

# FACTEURS INTERVENANT DANS LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE: ÉTAT D'OXYDO-RÉDUCTION DES TRANSPORTEURS D'ÉLECTRONS ET pH

PIERRE V. VIGNAIS ET PAULETTE M. VIGNAIS

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Alger (Algérie)*

(Reçu le 4 février 1960)

## SUMMARY

*Factors affecting oxidative phosphorylation: redox condition of electron carriers and pH*

1. The effect was studied of the pH and of the redox condition of the electron carriers in the DPN...O<sub>2</sub> chain, on the partial reactions in oxidative phosphorylation that are catalysed by submitochondrial particles.
2. The rate of oxidation of  $\beta$ -hydroxybutyrate, the efficiency of the phosphorylation connected with it, and the rate of the ATP-P<sub>i</sub> exchange are characterized by two pH optima, at 6.5 and 7.3. ATPase activity is characterized by three pH optima, at 6.5, 7.3 and 8.5.
3. Partial, nearly complete and complete reduction states of the DPN...O<sub>2</sub> respiratory chain or parts thereof were obtained by means of the inhibitors amytal, antimycin A, cyanide, or by means of total anaerobiosis.
4. At pH 6.5, nearly complete or complete reduction of the electron carriers situated between DPN and cytochrome *b* or between DPN and cytochrome *a<sub>3</sub>* increases ATPase activity and reduces the rate of the ATP-P<sub>i</sub> exchange, whereas at pH 7.3 both the ATPase activity and the rate of ATP-P<sub>i</sub> exchange are diminished.
5. At pH 7.3, a semi-reduced condition of the electron carriers located between DPN and cytochrome *b* stimulates both the ATPase activity and the ATP-P<sub>i</sub> exchange.
6. The results obtained suggest that there are two possible mechanisms of oxidative phosphorylation as regards the transfer of electrons from DPNH to cytochrome *b*. These mechanisms are discussed in the light of the experimental results.

## INTRODUCTION

L'oxydation d'une molécule de DPNH par des mitochondries s'accompagne de la phosphorylation de 3 molécules d'ADP<sup>1,2</sup>, chaque phosphorylation étant probablement associée à un transfert d'électrons entre les transporteurs: DPN et flavoprotéine,

Abbreviations: DPNH et DPN<sup>+</sup>: diphosphopyridine nucléotide réduit et oxydé; ATP et ADP: adénosine di- et triphosphate; P<sub>i</sub>: orthophosphate; Tris: tris(hydroxyméthyl)amine-méthane; EDTA: éthylène-diaminetétracétate de sodium; amytal: éthyl-5-isoamyl-5-barbiturate, DNP: 2,4-dinitrophénol.

flavoprotéine et cytochrome *c*, cytochrome *c* et oxygène<sup>3-7</sup>. Les différents schémas proposés actuellement pour expliquer le mécanisme de la phosphorylation oxydative<sup>6,8-11</sup> peuvent être classés en 3 catégories:

Schéma I:

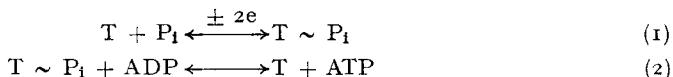


Schéma II:

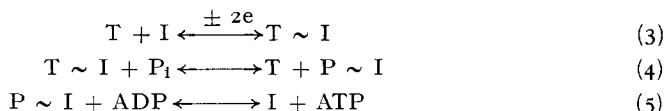
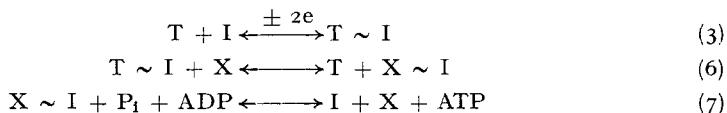
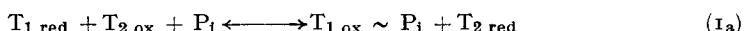


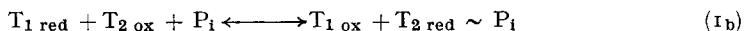
Schéma III:



où *T* représente un transporteur d'électrons, *X* un intermédiaire hypothétique, *I* un inhibiteur qui serait présent dans les mitochondries et dont la combinaison avec *T* est déplacée par *P<sub>i</sub>* ou par *X*. On admet que les liaisons entre *T* et *P<sub>i</sub>*, *T* et *I*, *P<sub>i</sub>* et *I* ou encore entre *X* et *I* sont de même niveau énergétique que la liaison pyrophosphate terminale de l'ATP. Les réactions de transfert (1) et (3) présentent chacune deux alternatives aboutissant à un dérivé "riche en énergie" dans lequel *T* est soit oxydé soit réduit. Ainsi la réaction (1) s'écrira:



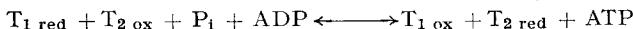
ou bien



Quel que soit le schéma invoqué, il est difficile de préciser si *T* est sous un état oxydé (alternative a) ou réduit (alternative b) dans les dérivés *T* ~ *P<sub>i</sub>* et *T* ~ *I*, les résultats publiés jusqu'à présent<sup>12-15</sup> aboutissant à des conclusions différentes.

On peut tenter de résoudre le problème de la formation des dérivés "riches en énergie" et celui du choix entre les schémas I, II et III par l'étude de deux processus bien individualisés qui font partie de la phosphorylation oxydative: l'hydrolyse de l'ATP et l'échange ATP-*P<sub>i</sub>* en l'absence de tout substrat exogène oxydable. Les processus d'hydrolyse et d'échange sont, en effet, impliqués dans les schémas I, II et III à des niveaux différents: au niveau des réactions (1) et (2) dans le schéma I, des réactions (4) et (5) dans le schéma II, de la réaction (7) dans le schéma III; ils dépendent dans le schéma I d'un transfert d'électrons entre 2 transporteurs *T<sub>1</sub>* et *T<sub>2</sub>* et par conséquent de l'état d'oxydo-réduction des deux transporteurs *T<sub>1</sub>* et *T<sub>2</sub>*; selon le schéma II, ils ne sont liés qu'à l'état d'oxydo-réduction d'un seul transporteur; enfin selon le schéma III ils s'accomplissent sans qu'aucun transporteur n'intervienne et indépendamment de tout changement d'état d'oxydo-réduction.

Dans le cas général du schéma I, les vitesses d'échange ATP-*P<sub>i</sub>* et d'hydrolyse de l'ATP dépendent à la fois de la proportion des formes oxydée et réduite des deux transporteurs *T<sub>1</sub>* et *T<sub>2</sub>* et de la constante d'équilibre *K* de la réaction globale:



Par exemple, si  $K$  est voisin de 1, ces vitesses sont maxima lorsque les proportions des formes oxydée et réduite de  $T_1$  et  $T_2$  sont du même ordre de grandeur\*. De toutes façons, dans le schéma I, une oxydation complète ou une réduction complète de  $T_1$  et de  $T_2$  doit entraîner un ralentissement des processus d'échange et d'hydrolyse. Dans le cas du schéma II, suivant que  $T$  dans  $T \sim I$  est sous un état réduit, oxydé ou de type "semi-quinonique", les vitesses d'échange et d'hydrolyse sont maxima pour un état complètement réduit, complètement oxydé ou semi-réduit de la portion de chaîne où  $T$  se trouve localisé.

Dans ce mémoire, les variations de la vitesse d'échange ATP- $P_1$  et de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP sont étudiées à différents pH en fonction de l'état d'oxydo-réduction des transporteurs de la chaîne respiratoire DPN...O<sub>2</sub>. Les expériences ont été réalisées avec des particules sub-mitochondriales préparées à partir de foie de rat. Les résultats obtenus conduisent à admettre que le schéma I ou l'alternative "semi-quinonique" du schéma II représentent des mécanismes possibles de phosphorylation oxydative pour un transfert d'électrons du DPNH au cytochrome *b*.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

##### *Préparation de fragments de membranes de mitochondries*

Les fragments de mitochondries sont préparés par un procédé voisin de celui décrit par DEVLIN ET LEHNINGER<sup>16</sup>. Les mitochondries de foie de rat (rats Wistar adultes de 150 à 200 g) sont d'abord isolées suivant la méthode de SCHNEIDER ET HOGEBOOM<sup>17</sup> et lavées deux fois avec une solution de saccharose 0.25 M. On homogénéise alors le sédiment mitochondrial dans une solution refroidie de digitonine purifiée à 1% (5 ml de solution de digitonine pour un foie). Après 30 min de contact à 2°, la suspension est centrifugée à 35.000  $\times g$  pendant 15 min (Ultracentrifugeuse Spinco, Rotor 40.2). Le sédiment constitué par des mitochondries non lysées et par de gros débris mitochondriaux est éliminé; le surnageant est centrifugé à 110,000  $\times g$  pendant 30 min. Les fragments ainsi isolés sont remis en suspension dans de l'eau distillée et utilisés immédiatement pour les expériences. Toutes les opérations sont conduites à une température voisine de 2°. Le rendement en particules sub-mitochondriales obtenues à partir de mitochondries entières a été calculé d'après les teneurs en azote; il varie entre 10 et 15%.

##### *Produits chimiques et leur purification*

Les produits chimiques utilisés sont des produits commerciaux: ATP et ADP (Sigma Chemical Company), Antimycine A (Wisconsin Alumni Research Foundation). La digitonine (Hoffmann La Roche) est purifiée de la façon suivante: 5 g sont dissous dans 24 ml de soude N auxquels on ajoute 16 ml d'EDTA 0.1 M. Afin de précipiter la digitonine on ajoute trois volumes d'acétone refroidie à 0°. Il se forme un gel blanchâtre qu'il est aisé de recueillir sur les parois d'un agitateur. On dissout le gel dans 5 ml d'eau et on le précipite à nouveau par de l'acétone. On effectue une troisième fois la même opération et on lave finalement le gel par de l'acétone pure. Après dessication sous vide, on obtient la digitonine sous forme d'une poudre soluble dans l'eau. Le pH de la solution aqueuse est ajusté à 7 par addition d'acide chlorhydrique *N*.

\* Un cas particulier du schéma I est celui où  $T$  dans  $T \sim P_1$  est de type "semi-quinonique".

Les méta- et pyrophosphates qui accompagnent souvent à l'état de traces l'orthophosphate radioactif  $^{32}\text{P}$  sont éliminés par hydrolyse acide suivant la méthode de NIELSEN ET LEHNINGER<sup>2</sup>.

L'amytal (Laboratoires Roussel) a été recristallisé deux fois dans de l'éthanol en présence d'EDTA.

#### *Mesure de l'échange ATP- $P_i$*

L'incubation se fait dans de microfioles à fond plat agitées dans un thermostat à 25°. Chaque fiole contient: ATP 0.0075 M, orthophosphate 0.0001 M à 0.05 M marqué par  $^{32}\text{P}$ , 1 à 2.10<sup>6</sup> coups/min, EDTA 0.0025 M et 100  $\mu\text{l}$  de la suspension de fragments sub-mitochondriaux (50 à 150  $\mu\text{g}$  d'azote). Le volume final est de 400  $\mu\text{l}$ . L'orthophosphate sert de tampon entre pH 6.5 et pH 8.5, l'ATP entre pH 5.5 et 7.5. En dehors de ces zones le pH de l'ATP et celui de l'orthophosphate sont ajustés approximativement et maintenus à la valeur désirée par l'addition de tampons appropriés: tampon acétate-acide acétique pour les pH inférieurs à 5.5, tampon Tris-HCl pour les pH supérieurs à 7.0 (dans les deux cas concentration finale 0.015 M). Aucun substrat oxydable exogène n'est ajouté au milieu d'incubation.

La vitesse de l'échange étant constante pendant les 30 premières minutes d'incubation dans nos conditions expérimentales (Tableau II), la durée de l'incubation se limite, en général, à 15 min. Les réactions enzymatiques sont stoppées par addition de 100  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique à 30 % et les protéines éliminées par centrifugation. L'orthophosphate et l'ATP contenus dans une partie aliquote du surnageant (40 à 80  $\mu\text{l}$ ) sont séparés par chromatographie sur papier Whatman No 1 avec une phase éther isopropylque-acide formique<sup>18</sup>. Après révélation, les zones correspondant aux taches d'orthophosphate et de phosphates organiques sont découpées et minéralisées dans 500  $\mu\text{l}$  du mélange: 2 parties d'acide perchlorique à 60 % et 3 parties d'acide sulfurique concentré pur. L'acide phosphorique est extrait de la totalité de l'échantillon minéralisé par de l'isobutanol et dosé colorimétriquement<sup>19,20</sup>. Une partie aliquote de l'extrait isobutanolique est déposée sur une coupelle et la radioactivité mesurée après évaporation. Dans quelques expériences on a mesuré directement la radioactivité des taches.

La vitesse de l'échange ATP- $^{32}\text{P}$  est calculée d'après la formule de STEWART<sup>21</sup> lorsque la concentration en orthophosphate varie peu durant l'incubation: cette condition est remplie lorsque la concentration en orthophosphate initialement présente est relativement importante (égale ou supérieure à 0.01 M). Dans le cas contraire l'ordre de grandeur de l'échange ATP- $P_i$  est évalué d'après le rapport:

$$\frac{\text{radioactivité spécifique de } P\gamma \text{ de l'ATP}}{\text{radioactivité spécifique de l'orthophosphate}}$$

#### *Mesure de l'ATPase*

Le milieu d'incubation type (volume final 400  $\mu\text{l}$ ) contient: ATP 0.0075 M, EDTA 0.0025 M et 100  $\mu\text{l}$  de la suspension de fragments de mitochondries (50 à 150  $\mu\text{g}$  d'azote). Les tampons sont employés dans les mêmes conditions que précédemment. Le phosphate libéré par hydrolyse de l'ATP est dosé après séparation chromatographique sur papier. Dans nos conditions expérimentales la vitesse d'hydrolyse est constante pendant les 30 premières minutes d'incubation (Tableau I).

### *Mesure de la phosphorylation oxydative*

A moins que des conditions spéciales ne soient précisées, le milieu d'incubation type (volume final 400  $\mu$ l) est le suivant:  $\beta$ -hydroxybutyrate 0.01  $M$ , EDTA 0.0025  $M$ , orthophosphate 0.025  $M$  marqué par  $^{32}P$ , 1.10<sup>6</sup> coups/min, ADP 0.0073  $M$ . Les solutions tampons à différents pH sont utilisées comme dans la réaction d'échange. La vitesse d'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate est estimée égale à la vitesse de formation de l'acétoacétate<sup>1,22</sup>. L'acétoacétate formé est dosé suivant la méthode de WALKER<sup>23</sup>. Les phosphates sont séparés par chromatographie sur papier<sup>18</sup> et la quantité d'ATP synthétisé est calculée d'après la radioactivité de la tache correspondant aux phosphates organiques et la radioactivité spécifique de l'orthophosphate.

### *Autres déterminations*

La radioactivité spécifique du dernier phosphate ( $P\gamma$ ) de l'ATP et celle de l'avant-dernier phosphate ( $P\beta$ ) sont mesurées après hydrolyse de l'ATP à 0° par de l'apyrase selon la méthode de WHITTAM *et al.*<sup>24</sup>.

Les nucléotides pyridiniques (DPN<sup>+</sup> et DPNH) présents dans les fragments sub-mitochondriaux sont extraits respectivement en milieu acide et en milieu alcalin selon GLOCK ET MCLEAN<sup>25</sup> et dosés au spectrophotomètre Beckman DU à 340 m $\mu$ , en présence d'alcool déshydrogénase, d'éthanol ou d'acétaldéhyde<sup>26</sup>.

L'azote des préparations enzymatiques est dosé après minéralisation et entraînement de l'ammoniaque dans un appareil de PARNAS ET WAGNER. Cependant, dans plusieurs expériences la quantité de protéines a été évaluée par la méthode du biuret<sup>27</sup> et la valeur trouvée rapportée à son équivalent en azote.

### *Emploi des inhibiteurs respiratoires dans l'étude de la réaction d'échange ATP- $P_i$ , de l'hydrolyse de l'ATP et de la phosphorylation oxydative*

On sait que l'amytal<sup>28,29</sup> et l'antimycine A<sup>30</sup> inhibent les transferts d'électrons respectivement entre DPN et flavoprotéine et au niveau du cytochrome  $b^*$ . L'amytal et l'antimycine A sont dissous dans de l'éthanol à 70 %; 4  $\mu$ l de cette solution alcoolique sont ajoutés au milieu d'incubation (400  $\mu$ l). Dans les expériences où la concentration finale en amytal dépasse 10<sup>-3</sup>  $M$ , le propylène glycol sert de solvant à l'amytal et l'on ajoute 10  $\mu$ l de la solution au milieu d'incubation. (Il est à noter que le propylène glycol entraîne par lui-même une inhibition partielle — 20 à 30 % — de la réaction d'échange et de la vitesse d'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate).

Le cyanure est utilisé, le plus souvent, en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate afin d'assurer une réduction plus complète de la partie de chaîne DPN... cytochrome  $a_3$ <sup>14</sup>. La suspension de fragments sub-mitochondriaux est d'abord mise en préincubation pendant 2 min à 25° avec du cyanure 8.10<sup>-3</sup>  $M$  et du  $\beta$ -hydroxybutyrate 8.10<sup>-3</sup>  $M$ , puis des portions aliquotes de 100  $\mu$ l sont prélevées et ajoutées au milieu d'incubation type pour la mesure de l'échange ATP- $P_i$  (volume final 400  $\mu$ l).

Les conditions d'anaérobiose complète sont réalisées dans de microfoiles de WARBURG: un bâtonnet de phosphore blanc est introduit dans le godet central et l'on fait passer pendant 3 min un courant d'azote.

L'effet du cyanure et de l'antimycine A sur l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons dans les fragments sub-mitochondriaux a été déterminé en présence

\* Si l'on se réfère au schéma de la chaîne respiratoire DPN...O<sub>2</sub> donné par CHANCE ET WILLIAMS<sup>6</sup>.

et en absence de  $\beta$ -hydroxybutyrate, dans des conditions analogues à celles utilisées pour la mesure de l'échange ATP-P<sub>i</sub>.

### RESULTATS

#### *Caractéristiques des fragments de membranes de mitochondries en relation avec les réactions de la phosphorylation oxydative*

L'hydrolyse de l'ATP et l'échange ATP-P<sub>i</sub> catalysés par des particules sub-mitochondriales sont particulièrement sensibles à l'EDTA. L'action de l'EDTA sur l'ATPase a été évaluée en présence et en absence de 2,4-dinitrophénol (Tableau I).

TABLEAU I

#### EFFET DE L'EDTA SUR L'ATPASE EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE DE DNP

Conditions: ATP 0.0075 M pH 7.0, éventuellement DNP 1.10<sup>-4</sup> M et EDTA à la concentration indiquée, fragments sub-mitochondriaux 100  $\mu$ g N appartenant à la préparation I ou II. Volume final 400  $\mu$ l; température, 25°.

| Préparation enzymatique | Temps d'incubation (min) | EDTA $\times 10^{-4}$ M | $P_i$ libéré            |                         | Activité ATPase (avec DNP)<br>Activité ATPase (sans DNP) |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
|                         |                          |                         | Avec DNP<br>$\mu$ moles | Sans DNP<br>$\mu$ moles |  |
| I*                      | 15                       | 0                       | 1.00                    | 0.29                    | 3.4  |
|                         | 15                       | 0.25                    | 1.05                    | 0.25                    | 4.2  |
|                         | 15                       | 7.5                     | 1.13                    | 0.23                    | 4.9  |
|                         | 30                       | 7.5                     | 2.14                    | 0.43                    | 5.0  |
|                         | 15                       | 0                       | 0.53                    | 0.32                    | 1.7  |
|                         | 15                       | 0.25                    | 0.45                    | 0.23                    | 2.0  |
|                         | 15                       | 2.5                     | 0.40                    | 0.15                    | 2.7  |
|                         | 15                       | 7.5                     | 0.39                    | 0.14                    | 2.8  |
|                         | 30                       | 7.5                     | 0.75                    | 0.30                    | 2.5  |

\* Préparation de fragments sub-mitochondriaux I: la digitonine qui a servi à la lyse des mitochondries a été traitée préalablement par de l'EDTA suivant la méthode indiquée dans **MATÉRIEL ET MÉTHODES**.

\*\* Préparation de fragments sub-mitochondriaux II: la digitonine a été utilisée sans purification préalable.

Puisque la stimulation de l'hydrolyse de l'ATP par le 2,4-dinitrophénol est un phénomène caractéristique de la phosphorylation oxydative, le rapport

$$R = \frac{\text{Activité de l'ATPase en présence de 2,4-dinitrophénol}}{\text{Activité de l'ATPase en absence de 2,4-dinitrophénol}}$$

peut être considéré comme un indice de l'activité du système plurienzymatique impliqué dans la phosphorylation oxydative. R a été déterminé pour deux types de préparation de fragments sub-mitochondriaux (Tableau I). Les fragments de la préparation I proviennent de mitochondries lysées par de la digitonine qui avait été préalablement traitée par de l'EDTA; en ce qui concerne la préparation II, la digitonine utilisée n'avait pas été traitée par l'EDTA. Le rapport R obtenu avec la préparation I est environ deux fois plus grand que celui obtenu avec la préparation II. En outre, dans le cas des deux préparations, l'addition d'EDTA au milieu d'incubation accroît sensiblement la valeur de R. La vitesse de l'échange ATP-P<sub>i</sub> et le rendement de la phosphorylation associée à l'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate (Tableau II) sont également augmentés

par l'EDTA. Par conséquent, l'EDTA protège ou maintient le système enzymatique de phosphorylation dans les particules sub-mitochondriales.

TABLEAU II

EFFET DE L'EDTA SUR L'ÉCHANGE ATP-<sup>32</sup>P ET SUR LA PHOSPHORYLATION D'ADP ASSOCIÉE À L'OXYDATION DU  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE

Conditions: Echange ATP-P<sub>1</sub>: ATP 0.0075 M, pH 6.5, tampon phosphate marqué par <sup>32</sup>P 0.016 M, pH 6.5. Phosphorylation oxydative: ADP 0.0075 M, pH 6.5, tampon phosphate marqué par <sup>32</sup>P 0.014 M, pH 6.5  $\beta$ -hydroxybutyrate 0.010 M. Dans les deux cas, EDTA à la concentration indiquée, fragments mitochondriaux 80  $\mu$ g N; température, 25°.

| Temps d'incubation (min) | EDTA M                       | P <sub>1</sub> échangé $\mu$ moles | ATP synthétisé $\mu$ moles | Acétoacétate formé $\mu$ moles | P/O  |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------|
| 15                       | 0                            | 105                                | 166                        | 149                            | 1.11 |
| 15                       | 5.0 $\cdot$ 10 <sup>-4</sup> | 124                                | 204                        | 146                            | 1.40 |
| 15                       | 1.0 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> | 137                                | 246                        | 146                            | 1.68 |
| 15                       | 2.5 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> | 139                                | 240                        | 143                            | 1.68 |
| 15                       | 5.0 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> | 141                                | 233                        | 140                            | 1.66 |
| 15                       | 7.5 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> | 132                                | 226                        | 136                            | 1.66 |
| 30                       | 2.5 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> | 264                                |                            |                                |      |
| 60                       | 2.5 $\cdot$ 10 <sup>-3</sup> | 500                                |                            |                                |      |

L'addition de Mg<sup>++</sup> n'est nécessaire ni à l'échange ATP-P<sub>1</sub>, ni à la phosphorylation oxydative, ce qui confirme les résultats de COOPER ET LEHNINGER<sup>11, 22</sup>. Mg<sup>++</sup> est même inhibiteur à des concentrations relativement faibles: par exemple à pH 6.5 et pour une concentration en Mg<sup>++</sup> égale à 6  $\cdot$  10<sup>-4</sup> M, la vitesse d'échange ATP-P<sub>1</sub> est diminuée de moitié tandis que la vitesse d'hydrolyse de l'ATP est augmentée de 9 fois. Le fait qu'il existe une quantité notable de Mg<sup>++</sup> dans les fragments sub-mitochondriaux<sup>31</sup> et que l'EDTA stabilise le Mg<sup>++</sup> des mitochondries sous une forme liée<sup>32</sup> suggère que la forme liée du Mg<sup>++</sup> intraparticulaire est fonctionnelle et indispensable aux réactions de la phosphorylation oxydative.

Au cours de l'échange ATP-<sup>32</sup>P, le dernier phosphate P<sub>γ</sub> de l'ATP se marque beaucoup plus rapidement que l'avant dernier phosphate P<sub>β</sub>. Ainsi, après 15 min d'incubation à 25° en présence d'une quantité de fragments de mitochondries correspondant à 100  $\mu$ g d'azote, la radioactivité spécifique du P<sub>β</sub> de l'ATP est 50 fois plus petite que celle du P<sub>γ</sub> (moyenne de 3 expériences). Les fragments mitochondriaux utilisés renferment donc très peu de myokinase.

*pH optima pour l'échange ATP-P<sub>1</sub>, pour l'hydrolyse de l'ATP et pour l'oxydation phosphorylante du  $\beta$ -hydroxybutyrate*

Tracées en fonction du pH, les courbes de vitesse de l'échange ATP-P<sub>1</sub>, de l'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate et de la phosphorylation couplée d'ADP ont en commun deux pics distincts, l'un à pH 6.5, l'autre à pH 7.3 (Fig. 1). L'échange ATP-P<sub>1</sub> présente un pic principal à pH 7.3 et un pic secondaire à pH 6.5. L'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate, la phosphorylation d'ADP qui y est associée ainsi que le quotient de phosphorylation P/O présentent au contraire un pic principal à pH 6.5 et un pic secondaire à pH 7.3. Ces pics ne semblent pas résulter d'artefacts dûs à des concentrations limitantes en ATP, P<sub>1</sub> et ADP; ces réactifs sont en effet présents dans le milieu à des concentrations 5 à 25 fois supérieures aux valeurs des constantes de

Michaélis correspondantes (déterminations personnelles et réf. 11, 22). HÜLSMAN ET SLATER<sup>33</sup> avaient déjà observé des valeurs maxima de quotients de phosphorylation à pH 6.3, 7.4 et 8.5 lorsque du glutamate était oxydé par des sarcosomes de cœur de boeuf.

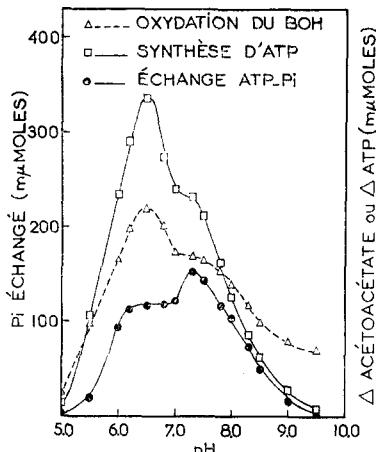


Fig. 1. Influence du pH sur la vitesse d'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate (BOH), sur le rendement de la phosphorylation associée et sur la vitesse d'échange ATP- $^{32}$ P.  $P_1$ , 0.05 M; fragments sub-mitochondriaux, 120  $\mu$ g N pour la mesure de l'échange ATP- $^{32}$ P; fragments sub-mitochondriaux: 100  $\mu$ g N pour la phosphorylation oxydative. Voir aussi MATÉRIEL ET MÉTHODES. Incubation, 15 min à 25°.

Trois pH optima caractérisent la vitesse d'hydrolyse de l'ATP: 6.5, 7.3\* et 8.5. Ces valeurs de pH sont proches de celles trouvées par PURVIS<sup>34</sup>, mais dans nos expériences l'addition de  $Mg^{++}$  n'est pas indispensable à la mise en évidence des pics d'activité de l'ATPase. Cette différence est sans doute liée au  $Mg^{++}$  intraparticulaire qui reste attaché aux fragments sub-mitochondriaux en quantités plus ou moins importantes suivant la méthode de préparation. SWANSON<sup>35</sup>, MYERS ET SLATER<sup>36, 37</sup> ont également montré l'influence du pH sur l'ATPase des mitochondries entières de foie de rat.

Les réactions qui s'effectuent préférentiellement à pH 6.5 et à pH 7.3 sont communes à l'échange ATP- $P_1$ , à l'ATPase et à la respiration. Au contraire, la (ou les) réaction qui se fait à pH 8.5 semble contrôler uniquement l'hydrolyse de l'ATP.

#### *Effet de l'antimycine A et du cyanure sur l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons dans des fragments sub-mitochondriaux*

Si on ajoute à des fragments sub-mitochondriaux du cyanure en quantité suffisante pour stopper toute respiration (conc. finale  $2 \cdot 10^{-3} M$ ), les transporteurs d'électrons intraparticulaires: cytochromes *a*, *a<sub>3</sub>*, *b* et *c* et flavoprotéine deviennent notamment réduits (Fig. 2). Il existe donc dans les fragments de mitochondries suffisamment de substrats endogènes pour assurer, en présence d'un inhibiteur respiratoire, une réduction importante des transporteurs localisés entre le DPN et le point d'action de l'inhibiteur. Cette réduction est accrue si l'on emploie simultanément du  $\beta$ -hydroxybutyrate et du cyanure au lieu de cyanure seul (Fig. 2).

\* Le pic d'activité de l'ATPase à pH 7.3 est d'autant plus marqué que la concentration en EDTA est plus faible.

La présence d'antimycine A à une concentration inhibant complètement la respiration: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Tableau III), entraîne une réduction du cytochrome  $b$  et de la flavoprotéine qui est décelable mais qui peut être augmentée par l'addition de  $\beta$ -hydroxybutyrate (Fig. 3); cette augmentation dans le cas du cytochrome  $b$  est d'environ 30 %. Un tiers environ du cytochrome  $b$  est réduit (Fig. 3). lorsque l'antimycine A est utilisée à une concentration qui ralentit de moitié la respiration: 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Tableau III).

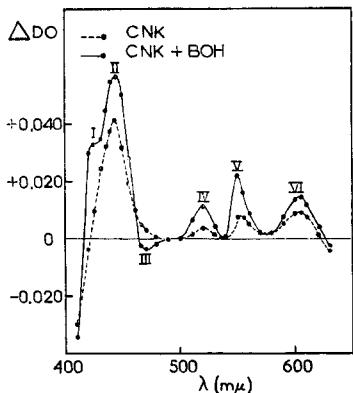


Fig. 2. Spectre différentiel entre l'état oxydé et l'état réduit de la portion de chaîne DPN...cytochrome  $a_3$ . Les pics et la dépression correspondent à l'état réduit: I et II représentent les bandes de Soret des cytochromes  $c$ ,  $a$  et  $a_3$ , III la flavoprotéine, IV et V les bandes  $\beta$  et  $\alpha$  du cytochrome  $c$ , VI la bande  $\alpha$  des cytochromes  $a$  et  $a_3$ . Le milieu d'incubation contient: fragments sub-mitochondriaux, 750  $\mu\text{g}/\text{N}$ ; ATP pH 7.3, 0.0075  $M$ ;  $P_1$  pH 7.3, 0.003  $M$  et suivant le cas de l'Antimycine A à la concentration indiquée et du  $\beta$ -hydroxybutyrate (BOH), 0.002  $M$ . Volume final 2.7 ml. Température, 23°. Les lectures sont faites 5 min après l'addition de fragments sub-mitochondriaux au milieu d'incubation; à partir de ce moment l'état de réduction des transporteurs d'électrons dans les fragments est stable.

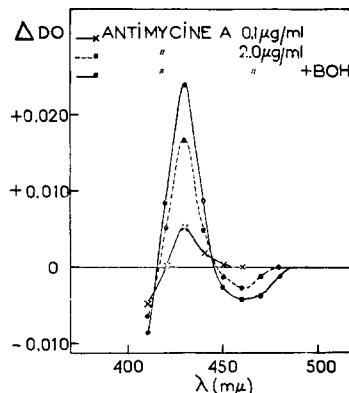


Fig. 3. Spectre différentiel entre l'état oxydé et l'état réduit de la portion de chaîne DPN...cytochrome  $b$ . Le pic correspond à la bande de Soret du cytochrome  $b$  réduit et la dépression à la flavoprotéine. Le milieu d'incubation contient: fragments sub-mitochondriaux, 750  $\mu\text{g}/\text{N}$ ; ATP pH 7.3, 0.0075  $M$ ;  $P_1$  pH 7.3, 0.003  $M$  et suivant le cas de l'Antimycine A à la concentration indiquée et du  $\beta$ -hydroxybutyrate (BOH) 0.002  $M$ . Volume final, 2.7 ml. Température, 23°. Par ailleurs les conditions sont identiques à celles données dans la légende de la Fig. 2.

En somme, lorsqu'un inhibiteur est ajouté à des fragments de mitochondries à une concentration capable de bloquer la respiration, la réduction subie par les transporteurs d'électrons intraparticulaires est soit totale soit subtotale, suivant la présence ou l'absence d'un substrat exogène oxydable dans le milieu d'incubation; la réduction n'est que partielle lorsque l'inhibiteur est utilisé à une concentration qui ralentit la respiration sans la bloquer.

L'existence de substrats endogènes oxydables dans les fragments sub-mitochondriaux pose, évidemment, la question de la proportion des formes oxydée et réduite des pyridine-nucléotides qui s'y trouvent. La détermination a été effectuée sur des fragments sub-mitochondriaux préparés à partir de 10 foies de rat et mis en incubation pendant 5 min à 25° avec de l'ATP 0.0075  $M$  pH 7.3, de l'orthophosphate 0.0075  $M$  pH 7.3 et de l'EDTA 0.0025  $M$ , c'est-à-dire dans un milieu analogue à celui mis en oeuvre pour la mesure de l'échange ATP- $P_1$ . Le DPN<sup>+</sup> et le DPNH étaient alors extraits et dosés comme il a été indiqué dans MATÉRIEL ET MÉTHODES.

TABLEAU III

EFFET DE CONCENTRATIONS CROISSANTES EN AMYTALE ET EN ANTIMYCINE A SUR L'OXYDATION DU  $\beta$ -HYDROXYBUTYRATE ET SUR LA PHOSPHORYLATION ASSOCIÉE  
Conditions données dans MATÉRIEL ET MÉTHODES; pH, 6.5; Incubation 15 min à 25°.

|     |              | Fragments<br>submitochondriaux<br>$\mu\text{g N}$ | Inhibiteur respiratoire | ATP<br>synthétisé<br>mumoles | Acétoacétate<br>formé<br>mumoles | $\frac{P}{O}$ |
|-----|--------------|---|-------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------|
| 95  | Amytal       | 0   | 280                     | 200                          | 1.40                             |               |
|     |              | $0.03 \cdot 10^{-3} M$                            | 246                     | 172                          | 1.43                             |               |
|     |              | $0.06 \cdot 10^{-3} M$                            | 207                     | 144                          | 1.44                             |               |
|     |              | $0.12 \cdot 10^{-3} M$                            | 119                     | 86                           | 1.38                             |               |
|     |              | $0.25 \cdot 10^{-3} M$                            | 59                      | 46                           | 1.28                             |               |
|     |              | $0.50 \cdot 10^{-3} M$                            | 7                       | 13                           |                                  |               |
|     |              | $1.00 \cdot 10^{-3} M$                            | 0                       | 0                            |                                  |               |
| 100 | Antimycine A | 0   | 335                     | 228                          | 1.47                             |               |
|     |              | $0.05 \mu\text{g/ml}$                             | 240                     | 170                          | 1.41                             |               |
|     |              | $0.10 \mu\text{g/ml}$                             | 185                     | 135                          | 1.37                             |               |
|     |              | $0.20 \mu\text{g/ml}$                             | 71                      | 60                           | 1.18                             |               |
|     |              | $1.00 \mu\text{g/ml}$                             | 14                      | 10                           |                                  |               |
|     |              | $2.00 \mu\text{g/ml}$                             | 0                       | 0                            |                                  |               |

Les quantités de  $\text{DPN}^+$  et de  $\text{DPNH}$  sont respectivement de  $0.5 \mu\text{mole}$  et de  $0.2 \mu\text{mole/g d'azote}$ .

Dans les conditions de l'échange  $\text{ATP-P}_1$  et en l'absence d'inhibiteur respiratoire, l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons de la chaîne  $\text{DPN} \dots \text{O}_2$  correspond approximativement à "l'état 1" tel qu'il a été défini par CHANCE ET WILLIAMS<sup>6,38</sup>. Ces transporteurs sont sous un état d'autant plus oxydé que leur potentiel d'oxydo-réduction est plus élevé. En particulier, il est probable que les cytochromes  $a$ ,  $a_3$  et  $c$  sont complètement oxydés tandis qu'une faible proportion de flavoprotéine et de cytochrome  $b$  se trouve sous un état réduit en raison de la proximité qui existe entre ces deux transporteurs et le  $\text{DPNH}$ .

*Effet de l'amytal, de l'antimycine A, du cyanure et de l'anaérobiose totale sur l'échange  $\text{ATP-P}_1$*

La vitesse d'échange  $\text{ATP-P}_1$  a tout d'abord été mesurée lorsque les portions de chaîne:  $\text{DPN} \dots$  "point d'action de l'amytal",  $\text{DPN} \dots$  cytochrome  $b$ ,  $\text{DPN} \dots$  cytochrome  $a_3$  étaient maintenus dans un état de réduction sub-totale ou totale par addition respective d'amytal, d'antimycine A, de cyanure ou de cyanure en présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate ou encore par anaérobiose totale. Dans cette première série d'expériences, les inhibiteurs étaient ajoutés au milieu à des concentrations bloquant tout transfert d'électrons. Quel que soit l'inhibiteur respiratoire utilisé, la vitesse de l'échange  $\text{ATP-P}_1$  est diminuée (Tableau IV). Le ralentissement de l'échange est plus important à pH 7.3 qu'à pH 6.5; à pH 7.3, il est plus marqué lorsque la concentration en orthophosphate est plus faible. La présence de  $\beta$ -hydroxybutyrate n'accroît pas l'inhibition de l'échange due à l'addition de cyanure. Fait intéressant, l'amytal a une action inhibitrice au moins aussi grande, sinon plus, que l'antimycine A, le cyanure ou l'anaérobiose totale, ce qui est en accord avec les résultats que LÖW *et al.*<sup>15</sup> ont obtenus avec des mitochondries entières.

Le comportement spécial de l'amytal a motivé une étude plus détaillée des rela-

TABLEAU IV

EFFET DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS RESPIRATOIRES SUR L'ÉCHANGE  
ATP-<sup>32</sup>P À pH 6.5 ET À pH 7.3

Conditions données dans MATÉRIEL ET MÉTHODES; Incubation 15 min à 25°. La concentration des inhibiteurs est celle requise pour arrêter toute respiration: KCN: 0.002 M; antimycine A, 2 µg/ml; amytal, 0.001 M. Du  $\beta$ -hydroxybutyrate (conc. finale 0.002 M) a été ajouté au milieu dans les expériences 2 et 3.

| Exp. | Fragments<br>submitochondriaux<br>µg N | Inhibiteur respiratoire | $P_i$<br>$\times 10^{-2} M^*$ | Radioactivité spécifique de $P_i$ de l'ATP    |   |
|------|--|-------------------------|-------------------------------|---|---|
|      |  |                         |                               | Radioactivité spécifique de $P_i$<br>A pH 6.5 | Radioactivité spécifique de $P_i$<br>A pH 7.3 |
| 1    | 110                                    | Aucun                   | 5.00                          | 0.052   | 0.063   |
|      | 110                                    | Anaérobiose             | 5.00                          | 0.041   | 0.047   |
| 2    | 100                                    | Aucun                   | 0.01                          | 0.014   | 0.022   |
|      | 100                                    | KCN                     | 0.01                          | 0.012   | 0.007   |
| 3    | 100                                    | Aucun                   | 5.00                          | 0.039   | 0.053   |
|      | 100                                    | KCN                     | 5.00                          | 0.035   | 0.043   |
| 4    | 66                                     | Aucun                   | 1.00                          | 0.014   |   |
|      | 66                                     | KCN                     | 1.00                          | 0.011   |   |
| 5    | 120                                    | Aucun                   | 0.01                          | 0.015   | 0.017   |
|      | 120                                    | Antimycine A            | 0.01                          | 0.013   | 0.010   |
| 6    | 120                                    | Aucun                   | 5.00                          | 0.038   | 0.050   |
|      | 120                                    | Antimycine A            | 5.00                          | 0.031   | 0.036   |
| 7    | 130                                    | Aucun                   | 0.01                          | 0.021   | 0.029   |
|      | 130                                    | Amytal                  | 0.01                          | 0.011   | 0.007   |
| 8    | 100                                    | Aucun                   | 5.00                          | 0.054   | 0.066   |
|      | 100                                    | Amytal                  | 5.00                          | 0.020   | 0.033   |

\* Les concentrations données sont celles au temps zéro d'incubation.

tions entre l'échange ATP- $P_i$  et l'état d'oxydo-réduction des premiers transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire. On a réalisé des états de plus en plus réduits de la portion de chaîne DPN... cytochrome *b* en utilisant l'antimycine A à des concentrations croissantes allant de zéro jusqu'à la concentration nécessaire pour arrêter tout transfert d'électrons et l'on a mesuré dans chaque cas la vitesse de l'échange ATP- $P_i$ . Lorsque la concentration en antimycine A est égale ou inférieure à 0.1 µg/ml, la vitesse de l'échange est augmentée significativement aussi bien à pH 7.3 qu'à pH 6.5 (Tableau V); l'augmentation est maximum (environ 20 %) pour une concentration en antimycine A, 0.1 µg/ml, qui est capable d'entraîner la réduction d'approximativement un tiers du cytochrome *b* présent dans les fragments sub-mitochondriaux (Fig. 3). Au delà de 0.2 µg/ml l'antimycine A exerce une action inhibitrice. Cette action inhibitrice ne semble pas être le résultat d'une dissociation de la phosphorylation oxydative (Tableau III); elle est vraisemblablement liée aux modifications de l'état d'oxydo-réduction de la portion de chaîne DPN...cytochrome *b*. En somme, la vitesse de l'échange ATP- $P_i$  catalysé par des fragments sub-mitochondriaux à pH 6.5 et à pH 7.3 est maximum lorsque l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons localisés entre DPN et cytochrome *b* est intermédiaire entre la réduction sub-totale et la quasi-oxidation. Aucun effet de stimulation n'a été mis en évidence dans le cas de l'amytal (Tableau V).

*Effet de l'amytal, de l'antimycine A et du cyanure sur l'ATPase*

L'activité de l'ATPase dans les fragments sub-mitochondriaux a été déterminée dans des conditions de réduction totale ou sub-totale des portions de chaîne: DPN...

cytochrome  $a_3$ , DPN . . . cytochrome  $b$ , DPN . . . "point d'action de l'amytal" suivant des méthodes analogues à celles utilisées pour l'étude de l'échange ATP- $P_i$ .

WADKINS ET LEHNINGER<sup>14</sup> ont montré que le cyanure inhibe à pH 7.5 l'ATPase des fragments de mitochondries. En fait, les modifications d'activité d'ATPase qui résultent d'un état de réduction totale de la portion de chaîne DPN . . . cytochrome  $a_3$  sont plus complexes et dépendent étroitement du pH. Dans nos conditions expérimentales, en présence de cyanure, l'hydrolyse de l'ATP est ralentie à pH 7.3 et accélérée au contraire à pH 6.5 et à pH 8.5 (Fig. 4). On observe des variations analogues si on remplace le cyanure par l'antimycine A: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Fig. 5). Par contre, l'addition d'amytal ralentit l'hydrolyse de l'ATP aux trois pH: 6.5, 7.3 et 8.5 (Fig. 6).

L'activité de l'ATPase a également été mesurée pour des états de réduction partielle de la portion de chaîne: DPN . . . cytochrome  $b$ , ces états étant obtenus par l'addition d'antimycine A à des concentrations croissantes. A pH 7.3, l'activité

TABLEAU V

EFFET DE CONCENTRATIONS CROISSANTES EN AMYTAL ET EN ANTIMYCINE A SUR L'ÉCHANGE ATP- $^{32}\text{P}$  À pH 6.5 ET À pH 7.3

Conditions données dans MATÉRIEL ET MÉTHODES; Incubation, 15 min à 25°.

| Fragments<br>mitochondriaux<br>$\mu\text{g N}$ | Inhibiteur respiratoire | $P_i$<br>$10^{-2} M$         | $P_i$ échangé       |                     |
|--|-------------------------|------------------------------|---------------------|---------------------|
|  |                         |                              | A pH 6.5<br>mumoles | A pH 7.3<br>mumoles |
| 80   | Amytal                  | 0                            | 5.00                | 71                  |
|  |                         | 0.06 · 10 <sup>-3</sup> M    | 5.00                | 60                  |
|  |                         | 0.12 · 10 <sup>-3</sup> M    | 5.00                | 48                  |
|  |                         | 1.00 · 10 <sup>-3</sup> M    | 5.00                | 35                  |
|  | Antimycine A            | 0                            | 1.00                | 101                 |
| 100  | Antimycine A            | 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 1.00                | 105                 |
|  |                         | 0.10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 1.00                | 111                 |
|  |                         | 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 1.00                | 86                  |
|  |                         | 1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 1.00                | 77                  |
|  |                         | 2.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ | 1.00                | 74                  |
|  |                         |                              |                     | 87                  |

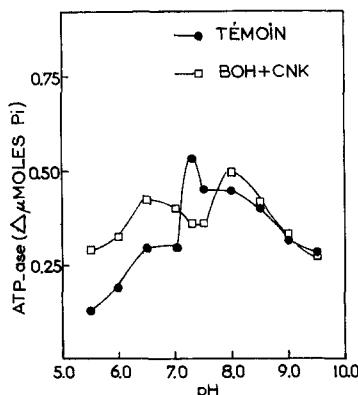


Fig. 4. Effet du cyanure sur l'ATPase à différents pH. KCN,  $2 \cdot 10^{-3} M$ ;  $\beta$ -hydroxybutyrate (BOH),  $2 \cdot 10^{-3} M$ ; fragments sub-mitochondriaux, 120  $\mu\text{g N}$ . Voir aussi MATÉRIEL ET MÉTHODES. Incubation, 15 min à 25°.

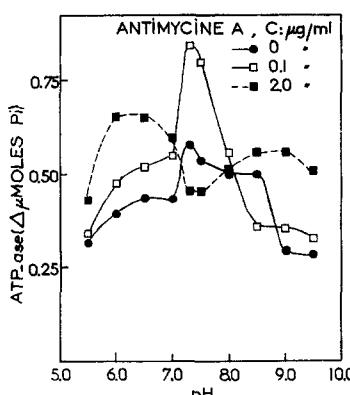


Fig. 5. Effet de l'antimycine A sur l'ATPase à différents pH. Conditions données dans MATÉRIEL ET MÉTHODES. Fragments sub-mitochondriaux, 120  $\mu\text{g N}$ . Incubation, 15 min à 25°.

de l'ATPase est stimulée lorsque la concentration en antimycine A est égale ou inférieure à  $0.1 \mu\text{g/ml}$ ; elle est diminuée pour des concentrations en antimycine A supérieures à  $0.2 \mu\text{g/ml}$  (Tableau IV, Fig. 5). Une réduction de plus en plus complète de la portion de chaîne DPN... cytochrome *b* entraîne donc des variations similaires de la vitesse d'échange ATP- $P_i$  et de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP à pH 7.3, ce qui est nettement mis en évidence dans la Fig. 7. A pH 6.5 au contraire l'activité de l'ATPase augmente régulièrement en fonction de la concentration en antimycine A et se maintient à une valeur maximum pour des concentrations supérieures à  $0.1 \mu\text{g/ml}$  (Tableau VI).

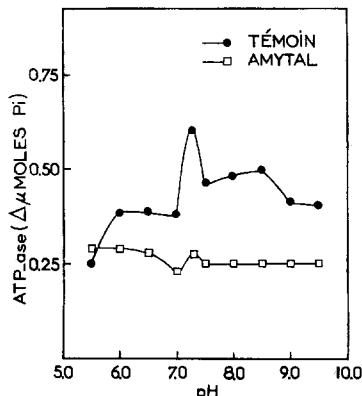


Fig. 6. Effet de l'amytal sur l'ATPase à différents pH. Conditions données dans MATÉRIEL ET MÉTHODES. Fragments sub-mitochondriaux,  $130 \mu\text{g N}$ ; amytal,  $1 \cdot 10^{-3} M$ . Incubation, 15 min à  $25^\circ$ .

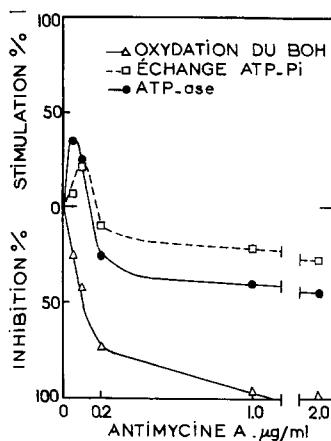


Fig. 7. Effet de concentrations croissantes en antimycine A sur les vitesses d'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate, de l'échange ATP- $^{32}\text{P}$  et de l'hydrolyse de l'ATP à pH 7.3.  $\text{P}_i, 0.05 M$  pour la mesure de l'échange ATP- $^{32}\text{P}$ , fragments sub-mitochondriaux:  $100$  à  $120 \mu\text{g N}$ . Voir aussi MATÉRIEL ET MÉTHODES. Incubation, 15 min à  $25^\circ$ .

TABLEAU VI

EFFET DE CONCENTRATIONS CROISSANTES EN ANTIMYCINE A SUR LA VITESSE D'HYDROLYSE DE L'ATP A pH 6.5 ET A pH 7.3

Conditions données dans MATÉRIEL ET MÉTHODES; Quantité de fragments sub-mitochondriaux  $100 \mu\text{g N}$ . Incubation, 15 min à  $25^\circ$ .

| Antimycine A<br>$\mu\text{g/ml}$ | $P_i$ libéré à pH 6.5<br>μmoles | $P_i$ libéré à pH 7.3<br>μmoles |
|----------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 0                                | 0.38                            | 0.42                            |
| 0.05                             | 0.54                            | 0.56                            |
| 0.10                             | 0.62                            | 0.52                            |
| 0.20                             | 0.68                            | 0.31                            |
| 1.00                             | 0.74                            | 0.25                            |
| 2.00                             | 0.78                            | 0.23                            |

DISCUSSION

Les processus d'échange ATP- $P_i$  et d'hydrolyse de l'ATP catalysés par des fragments sub-mitochondriaux de foie de rat sont caractérisés par 2 pH optima communs:

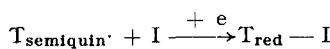
6.5 et 7.3. Deux pics d'activité à pH 6.5 et à pH 7.3 ont également été observés pour l'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate et pour la synthèse d'ATP qui y est associée. Ces résultats sont en accord avec la notion que l'échange ATP-P<sub>1</sub> et l'hydrolyse de l'ATP sont des processus partiels de la phosphorylation oxydative<sup>11</sup>. Ils indiquent de plus que les différentes étapes phosphorylantes correspondant à l'oxydation du DPNH sont contrôlées, au moins, par deux réactions dépendantes du pH: l'une de ces réactions a pour pH optimum 6.5, l'autre 7.3.

Dans des conditions de réduction totale ou sub-totale des portions de chaîne DPN . . . cytochrome *a*<sub>3</sub> ou DPN . . . cytochrome *b*, l'échange ATP-P<sub>1</sub> et l'hydrolyse de l'ATP sont tous deux ralents à pH 7.3, tandis qu'à pH 6.5 l'échange est ralenti et l'hydrolyse stimulée. En outre, à pH 7.3, l'amytal inhibe l'échange ATP-P<sub>1</sub> et l'hydrolyse de l'ATP autant, sinon plus, que l'antimycine A, le cyanure ou l'anaérobiose complète. De plus, à pH 7.3, les vitesses d'échange ATP-P<sub>1</sub> et d'hydrolyse de l'ATP subissent des variations parallèles, de même sens et du même ordre de grandeur lorsque l'état d'oxydo-réduction de la portion de chaîne DPN . . . cytochrome *b* évolue entre la quasi-oxydation et la réduction sub-totale; en particulier, ces vitesses sont toutes deux maxima pour un état moyen de demi-réduction des transporteurs localisés entre le DPN et le cytochrome *b*.

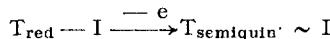
Ces différents résultats se complètent et sont interprétés de la façon suivante: (a) Les processus d'échange et d'hydrolyse qui ont lieu préférentiellement à pH 7.3 dépendent de l'état d'oxydo-réduction des premiers transporteurs de la chaîne respiratoire DPN . . . O<sub>2</sub>. (b) Lorsque des électrons sont transférés du DPNH au cytochrome *b* à pH 7.3, l'ATP peut être synthétisé suivant le schéma I ou bien suivant l'alternative du schéma II qui fait intervenir un transporteur T sous une forme de type "semi-quinonique" (voir INTRODUCTION).

Le cas général du schéma I est applicable au moins à la première étape phosphorylante DPN . . . flavoprotéine. Il implique un transfert réversible de paires d'électrons, 2e, entre deux transporteurs T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> ainsi que la phosphorylation de l'un de ces transporteurs en un dérivé T ~ P<sub>1</sub>. Cependant, les données expérimentales ne permettent pas de prévoir si T dans T ~ P<sub>1</sub> (réaction (1)) est oxydé ou réduit.

Dans le mécanisme de type "semi-quinonique" qui fait intervenir T<sub>semiquin</sub> ~ I (schéma II) ou T<sub>semiquin</sub> ~ P (schéma I), les électrons sont transférés par unités du DPNH vers un autre transporteur. Dans de telles conditions, la synthèse d'une liaison "riche en énergie" ( $\Delta F \leq -8.000$  cal) nécessite que les potentiels d'oxydo-réduction du donneur et de l'accepteur d'électrons diffèrent d'au moins 0.35 V. Pour illustrer cette hypothèse on peut prendre comme exemple un transfert d'électrons-unités du DPNH au cytochrome *c*, chaque transfert étant associé à la synthèse d'une molécule d'ATP. Le transporteur T intervenant dans T<sub>semiquin</sub> ~ I ou T<sub>semiquin</sub> ~ P serait localisé entre le DPN et le cytochrome *c*; éventuellement il évoluerait de façon réversible de la forme "semi-quinonique" à la forme totalement réduite. Ainsi, en présence de I, le transfert d'électrons du DPNH à T<sub>semiquin</sub> aboutirait à la formation de T<sub>red</sub> — I suivant la réaction:



le transfert ultérieur d'électrons de T<sub>red</sub> — I au cytochrome *c* potentialiserait la liaison entre T et I sous une forme "riche en énergie":



Des réactions analogues peuvent être envisagées en ce qui concerne la formation de  $T_{\text{semiquin}} \sim P$ .

En résumé, une molécule d'ATP se trouverait synthétisée chaque fois qu'un électron serait transféré du DPNH au cytochrome *c*. Le rendement de la phosphorylation d'ADP associée au transfert d'électrons du DPNH au cytochrome *c* est théoriquement le même dans le mécanisme "semi-quinonique" que dans celui qui fait intervenir des transferts de paires d'électrons: dans les deux cas, deux molécules d'ATP sont synthétisées quand deux molécules de cytochrome *c* sont réduites par une molécule de DPNH.

Nous n'avons pas retenu le schéma III dans cette discussion. Selon ce schéma, l'échange ATP-P<sub>1</sub> et l'hydrolyse de l'ATP seraient indépendants de l'état d'oxydo-réduction de *T* ce qui n'est pas en accord avec nos résultats expérimentaux. Le schéma I ou l'alternative "semi-quinonique" des schémas I et II représentent donc des mécanismes possibles de la phosphorylation oxydative en relation avec des transferts d'électrons au niveau des premiers transporteurs de la chaîne DPN . . . O<sub>2</sub>. Cependant, ces schémas ne sauraient être exclusifs; ils sont envisagés ici en tant qu'hypothèse de travail. D'autre part, d'autres schémas, en particulier le schéma III, restent valables en ce qui concerne au moins l'étape phosphorylante cytochrome *c* . . . O<sub>2</sub>. Il n'y a effectivement aucun argument expérimental en faveur d'un mécanisme de la phosphorylation oxydative identique pour chacune des étapes phosphorylantes de la chaîne respiratoire DPN . . . O<sub>2</sub>.

#### ADDENDUM

Des concentrations en antimycine A supérieures à 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  qui ne modifient pas sensiblement le rapport P/O relatif à l'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate par l'oxygène diminuent significativement le rapport P/2 e relatif à l'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate par le cytochrome *c*. La diminution de l'effet stimulant sur l'échange ATP-P<sub>1</sub> obtenue avec des concentrations en antimycine A supérieures à 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pourrait, de ce fait, être liée à une dissociation de la phosphorylation oxydative. Si cette hypothèse était vérifiée, ceci impliquerait que la phosphorylation (ou l'une au moins des phosphorylations) qui se produit entre le DPN et le point d'action de l'antimycine A peut faire intervenir un dérivé riche en énergie sous un état réduit  $T_{\text{red}} \sim I$  (schéma II). Des expériences ultérieures doivent permettre de le préciser.

(Reçu le 23 août 1960)

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention de l'Institut National d'Hygiène.

#### RÉSUMÉ

1. On a étudié l'effet du pH et de l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons de la chaîne DPN . . . O<sub>2</sub> sur des réactions partielles de la phosphorylation oxydative catalysées par des particules sub-mitochondriales.

2. Deux pH optima 6.5 et 7.3 caractérisent la vitesse d'oxydation du  $\beta$ -hydroxybutyrate, le rendement de la phosphorylation qui y est associée et la vitesse d'échange ATP-P<sub>1</sub>. Trois pH optima 6.5, 7.3 et 8.5 caractérisent l'activité de l'ATPase.

3. Des états de réduction partielle, sub-totale ou totale de la chaîne respiratoire DPN . . . O<sub>2</sub> ou de portions de cette chaîne ont été obtenus grâce à l'emploi des inhibiteurs: amytal, antimycine A, cyanure ou grâce à l'anaérobiose complète.

4. Une réduction sub-totale ou totale des transporteurs d'électrons situés entre le DPN et le cytochrome *b* ou entre le DPN et le cytochrome *a<sub>3</sub>* entraîne à pH 6.5 une augmentation de l'activité de l'ATPase et une diminution de la vitesse d'échange ATP-P<sub>1</sub> alors qu'à pH 7.3 l'activité de l'ATPase et la vitesse d'échange sont toutes deux diminuées.

5. Un état de demi-réduction des transporteurs situés entre le DPN et le cytochrome *b* entraîne à pH 7.3 une stimulation de l'activité de l'ATPase et de l'échange ATP-P<sub>1</sub>.

6. Les résultats obtenus suggèrent deux mécanismes possibles de phosphorylation oxydative pour le transfert d'électrons du DPNH au cytochrome *b*. Ces mécanismes ont été discutés en fonction des résultats expérimentaux.

#### REFERENCES

- 1 A. L. LEHNINGER ET S. W. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 415.
- 2 A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 345.
- 3 S. O. NIELSEN ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 555.
- 4 B. BORGSTRÖM, H. C. SUDDUTH ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 571.
- 5 A. L. LEHNINGER, *Harvey Lectures Ser.*, 39 (1955) 176.
- 6 B. CHANCE ET G. R. WILLIAMS, *Advances in Enzymology*, 17 (1956) 65.
- 7 A. L. LEHNINGER, C. L. WADKINS, C. COOPER, T. M. DEVLIN ET J. L. GAMBLE JR., *Science*, 128 (1958) 450.
- 8 F. LIPPMANN, IN D. E. GREEN, *Currents in Biochemical Research*, Interscience Publ. Inc. New-York, 1946, p. 137.
- 9 E. C. SLATER, *Nature*, 172 (1953) 975.
- 10 H. A. LARDY, *3eme Congrès Intern. Biochimie*, Bruxelles, 1955, *Conf. et rapports*, 298.
- 11 C. COOPER ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 561.
- 12 C. L. WADKINS ET A. L. LEHNINGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 1010.
- 13 B. CHANCE ET G. HOLLUNGER, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 2970.
- 14 C. L. WADKINS ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 681.
- 15 H. LÖW, P. SIEKEWITZ, L. ERNSTER ET O. LINDBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 392.
- 16 T. M. DEVLIN ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1586.
- 17 W. C. SCHNEIDER ET G. H. HOGEBOOM, *J. Biol. Chem.*, 183 (1950) 123.
- 18 C. S. HANES ET F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- 19 I. BERENBLUM ET E. CHAIN, *Biochem. J.*, 32 (1938) 295.
- 20 W. BARTLEY, *Biochem. J.*, 54 (1953) 677.
- 21 C. A. STEWART, *Biochem. J.*, 54 (1953) 117.
- 22 C. COOPER ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 219 (1956) 489.
- 23 P. G. WALKER, *Biochem. J.*, 58 (1954) 699.
- 24 R. WHITTEM, W. BARTLEY ET G. WEBER, *Biochem. J.*, 59 (1955) 590.
- 25 G. E. GLOCK ET P. MC LEAN, *Biochem. J.*, 61 (1955) 381.
- 26 M. M. CIOTTI ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. III Academic Press Inc., New-York, 1957, p. 890.
- 27 A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL ET M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- 28 L. ERNSTER, O. JALLING, H. LÖW ET O. LINDBERG, *Exptl. Cell. Research, Suppl.*, 3 (1955) 124.
- 29 B. CHANCE, IN *Enzymes: Units of biological structure and function*, Academic Press Inc. New-York, 1956, p. 447.
- 30 A. E. REIF ET V. R. POTTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 (1954) 1.
- 31 C. COOPER ET A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, 224 (1957) 547.
- 32 P. SIEKEWITZ, H. LÖW, L. ERNSTER ET O. LINDBERG, *Biochim. Biophys. Acta*, 29 (1958) 378.
- 33 W. C. HÜLSMAN ET E. C. SLATER, *Nature*, 180 (1957) 372.
- 34 J. L. PURVIS, *Exptl. Cell. Research*, 16 (1959) 98.
- 35 M. A. SWANSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 85.
- 36 D. K. MYERS ET E. C. SLATER, *Nature*, 179 (1957) 363.
- 37 D. K. MYERS ET E. C. SLATER, *Biochem. J.*, 67 (1957) 558.
- 38 B. CHANCE ET G. R. WILLIAMS, *J. Biol. Chem.*, 217 (1955) 409.