

## TRANSFERTS D'ACIDES GRAS ET DE PROTEINES ENTRE MEMBRANES CYTOPLASMIQUES ET MESOSOMES DE *BACILLUS SUBTILIS* VAR. *NIGER*

Gilbert BUREAU et Paul MAZLIAK

Laboratoire de Biochimie, Faculté des Sciences, 51062-Reims-Cédex, France

et

Laboratoire de Physiologie cellulaire, 12, rue Cuvier, 75005 -Paris, France

Reçu le 12 Octobre 1973

A transfer of labelled branched-chain fatty acids or proteins between mesosomes, periplasmic space and protoplasts, is suggested in vivo and demonstrated in vitro.

In the sole mesosomal fraction, [ $^{14}\text{C}$ ]valine or [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine are, always, more incorporated in fatty acids than in proteins.

Mesosomal fatty acids can be transferred to the protoplasts, but protoplasts seems to give essentially amino acids to mesosomes.

### 1. Introduction

Les membranes cytoplasmiques et les mésosomes des bactéries gram + contiennent ensemble la grande majorité des lipides cellulaires, notamment les phospholipides riches en acides gras ramifiés [1]. Cependant, les rapports biochimiques ou fonctionnels entre les membranes cytoplasmiques et les mésosomes ne sont pas actuellement clairement établis [2, 3]. Des expériences préliminaires, conduites sur *Bacillus subtilis*, nous ont montré [4], que la biosynthèse des acides gras ramifiés n'est pas également intense dans les deux types de fractions membranaires, en particulier lorsque les bactéries sont en phase de croissance exponentielle. Nous avons donc repris, dans le présent travail, l'étude de la biosynthèse des acides gras ramifiés dans les bactéries, en nous efforçant de préciser les participations respectives de la membrane cytoplasmique et des mésosomes dans cette biosynthèse, ainsi que les relations pouvant exister entre ces deux systèmes membranaires. Pour cela, deux types d'expériences de marquage ont été réalisés:

(i) Des cinétiques d'incorporation in vivo, dans les acides étudiés, de deux précurseurs radioactifs ([ $^{14}\text{C}$ ]valine pour les acides ramifiés de la série *iso* ou [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine pour les acides ramifiés de la série *anteiso* [5]);

(ii) des cinétiques d'échange in vitro d'acides gras radioactifs entre différentes fractions membranaires.

### 2. Matériel et méthodes

La souche utilisée (*B. subtilis* var. *niger*) et les méthodes de culture employées ont été décrites précédemment [6]. Les fractions membranaires sont préparées à partir des bactéries selon la méthode de Frehel et al. [7]; la pureté de ces fractions est contrôlée par observation au microscope électronique, en contraste négatif\*. On distingue trois fractions: a) La fraction des mésosomes; b) la fraction des protoplastes (contenant les membranes cytoplasmiques sans les mésosomes); c) la fraction du surnageant des mésosomes contenant les matières présentes dans l'espace périplasmique.

Les acides gras sont extraits et analysés comme décrit antérieurement [6]; la détermination de la radioactivité totale ou spécifique est effectuée par radiochromatographie en phase gazeuse [5]. Les protéines globales sont dosées par la méthode de Lowry [8], après précipitation à l'acide trichloroacétique et redissolution dans la soude; la radioactivité totale des protéines est mesurée en scintillation liquide (compteur Tri-Carb, Packard).

La [ $^{14}\text{C}$ ]valine (90 mCi/mM) et la [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine (110 mCi/mM) sont fournies par le C.E.A.

\* Mme C. Frehel (Institut Pasteur) a droit à tous nos remerciements pour avoir accepté d'effectuer les examens en microscopie électronique.

### 3. Résultats

#### 3.1. Incorporation 'in vivo' de [ $^{14}\text{C}$ ]valine ou de [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine dans les acides gras ramifiés des différentes fractions cellulaires

Le précurseur radioactif est ajouté pendant 30 min dans une culture ( $0,5 \mu\text{Ci/ml}$ ), peu avant la fin de croissance exponentielle ( $t-1$ ), au moment où la synthèse des acides gras est très active [9]. On constate (fig. 1) que dans les 5 premières minutes d'expérience, la [ $^{14}\text{C}$ ]valine fournit autant de carbone radioactif aux acides gras ramifiés de la série *iso* des membranes protoplastiques qu'à ceux des mésosomes; les acides gras des mésosomes ont à ce moment leur radioactivité maximale. Les acides gras du surnageant des mésosomes (provenant de l'espace périplasmique) sont moins marqués et atteignent un maximum de radioactivité seulement 10 min après le début de l'expérience. Au cours des minutes suivantes, les acides gras des membranes deviennent, de plus en plus radioactifs: un maximum d'incorporation dans cette fraction est observé après 30 min. Pendant le même temps, la radioactivité dans des acides gras liés aux mésosomes ou présents dans l'espace périplasmique, décroît jusqu'à

un minimum, atteint également à 30 min. En fin d'expérience la radioactivité tend à devenir égale dans les membranes, les mésosomes et l'espace périplasmique.

Ces courbes peuvent faire penser à une accumulation transitoire des acides ramifiés de la série *iso* dans les mésosomes, d'où ils seraient ensuite transférés vers les membranes cytoplasmiques, en passant par l'espace périplasmique.

La cinétique d'incorporation du carbone radioactif de la [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine dans les acides gras ramifiés de la série *anteiso* des principales fractions cellulaires (fig. 2), donne des résultats assez semblables; mais l'incorporation transitoire des acides ramifiés marqués dans les mésosomes n'apparaît pas nettement sur les graphiques. On peut penser, pour expliquer ce fait, que le temps de séjour des acides gras de la série *anteiso* dans les mésosomes est extrêmement bref.

Le tableau 1, montre que seul le quart de la radioactivité globale incorporée en 5 mn par les bactéries à partir de la [ $^{14}\text{C}$ ]valine fournie, est retrouvé dans les acides gras, essentiellement dans les systèmes membranaires. Les trois quarts du précurseur incorporé se retrouvent dans les protéines. Il est remarquable de constater que seule la fraction des mésosomes contient plus de carbone radioactif dans ses acides gras que dans

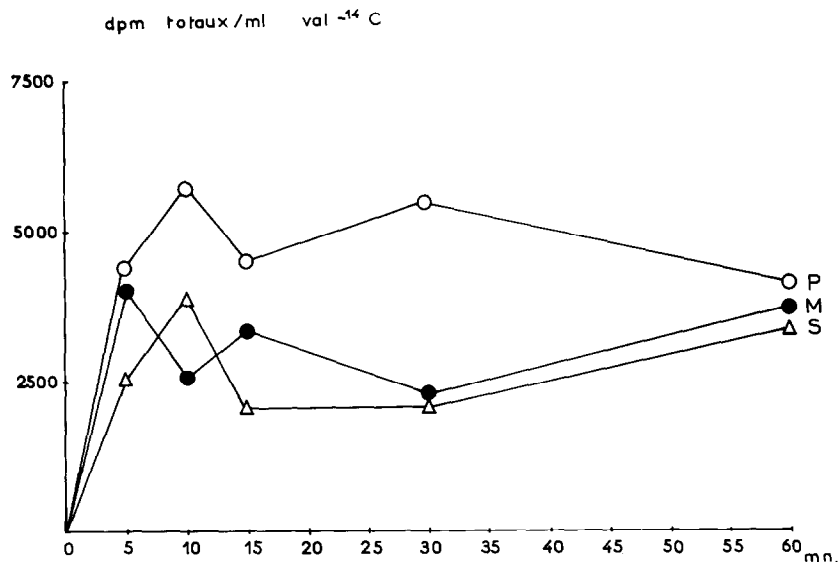


Fig. 1. Incorporation in vivo de [ $^{14}\text{C}$ ]val dans les acides gras des différentes fractions cellulaires, exprimés en dpm totaux/ml de culture en fonction du temps (○—○—○, P: protoplastes; ●—●—●, M: mésosomes; △—△—△, S: surnageant des mésosomes).

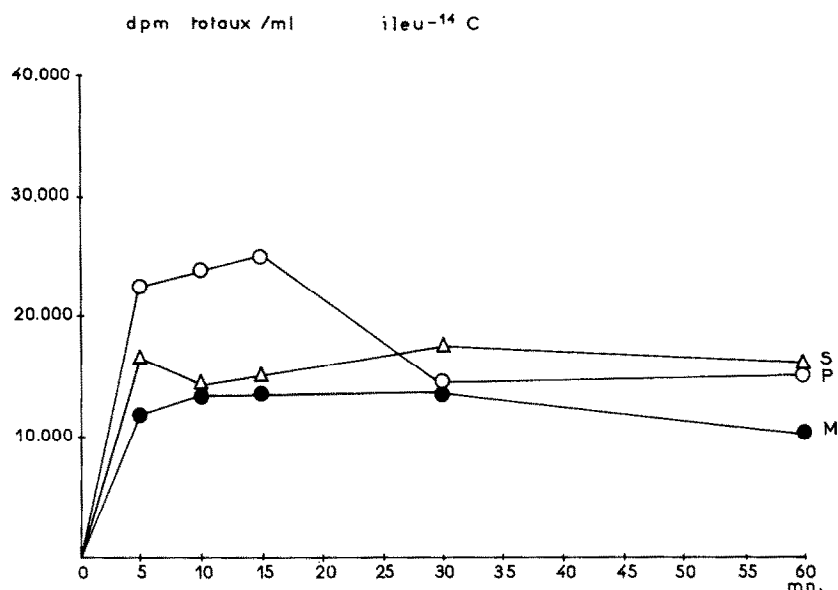


Fig. 2. Incorporation in vivo de [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine dans les acides gras des différentes fractions cellulaires, représentée comme dans la fig. 1.

Tableau 1

Fractions cellulaires	[ $^{14}\text{C}$ ]valine		[ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine	
	Acides gras	Protéines	Acides gras	Protéines
Bactéries entières	25	75	46	54
Protoplastes	40	46	45	33
Mésosomes	36	2	22	1
Espace péri-plasmique	24	52	33	66

Distribution de la radioactivité incorporée en 5 mn entre les acides gras et les protéines des différentes fractions. (Les résultats sont exprimés en % de la radioactivité totale incorporée pour les bactéries entières; en % de radioactivité totale des lipides ou des protéines pour les fractions cellulaires).

ses protéines. Le même tableau 1 indique que le carbone radioactif de la [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine est incorporé presque également dans les protéines et dans les acides gras des bactéries entières, ce qui est assez différent de ce qu'on observe avec la valine. On peut, là aussi, remarquer que la fraction des mésosomes intègre le carbone de l'isoleucine essentiellement dans ses acides gras.

### 3.2. Echanges 'in vitro' d'acides gras radioactifs entre les fractions cellulaires

#### 3.2.1. Réalisation des expériences

Une culture bactérienne est séparée en deux parties égales et l'une seulement reçoit de la [ $^{14}\text{C}$ ]valine ou de la [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine avec une activité de  $0,5 \mu\text{Ci/ml}$  pendant 30 min. Des fractions cellulaires sont préparées à partir des deux demi-populations: les unes sont marquées, les autres non. On mélange alors dans une fiole, une suspension contenant des membranes radioactives (2 ml contenant environ 50 à 100  $\mu\text{g}$  de protéines/ml selon la fraction) avec une suspension contenant d'autres membranes non marquées (mêmes conditions de volume et de concentration), en incubant le mélange à  $30^\circ\text{C}$  pendant des temps variables. On suit ainsi les transferts éventuels de substances radioactives d'une fraction à l'autre.

#### 3.2.2. [ $^{14}\text{C}$ ]valine

a) 1<sup>ère</sup> expérience: mésosomes marqués remis en suspension dans du surnageant non radioactif, avec des protoplastes non radioactifs

On observe très nettement (fig. 3a et b) une diminution de la radioactivité dans la fraction mésosomique pendant les 5 premières minutes; cette diminution

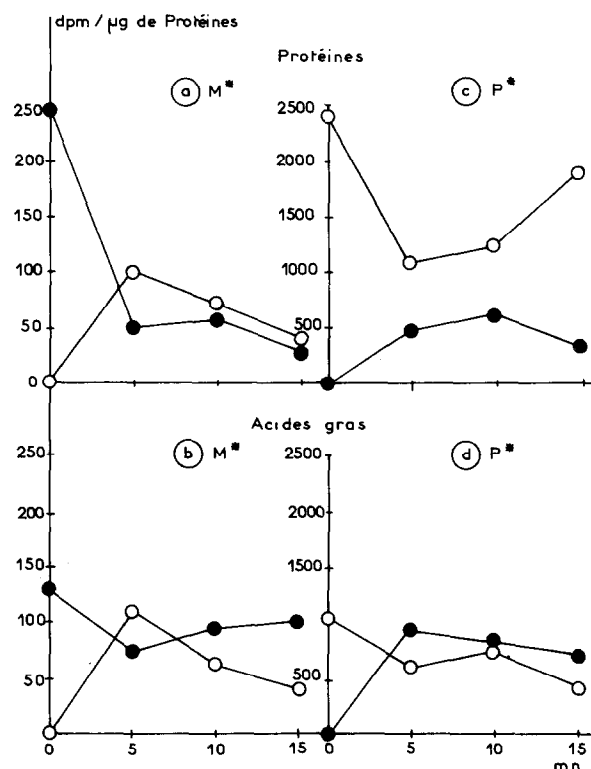


Fig. 3. Transfert d'acides gras ou de protéines radioactifs in vitro, d'une fraction initialement marquée (indiquée par \*) par la [ $^{14}\text{C}$ ]valine vers une autre fraction cellulaire (mêmes symboles que précédemment).

est concomittante d'une augmentation de la radioactivité dans les protoplastes. Ce résultat implique le transfert de substances radioactives des mésosomes vers les membranes des protoplastes. Après 5 mn, un retour de certaines substances radioactives des protoplastes vers les mésosomes peut s'observer.

b) 2<sup>ème</sup> expérience: protoplastes marqués avec mésosomes non radioactifs (remis en suspension dans du surnageant non radioactif)

Les figs. 3c et d montrent que l'activité de la fraction mésosomique augmente aussi bien dans les acides gras que dans les protéines, alors que celle des protoplastes diminue pendant les 5 premières minutes. Un transfert de protéines ou de lipides marqués des protoplastes vers les mésosomes est donc possible. Mais après 5 min d'incubation mixte, la radioactivité recommence à augmenter dans les protoplastes alors qu'elle diminue dans les mésosomes: nous interprétons ce résultat comme une conséquence des transferts de

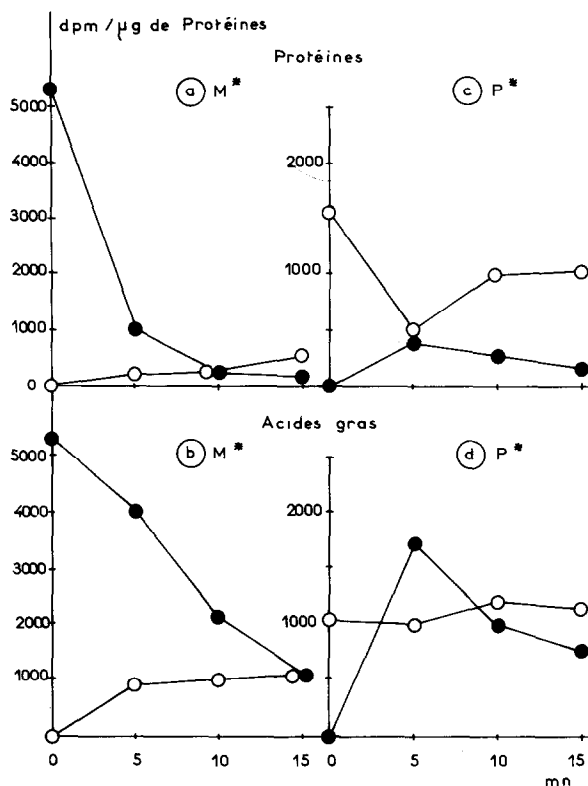


Fig. 4. Transfert d'acides gras ou de protéines radioactifs in vitro, d'une fraction initialement marquée (indiquée par \*) par le [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine vers une autre fraction cellulaire (mêmes symboles que précédemment).

substances très actifs des mésosomes vers les protoplastes, transferts intéressant aussi les substances nouvellement arrivées.

### 3.2.3. [ $^{14}\text{C}$ ]isoleucine

a) 1<sup>ère</sup> expérience: mésosomes marqués dans du surnageant non radioactif avec protoplastes non radioactifs

Il apparaît très clairement (fig. 4a et b) que les augmentations de radioactivité des acides gras ou des protéines des protoplastes, correspondent à une baisse régulière des radioactivités mesurables pour les lipides ou les protéines des mésosomes. Un tel résultat s'interprète bien si l'on suppose qu'il y a un transfert actif de lipides et de protéines des mésosomes vers les protoplastes.

b) 2<sup>ème</sup> expérience: protoplastes marqués avec mésosomes non radioactifs en suspension dans le surnageant non radioactif

Tableau 2

Fractions cellulaires	$[^{14}\text{C}]$ valine		$[^{14}\text{C}]$ isoleucine	
	Acides gras	Protéines	Acides gras	Protéines
<i>Expérience 1</i>				
Protoplastes +	48	24	72	58
Mésosomes	37	6	23	8
Surnageant	14	70	5	34
<i>Expérience 2</i>				
Protoplastes	57	23	46	48
Mésosomes +	23	8	41	23
Surnageant	19	69	13	29
<i>Expérience 3</i>				
Protoplastes	29	5	10	3
Surnageant +	71	95	90	97
<i>Expérience 4</i>				
Mésosomes	57	1	52	5
Surnageant +	43	99	48	95

Transfert d'acides gras ou de protéines radioactifs d'une fraction initialement marquée (indiquée par +) vers d'autres fractions cellulaires. Les résultats indiqués dans le tableau (en % de radioactivité totale des lipides ou des protéines) sont observés après 5 min d'incubation des différentes fractions.

la radioactivité des mésosomes augmente initialement comme dans le cas de la  $[^{14}\text{C}]$ valine; mais cette apparition de substances radioactives dans les mésosomes ne se prolonge pas au-delà de 5 min (fig. 4c et d). Le seul transfert quelque peu actif observable est celui des protéines protoplastiques vers les mésosomes (fig. 4c).

3.2.4. Le tableau 2 permet de constater que pendant les 5 premières minutes d'expérience, le transfert d'acides gras radioactifs (marqués à partir de  $[^{14}\text{C}]$ -valine ou de  $[^{14}\text{C}]$ isoleucine) se produit surtout dans le sens mésosomes vers protoplastes et surnageant vers mésosomes. Par contre, la plus grande partie des protéines marquées, provenant d'une fraction cellulaire quelconque, se retrouve (ou reste) dans le surnageant des mésosomes, correspondant à l'espace périplasmique.

#### 4. Discussion

Des transferts de lipides entre membranes cellulaires d'eucaryotes ont été récemment observés *in vitro*, sur des fractions provenant de cellules animales [10] ou

végétales [11]. Les échanges observés se produisaient principalement entre mitochondries et microsomes (membranes fragmentées du réticulum endoplasmique). A notre connaissance, le présent travail est le premier établissant l'existence de transferts de lipides ou de protéines entre membranes de cellule procaryote. Comme pour les cellules supérieures, l'existence d'échanges de lipides dans la cellule bactérienne, suggère que les lipides nouvellement formés se distribuent sur toutes les membranes à partir de leur site de synthèse.

Nous expériences avaient par ailleurs pour but de préciser et de comparer le rôle des différentes fractions membranaires (mésosomes, membrane cytoplasmique proprement dite) et de l'espace périplasmique, dans la biosynthèse des acides gras ramifiés. Nous pouvons conclure: i) que les mésosomes jouent un rôle particulièrement actif dans cette biosynthèse, en incorporant l'isoleucine ou la valine préférentiellement dans les acides gras ramifiés et non dans les protéines; ii) que les mésosomes, en présence du surnageant périplasmique, sont capables de transférer des acides gras vers les protoplastes, tandis que réciproquement les protoplastes ne semblent céder que des acides aminés aux mésosomes; iii) que le surnageant correspondant à l'espace périplasmique, incorpore l'isoleucine ou la valine de préférence dans les protéines et ne cède pratiquement ses acides gras qu'aux mésosomes.

#### Références

- [1] Bishop, D.G., Rutberg, L. and Samuelsson, B. (1967) *Europ. J. Biochem.* 2, 448.
- [2] Fitz-James, P.C. (1967) *Protides Biol. Fluids* 15, 303.
- [3] Keusch, V.M. and Burger, M.M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 300, 79.
- [4] Bureau, G. et Mazliak, P. (1973) *Comptes Rendus* 276, série D, 221.
- [5] Bureau, G. et Mazliak, P. (1971) *Comptes Rendus* 272, série D, 153.
- [6] Bureau, G. et Mazliak, P. (1971) *Ann. Inst. Pasteur* 120, 144.
- [7] Frehel, C., Ferrandes, B. et Chaix, P. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 223, 292.
- [8] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 261.
- [9] Bureau, G. (1972) *Comptes Rendus*, 274, série D, 468.
- [10] Wirtz, K.W.A. and Zilversmit, D.B. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 3596.
- [11] Ben Abdelkader, A. et Mazliak, P. (1970) *Europ. J. Biochem.* 15, 250.