *B. subtilis* CULTIVÉ SUR MILIEU COMPLEXE NON-GLUCOSÉ

L'intensité de l'absorption des différents pics décelés à basse température est exprimée en prenant arbitrairement égal à 1 l'intensité de l'absorption de la bande α de l'oxydase ($a + a_3$) ($\lambda = 600$ nm).

Exp.	Fraction	λ (nm):					
			548.5	553	557	561.5	600
2	FC	0.74	1.35	1.16	0.37	1	
	FM	0.96	1.30	1.10	0.75	1	
3	FC	0.50	1.10	0.91	0.27	1	
	FM	0.65	1	1	0.59	1	
4	FC	0.52	1	0.78	0.26	1	
	FM	0.83	1.12	1	0.80	1	
6	FC	0.50	1.05	0.90	0.29	1	
	FM	1.13	1.16	1.21	1.53	1	

oxydase et (ascorbate + TMPD)-oxydase sont plus élevées dans la fraction mésosomique que dans la fraction cytoplasmique.

Propriétés spectrales des sous-fractions membranaires obtenues à partir de la fraction mésosomique

L'étude spectrale à température ordinaire conduit aux observations suivantes (Fig. 2 et Tableau V donnant à titre d'exemple les résultats d'une de nos expériences).

Zone des bandes γ : La fraction 2M est moins riche en oxydase ($a + a_3$) ($\lambda = 443$ nm) que la fraction mésosomique brute (le degré de purification $\simeq 0.3$), alors qu'elle présente un accroissement d'absorption spécifique (A spéc.) à $\lambda = 427$ nm,

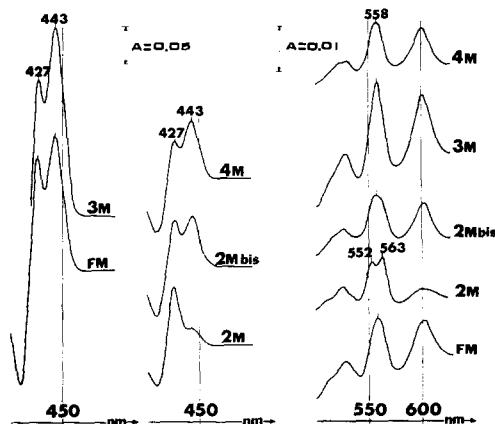


Fig. 3. Spectre de différence (réduit par dithionite/oxydé) à température ordinaire de la fraction membranaire mésosomique purifiée 2M et des autres fractions séparées à partir de la fraction mésosomique brute (expérience No. 3 du Tableau V). Les fractions membranaires sont en suspension dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7.2; épaisseur de la préparation: 0.5 cm. Le contenu en protéine (en mg/ml) des différentes fractions est le suivant: FM, 3.68 (bandes γ); 2M, 1.84 (bandes β et α); 2M bis, 1.02; 3M, 2.08 (bande γ) et 1.04 (bandes β et α); 4M, 0.65.

TABLEAU V

ÉTUDE QUANTITATIVE DU SPECTRE HÉMATINIQUE (À TEMPÉRATURE ORDINAIRE) DE LA FRACTION MÉMBRANAIRE MÉSOSOMIQUE PURIFIÉE 2 M ET DES AUTRES FRACTIONS SÉPARÉES À PARTIR DE LA FRACTION MÉSOSOMIQUE BRUTE (1 M)

A spéc. = absorption spécifique ($1A/mg$ protéine) déterminée à partir de spectres de différence (réduit par dithionite/oxydé) en mesurant l'écart de l'absorbance entre un maximum et un point isosbstique. DP = degré de purification des fractions membranaires.

Maximum	Point isosbstique	Cytochromes	$(b + c)\gamma$	$(a + a_3)\gamma$	$(b + c)\alpha$	$(a + a_3)\alpha$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\gamma}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\gamma} \times 100$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\alpha}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\alpha} \times 100$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\gamma}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\alpha} \times 100$
427	470		$(b + c)\gamma$						
443	470		$(a + a_3)\gamma$						
552 (1)	580	mésosomique, α							
558	580	$(b + c)\alpha$							
563 (2)	580	mésosomique, α							
600	625	$(a + a_3)\alpha$							
Frac-tion		$(b + c)\gamma$	$(a + a_3)\gamma$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\gamma}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\gamma} \times DP$	$(b + c)\alpha$	$(a + a_3)\alpha$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\alpha}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\alpha} \times DP$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\gamma}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\alpha} \times 100$	$\frac{A \text{ spéc. } (b + c)\gamma}{A \text{ spéc. } (a + a_3)\alpha} \times 100$
100	100								
1 M	6.9	8.6	1	0.8	1.4	1	1.4	5.0	8.6
					(1)	(2)			
2 M	9.5	2.6	0.3	3.6	1.2	1.4	0.3	4.0	4.6
2 M bis	10.5	11.6	1.3	0.9	1.8	1.5	1.5	1.2	7.9
3 M	16.4	24.5	2.8	0.7	3.8	2.7	2.7	1.4	7.7
									4.3
									5.8
									9.0

traduisant probablement un enrichissement en cytochromes ($b + c$); il s'en suit une forte augmentation du rapport A spéc. ($b + c$) γ/A spéc. ($a + a_3$) γ (1 pour la fraction mésosomique brute et 2.7 à 3.6 pour 2 M). En revanche, la fraction 3M s'est enrichie en oxydase ($a + a_3$) par rapport à la fraction brute mésosomique (le degré de purification ≈ 2.8). L'enrichissement en cytochromes ($b + c$) de cette fraction 3M n'est que légèrement inférieur à celui de l'oxydase; le rapport A spéc. ($b + c$) γ/A spéc. ($a + a_3$) γ de 3M est proche de celui de la fraction de départ la fraction mésosomique. Selon que, d'une expérience à l'autre, la fraction 2M bis contient des tubules mésosomiques plus ou moins mélangés à des membranes cytoplasmiques, le degré de purification de l'oxydase ($a + a_3$) s'est montré élevé ou faible, mais toujours supérieur à 1.

Zone des bandes α : La fraction 3M s'est enrichie d'une façon égale en cytochromes ($b + c$) et en oxydase; le rapport A spéc. ($b + c$) α/A spéc. ($a + a_3$) α reste proche de celui de la fraction mésosomique initiale. En revanche, la fraction 2M (membranes mésosomiques morphologiquement les plus pures) est très appauvrie

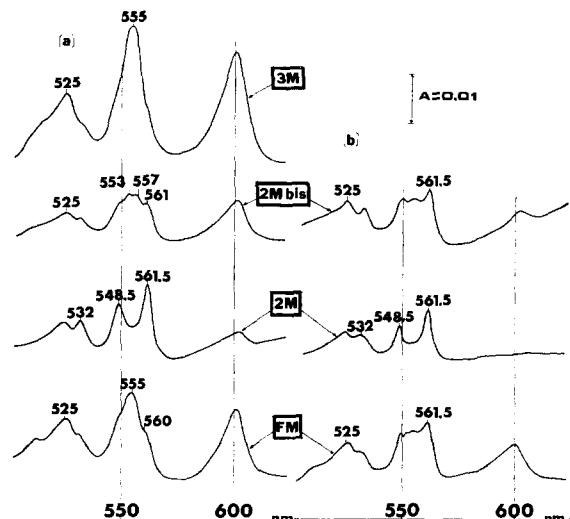


Fig. 4. Spectres à basse température (-190°) de la fraction membranaire mésosomique purifiée 2 M et des autres fractions séparées à partir de la fraction mésosomique brute. La série (a) des spectres illustre plusieurs manipulations au cours desquelles la fraction mésosomique purifiée 2M montre encore une très faible absorption à 600 nm dépendante de la présence d'oxydase ($a + a_3$). La série (b) des spectres se rapporte à une manipulation; cf. Tableau VI, Exp. 6: la fraction mésosomique étant particulièrement riche en membranes mésosomiques, la fraction 2M qui en est issue s'est montrée complètement dépourvue d'oxydase ($a + a_3$). Les différentes fractions membranaires sont en suspension dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7.2; épaisseur de la préparation: 1 mm. Réduction par le dithionite.

Fraction	Protéines (mg/ml)	
	Série a	Série b
FM	3.7	3.1
2M	2.9	1.0
2M bis	2.0	2.3
3M	2.1	—

TABLEAU VI

ÉTUDE SEMI-QUANTITATIVE DU SPECTRE HÉMATINIQUE, À BASSE TEMPÉRATURE, DE LA FRACTION MEMBRANaire MÉSOSOMIQUE PURIFIÉE 2 M ET DES AUTRES FRACTIONS SÉPARÉES À PARTIR DE LA FRACTION MÉSOSOMIQUE BRUTE (FM)

 $A_{spéc.}$ = absorption spécifique déterminée à partir du spectre des préparations réduites avec le dithionite (épaisseur de la préparation = 1 mm), et exprimée en mm par mg de protéine (10 min correspondent à 0,5% de transmission). DP = degré de purification.

Fraction	Exp.	$\lambda(\mu\text{m})$:	548,5				553				557				561,5				600			
			$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP	$A_{spéc.}$	DP				
FM	3	10.9	1		17.1	1		16.8	1		9.9	1		10.8	1							
	4	12.9	1		17.3	1		15.5	1		12.3	1		15.5	1							
	6	11.2	1		11.5	1		12	1		15.2	1		10	1							
2 M	3	13.7	1.27		7.5	0.44		8.9	0.53		20.9	2.1		4.45	0.26							
	4	16	1.24		9.5	0.55		11.6	0.75		24	1.95		5.6	0.36							
	6	25	2.23		11	0.96		17	1.42		41	2.7		0	—							
2 M bis	3	12.7	1.16		17.6	1.03		17.2	1.02		14.7	1.5		17.2	1.02							
	4	18.8	1.46		28	1.62		23	1.48		16.8	1.37		29.4	1.9							
	6	13.2	1.18		13.6	1.18		13.8	1.15		18.5	1.22		4.3	0.43							
3 M	3	26.5	2.43		49	2.87		46.6	2.78		16.8	1.7		46	2.74							
	4	33.2	2.57		55.4	3.2		49.6	3.2		21.6	1.76		50	3.23							

en oxydase ($a + a_3$) ($\lambda = 600$ nm) (le degré de purification ≈ 0.3). Son spectre présente deux pics d'absorption situés à $\lambda = 552$ nm et $\lambda = 563$ nm (Fig. 3).

La comparaison entre l'absorption spécifique (A spc.) relative à l'oxydase ($a + a_3$) de la sous-fraction 2 M et celle de la sous-fraction 3 M, permet d'apprécier l'efficacité de la purification par gradient de densité. Dans le cas de l'expérience rapportée ici (Fig. 3 et Tableau V), 3M est 9 fois plus riche en oxydase ($a + a_3$) que 2 M.

Spectres à basse température. La Fig. 4 donne les spectres des différentes fractions membranaires isolées à partir de la fraction mésosomique brute.

Sur le Tableau VI, figurent les valeurs des absorptions spécifiques calculées pour chacun des pics d'absorption cytochromiques décelés à basse température chez *B. subtilis*⁴.

Ces valeurs permettant de calculer, pour chaque cytochrome, le degré de purification obtenu par rapport à la fraction mésosomique brute, les résultats des Expériences 3 et 4, montrent sans ambiguïté:

Qu'en ce qui concerne l'oxydase ($a + a_3$), il y a appauvrissement très net (le degré de purification = 0.3 à 0.4) dans les membranes mésosomiques purifiées 2 M en même temps qu'un enrichissement dans les membranes cytoplasmiques 3 M (le degré de purification = 3) de telle sorte que 2 M est de 7 à 10 fois moins riche en cytochromes ($a + a_3$) que 3 M. Lors de l'Expérience 6 (Tableau VI et Fig. 4b), la fraction membranaire mésosomique brute, s'étant trouvée particulièrement riche en membranes mésosomiques, sa purification par passage sur gradient de densité a donné une fraction 2 M complètement dépourvue d'oxydase ($a + a_3$).

Qu'en ce qui concerne les pigments absorbant à basse température à $\lambda = 548.5$ nm et à $\lambda = 561.5$ nm, il y a un enrichissement important dans les membranes mésosomiques 2M. Pour 3M, il n'y a pas d'enrichissement en ces cytochromes puisque les pics $\alpha = 548.5$ et $\alpha = 561.5$ n'apparaissent pratiquement plus et qu'à ces longueurs d'onde s'ajoute une absorption dépendant des cytochromes absorbant à $\lambda = 553$ nm et $\lambda = 557$ nm. Le degré de purification de chacun des cytochromes absorbant à $\lambda = 553$ nm et $\lambda = 557$ nm dans la fraction 3 M, est d'ailleurs le même que celui de l'oxydase ($a + a_3$), alors que le degré de purification du cytochrome absorbant à $\lambda = 548.5$ nm (et surtout celui du cytochrome absorbant à $\lambda = 561.5$ nm) est nettement inférieur à celui de l'oxydase ($a + a_3$).

En conclusion, parmi les sous fractions séparées de la fraction mésosomique brute, la fraction 3M, essentiellement constituée de membranes cytoplasmiques contient les trois cytochromes α_{553} , α_{557} , $\alpha_{600}(a + a_3)$, alors que la fraction 2M (constituée de membranes mésosomiques) contient les cytochromes $\alpha_{548.5}$ et $\alpha_{561.5}$.

Propriétés spectrales des sous-fractions membranaires obtenues à partir de la fraction cytoplasmique brute

L'étude spectrale à température ordinaire est résumée dans Fig. 5 et le Tableau VII.

L'analyse des résultats montre qu'il existe un enrichissement très net en oxydase ($a + a_3$) (le degré de purification = 2 à 4) dans toutes les sous-fractions membranaires autres que 2C, sous-fractions où l'on retrouve la plus grande partie des mésosomes contaminant initialement la fraction cytoplasmique brute.

L'étude des spectres obtenus à basse température (Fig. 5 et Tableau VIII) sur les différentes fractions séparées à partir de la fraction cytoplasmique brute, confirme ce qui apparaît d'après l'étude spectrale à température ordinaire, c'est-à-dire un enrichissement en oxydase ($a + a_3$) des membranes cytoplasmiques purifiées.

ÉTUDE QUANTITATIVE DU SPECTRE HÉMATINIQUE, À TEMPÉRATURE ORDINAIRE, DES SOUS-FRACTIONS MEMBRANAIRES 2°C ET 3°C, SÉPARÉES À PARTIR DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE BRUTE (FC)

A Spéc. = absorption spécifique (A_d /mg protéine) déterminée à partir du spectre de différence (réduit par dithionite/oxydé) en mesurant l'écart de l'absorbance entre un maximum et un point isobétiq (cf. Tableau V). DP = degré de purification des fractions membranaires.

$Exp.$ $\frac{(b+c)\gamma}{A_{spéc.} \times DP}$ $\frac{(a+a_3)\gamma}{A_{spéc.} \times DP}$ $\frac{(b+c)\alpha}{A_{spéc.} \times DP}$ $\frac{(a+a_3)\alpha}{A_{spéc.} \times DP}$ $\frac{A_{spéc.}(b+c)\gamma}{A_{spéc.}(a+a_3)\gamma} \times 100$ $\frac{A_{spéc.}(b+c)\alpha}{A_{spéc.}(a+a_3)\alpha} \times 100$

FC 2 5.6 5.8 1 1.0 1.1 0.6 1 1.8 5.1 0.7
3 5.2 8.9 1 0.6 1.2 0.9 1 1.4 4.3 0.9

2°C 2 5.3 4.6 0.8 1.2 1.2 0.8 1.3 1.5 4.4 5.8
3 6.5 6.8 0.8 1 1.4 0.8 0.9 1.7 4.6 8.5

3°C 2 14.6 17.1 3.0 0.9 2.8 1.9 3.2 1.5 5.2 0.0
3 9.7 19.3 2.2 0.5 2.8 2.0 2.2 1.4 3.5 9.6

TABLEAU VIII

ÉTUDE SEMI-QUANTITATIVE DU SPECTRE HÉMATINIQUE, À BASSE TEMPÉRATURE, DES SOUS-FRACTIONS MEMBRANAIRES 2°C ET 3°C SÉPARÉES À PARTIR DE LA FRACTION CYTOPLASMIQUE BRUTE (FC)

A Spéc. = absorption spécifique déterminée à partir du spectre des préparations réduites avec le dithionite (épaisseur de la préparation = 1 mm) et exprimée en mm par mg de protéine (10 mm correspondent à 0,5% de transmission). DP = degré de purification.

$Exp.$ $\lambda (nm)$: 548.5 553 557 561.5 600

$A_{spéc.}$ DP $A_{spéc.}$ DP $A_{spéc.}$ DP $A_{spéc.}$ DP

FC 3 5.4 11.6 1 9.7 1 2.9 1 10.0 1
5 3.9 1 7.3 1 0 1 2.0 1 6.4 1

2°C 3 8.5 1.6 18 1.5 1.6 1.6 5.1 1.8 12.5 1.2
5 5.8 1.5 10.2 1.4 9.4 1.6 3.4 1.7 7 1.1

3°C 3 27 5 51.7 4.4 50 5.2 14.5 5 49.5 4.6
5 12 3 21 2.9 19 3.2 6.0 3.3 21.8 3.4

Il convient toutefois de remarquer qu'il est difficile d'analyser d'une façon aussi précise que dans le cas des sous-fractions membranaires mésosomiques, même à basse température, les propriétés spectrales des sous-fractions membranaires cytoplasmiques dans la zone α d'absorption des cytochromes ($b + c$). En effet, dans les fractions 3C, 4C, 5C, la très forte absorption à $\lambda = 555$ nm masque les absorptions des cytochromes éventuellement présents à $\lambda = 548.5$ nm et $\lambda = 561.5$ nm et empêche d'apprécier correctement le degré d'absorption à ces deux longueurs d'onde. D'autre part, l'estimation quantitative du cytochrome $\alpha_{548.5}$ est faussée par le fait que le cytochrome α_{553} présente, à basse température, une seconde bande d'absorption à $\lambda = 546$ nm⁸

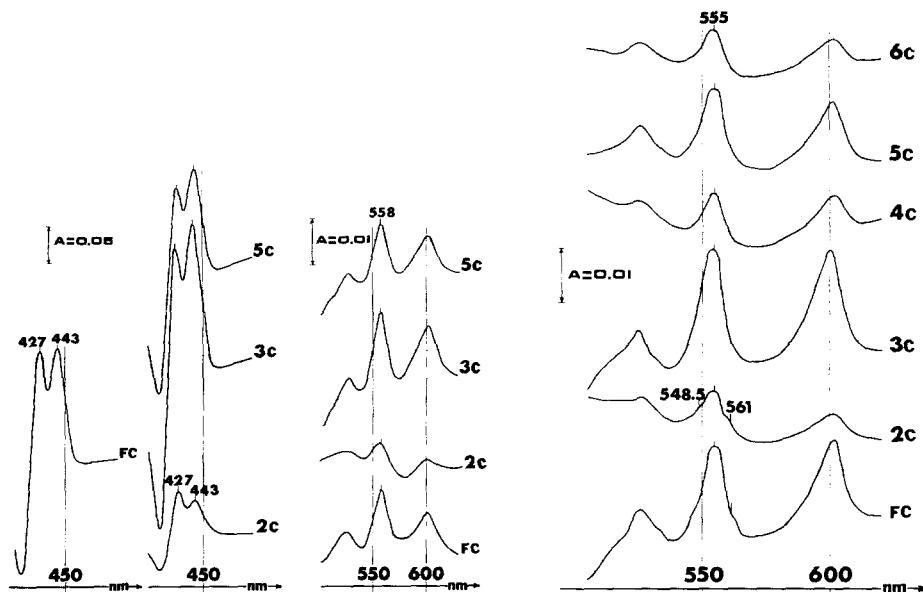


Fig. 5. Spectre de différence (réduit par dithionite/oxydé) à température ordinaire des fractions membranaires cytoplasmiques purifiées 3C et 5C et des autres fractions séparées à partir de la fraction cytoplasmique brute (FC). Les fractions membranaires sont en suspension dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7.2; épaisseur de la préparation: 0.5 cm. Contenu en protéine (mg/ml) des différentes fractions: FC, 3.70; 2C, 1.70; 3C, 2.20; 5C, 2.64.

Fig. 6. Spectres à basse température (-190°) des fractions membranaires cytoplasmiques purifiées 3C et 5C et des autres fractions séparées à partir de la fraction cytoplasmique brute (FC). Les fractions membranaires sont en suspension dans un tampon phosphate 50 mM, pH 7.2; épaisseur de la préparation: 1 mm. La réduction a été obtenue à l'aide du dithionite. Contenu en protéines (mg/ml) des différentes fractions: FC, 6.20; 2C, 1.76; 3C, 1.72; 4C, 1.08; 5C, 1.92; 6C, 0.90

DISCUSSION ET CONCLUSION

En vue de connaître la répartition des cytochromes de *B. subtilis* dans les membranes cytoplasmiques d'une part, et mésosomiques d'autre part, nous avons tout d'abord séparé ces deux types de membranes en 2 fractions, relativement grossières, respectivement désignées la fraction cytoplasmique et la fraction mésosomique, que nous avons ensuite purifiées par séparation sur gradient discontinu de densité

de saccharose². L'aspect morphologique de la fraction membranaire mésosomique la plus pure (2M) (petites vésicules résultant de la fragmentation des tubules mésosomiques) et l'aspect morphologique des fractions membranaires cytoplasmiques les plus pures sont caractéristiques.

Notre étude spectrale de toutes les fractions obtenues au cours de la purification des fractions mésosomiques et cytoplasmiques a montré clairement que:

(1) Les membranes mésosomiques purifiées contiennent deux cytochromes $\alpha_{548.5}$ et $\alpha_{561.5}$; ces deux cytochromes sont absents des membranes cytoplasmiques purifiées.

(2) L'oxydase ($a + a_3$) α_{600} est localisée dans les membranes cytoplasmiques (les très faibles quantités d'oxydase retrouvées dans la fraction membranaire mésosomique purifiée 2M doit être mise sur le compte d'une contamination membranaire cytoplasmique résiduelle).

(3) Les cytochromes α_{553} et α_{557} sont, comme l'oxydase ($a + a_3$), localisés dans les membranes cytoplasmiques.

Le calcul du rapport A spéc. ($a + a_3$) γ/A spéc. ($a + a_3$) α s'est toujours montré constant. En revanche, le rapport A spéc. ($b + c$) γ/A spéc. ($b + c$) α s'est montré très variable d'une fraction à l'autre; il atteint la valeur de 8 pour la fraction membranaire mésosomique purifiée 2M (cf. Tableau V), alors qu'il se situe aux environs de 4 pour les fractions membranaires cytoplasmiques (cf. Tableau VII).

En accord avec les résultats de l'étude spectrale, nous avons constaté que les membranes cytoplasmiques purifiées contenant des quantités élevées de cytochrome-oxydase ($a + a_3$) ont une activité respiratoire élevée sur tous les substrats étudiés, alors que les membranes mésosomiques purifiées (2M), pratiquement dépourvues d'oxydase ($a + a_3$), ont une activité respiratoire très faible.

Nous avons établi (Tableau IX) que les activités spécifiques (act. spéc.) succino-déshydrogénase, succino-oxydase, (ascorbate + TMPD)-oxydase des différentes

TABLEAU IX

DEGRÉS DE PURIFICATION DE DIFFÉRENTES FRACTIONS MEMBRANAIRES DE *B. subtilis*

L'Estimation de degré de purification d'après: (a) des mesures d'activité succino-déshydrogénase; (b) des mesures d'activité succino-oxydase; (c) des mesures d'activité (ascorbate + TMPD)-oxydase; (d) des mesures d'absorption spécifique à température ordinaire de l'oxydase ($a + a_3$) ($\lambda = 600$ nm); (e) des mesures d'absorption spécifique à basse température de l'oxydase ($a + a_3$) et calculées par rapport à la fraction mésosomique brute ou à la fraction cytoplasmique brute dont elles sont issues.

Fraction	Exp.	Degrés de purification estimés d'après:				
		(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
2M	1	0.4	—	0.6	0.6	0.5
	2	—	0.2	0.5	0.3	0.26
3M	1	3.6	—	2.7	—	2.7
	2	—	2.7	2.5	2.7	2.7
3C	1	2.5	—	3.5	3.2	2
	2	—	4	3.2	2.2	4.6
4C	1	3.7	—	4.9	3.7	3
	2	—	3.6	3.5	1.7	2.5
5C	1	2.4	—	2.5	2	2.8
	2	—	3	3	2.2	2.4

fractions membranaires, coïncident assez étroitement avec le degré de purification de l'oxydase ($a + a_3$), calculé sur la bande $\alpha = 600$ nm des spectres obtenus à température ordinaire et à basse température.

Il apparaît que par leurs caractères morphologiques, spectraux et enzymatiques, les membranes mésosomiques purifiées se distinguent nettement des membranes cytoplasmiques purifiées.

Les résultats de nos expériences (dont l'essentiel a récemment fait l'objet d'une brève communication)⁹ nous permettent d'affirmer sans ambiguïté, que seule la membrane cytoplasmique contient les cytochromes α_{553} , α_{557} , α_{600} ($a + a_3$), faisant partie d'une chaîne de transfert d'électrons apparentée à la chaîne respiratoire classique. Les cytochromes $\alpha_{548.5}$ et $\alpha_{561.5}$ présents dans les membranes mésosomiques, ne semblent pas intervenir directement dans ce processus. Comme l'indiquent les résultats (en cours de publication) d'une étude des propriétés spectrales des cytochromes présents dans les membranes totales (cytoplasmiques + mésosomiques) de *B. subtilis*, les cytochromes des membranes mésosomiques, réductibles par NADH et, mieux encore, par (ascorbate + TMPD), et non réductibles par le succinate, interviendraient dans une autre chaîne de transfert d'électrons (cf. réf. 7).

RÉSUMÉ

Ayant mis au point une méthode de séparation et de purification des membranes cytoplasmiques et mésosomiques de *Bacillus subtilis*, il a été possible d'établir que:

1. Les membranes cytoplasmiques contiennent exclusivement les cytochromes α_{553} , α_{557} et α_{600} ($a + a_3$) et possèdent des activités NADH-oxydase, succino-déshydrogénase, succino-oxydase et (ascorbate + TMPD)-oxydase élevées.

2. Les membranes mésosomiques contiennent exclusivement les cytochromes $\alpha_{548.5}$ et $\alpha_{561.5}$. Leur activité succino-oxydase est pratiquement nulle; les deux cytochromes ne sont pas réductibles par le succinate. En revanche, leurs activités NADH-oxydase et (ascorbate + TMPD)-oxydase sont comparativement plus élevées; les deux cytochromes peuvent être alimentés en électrons par NADH et (ascorbate + TMPD).

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une aide du CNRS (Equipe de Recherche Associée No. 172) et de l'aide du C.E.A. (contrat No. 10 225 II B6). Nous remercions Melle. Christine Gautier, Aide Chimiste CNRS, pour son excellente collaboration technique.

Les micrographies électroniques des différentes fractions ont été réalisées dans le service de photomicrographie de l'Institut Pasteur. Nous tenons à remercier, ici, Mme A. Ryter de sa précieuse collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 B. FERRANDES, P. CHAIX ET A. RYTER, *C.R. Acad. Sci.*, 263 (1966) 1632.
- 2 B. FERRANDES, C. FREHEL ET P. CHAIX, *Biochim. Biophys. Acta*, 223 (1970) 292.
- 3 C. FREHEL, B. FERRANDES ET A. RYTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 234 (1971) 226.
- 4 P. CHAIX ET J. F. PETIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 481.
- 5 P. LABBE ET P. CHAIX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 1642.
- 6 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 7 S. K. ERICKSON ET G. L. PARKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 180 (1969) 56.
- 8 K. MIKI ET K. OKUNUKI, *J. Biochem.*, 66 (1969) 845.
- 9 P. CHAIX ET B. FERRANDES, *Abstr. Commun. 7th Meeting Eur. Biochem. Soc.*, No. 547, 1971, p. 212.