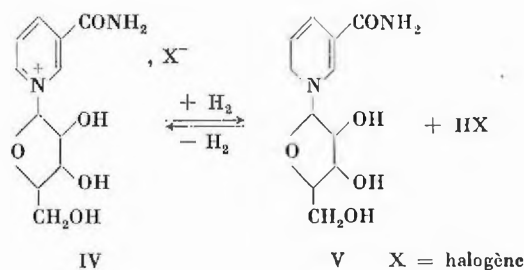


certaines bases puriques ou pyrimidiques naturelles; ces glycosides sont désignés sous le nom de nucléosides. C'est ainsi que le nucléoside de l'adénine est l'adénosine. A l'état naturel l'adénosine peut être obtenue phosphorylée, soit sur l'une des deux fonctions alcool secondaire, soit sur la fonction alcool primaire auquel cas l'ester phosphorique porte le nom d'acide adénylique (III). D'autre part, le D-furanoribose peut donner des sels quaternaires IV avec l'amide nicotinique. Ces sels quaternaires sont doués de propriétés chimiques remarquables: ils sont stables en milieu acide, instables en milieu alcalin et se laissent facilement réduire selon l'équation suivante:



Le dérivé dihydrogéné V ainsi obtenu est un véritable N-glycoside, stable en milieu alcalin, mais très sensible aux acides. Cette réduction peut être suivie par la spectrophotométrie. Le spectre U.V. des sels quaternaires des nicotinium-amide (IV) possède un maximum à 270 m μ qui, pendant la réduction, se déplace vers les grandes longueurs d'onde pour se stabiliser vers 340 m μ (fig. 1). D'un autre côté, l'oxydation des produits dihydrogénés V en sels quaternaires IV s'effectue sans difficulté. En définitive le sel de N-D-ribofuranosidonicotinium-amide (IV) et le N-glycoside V constituent en milieu neutre un système oxydo-réducteur naturel par excellence. En solution acide le dérivé dihydrogéné V subit une transformation irréversible qui conduit à des produits de dégradation ne présentant plus d'intérêt biologique et dont les spectres d'absorption finissent par

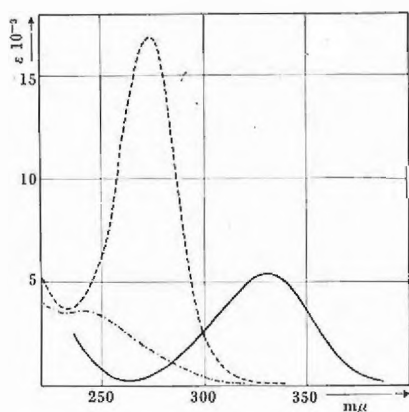
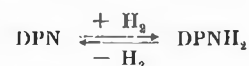


Fig. 1. Spectre du N¹-D-ribofuranosido-dihydro-nicotinamide
 — dans l'eau pure
 - - - - - après traitement à pH 3
 ······ après traitement à n-HCl

disparaître après avoir présenté un fort maximum vers 290 m μ (fig. 1).

Nous avons dit qu'une moitié du DPN (I) était justement constituée par le sel quaternaire IV. La liaison entre ce sel quaternaire et l'adénosine, seconde moitié du DPN, se fait par l'intermédiaire d'une molécule d'acide pyrophosphorique dont une fonction acide neutralise l'azote positif du noyau pyridinium. Un simple coup d'œil sur la formule I permet d'en déduire les propriétés chimiques: le DPN est un produit très soluble dans l'eau, insoluble dans les solvants organiques, hydrolysé par les acides minéraux qui en détachent l'adénine et scindent l'acide pyrophosphorique, instable en milieu alcalin en raison de la fonction azote quaternaire.

Le DPN se laisse réduire comme les sels de ribosidonicotinium-amide (IV) en dérivé dihydrogéné généralement désigné par l'abréviation DPNH₂. Le DPNH₂ lui-même peut être réoxydé en DPN selon l'équation:



Ajoutons que les spectres de ces produits représentent la somme des spectres de l'acide adénylique avec son maximum à 260 m μ et de l'ester phosphorique II avec son maximum à 272 m μ sous forme oxydée et 340 m μ sous forme réduite (fig. 2).

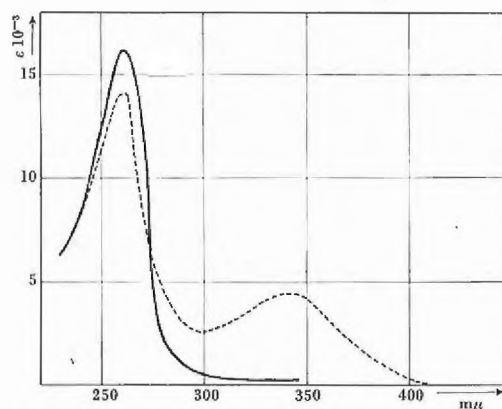
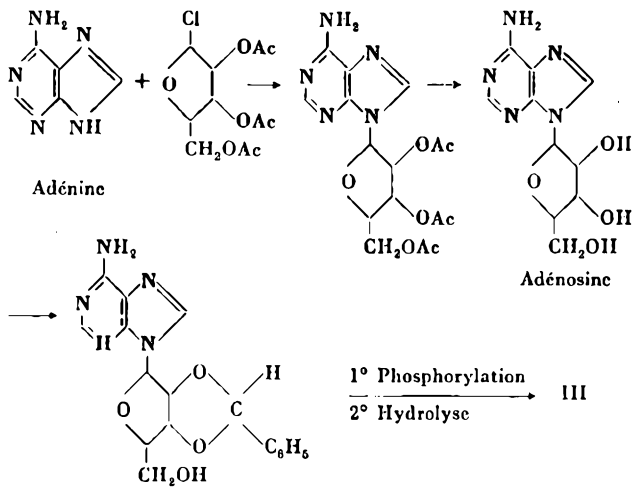


Fig. 2

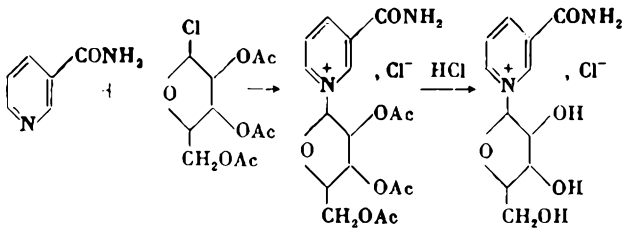
— Spectre du DPN (H₂O)
 - - - - - Spectre du DPNH₂ (H₂O)

La structure du DPN a été établie par l'étude du produit naturel. Bien qu'elle n'ait pas été confirmée par synthèse on peut la considérer comme certaine. Jusqu'à présent, seul l'acide adénylique (III) a pu être synthétisé selon le schéma suivant, qui ne laisse aucun doute sur l'exactitude de la formule²:

² J. DAVOLL, B. LYTGOE et A. R. TODD, *J. Chem. Soc.* 1948, 967; J. DAVOLL et B. A. LOWY, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 1650; D. M. BROWN, L. J. HAYNES et A. R. TODD, *J. Chem. Soc.* 1950, 3299.

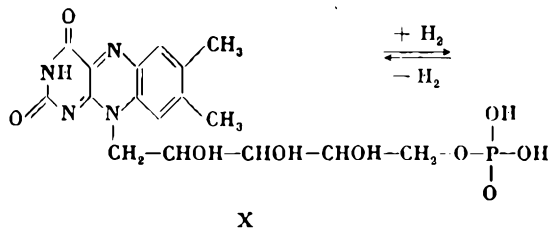


La deuxième moitié II de la molécule de DPN n'a pas encore été obtenue au laboratoire, mais de nombreuses substances modèles ont été synthétisées³. Les propriétés chimiques de ces substances correspondent tellement à celles du DPN qu'on peut tenir sa structure comme définitivement établie. Nous avons récemment décrit un chlorure de N¹-D-ribofuranosido-nicotinium-amide obtenu selon le schéma suivant⁴:



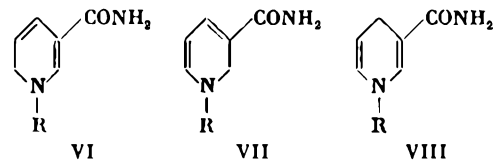
De récents travaux effectués dans nos laboratoires nous ont permis de montrer que ce sel de nicotinium-amide devait appartenir à la série β et correspondre selon toute vraisemblance au nucléoside naturel IV⁵.

Si la constitution du DPN ne fait aucun doute, celle du DPNH₂ prête encore à discussion. En effet, la réduction du noyau pyridinium peut porter sur les deux positions *ortho* (VI et VII) ou *para* (VIII).



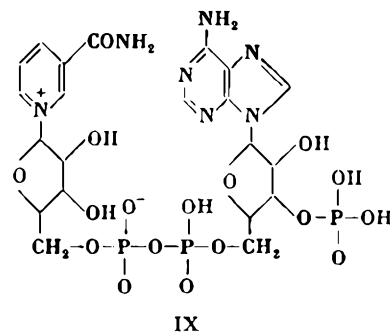
³ P. KARRER, G. SCHWARZENDACH, F. BENZ et U. SOLMSEN, *Helv. Chim. Acta* 19 (1936) 811; P. KARRER, B. H. RINGIER, J. BÜCHI, H. FRITZSCHE et U. SOLMSEN, *Helv. Chim. Acta* 20 (1937) 55.

⁴ M. VISCONTINI, M. MARTI et P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 1373; M. VISCONTINI, D. HOCH, M. MARTI et P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 646.



Alors que l'étude de substances modèles conduisait P. KARRER et ses collaborateurs à attribuer au dérivé réduit la structure *o*-dihydrogénée VI ou VII³, plusieurs laboratoires américains travaillant à l'aide d'isotopes ont prétendu que le dérivé réduit était hydrogéné en *para* (VIII)⁶. Nous sommes enclins à adopter le point de vue de P. KARRER en donnant la préférence à la formule *o*-dihydrogénée VI.

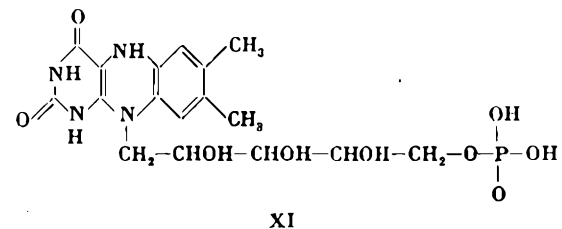
B. TPN. Le TPN est un DPN phosphorylé sur la fonction alcoolique secondaire 3' de l'adénosine (IX).



Toutes les propriétés chimiques et physico-chimiques du DPN se retrouvent dans le TPN. Toutefois, chacun de ces coenzymes agit sur des métabolites différents et dans une chaîne enzymatique d'oxydo-réduction on ne peut remplacer l'un par l'autre.

III. Les coenzymes des cytochrome-réductases

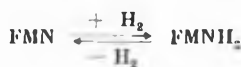
A. Acide riboflavine-5'-phosphorique (ancien ferment jaune de WARBURG). Le coenzyme de l'ancien ferment jaune de WARBURG est l'ester 5'-phosphorique de la riboflavine. On le désigne souvent sous le nom de flavine-monucléotide ou, en abrégé, FMN (X).



⁵ M. VISCONTINI et E. HÜRZELER-JUCKER, *Helv. Chim. Acta* 39 (1956) 1620.

⁶ M. E. PULLMANN, A. SAN PIETRO et S. P. COLOWICK, *J. Biol. Chem.* 206 (1954) 129. G. W. RAFTER et S. P. COLOWICK, *J. Biol. Chem.* 209 (1954) 773. D. MANZERALL et F. H. WESTHEIMER, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 2261. F. A. LOEWUS, B. VENNESLAND et D. L. HARRIS, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 3391.

Les propriétés chimiques de ce coenzyme se rapprochent tout particulièrement de celles de la vitamine B₂ dont il dérive. En particulier, il se laisse réduire pour donner un dérivé dihydrogéné XI, ayant perdu sa teinte jaunâtre, qu'on nomme souvent pour cette raison leucodérivé. Ce leucodérivé peut, à son tour, être oxydé pour redonner le coenzyme coloré de départ X. Ici encore la réaction peut s'écrire sous la forme schématique:



En tant qu'ester phosphorique, le FMN forme des sels dont certains, tels le sel d'ammonium, de potassium et de sodium, sont très solubles dans l'eau alors que la vitamine B₂ elle-même ne l'est pas. Son spectre U. V. est semblable à celui de la riboflavine (fig. 3).

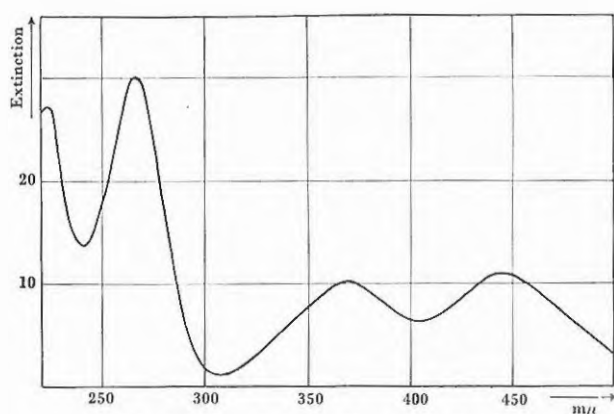


Fig. 3. Spectre de la riboflavine et du FMN

La synthèse de ce coenzyme a fait l'objet de nombreuses recherches. R. KUHN⁷ fut le premier à la tenter, puis TODD⁸, utilisant et améliorant cette technique, a pu obtenir une préparation beaucoup plus pure. Le procédé a été repris par la suite par L. A. FLEXNER et W. G. FARKAS⁹. La meilleure synthèse a pourtant été effectuée dans nos laboratoires où nous avons simplement traité la riboflavine par un mélange d'acides polyphosphoriques dont l'indice de polymérisation ne dépasse pas 7 ou 8¹⁰. Ce procédé a mis actuellement le coenzyme cristallisé à portée de tous les laboratoires et permet l'étude de son mode d'action dans les cellules vivantes.

B. FAD. A côté de l'ancien ferment jaune de WARBURG il existe d'autres enzymes dont le coenzyme renferme une molécule de riboflavine, par exemple le nouveau ferment jaune de WARBURG et une série de ferments réunis sous le nom générique de cytochrome-réductases.

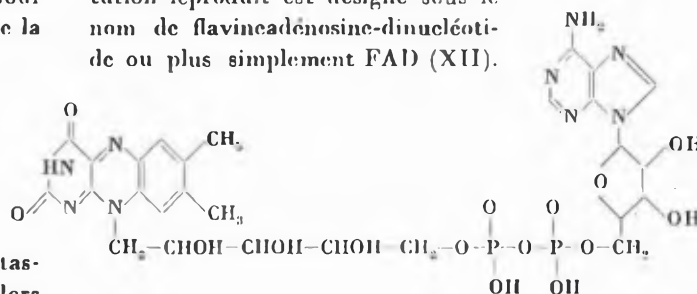
⁷ R. KUHN, H. RUDY et F. WEYGAND, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 69 (1936) 1543; R. KUHN et H. RUDY, *Ber. dtsh. chem. Ges.* 69 (1936) 1974.

⁸ H. S. FORREST et A. R. TODD, *J. Chem. Soc.* 1950, 3295.

⁹ *Chem. Eng. News* 29 (1951) 3947.

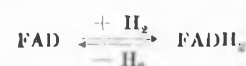
¹⁰ M. VISCONTINI, C. ENNÖTHNER et P. KARRER, *Helv. Chim. Acta* 35 (1952) 457. H. ROUX, E. THILD, H. GRUNZE et M. VISCONTINI, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 15.

Le coenzyme commun de ces ferments est formé par la condensation du FMN et de l'acide adénylique avec élimination d'une molécule d'eau entre les deux esters phosphoriques et formation d'un pont pyrophosphorique entre la riboflavine et l'adénosine. En raison de sa constitution le produit est désigné sous le nom de flavinacétyl-dinucléotide ou plus simplement FAD (XII).



XII

Bien entendu, le FAD possède les propriétés chimiques du FMN avec ses possibilités d'oxydo-réduction qu'on représente par l'équation:



Le spectre du FAD est la somme des spectres du FMN et de l'acide adénylique. Une fois oxydé, les deux bandes situées dans le domaine visible disparaissent et on obtient là encore un leucodérivé (fig. 4).

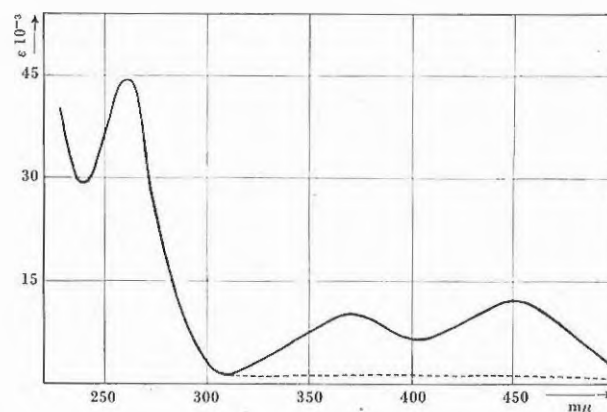


Fig. 4

— Spectre du FAD d'après E. DIMANT, D. R. SANADI et F. M. HUENNEKENS, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 (1952) 5440
 - - - - - Spectre du FADH₂

Pour synthétiser le FAD, on peut faire réagir le FMN sur le 2',3'-isopropylidène-adénosine-5'-benzyl-phosphochloridate¹¹ ou encore le FMN avec l'acide adénylique en présence de carbodiimine¹². Dans les deux cas les rendements sont très mauvais, mais le FAD se retrouve parmi les produits de condensation et on peut considérer sa structure comme définitivement établie.

¹¹ S. M. H. CHRISTIE, G. W. KENNER et A. R. TODD, *J. Chem. Soc.* 1954, 46.

¹² F. M. HUENNEKENS et G. L. KILGOUR, *J. Amer. Chem. Soc.* 77 (1955) 6716.

HCN pour donner un complexe caractéristique de cette classe de produits, et très stable. Les bases organiques s'associent aussi avec le noyau métallique des porphyrines. Avec l'hème et les porphyrines ferreuses on obtient l'hémochromogène XX, avec l'hémine et les porphyrines ferriques on obtient la parahématine XXII après passage par l'hématine XXI comme produit intermédiaire.

Tous les produits dont nous venons de parler possèdent des spectres caractéristiques. L'hème, ou son complexe avec l'oxyde de carbone, présente un bande principale d'absorption vers 420 $m\mu$ et des maxima secondaires vers 540 et 570 $m\mu$ (fig. 5). Ces bandes sont dé-

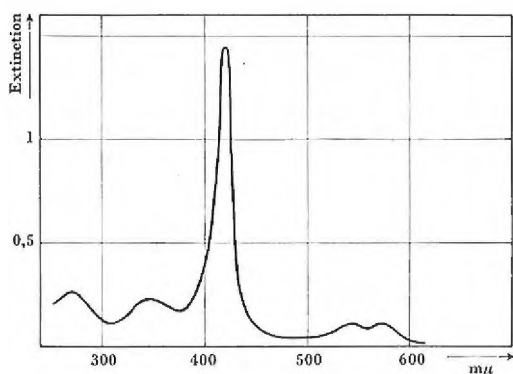


Fig. 5. Spectre du complexe CO-hémoglobine d'après O. WARBURG, *Angew. Chem.* 45 (1932) 1

signées sous le nom de α , β et γ . La région des 400 $m\mu$, renfermant les bandes γ , est appelée région de Soret, celle des 550-600 $m\mu$, renfermant les bandes α et β , région de STOKES. Fait intéressant à signaler, les bandes de STOKES se déplacent et s'estompent si on oxyde les porphyrines ferreuses en porphyrines ferriques.

Si maintenant nous examinons le spectre obtenu par la lumière traversant une culture de levures vivantes ou le corps translucide d'un insecte, nous aurons la surprise d'obtenir un spectre assez proche de celui des ferroporphyrines avec une bande importante dans la région de Soret et plusieurs bandes secondaires dans le domaine

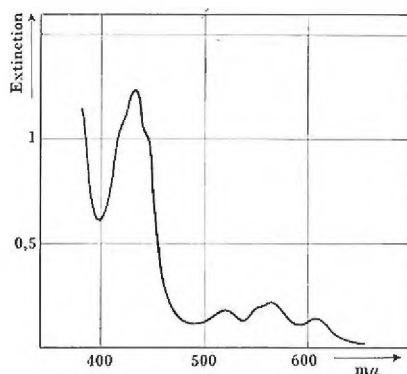


Fig. 6. Spectre du système transporteur d'électrons: cytochromes a , b , c et cytochrome-oxydase d'après E. G. BALL, C. F. STRITTMATTER et O. COOPER, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 635

de STOKES (fig. 6). Comme dans le cas de l'hème, la netteté des bandes de STOKES s'estompe si on oxyde les tissus et réapparaît si on les réduit. Sans entrer dans les détails, nous pouvons indiquer qu'il y a là un mélange de spectres des cytochromes a , b , c et du ferment respiratoire (Atmungsferment) ou cytochrome-oxydase.

De tous ces ferments le cytochrome c et la cytochrome-oxydase ont été les mieux étudiés; ce sont les seuls que nous traiterons dans cet exposé car, bien qu'assez rudimentaire, la chimie des coenzymes de ces deux ferments est mieux connue que celle des cytochromes a et b , à peu près inexistante.

Tout d'abord il nous faut faire une différence nette entre les coenzymes étudiés jusqu'ici et les coenzymes que nous allons traiter maintenant. Dans les déshydrogénases, cytochrome-réductases et autres, le coenzyme n'est pas lié fermement à l'apoenzyme et on peut l'en séparer par des méthodes douces sans dégrader ni l'un ni l'autre des deux constituants de l'enzyme. Les cytochromes et le ferment respiratoire se comportent autrement, tout comme l'hémoglobine. Là, le coenzyme n'est libéré que sous l'action de réactifs assez forts, tels une solution acétique d'un hydracide (HCl ou HBr), une solution basique, etc. Il semble dans ce cas que le pigment porphyrine est lié à la partie protidique du ferment par des valences chimiques homéopolaire. Il est alors préférable d'utiliser le terme groupement prosthétique plutôt que coenzyme pour désigner la fraction de la molécule douée d'activité catalytique.

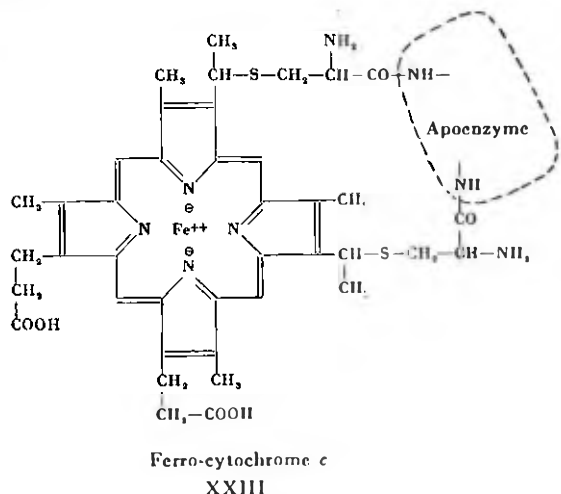
A. Cytochrome c. Le cytochrome c est de tous les cytochromes celui qui se laisse le plus facilement isoler. Il se présente sous forme d'une protéine rouge, un peu plus pâle que l'hémoglobine, difficilement soluble dans l'eau où il donne des suspensions colloïdales.

Lorsqu'on hydrolyse brutalement le cytochrome c en milieu acide, on en détache une hématoporphyrine isomère de l'hématoporphyrine sanguine XVII, mais douée de pouvoir rotatoire. La pyrolyse de ces deux porphyrines conduit à la même protoporphyrine XVI ce qui démontre l'identité de leur structure¹³. Si au contraire on soumet le cytochrome c à une hydrolyse acide douce, on obtient une porphyrine optiquement active renfermant 2 molécules de cystéine; une hydrolyse pepsique ou trypsique conduit à une porphyrine reliée à deux chaînes polypeptiques par 2 molécules de cystéine¹⁴. Il ne fait aucun doute que la porphyrine est liée à la molécule protidique du cytochrome c par l'intermédiaire de ces deux chaînes peptidiques (XXIII). On admet que les deux molécules de cystéine saturer les 2 doubles liaisons vinyliques de la protoporphyrine XVI pour donner naissance à une sorte d'hématoporphyrine possédant deux carbones asymétriques. On comprend alors que l'hydrolyse acide du cytochrome XXIII puisse libérer une hématoporphyrine dotée de 2 fonctions alcool se-

¹³ K.-G. PAUL, *Acta Chem. Scand.* 5 (1951) 389.

¹⁴ H. TUPPY et G. BODO, *Mh. Chem.* 85 (1954) 1024; S. PALEUR, A. EHRENBERG et H. TUPPY, *Acta Chem. Scand.* 9 (1955) 365.

conculaire asymétriques et possédant un pouvoir rotatoire.



Le spectre du cytochrome c réduit (fig. 7) indique que le ferment renferme un noyau ferreux comme l'hémoglobine. Effectivement on peut mettre le fer en évidence dans le cytochrome c, tout comme dans les autres ferments qui l'accompagnent dans les cellules: cytochromes a et b, cytochrome-oxydase.

Le cytochrome à fer divalent est désigné sous le nom de ferro-cytochrome. Contrairement à l'hémoglobine il ne donne de complexe ni avec CO ni avec O₂. On ne peut oxyder le ferrocyclochrome c au contact de l'oxygène de l'air. Seuls certains substrats, capables d'enlever un électron du noyau ferreux, l'oxydent en ferri-cytochrome c. Là encore on ne connaît pas de complexe du ferri-cytochrome c avec HCN. Il semble que la liaison chimique porphyrine-apoenzyme produise une telle imbrication du groupement prosthétique dans la molécule protidique que les noyaux ferreux ou ferriques s'en trouvent complètement protégés.

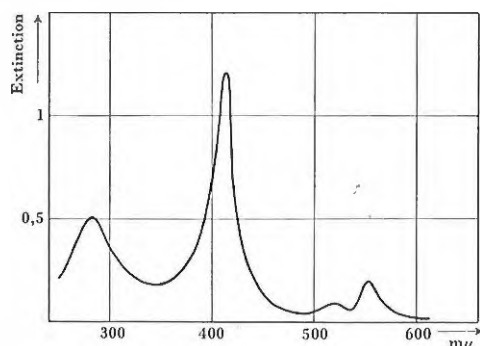
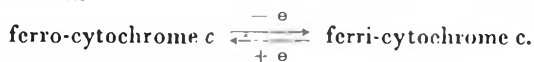


Fig. 7. Spectre du cytochrome c d'après H. THEORELL et A. AKESON, *J. Amer. Chem. Soc.* 63 (1941) 1812

La réduction chimique du ferri-cytochrome c en ferro-cytochrome est assez aisée. Nous sommes donc en présence d'un nouveau système naturel oxydo-réducteur mettant en jeu un déplacement d'électron qu'on schématise ainsi



B. Cytochrome-oxydase (ferment respiratoire). Nous savons peu de chose sur le groupement prosthétique du ferment respiratoire et les quelques notions que nous possédons, sont surtout dues aux travaux de WARBURG sur ce sujet. Si on traite à l'obscurité une suspension de cellules vivantes, dépourvues d'hémoglobine, par du CO, on constate que la respiration des cellules est inhibée. Si on éclaire cette suspension inhibée par de la lumière monochromatique, la respiration se rétablit plus ou moins fortement selon la longueur d'onde de la lumière

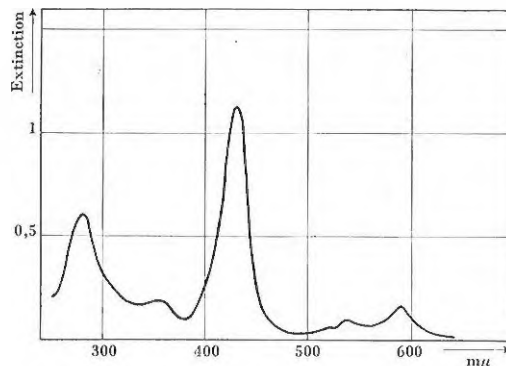
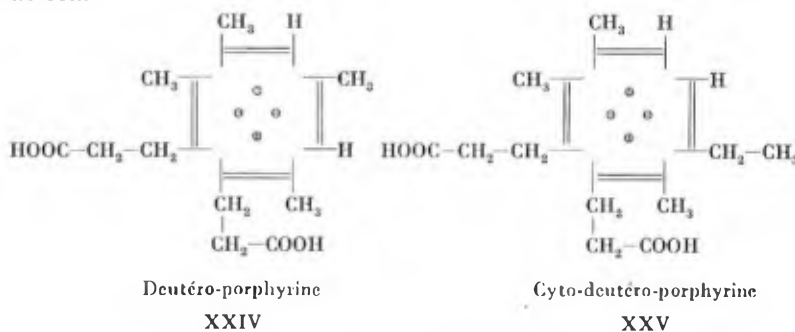


Fig. 8. Spectre de la cytochrome-oxydase d'après O. WARBURG, *Angew. Chem.* 45 (1932) 1

incidente. Si on construit la courbe de réactivation de la respiration en fonction de la longueur d'onde, on obtient un spectre caractéristique de ferro-porphyrine (fig. 8). C'est ainsi que WARBURG mit en évidence la présence du ferment respiratoire chez les êtres vivants¹⁵. Il réussit par la suite à isoler le groupement prosthétique de ce ferment sous forme de ferri-porphyrine. Comme lui, nous désignerons cette ferri-porphyrine sous le nom de cytohémine, la forme ferreuse réduite étant le



cytohème. L'analyse élémentaire montre que la cytohémine renferme plus de carbone, d'hydrogène et d'oxygène que l'hémine, mais moins de fer et d'azote¹⁶. L'hémine possède 34 atomes de carbone, la cytohémine en posséderait 48¹⁷. Pour obtenir quelques renseignements supplémentaires sur la structure de la cytohémine, WARBURG l'a transformée en cyto-deutéro-porphyrine.

¹⁵ O. WARBURG et E. NEGELEIN, *Bioch. Z.* 193 (1928) 339; *ibid.* 204 (1929) 495; O. WARBURG, *Angew. Chem.* 45 (1932) 1.

¹⁶ O. WARBURG et H. S. GEWITZ, *Z. physiol. Chem.* 208 (1951) 1.

¹⁷ O. WARBURG, *Naturwiss.* 40 (1953) 493.

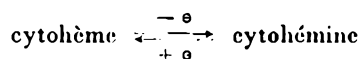
On appelle deutéro-porphyrine XXIV la protoporphyrine exempte des deux fonctions vinyliques. On constate alors que la cyto-deutéro-porphyrine diffère de la deutéro-porphyrine par un groupeméthylène $-\text{CH}_2-$ en plus¹⁸. O. WARBURG et H. S. GEWITZ ont proposé pour la cyto-deutéro-porphyrine la formule XXV en s'appuyant sur les constatations suivantes:

Le spectre du cytohème, semblable au spectre de l'hème, en diffère par la position des bandes α , β et γ . Les bandes α et β de l'hème sont situées dans le domaine du vert (maxima à 540 et 570 $m\mu$), celles du cytohème dans celui du jaune (maxima à 550 et 590 $m\mu$).

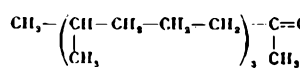
Si on compare maintenant le spectre du cytohème avec celui obtenu en substituant le fer au magnésium dans la molécule de chlorophylle *b* (XXIV), on est frappé par leur identité.

Il semble que la cyto-porphyrine est plus proche de la porphyrine de la chlorophylle *b* que de la protoporphyrine. La cyto-porphyrine doit posséder une chaîne carbonée, encore inconnue chez les autres porphyrines naturelles; de même elle doit renfermer sur un des cycles pyrroliques une fonction formylée, caractéristique de la chlorophylle *b* et responsable de la présence de la bande α dans le jaune. Ces porphyrines formylées sont appelées porphyrines vertes par opposition aux porphyrines rouges dont la bande α est localisée dans le vert.

Le couple cytohème-cytohémine forme un nouveau système oxydo-réducteur naturel mettant en jeu un déplacement d'électron:

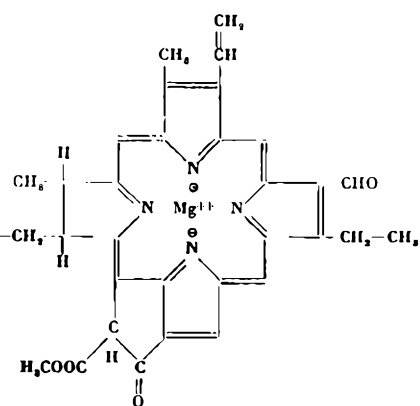


¹⁸ O. WARBURG et H. S. GEWITZ, *Z. physiol. Chem.* 292 (1953) 174.



Chlorophylle *b*

XXVI



Dans la cytochrome-oxydase le fer ne semble pas aussi protégé que dans le cytochrome *c*. On connaît les complexes très stables de CO avec le cytohème et de HCN avec la cytohémine.

Conclusion

Nous avons essayé de présenter le plus succinctement possible l'essentiel de ce qu'il est indispensable de connaître sur la chimie des coenzymes d'oxydo-réduction pour aborder avec succès l'étude du mode d'action de ces coenzymes dans la chaîne respiratoire. Nous avons évité d'entrer dans les détails dont le seul résultat eut été un alourdissement de notre exposé, mais le lecteur dont l'attention aura été éveillée par le côté passionnant de cette partie de la biochimie organique voudra bien se reporter aux quelques références que nous avons mentionnées. Il y trouvera l'amorce de toute une littérature qui l'incitera peut être à consacrer quelques efforts personnels à la poursuite de l'étude des ferments et de leurs coenzymes.