

Sur un mécanisme possible de la phosphorylation oxydative¹

On peut considérer à l'heure actuelle comme établi que les quinones naturelles telles que les vitamines K et les ubiquinones sont des intermédiaires dans le transport des électrons le long de la chaîne respiratoire². Il est probable, bien que la question soit encore controversée, qu'elles interviennent également dans l'une au moins des phosphorylations qui accompagnent l'oxydation, l'intermédiaire commun à ces deux réactions étant un phosphate d'hydroquinone ou de chromanyle-6³.

Cette hypothèse a été fortement étayée par les expériences-modèles non-enzymatiques de WIELAND⁴ et surtout de TODD⁵ qui ont montré qu'en présence d'un oxydant tel que par exemple le sulfate de cerium ou le brome (jouant le rôle des cytochromes), les phosphates d'hydroquinone agissent comme agents phosphorylants vis-à-vis d'alcools pour former un ester phosphorique, ou vis-à-vis d'esters phosphoriques en donnant des pyrophosphates. TODD et al. ont ainsi synthétisé l'ADP à partir d'AMP, de diméthylnaphthoquinol phosphate et de brome comme oxydant⁶ (Figure 1⁷).

Mais, pour que ces expériences, d'une portée considérable, constituent un modèle complet de phosphorylation oxydative, il faudrait encore montrer comment se forme le quinol phosphate au cours de la réduction de la quinone en présence de phosphate minéral (Figure 2).

Une telle « phosphorylation réductive » d'une quinone n'a pas encore été réalisée jusqu'à ce jour et l'on en est réduit aux spéculations pour essayer de comprendre le mécanisme par lequel une telle fixation de phosphate minéral peut s'effectuer. Un mécanisme tout simple a été proposé par WIELAND⁴ (Figure 3).

Das hochgereinigte Polypeptid ist am isolierten Rattenuterus in der Versuchsanordnung nach MAGNUS⁹ in Nanogramm-Mengen (0,5–10 ng/30 ml Badflüssigkeit) wirksam. Die uterusrelaxierende Aktivität¹⁰ am Meer-schweinchenuterus *in situ*¹¹ beträgt 2700–3300 URF-Einheiten/mg¹².

Summary. A highly purified polypeptide with a powerful uterus relaxing activity has been isolated from pregnant sow ovaries. The homogeneity has been checked, using various electrophoretic and chromatographic techniques.

G. GRISS, J. KECK,
R. ENGELHORN und H. TUPPY

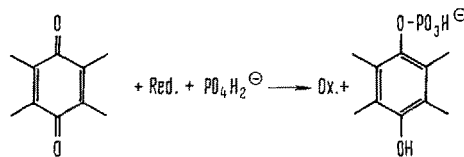
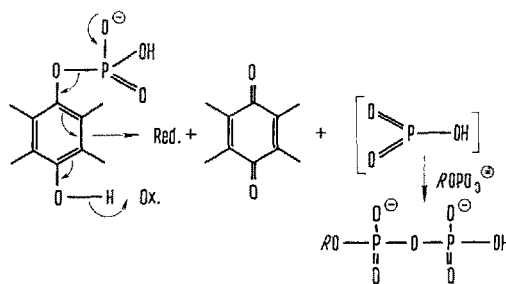
Wissenschaftliche Abteilung der Firma Dr. Karl Thomae GmbH, Biberach an der Riss (Deutschland), und Institut für Biochemie der Universität Wien (Österreich), 24. September 1962.

⁹ R. MAGNUS, Pflügers Arch. ges. Physiol. 102, 123 (1904).

¹⁰ L. C. FELTON, E. H. FRIEDEN, H. H. BRYANT, J. Pharmacol. exp. Therap. 107, 160 (1953).

¹¹ R. ENGELHORN und L. SCHMIDT, Arzneimittelforschung 6, 454 (1956).

¹² Eine ausführliche Beschreibung der Versuche wird demnächst veröffentlicht.



¹ Communication présentée au Symposium International de Chimie organique des Produits Naturels, Bruxelles (12–15 juin 1962). Résumé dans: Industrie Chimique Belge 27, 558 (1962).

² Ciba Foundation Symposium on Quinones in Electron Transport (Churchill, London 1961).

³ A. F. BRODIE, Fed. Proc. 20, 995 (1961).

⁴ TH. WIELAND et F. PATTERMANN, Chem. Ber. 92, 2917 (1959).

⁵ V. M. CLARK, D. W. HUTCHINSON, G. W. KIRBY et Sir ALEXANDER TODD, J. chem. Soc. 1961, 715.

⁶ V. M. CLARK, D. W. HUTCHINSON et Sir ALEXANDER TODD, J. chem. Soc. 1961, 722.

⁷ Sur cette Figure et les suivantes, «Ox.» et «Red.» représentent les deux formes, oxydée et réduite, d'un couple oxydo-réducteur approprié.

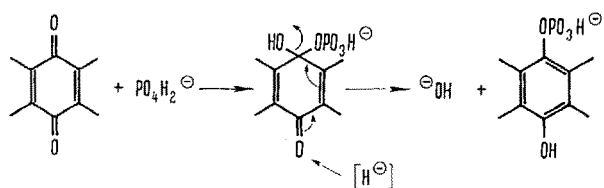


Fig. 3

CLARK et TODD⁸ font intervenir la double liaison en $\beta\gamma$ du noyau quinonique, commune aux vitamines K et aux ubiquinones (Figure 4):

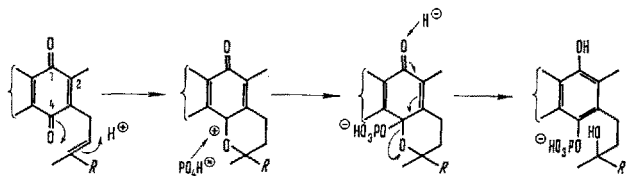


Fig. 4

Ce mécanisme met le phosphore en 4 alors que les quinol-phosphates biologiquement actifs le portent en 1, résultat qui vient d'être confirmé par BRODIE, FOLKERS et al.⁹ qui ont isolé et montré le rôle phosphorylant du phosphate de naphthochromanyle-6 (I) dans *Mycobacterium phlei*¹⁰.

CHMIELEWSKA¹¹ fait appel en outre au méthyle en 2 commun aux deux séries (Figure 5):

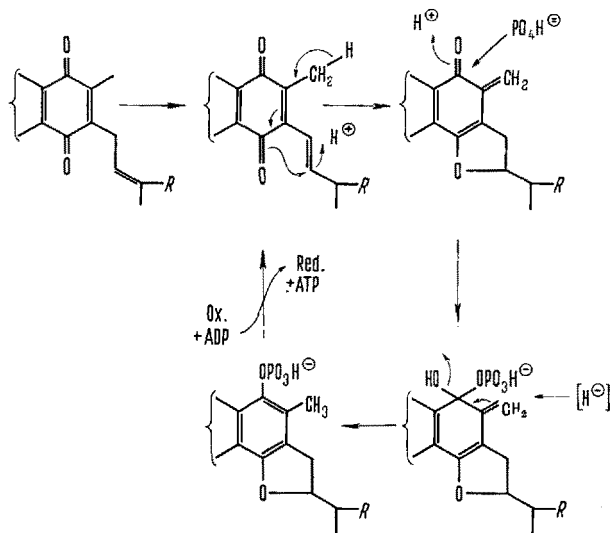


Fig. 5

Tous ces mécanismes obligent à envisager l'échange continu d'un oxygène quinonique. A l'heure actuelle rien ne permet d'affirmer qu'un tel échange a lieu ou n'a pas lieu, mais d'après ce que l'on sait de la difficulté des additions 1-2 sur le carbonyle quinonique, il paraît peu probable¹².

Nous proposons maintenant deux variantes d'un mécanisme hypothétique, également basé, comme celui de CHMIELEWSKA, sur la formation intermédiaire d'une méthylène-quinone (ou quinone-méthide) (II), mais avec un cycle pyranique plutôt que furanique, conformément à ce que l'on sait de la chimie des vitamines K et des tocophérols (Figure 6). La fixation d'acide phosphorique se ferait ensuite, non sur le carbonyle quinonique, mais en 1-4 du système conjugué méthylène-quinone en donnant le phosphate benzylque (III); une migration intramoléculaire du phosphore le place sur l'hydroxyle phénolique (IV); la ré-

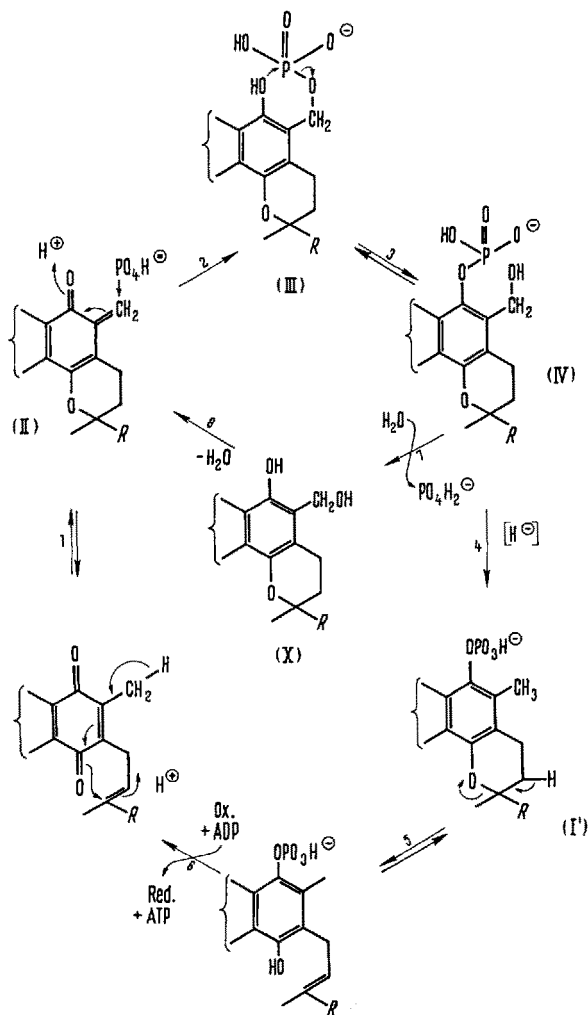


Fig. 6

duction de l'hydroxyle benzylque (réaction 4) complète le processus de formation du phosphate de chromanyle (I') dont l'ouverture de cycle et l'oxydation phosphorylante (réactions 5 et 6) redonnent la quinone de départ.

A l'appui de ce mécanisme, nous ne pouvons encore présenter que des considérations théoriques et des raisonnements par analogie:

(1) En ce qui concerne l'isomérisation quinone \rightleftharpoons méthylène-quinone (II), des calculs de différences d'enthalpie de formation des molécules ont montré que la chaîne latérale insaturée en $\beta\gamma$ du noyau apporte une aide effective à cette isomérisation¹³. En effet pour les isomérisations représentées ci-dessous, on a:

⁸ V. M. CLARK et Sir ALEXANDER TODD, dans ², p. 190.

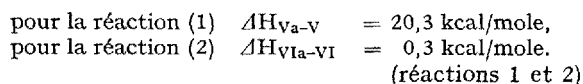
⁹ A. ASANO, A. F. BRODIE, A. F. WAGNER, P. E. WITTEICH et K. FOLKERS, Fed. Proc. 21, 54 (1962); J. biol. Chem. 237, PC 2411 (1962).

¹⁰ Le carbone 6 du chromanol (I) correspond au carbone 1 des vitamines K.

¹¹ I. CHMIELEWSKA, Biochim. biophys. Acta 39, 170 (1960).

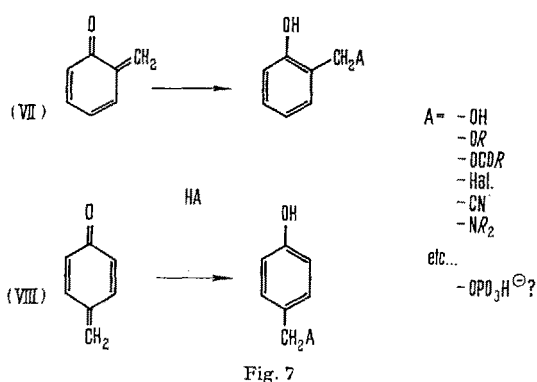
¹² Au cours d'expériences récentes de phosphorylation oxydative effectuées par M. COHN et R. LESTER avec du phosphate minéral marqué sur l'oxygène, aucune incorporation d'oxygène lourd dans le noyau quinonique n'a pu être décelée (communication personnelle du Professeur E. RACKER).

¹³ J. SERRE et M. VILKAS, résultats non publiés.



En d'autres termes, il faudrait fournir 20,3 kcal à V pour provoquer son isomérisation en la méthylène-quinone Va, alors que VI et VIa sont de stabilités sensiblement égales.

(2) Les méthylène-quinones du type *ortho*- (VII) ou *para*- (VIII) sont connues pour être des molécules très instables qui se polymérisent spontanément, donc difficiles à isoler^{14,15}. Certaines sont néanmoins suffisamment stables, au moins en solution, pour qu'on ait pu étudier leurs propriétés, et l'on a pu montrer qu'elles donnent lieu très facilement aux additions conjuguées 1-4 ou 1-6 lorsqu'on les oppose à des réactifs variés: eau, alcools, acides, amines, etc. ... (Figure 7). Il est donc plausible que l'acide phosphorique s'additionne également en 1-4, ce qui conduit à un phosphate benzylique (III).



Les deux étapes suivantes du mécanisme envisagé, à savoir la migration du phosphore en (IV) et la réduction de l'hydroxyle benzylique (réactions 3 et 4), ne semblent pas avoir d'analogie *biochimique* connu, encore qu'elles soient *chimiquement* très concevables.

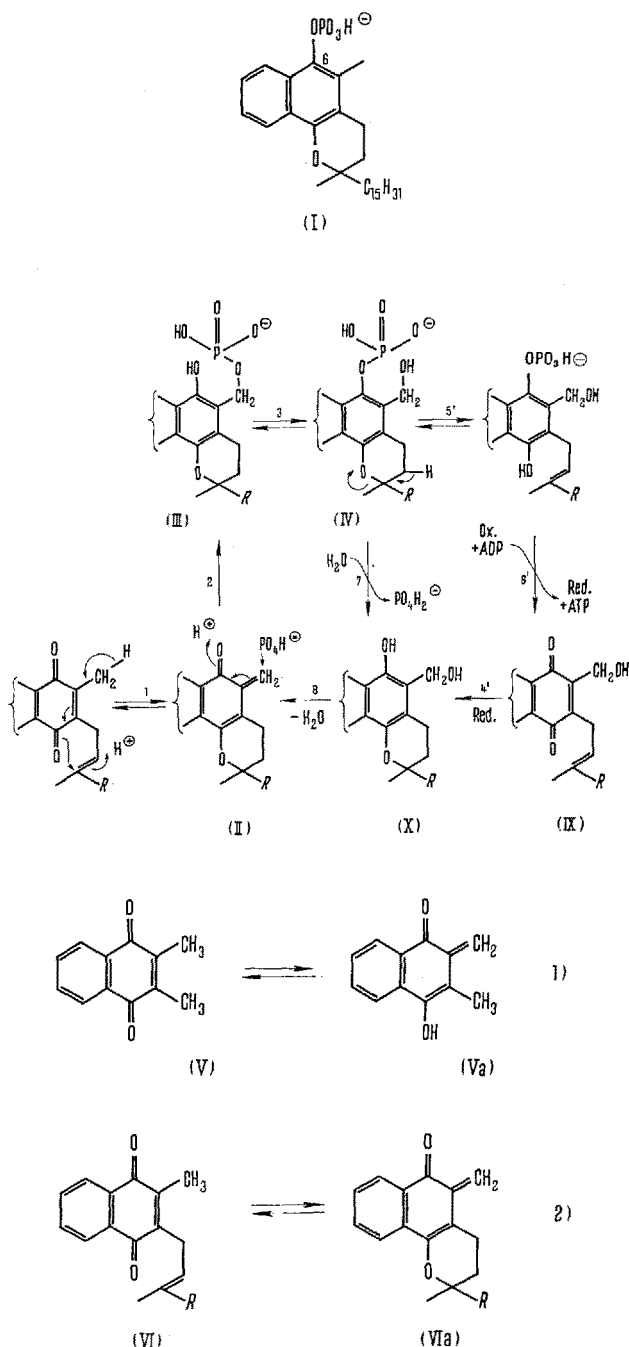
On pourrait d'ailleurs envisager un mécanisme différent, où l'étape d'oxydation phosphorylante (réaction 6') interviendrait avant la réduction de l'hydroxyle, conduisant à une hydroxyméthyl-quinone (IX) dont la réduction subséquente fournit après cyclisation un hydroxyméthyl-chromanol (X), forme hydratée de la méthylène-quinone (II), bouclant ainsi le cycle (Figure 8).

Cela suppose évidemment que la vitamine K ou l'ubiquinone jouent le rôle du composé *réduit* par l'intermédiaire de leur forme hydratée (X), la forme oxydée étant l'hydroxyméthyl-quinone (IX).

Cette deuxième hypothèse présente l'inconvénient d'exclure du cycle des transformations les phosphates de chromanyle (I') et en particulier celui de BRODIE, FOLKERS et al.⁹ puisqu'aucun intermédiaire ne s'y trouve à un niveau d'oxydation inférieur à celui de la quinone. Ce phosphate n'étant, très probablement, pas un artefact, le premier mécanisme envisagé (Figure 6) est donc plus vraisemblable, sans qu'il faille pour autant rejeter complètement le second (Figure 8).

La formation supposée du phosphate benzylique (III) et son isomérisation en un phosphate d'hydroxyméthyl-5-chromanyle-6 (IV), communes aux deux variantes, offrent en outre une explication plausible de l'échange d'oxygène intense entre le phosphate minéral et l'eau qui accompagne la phosphorylation oxydative^{16,17}. Le phosphate (IV) pourrait s'hydrolyser avec coupure de la liaison P-O phénolique en donnant directement (X) par une réaction (7)

concurrente, soit à la réduction en (I') (Figure 6), soit à l'oxydation en (IX) (Figure 8). Puisque cet échange s'effectue à une vitesse 5 à 30 fois supérieure à la vitesse de formation de l'ATP¹⁷, le cycle hydrolytique des réactions 2-3-7-8 serait parcouru 5 à 30 fois pour un seul parcours du



¹⁴ K. HULTZSCH, *Angew. Chem.* 60, 179 (1948).

¹⁵ R. W. MARTIN, *The Chemistry of Phenolic Resins* (John Wiley, New-York 1956), p. 139.

¹⁶ Voir p. ex. E. RACKER, in *Adv. Enzymol.* 23, 323 (1961).

¹⁷ P. C. CHAN, A. L. LEHNINGER et TH. ENNS, *J. Biol. Chem.* 235, 1790 (1960).

cycle oxydo-réducteur et phosphorylant des réactions 2-3-4-5-6-1 (Figure 6) ou 2-3-5'-6'-4'-8 (Figure 8).

Quoi qu'il en soit et pour nous résumer, la nouveauté essentielle de ces mécanismes hypothétiques réside en l'addition 1-4 d'acide phosphorique à la méthylène-quinone postulée par CHMIELEWSKA¹¹ suivie d'une migration du phosphore sur l'oxygène phénolique. Cette façon de voir, qui tient également compte du fait que le méthyle en 2¹⁸ et la double liaison de la chaîne latérale semblent essentielles pour la phosphorylation³, permet d'interpréter la formation d'un phosphate d'hydroquinone à partir du phosphate minéral sans incorporation dans le noyau quinonique d'oxygène venant du milieu^{19, 20}.

Summary. Two possible mechanisms for oxidative phosphorylation are suggested, based on participation of quinones in the process.

Both of them postulate the 1-4 addition of inorganic phosphate on a reactive quinone isomer (the quinone-methide II) without exchange of the quinone oxygen

atoms. They also account for the P_1 - $^{18}OH_2$ exchange observed during oxidative phosphorylation.

M. VILKAS et E. LEDERER

Laboratoire de Chimie de l'Ecole Normale Supérieure, Paris, et Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences de l'Université de Paris (France), le 23 juillet 1962.

¹⁸ La plastoquinone est dépourvue de méthyle en 2. Si elle participe aux phosphorylations oxydatives, ce qui ne semble pas encore prouvé avec certitude, elle le fait par un mécanisme différent de ceux envisagés ici pour les méthyl-2 quinones, à moins que le méthyle en 6 puisse jouer le même rôle que celui qui manque en 2.

¹⁹ Nous remercions les Collègues qui ont bien voulu discuter de ce problème avec nous, qu'ils partagent ou non notre point de vue: E. RACKER, Mlle B. TCHOUBAR, Lord TODD et R. B. WOODWARD.

²⁰ Dans deux ouvrages récents L. L. INGRAHAM, *Biochemical Mechanisms* (John Wiley, 1962), p. 47 et E. M. KOSOWER, *Molecular Biochemistry* (McGraw Hill, 1962), p. 21, les auteurs envisagent une estérification directe par l'anion phosphate (éventuellement complexé par Mg^{++}) de l'anion d'une hydroquinone ou d'une semi-quinone, donc sans échange de l'oxygène quinonique.

The Complete Structure and Relative and Absolute Configuration of Anhydroryanodine

In a recent preliminary note¹, it has been shown that anhydroryanodol must be represented by one of the structures I, II, and III in which the carboxyl is lactonized to an unspecified hydroxyl group. We now wish to extend the argument and propose the complete structure, configuration, and absolute configuration IV for anhydroryanodine, the dehydration product of ryanodine, easily obtainable either on sublimation or acid treatment of the latter compound². A second possibility which is not in accord with part of our evidence but cannot, at the present time, be excluded rigorously, is represented in V.

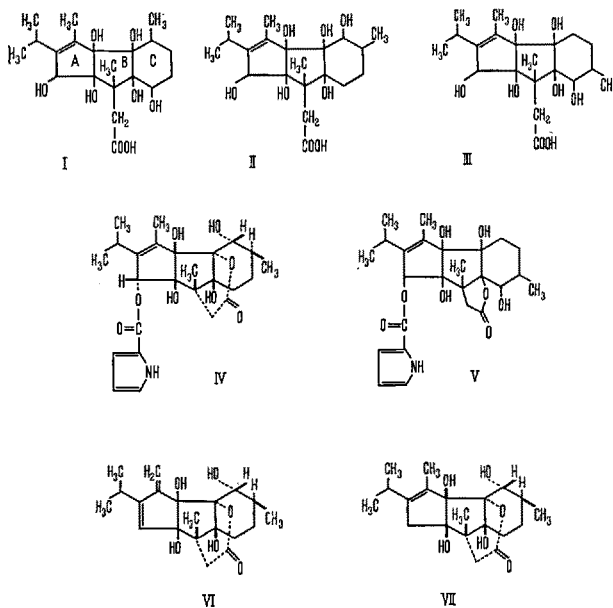
The location of the pyrrole- α -carboxylic acid residue in anhydroryanodine was determined as follows: Anhydroryanodine was acetylated with acetic anhydride-perchloric acid at $-10^\circ C$. This reaction gave a crystalline product, $C_{31}H_{37}O_{10}N$ (m.p. $259^\circ C$; IR 1735, 1675 cm^{-1} ; UV, $\lambda_{max} = 275 m\mu$ ($\epsilon = 17250$), 224 $m\mu$ ($\epsilon = 27000$), shoulder 250 $m\mu$ ($\epsilon = 11600$); UV (0.01 M alcoholic KOH), $\lambda_{max} = 310 m\mu$ ($\epsilon = 19200$), 251 $m\mu$ ($\epsilon = 18800$)). The analysis indicates that the product is an *ortho*-acetate diacetate. The ultraviolet spectrum shows clearly that one of the acetyl groups has entered the pyrrole nucleus, presumably in the 4 or 5 position. The same chromophore may be obtained if the identical acetylation procedure is applied to methyl pyrrole- α -carboxylate.

Since this chromophore forms an anion in alkaline solution (as shown by the UV-spectra), it was decided to methylate it with diazomethane in order to convert it into a nondissociating group; this should then be amenable to a differential saponification under mild conditions. This expectation was indeed fulfilled; the alkaline hydrolysis of the uncharacterized methylated product yielded the previously described¹ anhydroryanodol *ortho*-acetate monoacetate (VIII), which has been shown¹ to possess a free allylic hydroxyl in ring A. It is now clear that this hydroxyl must have been the site of attachment of the pyrrole- α -carboxylic acid residue.

For the further development of the anhydroryanodine structure, the bis-anhydro series is of importance. Bis-

anhydroryanodol, $C_{20}H_{28}O_6$, (VI) (m.p. $235^\circ C$; IR, 1725, 1637, 1618 cm^{-1} ; UV, $\lambda_{max} = 235.5 m\mu$ ($\log \epsilon = 4.17$)) may be obtained by treating ryanodol at 90° with 20% sulphuric acid. It is also, in addition to anhydroryanodine, one of the chief products isolated from a high vacuum sublimation of ryanodine.

Compound VI gave formaldehyde on ozonolysis and consumed one mole of periodic acid. Hydrogenation gave the dihydroderivative VII ($C_{20}H_{30}O_6$, m.p. $204^\circ C$; IR, 1725 cm^{-1} ; UV, end absorption). The N.M.R. spectra of VI and VII are in agreement with the proposed location of the double bonds. Both compounds VI and VII yield the



¹ Z. VALENTA and K. WIESNER et al., *Exper.* 18, 111 (1962).

² R. B. KELLY, D. J. WHITTINGHAM, and K. WIESNER, *Can. J. Chem.* 29, 905 (1951).