

Non-incorporation de tritium dans la dihydro-ménaquinone-9 de *Mycobacterium phlei* au cours des oxydations phosphorylantes

Pour expliquer la participation des ménaquinones dans les phosphorylations oxydatives des systèmes bactériens (BRODIE¹) VILKAS et LEDERER^{2,3} ont proposé un mécanisme faisant intervenir à la fois le méthyle en - 2 et la chaîne latérale en - 3 de la ménaquinone (voir schéma). Un autre mécanisme faisant intervenir les méthylène-quinones 2 a été proposé par ERIKSON et al.⁴.

Ce mécanisme implique un échange d'hydrogène entre l'eau du milieu et la ménquinone, affectant le méthyle en position α et le carbone β de la chaîne latérale. Cet échange pourrait s'effectuer, soit au stade de l'isomérisation supposée réversible quinone 1 \rightleftharpoons méthylène-quinone 2⁶, soit par le cycle même des transformations envisagées (AH_2 étant un transporteur pouvant librement échanger ses protons avec ceux du milieu).

GUTNICK et BRODIE⁹ ont signalé récemment que des extraits irradiés de *M. phlei*, dont les phosphorylations ont été restaurées par addition de phylloquinone, et oxydant le malate en présence d'eau tritiée, incorporaient du tritium dans la phylloquinone. Cette incorporation était dépendante de la présence de phosphate dans le milieu, et était supprimée par le dinitro-2,4 phénol. Cependant, SNYDER et al.¹⁰ utilisant le même système, n'ont trouvé qu'une incorporation négligeable, aussi bien dans la phylloquinone ajoutée que dans la dihydroménaquinone-9 [MK-9(H2)] endogène des extraits non irradiés, en présence de malate ou de pyruvate comme substrats. Ces résultats contradictoires nous amènent à publier nos propres expériences dans ce domaine, qui confirment entièrement la non-incorporation de tritium dans la phylloquinone ou la dihydroménaquinone-9 au cours des phosphorylations oxydatives dans les extraits de *M. phlei*.

L'activité spécifique élevée de l'eau tritierée que nous avons utilisée (1 curie/ml, fournie par le Commissariat à l'Energie Atomique) nous a permis de disposer d'une activité spécifique finale beaucoup plus élevée que celle qui a servi dans les travaux déjà cités. Néanmoins, en

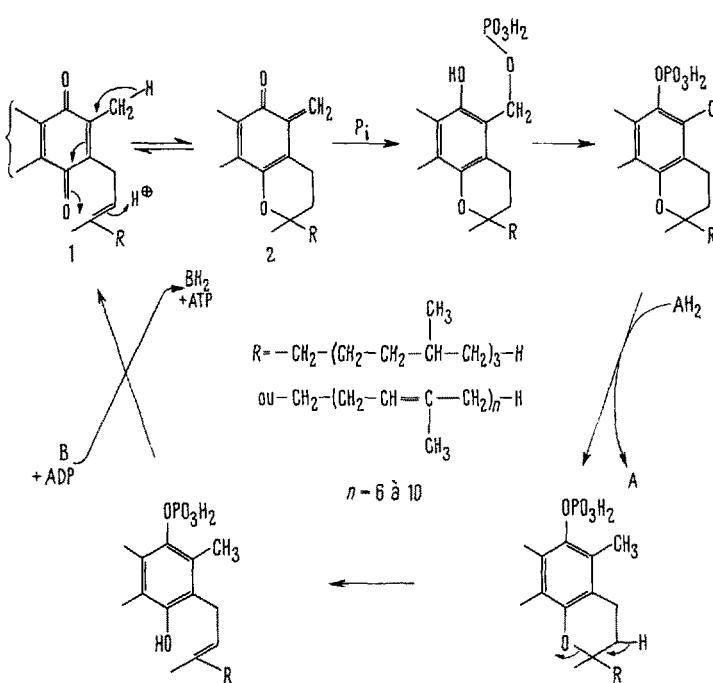
présence de malate et de β -hydroxybutyrate comme substrats, des extraits phosphorylants de *M. phlei* (BRODIE et GRAY¹¹), inactivés par irradiation à 360 nm et dont l'activité est restaurée par addition de phylloquinone, sont incapables d'incorporer d'une façon significative la radioactivité de l'eau tritée dans la phylloquinone

Tableau I. Phosphorylations oxydatives par les extraits de *M. phlei*^a

Substrat	Extrait	Quinone ajoutée	ΔP_i μat.	O μat.	P/O
Malate	non irradié		2,20	1,65	1,33
	irradié ^b		1,05	0,94	1,11
	irradié	phylloquinone ^c 2 μM/ml	1,92	1,48	1,29
β -Hydroxybutyrate	non irradié		3,52	2,27	1,55
	irradié		1,39	0,92	1,51
	irradié	phylloquinone 2 μM/ml	2,83	2,10	1,34
Succinate	non irradié		5,19	3,08	1,68
	irradié		0,87	1,70	0,51
	irradié	phylloquinone 5 μM/ml	1,32	2,67	0,50

^a Les mesures d'oxydation sont effectuées par la méthode de Warburg, dans des conditions identiques à celles de GUTNICK et BRODIE⁹ et BRODIE et GRAY¹¹, excepté pour la concentration en protéines (28 mg/ml d'extrait) et la présence de sérumalbumine (2 mg/ml). Les phosphorylations sont mesurées par l'incorporation de P^{32} .

Les phosphorylations sont mesurées par l'incorporation de ^{32}P (phosphate minéral radioactif) dans le mannose-6-phosphate en présence d'hexokinase (WADKINS et LEHNINGER¹³) pendant 15 min. L'irradiation est effectuée à 4°C à l'aide d'une lampe Mazda TWFN 20 pendant 50 min en agitant l'extrait sous une épaisseur de 3 cm (BRODIE¹⁴). La phylloquinone est ajoutée aux extraits et la dissolution obtenue en agitant magnétiquement à 4°C pendant quelques minutes (un contrôle effectué par dosage spectrophotométrique indique si la dissolution est totale).



- 1 A. F. BRODIE, in *Biochemistry of Quinones* (Ed. R. H. MORTON; Academic Press, London and New York 1965), p. 355.
 - 2 M. VILKAS et E. LEDERER, *Experientia* **18**, 546 (1962).
 - 3 M. VILKAS et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **2505** (1965).
 - 4 R. E. ERIKSON, A. F. WAGNER et K. FOLKERS, *J. Am. chem. Soc.* **85**, 1535 (1963).
 - 5 L'étude chimique, en milieu acide, de cette isomérisation (MAMONT et al.⁶; COHEN et al.⁷; COHEN et MAMONT⁸) a montré qu'elle est pratiquement irréversible dans les conditions utilisées; ceci ne permet pas d'exclure a priori sa réversibilité éventuelle dans les processus biologiques.
 - 6 P. MAMONT, P. COHEN, R. AZERAD et M. VILKAS, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **2513** (1965); **2824** (1965).
 - 7 P. COHEN, P. MAMONT, R. AZERAD et M. VILKAS, *C. r. hebdo. Séanc. Acad. Sci., Paris* **267**, 5144 (1965).
 - 8 P. COHEN et P. MAMONT, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, à paraître (1967).
 - 9 D. L. GUTNICK et A. F. BRODIE, *J. biol. Chem.* **240**, 3698 (1965).
 - 10 C. D. SNYDER, S. J. DI MARI et H. RAPOPORT, *J. Am. chem. Soc.* **88**, 3868 (1966).
 - 11 A. F. BRODIE et C. T. GRAY, *J. biol. Chem.* **219**, 853 (1956).

Tableau II. Incorporation de tritium pendant l'oxydation phosphorylante par des extraits de *M. phlei*^a

Substrat	Extrait	Quinone isolée ^b	Activité spécifique		Incorporation ^a %
			dans le milieu d'incubation en dpm/ μ at. H	dans la quinone ^c en dpm/ μ M	
Malate	irradié	phylloquinone MK-9 (H ₂)	170,5 · 10 ³	131 (4)	0,08 ± 0,01
	non irradié		165,6 · 10 ³	180 (6)	0,10 ± 0,01
β -Hydroxybutyrate	irradié	phylloquinone MK-9(H ₂)	33,6 · 10 ³	24 (4)	0,07 ± 0,02
	non irradié		158,57 · 10 ³	445 (6)	0,28 ± 0,02
Succinate	non irradié	MK-9(H ₂)	158,06 · 10 ³	1131 (7)	0,71 ± 0,01

^a Les incorporations ont été réalisées en présence d'eau tritée dans des conditions identiques à celles de la mesure des P/O avec des extraits simultanément testés pour leur capacité phosphorylante (Tableau I); les essais où les P/O n'étaient pas satisfaisants n'ont pas été retenus. Volumes d'extrait: de 5 ml à 45 ml; durée: 40 min. ^b La phylloquinone est isolée sans addition d'entraîneur; la ménaquinone est isolée après addition de 4 à 5 mg de MK-9(H₂). Méthode d'isolement (AZERAD et al.¹⁸): extraction à l'acétone, puis à l'hexane et chromatographies répétées sur couche mince de gel de silice. ^c Activité corrigée pour les dilutions éventuelles par un entraîneur. Comptages par scintillation liquide au moyen d'un Packard Tri-Carb 3314. Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de purifications sur plaques nécessaires pour obtenir l'activité spécifique donnée. ^a ± déviation standard sur la moyenne.

Tableau III. Purification de la dihydroménaquinone-9 isolée après incorporation de tritium par des extraits de *M. phlei* non irradiés

Stade de purification	Activité spécifique de la quinone en dpm/ μ M ^a		
	Substrat		
	Malate	β -Hydroxybutyrate	Succinate
Extrait hexanique	2012000	1267000	1224000
Chromatographies sur silicagel G:			
1ère chromatographie	36313 ^c	35370 ^b	3867 ^b
2ème chromatographie	3065 ^b	19555	3680
3ème chromatographie	2436	17661	3026
4ème chromatographie	1807	9990 ^c	2656
5ème chromatographie	—	570 ^d	2548
6ème chromatographie	180 ^d	445	1061 ^d
7ème chromatographie	—	—	1131

^a Corrigée pour l'addition d'entraîneur. ^b Solvant: hexane-MeCOEt (97:3). ^c Solvant: hexane-MeCOEt (9:1). ^d Solvant: benzène.

ajoutée. Les mêmes expériences répétées sans irradiation préalable, en présence de malate, β -hydroxybutyrate et succinate comme substrats, suivies de l'isolement de MK-9(H₂) *endogène*, montrent une incorporation légèrement supérieure mais encore très faible (Tableau II). Il est à noter que, paradoxalement, l'activité la plus forte est obtenue avec le substrat succinate, dont l'oxydation est liée à une phosphorylation peu dépendante de la présence d'une ménquinone (BRODIE et ADELSON¹²) (Tableau I). Au cours de la purification de MK-9(H₂) il a été difficile d'obtenir une activité spécifique constante. Celle-ci, qui décroît au fur et à mesure des purifications par chromatographies sur couche mince, est probablement due à des traces d'impuretés lipidiques; dans la plupart des cas un changement de solvant chromatographique

entraîne une diminution brutale de cette activité (Tableau III).

Un échange d'hydrogène entre l'eau du milieu et la ménquinone est donc exclu par ces expériences; cet échange devrait en effet entraîner, dans les conditions employées, l'incorporation d'une quantité importante de tritium dans la molécule de quinone. Un effet isotopique favorisant la rupture de la liaison C-H ne pourrait qu'augmenter ce % d'incorporation. Il faut signaler que HORTH et al.¹⁶ ont pu préparer la phylloquinone doublement marquée au C¹⁴ et H³ dans le méthyle -2 et qu'ils n'ont pu observer, dans des conditions analogues, aucun changement dans le rapport H³/C¹⁴ de la phylloquinone au cours des phosphorylations oxydatives dans des extraits de *M. phlei*.

Il reste néanmoins possible que seule une petite quantité de quinone, formant un pool séparé, est mise en jeu dans le mécanisme indiqué et que sa radioactivité éventuelle passe inaperçue en raison de la dilution par des quantités importantes de quinone inactive. De plus, on pourrait envisager que la forme active de la quinone soit la méthylène-quinone 2, formée irréversiblement à partir de la quinone 1, et fonctionnant dans un cycle de transformation excluant cette quinone.

Il ressort cependant de l'ensemble de tous ces résultats expérimentaux négatifs qu'une coupure de liaison C-H dans les ménquinones, au cours des oxydations phosphorylantes, est très peu probable, ce qui remet en question le mécanisme envisagé pour leur action. Ce mécanisme, qui n'a reçu jusqu'à présent aucune confirmation

¹² A. F. BRODIE et J. ADELSON, Science 149, 265 (1965).

¹³ C. L. WADKINS et A. L. LEHNINGER, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN; Academic Press, London and New York 1963), vol. 6, p. 265.

¹⁴ A. F. BRODIE, in *Methods in Enzymology* (Ed. S. P. COLOWICK et N. O. KAPLAN; Academic Press, London and New York 1963), vol. 6, p. 306.

¹⁵ R. AZERAD, R. BLEILER-HILL et E. LEDERER, Biochem. biophys. Res. Commun. 19, 194 (1965).

¹⁶ C. E. HORTH, D. McHALE, L. R. JEFFRIES, S. A. PRICE, A. T. DIPLOCK et J. GREEN, Biochem. J. 100, 424 (1966).

expérimentale biochimique, a d'ailleurs été critiqué (LEDERER et VILKAS¹⁷) et semble devoir être complètement abandonné^{18,19}.

¹⁷ E. LEDERER et M. VILKAS, Vitams Horm. 24, 409 (1966).

¹⁸ Des expériences analogues effectuées sur des mitochondries de cœur de porc ou des particules submitochondriales phosphorylantes ont montré qu'aucune radioactivité n'est incorporée dans l'ubiquinone-10 endogène (B. FOUCHER et Y. GAUDEMÉR, résultats non publiés).

¹⁹ Nous remercions Monsieur E. LEDERER pour l'intérêt porté à ce travail qui a bénéficié d'une subvention du Centre National de la Recherche Scientifique (R.C.P.21 «Oxydations Phosphorylantes»).

Summary. During oxidative phosphorylation with cell-free extracts of *Mycobacterium phlei*, carried out in the presence of tritiated water, only negligible incorporation of tritium has been found either into endogenous MK-9(H₂) or into phylloquinone added to the irradiated extract. These results rule out previously postulated mechanisms involving the enzymatic isomerization of menaquinones into quinone-methides 2.

F. SCHERRER, R. AZERAD
et M. VILKAS

Institut de Biochimie et Laboratoire de Chimie Organique Biologique, Faculté des Sciences, Orsay (Essonne, France), 28 novembre 1966.

A 'Dehydroascorbic Acid Reductase' Factor in Guinea-Pig Tissues

It is well established that dehydroascorbic acid reductase exists in plant tissues^{1,2} and in microorganisms^{3,4}. This enzyme catalyses the formation of ascorbic acid (AA) from dehydroascorbic acid (DHAA), reduced glutathione acting as the hydrogen donor. More recently, evidence has accumulated that points to the existence of a similar DHAA-reductase factor in the blood and liver of a number of species⁵. This letter reports the existence of this factor in other tissues of the guinea-pig and attempts that have been made to purify and characterize it.

Normal animals fed on a compounded pellet diet (Oxoid SGI) with a daily supplement of cabbage were killed by decapitation and the tissue to be examined was removed rapidly, homogenized in isotonic saline and the particulate fraction separated by centrifugation for 30 min at 5°C (16,500g). The supernatant was dialysed for 15 h at 5°C against 0.01 M phosphate buffer, pH 6.9.

'DHAA-reductase' activity was measured by determining the amount of AA formed when 4 ml of the preparation were added to a mixture of 5.75 μmoles DHAA and 16.25 μmoles reduced glutathione (GSH) in 6 ml 0.12 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ buffer, pH 6.9, and the resulting mixture incubated at 20°C for 20 min. The reaction was stopped by the addition of 10 ml 8% metaphosphoric acid, precipitated protein removed by centrifugation and the AA determined by the 2:6 dichlorophenol-indophenol method⁶.

Results (expressed as nm moles AA formed per min per g protein) for guinea-pig preparations were: stomach 550, brain 330, adrenals 300, small intestine 240, lung 220, liver 218.

The crude preparation obtained from the stomach and small intestine was further purified. The fraction obtained between 30% and 60% saturation with ammonium sulphate was dissolved in the minimal amount of 0.1 M phosphate buffer pH 6.9 and dialysed for 15 h at 5°C against 0.001 M phosphate buffer pH 6.9. The dialysate was washed through a column of Sephadex G 200 gel with 0.05 M phosphate buffer, pH 6.9. The active fraction was retarded by the column and it was possible to effect a 20-fold purification of the factor.

The properties of the preparation were, in general, similar to those of the liver preparation previously described⁶. The pH optimum (difficulty measurable because of the rapid increase in rate of the chemical reaction above pH 7.0) appeared to be about 6.9. Heating the preparation at 98°C pH 6.9 for 3 min resulted in a 50%

loss of activity. Incubation with ficin for 1.5 h at 37°C and pH 6.9 totally destroyed the activity; incubation with trypsin reduced the activity by 77%.

Sulphydryl compounds were essential as reductants in the system; cysteine was only 20% as effective as glutathione in this respect. NADH₂ was inactive as a hydrogen-donor – a finding in line with similar results obtained by other workers using bacterial preparations of the factor⁷. The factor showed 50% greater activity towards dehydroascorbic acid than towards dehydroascorbic acid⁶.

Azide and fluoride had no inhibitory effect at 1 · 10⁻³ M concentration at pH 6.9. Iodoacetic acid, iodoacetamide and p-chloroacetophenone (all at 2 · 10⁻⁴ M) produced 49%, 56% and 15% inhibition respectively. Hg ions (1 · 10⁻⁵ M) produced 92% inhibition.

The thermolability of the factor, the reduction in activity effected by proteolytic enzymes, the substrate specificity and the action of inhibitors are highly suggestive of the existence in animal tissues of an enzyme capable of catalysing the reduction of DHAA to AA.

The presence of a comparatively high concentration of the factor in the stomach wall is of especial significance in view of the recent reports that in the guinea-pig both DHAA and AA are absorbed from the stomach⁸ and that orally administered DHAA is more effectively reduced to AA by the body than is i.p. administered DHAA⁹.

Résumé. Dans des tissus de cobayes il existe une protéine capable de catalyser la réduction de l'acide déhydrosorbutique en acide ascorbique. Sa distribution, sa purification, sa spécificité et son action en présence d'enzymes inhibitrices typiques ont été étudié.

R. F. GRIMBLE and R. E. HUGHES

Welsh College of Advanced Technology, Cardiff (Wales), 22nd August 1966.

- 1 B. M. CROOK, Biochem. J. 35, 226 (1941).
- 2 M. YAMAGUCHI and M. A. JOSLYN, Archs Biochem. Biophys. 38, 451 (1952).
- 3 W. B. ESSELEM and J. E. FULLER, J. Bact. 37, 501 (1939).
- 4 A. R. STEWART and P. E. SHARP, Ind. Engng Chem. analyt. Edn 17, 373 (1945).
- 5 R. E. HUGHES, Nature 203, 1068 (1964).
- 6 R. E. HUGHES, Biochem. J. 64, 203 (1956).
- 7 H. TAKIGUCHI, J. Vitam. 11, 114 (1965).
- 8 R. E. HUGHES and S. C. LEWIS, Proc. Nutr. Soc. 24, 44 (1965).
- 9 P. G. DAYTON, M. M. SNELL and J. M. PEREL, J. Nutr. 88, 338 (1966).