

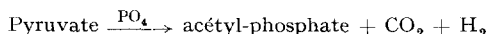
ROLE DE L'ATP ET DU CoA DANS LA DESHYDROGÉNATION DU PYRUVATE PAR LES EXTRAITS DE *CL. SACCHAROBUTYRICUM*

par

S. B. WIESENDANGER ET B. NISMAN

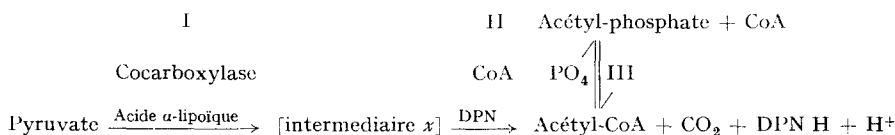
Institut Pasteur, Garches (France)

L'oxydation du pyruvate par les extraits de *Cl. saccharobutyricum*^{1,2,3} exige normalement la présence de phosphate minéral et s'effectue suivant la réaction⁴:



L'estérification de phosphate minéral, avec formation d'ATP au lieu d'acétyl-phosphate, peut être mise en évidence lorsque l'oxydation du pyruvate se poursuit en présence d'acide adénylique.

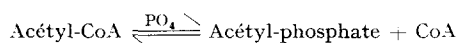
Les travaux récents ont montré que l'oxydation du pyruvate^{3,5,6,7} par les enzymes bactériens s'effectue en réalité par l'action d'un système enzymatique complexe constitué de plusieurs fractions activées par les coenzymes respectifs:



L'intermédiaire formé en présence de la première fraction enzymatique^{5,6,7} avec l'acide α -lipoïque et la cocarboxylase est transféré à la seconde fraction qui le transforme en acétyl-CoA en présence du CoA et du DPN^{5,6,7}. Le CoA est libéré par un système enzymatique accepteur des groupes acétylés (phosphotransacétylase, enzyme de condensation, enzyme acétylant les sulfamides), système nécessaire au fonctionnement normal de la pyruvo-déshydrogénase.

La formation de l'acétyl-phosphate par les extraits de *Cl. saccharobutyricum* s'effectue grâce à l'intervention de la phosphotransacétylase, enzyme accepteur des groupes acétylés.

Cet enzyme catalyse la réaction d'équilibre (STADTMAN⁸):



responsable de l'estérification de phosphate minéral correspondant à l'oxydation.

Des extraits que nous avons préparés dans certaines conditions et dont l'étude constitue l'objet de ce mémoire, n'oxydent le pyruvate qu'en présence d'ATP ou d'ADP.

L'ATP est déphosphorylé au cours de l'oxydation du pyruvate en phosphate minéral et AMP:



On sait que, l'activation de l'acétate par l'ATP, dans un système extrait de la levure, s'accompagne d'une scission de l'ATP en pyrophosphate + AMP (LIPMANN^{9,10}). Nos extraits étant dépourvus d'activité pyrophosphatasique et ATP-asiq, il s'ensuit que l'apparition de phosphate minéral est une propriété caractéristique du système enzymatique que nous étudions. L'exigence en ATP ou en ADP pour l'activité oxydative d'un système enzymatique, qui dans des conditions physiologiques est réputé libérer de l'énergie semble de prime abord paradoxale.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Préparations des extraits

Des cultures de *Cl. saccharobutyricum* sont recueillies après 16 heures de croissance sur milieu V.F. sans glucides par centrifugation à 0°. Les bactéries correspondant à 25 litres de culture sont lavées une fois à l'eau distillée froide, recentrifugées et suspendues dans 125 ml d'eau distillée froide. La suspension bactérienne est congelée brusquement dans un mélange de neige carbonique + acétone et abandonnée ensuite pendant 3-4 heures à -15°. Les bactéries sont ensuite décongelées et ultrasonnées pendant une période n'excédant pas 20 minutes dans un appareil S.C.A.M. à 950 kc et 11.3 watt/cm² environ, en présence de catalase, en ayant soin de refroidir le récipient à l'aide de glace. La suspension désintégrée par les ultra-sons est ensuite centrifugée pendant 25 minutes dans une centrifugeuse rapide Sorvall à 14,000 tours minutes. Le surnageant est rapidement décanté et lyophilisé. Les extraits lyophilisés conservent leurs propriétés enzymatiques pendant des périodes d'un an et plus.

Dialyse

L'extrait sec est dissous dans du KCl à 3% froid et dialysé pendant 5 heures contre de l'eau distillée contenant 1% de KCl et 0.2 g Na₂S par litre, à des températures n'excédant pas 0° C. Ce temps de dialyse est suffisant pour réduire l'oxydation des substances endogènes pratiquement à zéro sans pour cela provoquer aucune baisse appréciable de l'activité enzymatique.

Dosages

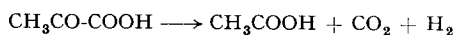
Le pyruvate de Na a été dosé par la méthode de FROMAGEOT ET DESNUELLE¹¹ suivant les modifications manométriques de WERKMAN ET SILVERMAN¹². Les mélanges expérimentaux sont exempts de produits interférant avec le dosage, tels que l'acide lactique. L'acide hydroxamique a été dosé par la méthode de LIPMANN ET TUTTLE¹³ (acétyl-phosphate + acétyl-CoA). L'acétate formé a été dosé après détection par la chromatographie sur papier¹⁴ par l'entraînement à la vapeur suivant ELSDEN ET LEWIS¹⁵. Le phosphate inorganique a été dosé par la méthode de SUMNER¹⁶. Le phosphate libéré après 7 min. d'hydrolyse dans HCl N a été dosé par la méthode de SUMNER¹⁶. La décarboxylation oxydative a été mesurée en anaérobiose par l'hydrogène dégagé ou le CO₂ libéré en atmosphère d'azote, par la technique manométrique de WARBURG.

Produits utilisés

Adénosine triphosphate (ATP), sel disodique, Pabst Laboratories U.S.A., pureté: 98%; acide adénosine-5-phosphorique (AMP), Pabst Laboratories U.S.A., pureté: 98%; Adénosine diphosphate (ADP), sel de barium Sigma U.S.A., pureté: 100%; Diphosphopyridine nucléotide (DPN) Pabst Laboratories U.S.A. pureté: 98%; Coenzyme A (CoA) pureté 50%: Dr. LIPMANN; 90% Drs. GUNSALUS ET GREEN; 75%: Pabst Laboratories U.S.A.; La cocarboxylase (DPT), Hoffman-La Roche; l'acide α-lipoïque libre et son conjugué: Dr I. C. GUNSALUS; Flavine adénine dinucléotide (FAD): Dr. HELMUT BEINERT; Le pyruvate de Na, Hoffmann-La Roche.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

L'oxydation du pyruvate par ces extraits de *Cl. saccharobutyricum* s'effectue globalement par la réaction suivante:



L'acide acétique formé et l'hydrogène libéré nous ont servi de test de l'activité enzymatique. Une faible quantité de pyruvate est consommée par une réaction parasite, dont le produit n'est ni l'acide lactique ni l'acétyl-méthyl carbinol, mais selon toute vraisemblance de l'alanine (15% du pyruvate disparu). On peut voir dans le Tableau I, que la quantité d'hydrogène libéré ou d'acide acétique formée à partir du pyruvate est nulle en absence d'ATP. L'addition d'ATP rétablit le dégagement d'hydrogène et la formation d'acide acétique.

TABLEAU I

ACTION DE DIFFÉRENTS COFACTEURS SUR LE RÉTABLISSEMENT DU DÉGAGEMENT D'HYDROGÈNE À PARTIR DU PYRUVATE ET EN PRÉSENCE DE L'EXTRAIT VIIB DE *Cl. Saccharobutyricum*

Chaque cupule contient dans sa partie centrale: 30 μ M pyruvate de Na + 100 μ M de phosphate pH 6.4 + les constituants indiqués plus bas. Dans la partie latérale 0.5 ml extrait VIIB (env. 30 mg poids sec). Dans le puit central 0.2 ml KOH à 20%. L'enzyme est ajouté au substrat au temps zéro. Phase gazeuse: N_2 . Temp. 37°. Temps expérimental: 120 min. Toutes les valeurs indiquées dans le tableau sont corrigées en tenant compte du témoin sans substrat.

Pyruvate initial μ M	Additions μ M	Hydrogène dégagé + μ M	Acétate formé + μ M
0	0	0	0
30	0	0	0
30	CoA 15 U	0.5	0.5
30	AMP 15	0.5	1
30	DPT (100 μ g)	0	0
30	DPN (1)	0	0
30	α -lipoïque (30 U)	0	0
30	FAD (100 μ g)	0	0
30	(CoA + DPN + FAD DPT + α -lipoïque)	0.5	1
30	ATP (3)	2.4	3
30	ATP (6)	9	8.5

Effet de la concentration en ATP sur l'oxydation du pyruvate en présence et en absence de phosphate minéral

Le Tableau II et les Figures 1, 2 et 3 montrent l'influence de la concentration en ATP sur le dégagement d'hydrogène moléculaire en présence d'un excès de pyruvate. On constate que la quantité totale d'hydrogène libéré augmente avec la concentration d'ATP. Un accroissement correspondant est observé pour l'acide acétique formé, qui se trouve pratiquement équivalent (rapport moléculaire) à l'hydrogène dégagé. L'étude cinétique du dégagement d'hydrogène (Fig. 1, 2, 3) en présence de phosphate inorganique fait apparaître, pour les fortes concentrations en ATP une phase de latence qui dure suivant les conditions de 30 à 60 minutes. L'inhibition du dégagement d'hydrogène en présence des fortes concentrations d'ATP peut être supprimée par le CoA (Fig. 3). Nous reviendrons plus tard sur cet effet. En présence de tampon phosphate de 0.7 à 1 molécule d'ATP est dégradée pour chaque molécule d'hydrogène libéré. L'activité oxydative se manifeste également en absence de phosphate minéral; mais, dans ces conditions, de plus fortes concentrations d'ATP sont nécessaires pour obtenir des activités comparables à celles observées en présence de phosphate (Tableau II et Fig. 2). En présence de TRIS (trihydroxy-méthyl-amino-méthane), le rapport entre la quantité d'ATP dégradé et l'hydrogène total libéré (ATP)/ H_2 se situe entre 1.5 et 2. De fortes concentrations d'ATP produisent dans les mêmes conditions un retard du dégagement d'hydrogène du même ordre que ceux observés en présence de phosphate minéral (30 à 60 min).

TABLEAU II

EFFET DES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS EN ATP SUR LA DÉGRADATION ANAÉROBIE DU PYRUVATE PAR LES EXTRAITS DE *Cl. Saccharobutyricum*. LIBÉRATION D'ORTHOPHOSPHATE A PARTIR DE L'ATP EN PRÉSENCE DU PYRUVATE (Extr. VIIB)

Les systèmes contiennent les constituants suivants: 50 μM de pyruvate de Na + 100 μM de TRIS pH 7.0 (ou 150 μM de phosphate pH 6.8) + 4 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 80 μM KCl, 0.5 ml extrait enzymatique (30-35 mg poids sec) dans la partie latérale. Dans le puits central 0.2 ml KOH 20%. Dans le deuxième diverticule latéral 0.2 ml SO_4H_2 5N. Volume final: 3 ml. L'enzyme est ajouté au substrat après équilibration du système.

Les autres constituants sont indiqués sur le tableau.

Phase gazeuse: N_2 . Température: 37°. Temps expérimental: 240 min. A la fin de la réaction des fractions aliquotes sont prélevées pour effectuer les dosages: du pyruvate disparu, phosphate minéral total, ATP restant, et acides volatils formés.

Pyruvate initial μM	add. ATP μM	pyruvate μM disparu	+ H_2 μM	+ Acétate μM	+ P_i μM	Acide Hydroxamique μM	P_i/H_2
TAMPON PHOSPHATE							
50	13.3	—	12	11.2	21	0.2	1.7
50	26.6	28.7	18	19	36.7	1.2	2.0
50 + 20 U CoA	26.6	26.6	26.6	28	36	0.9	1.4
50	39.9	—	34.4	35	69	0.2	2.0
TAMPON TRIS							
50	13.3	—	6	6	23	0.8	3.8
50	26.6	20.7	11.5	13	49	0.6	4.3
50	39.9	37	26.8	30	79.7	—	3.0
50	53.2	33	30		110	0.7	3.6

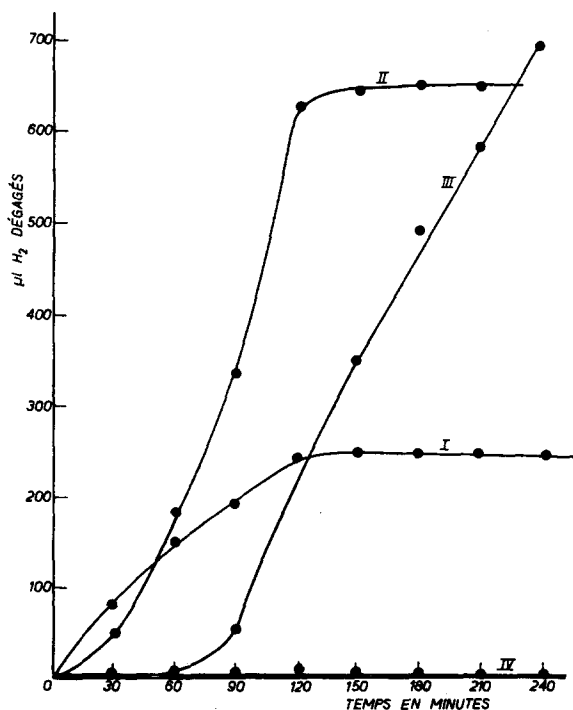


Fig. 1. Effet du phosphate minéral sur le dégagement d'hydrogène moléculaire à partir du pyruvate en fonction de différentes concentrations d'ATP et en présence de l'extrait VIIB et de *Cl. saccharobutyricum*.

Chaque cupule contient dans la partie centrale: 150 μM de phosphate, pH 6.5 + 80 μM KCl + 4 μM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 50 μM de pyruvate de Na + différentes concentrations d'ATP. Dans la partie latérale 0.5 ml enzyme VIIB (30 mg poids sec) qui est ajouté après équilibration du système. Dans le puits central 0.2 ml KOH à 20%. Temp. = 37°. Phase gazeuse: N_2 . La réaction est stoppée avec 0.2 ml SO_4H_2 , 5 N contenue dans un deuxième diverticule latéral.

L'hydrogène dégagé en présence de: (I) 13.3 μM ATP, (II) 26.6 μM ATP, (III) 39.9 μM ATP, (IV) en absence d'ATP.

Fig. 2. Dégagement d'hydrogène moléculaire à partir du pyruvate en absence de phosphate minéral (tampon TRIS) et en présence de concentration croissante d'ATP.

Les systèmes sont identiquement constitués à ceux représentés dans la Fig. 1. 100 μM de tampon TRIS, pH 7, remplacent le tampon phosphate. Toutes les autres conditions expérimentales sont analogues à celles de la Fig. 1.

Le dégagement d' H_2 en absence d'ATP (I), et en présence d'ATP et de tampon TRIS: (II) 13.3 μM ATP, (III) 26.6 μM ATP, (IV) 53.2 μM ATP, (V) 39.9 μM ATP (VI) 13.3 μM ATP + tampon phosphate, (VII) 26.6 μM ATP + Tampon phosphate.

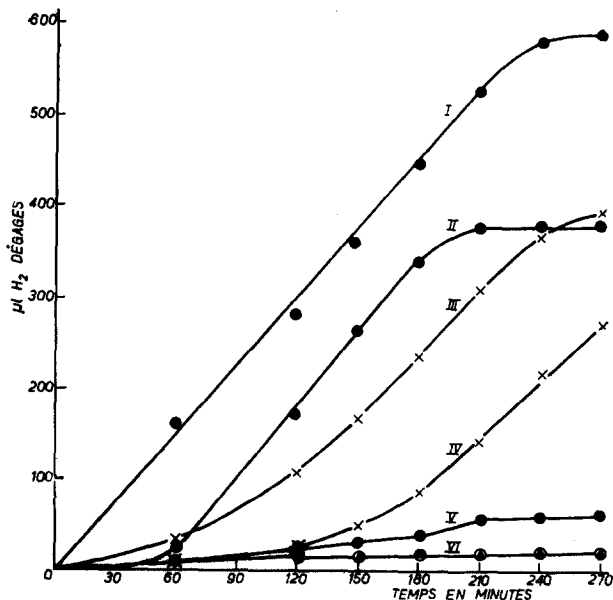
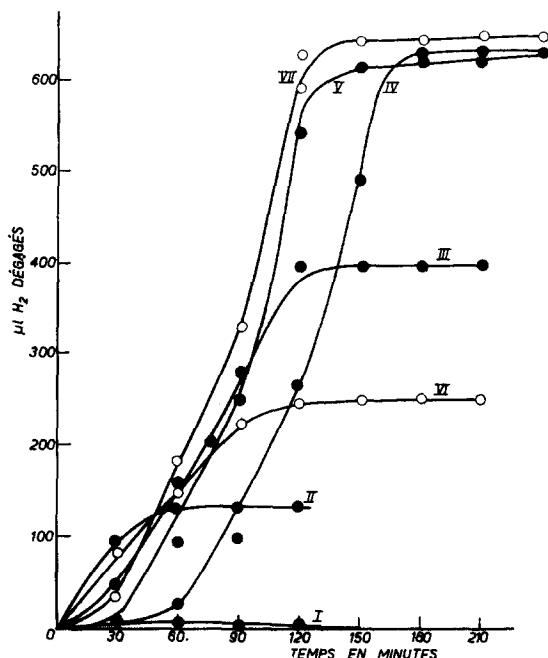


Fig. 3. Suppression par le Coenzyme A des phases de latence du dégagement d'hydrogène provoquées par les fortes concentrations d'ATP.

Toutes les conditions expérimentales sont identiques à celles indiquées dans les Fig. 1 et 2. Extrait VIIB de *Cl. saccharobutyricum*.

- (I): Dégagement d' H_2 en présence de 20 U CoA + 27.6 μM ATP + tampon phosphate.
- (II): Identique à (I) sans CoA.
- (III): 20 U CoA + 40.1 μM ATP + Tampon TRIS.
- (IV): Identique à (III) sans CoA.
- (V): Identique à (I) sans ATP.
- (VI): Identique à (II) sans ATP.

Remplacement de l'ATP par l'ADP

L'ADP essayé à une concentration équivalente à celle de l'ATP s'est montré aussi efficace que ce dernier dans le rétablissement de l'activité enzymatique.

Par contre la Fig. 5 et les Tableaux I et III montrent que le pyrophosphate, l'acétylphosphate et l'AMP ne sont pas capables de rétablir l'activité enzymatique.

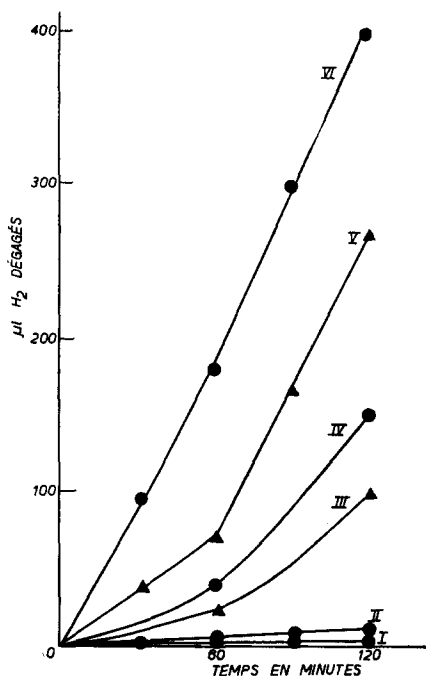


Fig. 4. Comparaison entre les vitesses de dégagement d' H_2 à partir du pyruvate en présence d'arséniate ou de phosphate et en présence ou absence de CoA.

Dans les systèmes contenant de l'arséniate 50 μM d'arséniate de Na pH 6.7 remplace l'orthophosphate. Toutes les autres conditions sont identiques à celles exprimées dans la Fig. 1. (Extrait VIB).

- (I) et (II): dégagement d' H_2 à partir du pyruvate en absence d'ATP et en présence de 30 U. CoA. (I): Tampon phosphate, (II): tampon arséniate.
 (III): 15 U CoA + 32 μM ATP + tampon phosphate.
 (V): 30 U CoA + 32 μM ATP + tampon phosphate.
 (VI): 50 μM d'arséniate remplacent le phosphate.
 (IV): identique à (VI) 15 U CoA.

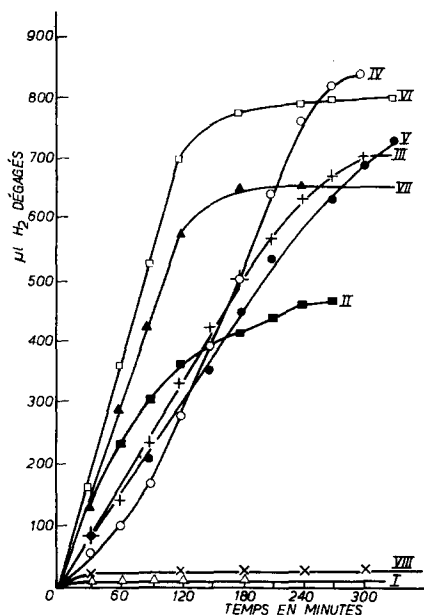


Fig. 5. Effet de l'ATP, ADP et de l'acétyl-phosphate sur le dégagement d'hydrogène à partir du pyruvate en présence de l'arséniate de Na et de l'extrait de *Cl. saccharobutyricum* VIB.

Les systèmes sont constitués de la même façon qu'indiqué dans la Fig. 1. 50 μM d'arséniate de Na pH 6.7 remplacent le phosphate.

Dégagement d'hydrogène en présence de: (I) 15 U CoA, (II) 15 U CoA + 8 μM ATP, (III) 15 U CoA + 16 μM ATP, (IV) 15 U CoA + 27 μM ATP, (V) 15 U CoA + 32 μM ATP, (VI) 30 U CoA + 16 μM ATP, (VII) 30 U CoA + 32 μM ADP, (VIII) 30 U CoA + 32 μM acétyl-phosphate.

Métabolisme de l'ATP au cours de la réaction d'oxydation du pyruvate

L'ATP est dégradé au cours de l'oxydation du pyruvate en orthophosphate et AMP (Tableau III et Fig. 6). Indépendamment de l'absence ou de la présence de phosphate minéral on constate une libération finale de 2 molécules de phosphate par molécule d'ATP dégradé. Etant donné que l'ADP est susceptible de remplacer l'ATP dans la réaction, on doit admettre que la dégradation de l'ATP s'effectue suivant le schéma:



TABLEAU III

L'INEFFICACITÉ DU PYROPHOSPHATE DE SODIUM DE REMPLACER L'ATP DANS L'OXYDATION DU PYRUVATE PAR LES EXTRAITS DE *Cl. saccharobutyricum* (Extr. VIB)

50 μM de pyruvate de Na + 0.5 ml d'extrait enzymatique (30 mg poids sec) + 4 μM SO_4Mg , $7\text{H}_2\text{O}$ + 150 μM KCl, sont incubés dans des tubes en pyrex à 37° pendant 180 min en présence des constituants suivants:

- I: 90 μM pyrophosphate de Na pH 6.8.
 - II: Idem + 25U CoA.
 - III: Idem + 25U CoA + 20 μM ATP.
 - IV: 100 μM phosphate de Na pH 6.6 remplace le pyrophosphate.
- Volume final 3 ml. La réaction est arrêtée par 0.2 ml d'acide trichloracétique à 25%.

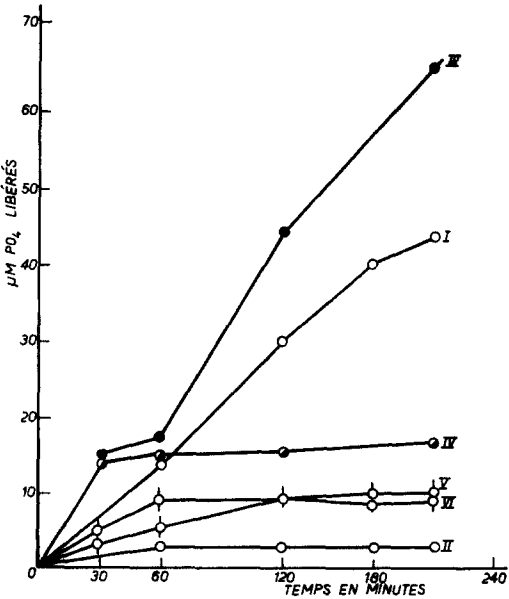
Additions μM	Tampon pyrophosphate		Tampon phosphate	
	pyruvate disparu μM	P_i libéré μM	pyruvate disparu μM	P_i libéré μM
0	—	—	—	—
25U CoA	1	0	8	—
25U CoA/+ 20 μM ATP	1.5	2	22	39.9

P_i = Phosphate minéral

Fig. 6. Libération de phosphate minéral à partir de l'ATP en présence et en absence de substrat, par les extraits de *Cl. saccharobutyricum*, en fonction du temps.

Chaque cupule de Warburg contient dans la partie centrale: 34 μM ATP + 100 μM tampon TRIS pH 7 + 80 μM KCl + 4 μM SO_4Mg , $7\text{H}_2\text{O}$ + 30 U CoA. Dans la partie latérale: 0.5 ml enzyme (30 mg poids sec, dialysé pendant 6 h) qui est ajouté au temps zéro. Dans le puits central: 0.2 ml de KOH à 20%. Les systèmes avec substrat contiennent en outre 50 μM de pyruvate de Na dans la partie centrale. Chaque dosage de phosphate minéral libéré et d'acide hydroxamique formé a été effectué sur le contenu d'une cupule dont la réaction a été stoppée par l'acide CCl_3COOH (0.2 ml 25%) au temps indiqué sur le graphique. Temp. = 37°. Phase gazeuse: N_2 .

- I: P_i libéré à partir de l'ATP en présence de substrat + extrait VIB.
- III: P_i libéré à partir de l'ATP en présence de substrat + extrait VIIIB.
- II: P_i libéré à partir de l'ATP en absence de substrat + extrait VIB.
- IV: P_i libéré à partir de l'ATP en absence de substrat + extrait VIIIB.
- V: μM d'acide hydroxamique formés en présence de substrat + extrait VIB.
- VI: μM d'acide hydroxamique formés en absence du substrat + extrait VIB.



Abscisses: μM de phosphate libéré ou μM d'acide hydroxamique formé.

La Fig. 6 montre la dégradation de l'ATP en fonction du temps, avec les diverses préparations enzymatiques étudiées. En absence de substrat, une petite fraction de l'ATP est clivée; celle-ci reste constante pendant toute la durée expérimentale. En présence de substrat, la dégradation de l'ATP est continue et parallèle à l'évolution de l'hydrogène. La nécessité du substrat pour la dégradation de l'ATP indique que les préparations sont exemptes d'ATP-ase. Le rapport phosphate minéral libéré par

molécule d'ATP dégradé (P_i/ATP) est de deux qu'on opère en tampon TRIS ou phosphate. La concentration de l'ATP en présence de TRIS doit être généralement double de celle requise en présence de phosphate. Autrement dit, une plus forte quantité d'ATP est dégradée, en présence de TRIS par molécule d'hydrogène dégagé.

Nous devons encore nous demander si le phosphate libéré à partir de l'ATP est un produit primaire ou secondaire de la réaction. A ce sujet, il est bon de rappeler que le système présent dans la levure, qui active l'acétate, clive l'ATP en AMP + pyrophosphate^{9, 10}.

Si notre système et ce dernier étaient identiques, la formation d'orthophosphate à partir de l'ATP serait due à l'action secondaire d'une pyrophosphatase. Or tel n'est pas le cas, car les préparations enzymatiques que nous avons étudiées n'ont aucune activité pyrophosphatasique (Tableau IV) et de plus, il est apparu que le pyrophosphate essayé en présence d'ATP inhibe l'oxydation du pyruvate.

MODE D'ACTION DE L'ATP

L'exigence en ATP pour l'oxydation du pyruvate par ces extraits de *Cl. saccharobutyricum*, semble à priori contredire :

1. Nos précédentes expériences qui démontraient que l'oxydation du pyruvate s'accompagne d'une *estérification de phosphate* minéral, et d'autre part

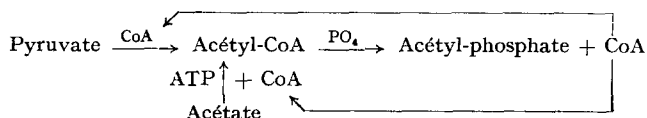
2. Les résultats de SCHWEET ET CHESLOCK¹⁷ concernant la pyruvo-oxydase des tissus des organismes supérieurs indiquant que l'intermédiaire formé dans le premier stade de l'oxydation n'exige pas la présence d'ATP pour acétyler les sulfamides.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'exigence en ATP: Soit 1. Intervention de l'ATP dans la synthèse d'un cofacteur; soit 2. Activation du Coenzyme A; soit encore 3. l'activation des enzymes accepteurs de groupes acétylés (phosphotransacétylase ou autres).

1. Les résultats relatés dans le Tableau I démontrent qu'il ne peut s'agir de la synthèse d'aucun cofacteur connu. L'addition de tous les cofacteurs, participant à la réaction, ne rétablit pas l'activité enzymatique.

2. Activation du CoA.—Le coenzyme A est un constituant des systèmes trans-acétylasiques¹⁸. NISMAN ET MAGER² ont démontré que les extraits de *Cl. saccharobutyricum* exigent le CoA pour l'oxydation du pyruvate. Les deux extraits que nous avons utilisés dans ce travail diffèrent l'un de l'autre par la concentration initiale en CoA. Même avant dialyse l'extrait VI B s'est montré exempt de CoA, car l'addition de ce cofacteur rétablit le dégagement de H_2 en présence d'ATP. Par contre l'extrait VII B s'est montré non saturé en ce coenzyme, l'addition de CoA accélère la vitesse du dégagement gazeux (Fig. 4, 5).

De plus le CoA supprime les phases de latence du dégagement produites par les fortes concentrations d'ATP (Fig. 4). Ces retards du dégagement semblent être conditionnés par une compétition, pour le CoA libéré (par l'activité de la phosphotransacétylase), entre la pyruvodéshydrogénase et l'enzyme catalysant l'activation de l'acétate formé (Fig. 7) par l'ATP:



Ce schéma explique pourquoi l'addition de CoA permet à la réaction de se poursuivre normalement.

Fig. 7. Influence de l'ADP, de l'ATP et du CoA sur la dégradation de l'acétylphosphate et activation de l'acétate par l'ATP et l'ATP + CoA dans les extraits de *Cl. saccharobutyricum* (VII B).

Des tubes contenant les constituants suivants sont incubés à 37° pendant 60 min: 8 μ M acétyl-phosphate de lithium + 30 mg (extrait VII B dialysé 5 h) + 75 μ M phosphate pH 6.5 + 80 μ M KCl + 4 μ M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + les autres cofacteurs indiqués plus bas. Volume final: 3 ml.

Des fractions sont prélevées aux temps indiqués, pour le dosage de l'acide hydroxamique.

I: décomposition spontanée de l'acétyl-phosphate incubé, dans les mêmes conditions que les autres systèmes.

II: décomposition enzymatique en absence de tout autre cofacteur étudié.

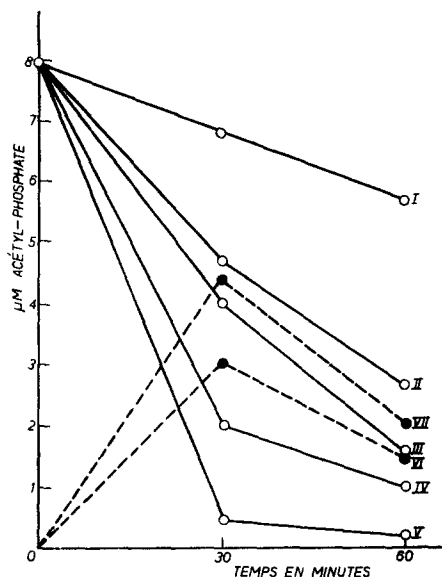
III: décomposition enzymatique en présence de 10 U CoA.

IV: décomposition enzymatique en présence de 5 μ M ATP.

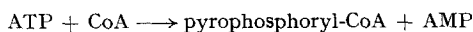
V: décomposition enzymatique en présence de 12.5 μ M AMP.

VI: synthèse de l'acide hydroxamique à partir de 12 μ M ATP + 30 μ M acétate de K.

VII: identique à VI + 30 U CoA.



LYNEN¹⁹ a montré que dans l'activation de l'acétate par les enzymes, de la levure ou des tissus des organismes supérieurs, l'ATP ne se combinerait pas avec le CoA suivant l'hypothèse envisagée par LIPMANN¹⁰:



mais que l'ATP réagissait avec l'enzyme activant l'acétate. Ces faits sont suffisamment suggestifs pour écarter l'hypothèse de l'activation préalable du CoA.

3. Activation des enzymes accepteurs de groupes acétylés. L'impossibilité de promouvoir l'activité enzymatique par le phosphate ou l'arséniate, avec ou sans addition de CoA (Tableaux I, II, III et Fig. 1, 2, 3, 5) ne peut s'expliquer que par l'absence de couplage entre la déshydrogénase proprement dite et la phosphotransacétylase. Il est probable que si un tel couplage existait comme c'est le cas pour les extraits accumulant l'acétyl-phosphate à partir du pyruvate^{1,4} l'exigence en ATP ne serait pas apparente. La situation mise en lumière par les observations ci-dessus peut être due, soit à l'absence de la phosphotransacétylase, soit encore à son inactivité initiale. Des expériences réalisées sur la dégradation de l'acétylphosphate sont en faveur de la deuxième hypothèse. La Fig. 7 montre que l'extrait dégrade faiblement l'acétyl-phosphate en absence d'ATP, et que la vitesse de dégradation est beaucoup plus forte en présence d'ATP. Un phénomène analogue a été également observé en présence d'acide adénylique (Fig. 7), cependant, le mécanisme mis en jeu dans ce cas est essentiellement différent. LIPMANN *et al.*²⁰ ainsi que STADTMAN ET BARKER²¹ ont montré que l'acide adénylique est un accepteur de phosphate labile.

L'inactivité initiale de la phosphotransacétylase et sa réactivation par l'ATP apparaissent aussi de la dépression du rapport ATP/H₂ en présence d'arséniate (Fig. 5). On sait que l'arséniate peut non seulement remplacer le phosphate pour l'activité de la phosphotransacétylase mais encore augmenter l'activité spécifique en raison de la décomposition spontanée de l'acétyl-arséniate. A ce sujet, la comparaison du rapport ATP/H₂ dans les différentes conditions expérimentales est suggestive (Tableau IV).

TABLEAU IV
EFFET DU TAMPON SUR LE RAPPORT ATP/H₂

ATP/H ₂ (TRIS)	= 1.5-2
ATP/H ₂ (Phosphate)	= 0.7-1
AT/PH ₂ (Arséniate)	= 0.4-0.5

La diminution progressive de la quantité d'ATP dégradé par molécule d'hydrogène libéré constitue en soi-même une preuve en faveur de l'intervention de la phosphotransacétylase comme accepteur des groupes acétylés. Reste à expliquer l'absence d'accumulation d'acétyl-phosphate à partir du pyruvate dans les conditions expérimentales observées. La quantité d'acide hydroxamique formée (Acétyl-phosphate + Acétyl-CoA) est sensiblement égale en absence comme en présence de substrat (Fig. 5), car, le même cofacteur qui réactive la phosphotransacétylase accélère le métabolisme de l'acétyl-phosphate.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous avons vu l'ATP rétablit l'activité oxydative de ces extraits déficients envers le pyruvate. A la lumière des observations de LIPMANN^{9, 10} ainsi que celles de LYNEN^{19, 19a} on peut admettre que l'ATP réagit avec les enzymes accepteurs d'acétyl (phosphotransacétylase). Toutefois, dans le cas des enzymes de *Cl. saccharobutyricum*, le clivage de l'ATP s'effectue par libération d'orthophosphate au lieu de pyrophosphate.

Nos expériences semblent démontrer que la décomposition du complexe Acétyl-CoA (qui s'effectue dans les systèmes des organismes supérieurs par une déacétylase²² et chez les bactéries par la phosphotransacétylase) est une activité essentielle pour le fonctionnement physiologique de la pyruvo-déshydrogénase. L'inactivité de cet enzyme instaure l'exigence en ATP. Des expériences que nous nous proposons de réaliser avec des extraits fractionnés de la même bactérie, nous permettront de vérifier plus en détail le mode d'action de l'ATP, comparativement aux systèmes décrits par les auteurs précédents^{9, 10, 19}.

Les auteurs remercient très profondément les Drs.: LIPMANN, GUNSALUS, GREEN, BEINERT et STATDMAN pour le coenzyme A, l'acide α -lipoïque, le FAD, et l'ADP qu'ils ont eu l'amabilité de leur envoyer.

RÉSUMÉ

Les auteurs décrivent quelques propriétés enzymatiques d'extraits déficients de *Cl. saccharobutyricum* vis à vis de la dégradation oxydative du pyruvate. Ces extraits ne décarboxylent oxydativement le pyruvate de sodium qu'en présence d'ATP ou d'ADP. L'estérification du phosphate minéral qui accompagne habituellement cette réaction oxydative est remplacée ici par une transformation de l'ATP en ADP ou AMP et en orthophosphate. Il semble que l'orthophosphate libéré soit un produit primaire de la réaction puisque les extraits ne présentent aucune activité ATP-ase ou pyrophosphatase. Le système enzymatique dans lequel intervient l'ATP au cours de cette réaction est probablement la phosphotransacétylase.

SUMMARY

The authors have described some enzymatic properties of deficient extracts of *Cl. saccharobutyricum* in the anaerobic oxidative breakdown of pyruvate. These extracts decarboxylate oxidatively sodium pyruvate only in the presence of ATP or ADP. The usual esterification of mineral phosphate accompanying this oxidative reaction is substituted here by a split of ATP to ADP or AMP and orthophosphate. The liberated orthophosphate seems to be a primary product of the reaction since the extracts do not show any ATP-ase or pyrophosphatase activity. The enzymatic system where ATP intervenes in this reaction is probably the phosphotransacetylase.

ZUSAMMENFASSUNG

Mangelhafte Fermentextrakte von *Cl. saccharobutyricum* oxidieren die Brenztraubensäure nur in der Anwesenheit von ATP oder ADP, die während der enzymatischen Reaktion zu AMP und Orthophosphat gespalten werden. Da die Extrakte keine ATP-ase oder Pyrophosphatase Aktivität zeigen, scheint das abgespaltene Mineralphosphat ein primäres Produkt der Enzymwirkung zu sein. Die Wirkung des ATP in diesem System scheint eine direkte Aktivierung der Phosphotransacetylase zu sein.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ B. NISMAN, *Compt. rend.*, 230 (1950) 248.
- ² B. NISMAN, *Nature*, 167 (1952) 709.
- ³ B. NISMAN, *Bacteriol. Revs.*, 1953 (sous presse).
- ⁴ H. J. KOEPSSELL AND M. F. JOHNSON, *J. Biol. Chem.*, 145 (1942) 379.
- ⁵ S. KORKES, A. DEL CAMPILLO, I. C. GUNSALUS AND S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 721.
- ⁶ I. C. GUNSALUS, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41 (1953) suppl. I, 113.
- ⁷ M. T. DOLIN AND I. C. GUNSALUS, *Federation Proc.*, 11, (1952) 203.
- ⁸ E. R. STADTMAN, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 527.
- ⁹ F. LIPMANN, M. E. JONES, S. BLACK AND R. M. FLYNN, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41 (1953) Suppl. I, 109.
- ¹⁰ F. LIPMANN, *Bacteriol. Revs.*, 17 (1953) 1.
- ¹¹ C. FROMAGEOT ET P. DESNUELLE, *Biochem.*, 279 (1935) 174.
- ¹² S. SILVERMAN ET C. H. WERKMAN, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 35.
- ¹³ F. LIPMANN AND M. L. C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 21.
- ¹⁴ F. BROWN AND L. P. HALL, *Nature*, 166 (1950) 66.
- ¹⁵ S. R. ELSDEN AND D. LEWIS, *Biochem. J.*, 55 (1953) 183.
- ¹⁶ B. SUMNER, *Science*, 100 (1944) 413.
- ¹⁷ R. S. SCHWEET AND K. CHESLOCK, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 65.
- ¹⁸ E. R. STADTMAN, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 41 (1953) Suppl. I, 89.
- ¹⁹ F. LYNEN, La β -oxydation, *Bull. soc. chim. biol.*, (1953) (sous presse).
- ^{19a} F. LYNEN AND S. OCHOA, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 299.
- ²⁰ F. LIPMANN, *Adv. Enzymol.*, 6 (1946) 231-67.
- ²¹ E. R. STADTMAN AND H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 769.
- ²² J. GERGELLY, P. HELE AND C. V. RAMAKRISHNAN, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 232.

Reçu le 27 octobre 1953