



**HAL**  
open science

## Interaction des 2',3'-dialdéhydes adénine nucléotides avec l'ATPase des mitochondries de coeur de boeuf.

Dirce Fernandes de Melo

► **To cite this version:**

Dirce Fernandes de Melo. Interaction des 2',3'-dialdéhydes adénine nucléotides avec l'ATPase des mitochondries de coeur de boeuf.. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1982. Français. NNT: . tel-00367970

**HAL Id: tel-00367970**

**<https://theses.hal.science/tel-00367970>**

Submitted on 13 Mar 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

*présentée à*

L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE  
DE GRENOBLE

*pour obtenir le titre de*

DOCTEUR DE 3<sup>me</sup> CYCLE

(BIOLOGIE CELLULAIRE)

*par*

**Dirce FERNANDES DE MELO**

---

**INTERACTION DES 2', 3' - DIALDEHYDES ADENINE NUCLEOTIDES  
AVEC L'ATPase DES MITOCHONDRIES DE CŒUR DE BŒUF**

---

*Soutenue le 12 Janvier 1982, devant la Commission d'Examen*

MM. R. DOUCE *Président*

R. MACHE  
M. SATRE  
P. V. VIGNAIS } *Examineurs*

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biochimie (Département de Recherche Fondamentale) du Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, sous la direction de Monsieur VIGNAIS. Je tiens à le remercier de m'avoir accueillie dans son laboratoire et je lui en suis reconnaissante.

Je remercie Monsieur DOUCE d'avoir bien voulu accepter la présidence du Jury de cette thèse et Monsieur MACHE d'être parmi les membres du Jury.

Je désire remercier Michel SATRE qui m'a fait bénéficier de ses connaissances dans ce domaine de recherche.

J'adresse mes remerciements à Mireille BOF, Christine MEYER, Gérard KLEIN, Joël LUNARDI, Richard POUCEOIS, René CESARINI, Jeannine BOURNET et Madame DZAMOUZAKIS pour leur disponibilité à mon égard et leur amicale collaboration.

Je veux également exprimer ma reconnaissance à Maria da Guia SILVA LI chef du "Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará", qui m'a permis de réaliser cette thèse et qui a suivi ce travail avec une attention constante.

Je remercie la "Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior" (CAPES), l'organisme brésilien, qui m'a accordé une bourse pour l'exécution de ce travail.

## SOMMAIRE

	Pages
ABREVIATIONS	
RESUME	1
INTRODUCTION	4
CHAPITRE I : MATÉRIEL ET MÉTHODES	12
-----	
I.A. PREPARATIONS BIOLOGIQUES	13
I.A.1. Isolement des mitochondries de coeur de boeuf	13
I.A.2. Isolement de l'ATPase-F <sub>1</sub> des mitochondries de coeur de boeuf	14
a/ Purification de F <sub>1</sub> par la technique de Vogel	14
b/ Purification de F <sub>1</sub> par la technique de Knowles et Penefsky	16
I.A.3. Synthèse des dialdéhyde nucléotides	20
a/ Synthèse des dial-nucléotides non radioactifs	20
b/ Synthèse du dial-nucléotide radioactif	21
c/ Pureté des dial-nucléotides	22
I.B. PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES	24
I.B.1. Dosage des protéines	24
a/ Méthode du "biuret"	24
b/ Méthode de Bradford	24
I.B.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS	25
I.B.3. Mesure de la radioactivité par scintillation en milieu liquide	26
I.B.4. Dosage de l'activité ATPasique	27
a/ Mesure du phosphate libéré	27
b/ Dosage de l'ATPase par réaction enzymatique couplée	28
I.B.5. Mesure de fluorescence de l'aurovertine	29
I.B.6. Technique de centrifugation-filtration	29

CHAPITRE II : CINÉTIQUE D'INACTIVATION DE L'ATPase-F <sub>1</sub> ----- PAR LES DIALDÉHYDE-NUCLÉOTIDES -----	31
II.A. INTRODUCTION	32
II.B. HYDROLYSE DU DIAL-ATP PAR F <sub>1</sub>	33
II.C. CINÉTIQUE D'INACTIVATION PAR LES DIAL-NUCLÉOTIDES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION	33
II.D. CINÉTIQUE D'INACTIVATION PAR LES DIAL-NUCLÉOTIDES EN FONCTION DU pH	45
CHAPITRE III : FIXATION DU ( <sup>14</sup> C) DIAL-ADP SUR L'ATPase-F <sub>1</sub> , ----- PROTECTION PAR LES ADÉNINE NUCLÉOTIDES -----	51
III.A. INTRODUCTION	52
III.B. INACTIVATION PAR LE DIAL-ADP : PROTECTION PAR L'ADP ET L'ATP	52
III.C. STOECHIOMETRIE DE LA FIXATION DE ( <sup>14</sup> C) DIAL-ADP	52
III.D. MESURE DE LA FLUORESCENCE DE L'AUROVERTINE D EN PRESENCE DE L'ATPase-F <sub>1</sub> MODIFIÉE PAR LE DIAL-ADP	56
III.E. LOCALISATION DU ( <sup>14</sup> C) DIAL-ADP DANS LES SOUS- UNITES DE L'ATPase-F <sub>1</sub>	60
III.F. FIXATION DE ( <sup>14</sup> C) ADP SUR L'ATPase-F <sub>1</sub> INACTIVÉE PAR LE DIAL-ADP	60
DISCUSSION ET CONCLUSION	66
BIBLIOGRAPHIE	73

## ABREVIATIONS

AMP, ADP, ATP	: adénosine-5'-mono, di, triphosphate
ATPase-F <sub>1</sub>	: adénosine-5'-triphosphatase (EC 3.6.1.3.), facteur de couplage de mitochondrie
BSA	: sérum albumine de boeuf
cpm	: coups par minute
dpm	: désintégrations par minute
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
MOPS	: acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
PCA	: acide perchlorique
P <sub>i</sub>	: orthophosphate
p/v	: poids/volume
rpm	: rotations par minute
SDS	: dodécyl sulfate de sodium
TEA	: triéthanolamine
Tris	: tris-(hydroxyméthyl) aminométhane

RESUME

Dans ce travail, l'étude des sites de fixation des nucléotides sur l'ATPase mitochondriale de coeur de boeuf a été effectuée en utilisant des analogues des adénine nucléotides capables de se lier de façon covalente à l'enzyme : les 2', 3' dialdéhydes adénine nucléotides (dial-nucléotides). Une bonne connaissance des sites de fixation des nucléotides est nécessaire pour comprendre le mécanisme de l'ATPase.

Les dial-ATP, dial-ADP et dial-AMP ont été obtenus à partir d'ATP, ADP et AMP respectivement, par coupure oxydative avec le periodate de sodium, au niveau des hydroxyles 2', 3' vicinaux du cycle du ribose. Les fonctions aldéhydiques créées peuvent réagir avec les groupes aminés comme les  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de la lysine en établissant une liaison imine (base de Schiff). Le dial-ATP est capable d'être hydrolysé par l'ATPase (facteur F<sub>1</sub>). Par comparaison avec l'ATP lui-même, le K<sub>m</sub> est peu modifié alors que la vitesse maximale d'hydrolyse du dial-ATP est environ 50 fois plus faible que celle de l'ATP. L'activité ATPasique de F<sub>1</sub> est inactivée par la mise en incubation avec le dial-ATP, le dial-ADP ou le dial-AMP. Dans tous les cas, le taux d'inactivation augmente en fonction du temps et de la concentration des dial-nucléotides. L'analyse des cinétiques d'inactivation montre que l'inactivation complète de l'enzyme nécessite la réaction de 1 mole de dial-nucléotide par site actif de F<sub>1</sub>, sauf pour le dial-ATP en présence de magnésium (0,6 mole/site actif). Cependant, compte-tenu du fait que le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> peut être hydrolysé, les cinétiques d'inactivation par le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> correspondent à l'effet propre du dial-ATP auquel se rajoutent les effets du dial-ADP produit par hydrolyse. L'ordre croissant d'efficacité des dérivés est dial-ATP, dial-AMP et dial-ADP.

L'inactivation par les dial-nucléotides est dépendante du pH. Elle est plus rapide aux pH alcalins en accord avec le fait que plus le milieu est basique, plus le groupe amine est sous sa forme -NH<sub>2</sub>, nécessaire à la réaction avec le groupe aldéhydique.

Les expériences cinétiques ont été complétées par une étude plus détaillée des effets du dial-ADP, le dérivé le plus efficace pour l'inactivation de F<sub>1</sub>. Une approche a été l'utilisation de l'aurovertine, un inhibiteur de l'ATPase qui se fixe sur F<sub>1</sub> et qui voit alors son intensité de fluorescence



modulée par la fixation de l'ADP sur un site régulateur de forte affinité et par la fixation de l'ATP sur le site catalytique d'affinité plus faible. L'augmentation de fluorescence du complexe  $F_1$ -aurovertine consécutive à une addition d'ADP n'est pas modifiée quand  $F_1$  est préalablement inactivée par le dial-ADP. Par contre, la diminution de fluorescence provoquée par l'ATP est réduite proportionnellement au degré d'inactivation. Cette expérience suggère que l'inactivation par le dial-ADP n'affecte pas le site régulateur de fixation de l'ADP, mais bloque le site catalytique de l'enzyme. Ceci est confirmé par la mesure de la fixation non-covalente du ( $^{14}C$ ) ADP sans doute sur les sites régulateurs d'affinité élevée. Cette fixation est de 3 moles ( $^{14}C$ ) ADP par mole de  $F_1$  dans un milieu contenant du magnésium et de 2 moles de ( $^{14}C$ ) ADP par mole de  $F_1$  en présence d'EDTA. L'ATPase préalablement inactivée par le dial-ADP ne montre aucune modification de la fixation du ( $^{14}C$ ) ADP.

L'ATPase totalement inactivée par le ( $^{14}C$ ) dial-ADP incorpore environ 11 moles de ( $^{14}C$ ) dial-ADP par mole de  $F_1$  qui se localisent sur les sous-unités majeures de l'ATPase. En réalisant le marquage en présence d'un excès d'ATP, il est possible d'en protéger environ 3 qui doivent correspondre à des sites spécifiques; les 8 sites supplémentaires ne sont vraisemblablement pas spécifiques et peuvent correspondre à des lysines réactives non situées dans le site de fixation des nucléotides.

Ce travail a montré que les dial adénine nucléotides inactivent efficacement l'ATPase- $F_1$  des mitochondries de coeur de boeuf. Cependant, ils s'avèrent potentiellement moins intéressants que d'autres analogues comme les arylazydonucléotides, par exemple. Le manque de sélectivité des dial-nucléotides, qui n'avait pas été observé pour d'autres enzymes, limitera leur emploi dans l'étude de l'ATPase- $F_1$ . Une application possible est le blocage des sites catalytiques de  $F_1$  sans affecter les sites régulateurs de forte affinité.

INTRODUCTION

Les cellules vivantes ont besoin d'énergie pour développer leurs activités. Dans le métabolisme aérobie, cette énergie provient principalement de la phosphorylation oxydative, qui est le processus de synthèse d'ATP couplée à la respiration cellulaire. Pendant la respiration cellulaire, il y a un transport d'électrons et de protons provenant des intermédiaires du cycle de Krebs ou bien d'autres voies métaboliques, à travers une chaîne constituée de cofacteurs enzymatiques jusqu'à l'oxygène moléculaire. L'énergie libérée lors de ces réactions d'oxydo-réduction est en partie récupérée par synthèse d'ATP ( $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ ). Par hydrolyse, cette énergie est ultérieurement restituée pour exécuter d'autres travaux dans la cellule.

Dans les mitochondries, l'enzyme ATPase/ATP synthétase qui catalyse l'hydrolyse ou la synthèse de l'ATP est associée à la membrane interne. De même, dans les membranes cytoplasmiques des bactéries comme dans les thylakoïdes du chloroplaste sont localisées des ATPases/ATP synthétases très semblables à l'enzyme mitochondriale, tant du point de vue de leur structure que de leur fonction (Nelson, 1976 ; Downie et coll., 1979 ; Penefsky, 1979 ; Senior, 1979).

Pendant plusieurs années, le mécanisme de la phosphorylation oxydative c'est-à-dire le couplage entre le transport d'électrons et la synthèse de l'ATP a donné lieu à de nombreuses controverses (Boyer, 1977 ; Ernster, 1977 ; Mitchell, 1977 ; Racker, 1977 ; Slater, 1977). La théorie proposée par Mitchell (1961, 1966) longtemps combattue est maintenant admise, au moins dans son principe. La quasi totalité des données expérimentales s'interprète dans le cadre des hypothèses de Mitchell. Les réactions d'oxydo-réduction le long de la chaîne respiratoire s'accompagnent, au niveau d'enzymes particulières, d'une éjection de protons vers l'extérieur de la mitochondrie. Mitchell a appelé force "proton-motrice" ( $\Delta p$ ) l'ensemble du potentiel de membrane ( $\Delta \Psi$ ) et du gradient de pH ( $\Delta \text{pH}$ ) établis lors du mouvement des  $\text{H}^+$ . L'ATPase/ATP synthétase est un des systèmes qui permet la rentrée des protons à l'intérieur de la mitochondrie et par conséquent l'utilisation de l'énergie emmagasinée dans la force "proton-motrice" pour assurer la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate (fonction ATP synthétase). Une représentation schématique est montrée ci-dessous :

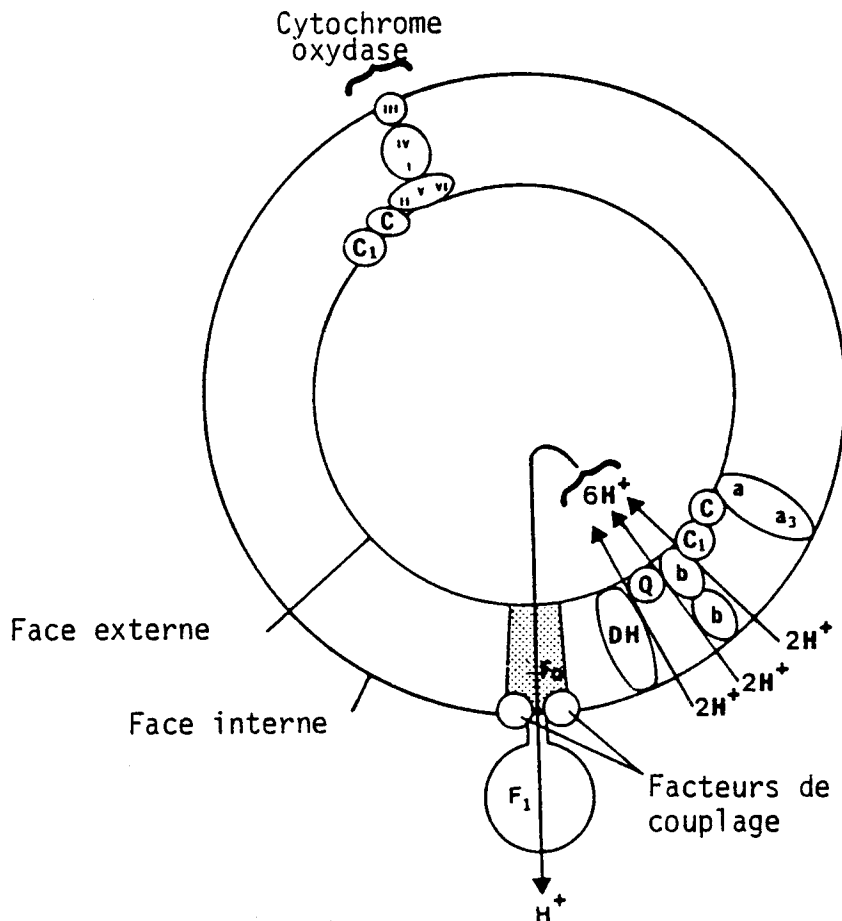


Figure 1 : Topographie des composants de la chaîne respiratoire et de l'ATPase dans une particule submitochondriale (schéma selon Racker, 1977).

Inversement, lors de la fonction ATPasique, l'hydrolyse de l'ATP par l'ATPase est associée à une éjection de protons vers l'extérieur de la mitochondrie et permet ainsi l'établissement d'une force "proton-motrice" même en l'absence de transferts d'électrons dans la chaîne respiratoire.

### COMPLEXE ATPase-F<sub>1</sub>

La compréhension des mécanismes de synthèse de l'ATP passe par la connaissance du fonctionnement catalytique de l'ATPase/ATP synthétase et de l'utilisation de la force "proton-motrice" qui est faite à son niveau.

L'ATPase/ATP synthétase est une enzyme complexe dont le poids moléculaire est voisin de 500.000 et qui comporte une partie extramembranaire appelée facteur  $F_1$  et une partie transmembranaire appelée  $F_0$ . D'autres polypeptides font aussi partie de l'enzyme mitochondriale comme les facteurs  $F_6$  et B, l'inhibiteur protéique naturel et une protéine : l'OSCP impliquée dans la réaction d'inhibition de l'ATPase par un antibiotique : l'oligomycine.

### ATPase - $F_1$

Le facteur extramembranaire : l'ATPase- $F_1$ , a été purifiée pour la première fois en 1960, à partir de mitochondries de coeur de boeuf par Pullman et coll. (1960). Le poids moléculaire de  $F_1$  est voisin de 350.000 (Knowles et Penefsky, 1972b). Sous sa forme soluble,  $F_1$  présente seulement une activité ATPasique et semble ne plus avoir la capacité de synthétiser de l'ATP. Quand  $F_1$  est examiné par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, elle présente 5 sous-unités différentes. Ces sous-unités sont identifiées dans l'ordre croissant de leur migration en gel :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$ . En plus de ces 5 sous-unités communes à toutes les préparations, un composant additionnel ayant un poids moléculaire de 10.000 qui est l'inhibiteur naturel :  $IF_1$ , a été décrit dans les mitochondries par Pullman et Monroy (1963). Les ATPases- $F_1$  ont été isolées à partir de différentes sources et leurs poids moléculaires ainsi que ceux de leurs sous-unités sont montrés sur le tableau I. La structure quaternaire de  $F_1$  est encore controversée. Deux modèles principaux de stoechiométrie ont été proposés, de type  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  ou  $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2\epsilon_2$ . Le modèle dimérique  $\alpha_2\beta_2$  a été proposé par Amzel et Pedersen (1978) après des études de diffraction de rayons X, pour  $F_1$  isolée à partir des mitochondries de foie de rat. Une stoechiométrie similaire a été trouvée par Verschoor et coll. (1977) par des expériences de fixation de l'aurovertine sur l'ATPase- $F_1$  de coeur de boeuf. L'aurovertine est une mycotoxine qui est un inhibiteur spécifique de l'ATPase (Lardy et coll., 1964). Ce même modèle a été envisagé pour l'ATPase de chloroplaste par Baird et Hammes (1976) à partir d'expériences de réticulation et par Nelson (1976) grâce à des mesures d'incorporation de ( $^{14}\text{C}$ )  $\text{CO}_2$  dans du  $\text{CF}_1$  provenant de chloroplastes de pois. Vogel et Steinhart (1976) par des expériences de dissociation/réassociation aboutissent aussi à un modèle dimérique pour l'ATPase de *E. coli*. De même, Senior (1975) d'après la mesure des groupes thiols et des ponts disulfures de  $F_1$  des mitochondries de coeur de boeuf et de ses sous-unités, conclut

à la présence de 2 sous-unités  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\epsilon$  ( $\beta$  et  $\delta$  ne contenant pas de thiols), donc un modèle de type dimérique. Par contre, à partir de l'intensité de coloration des sous-unités après électrophorèse sur gel de polyacrylamide, le modèle  $\alpha_3\beta_3$  a été proposé pour  $F_1$  isolée de mitochondrie de foie de rat (Catterall et coll., 1973) et de coeur de boeuf (Senior et Brooks, 1971). De même, Bragg et Hou (1975) et Kagawa et coll. (1976) respectivement pour  $F_1$  de *E. coli* et PS3, par incorporation d'acides aminés ( $^{14}C$ ) aboutissent à un modèle trimérique. Yoshida et coll. (1978) confirment le modèle  $\alpha_3\beta_3$  dans l'ATPase- $F_1$  de la bactérie PS3 ; en effet, ils mesurent 3 groupes SH seulement dans  $TF_1$  et ils les localisent sur les sous-unités  $\alpha$ , d'où la stoechiométrie  $\alpha_3$ .

Source	PM x 10 <sup>-3</sup>	Sous-unités (PM x 10 <sup>-3</sup> )				
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$	$\epsilon$
<b>Bactéries</b>						
BF <sub>1</sub> d' <i>E. coli</i> (Vogel et Steinhart, 1976)	340	56	52	32	21	11,5
TF <sub>1</sub> de la bactérie PS3 (Sone et coll., 1975)	380	56	53	32	15,5	11
<b>Chloroplaste</b>						
CF <sub>1</sub> d'épinard (Farron, 1970)	325	59	56	37	17,5	13
<b>Mitochondries</b>						
F <sub>1</sub> levure (Tzagoloff et Meagher, 1971)	340	58	54	38	31	12
F <sub>1</sub> de foie de rat (Lambeth et Lardy, 1971)	360	53	50	28	12,5	8
F <sub>1</sub> de coeur de porc (Godinot et coll., 1975)	394	58,7	54,7	28,6	12,7	8,7
F <sub>1</sub> de coeur de boeuf (Knowles et Penefsky, 1972b)	347	54	50	33	17	5,7

Tableau I : Poids moléculaires des ATPases- $F_1$  et de leurs sous-unités.

En dehors de la question importante de la stoechiométrie des sous-unités de l'ATPase- $F_1$ , il y a celle de la fonction de ces mêmes sous-unités. Ici un meilleur accord existe quant au rôle catalytique de la sous-unité  $\beta$  (Ferguson et coll., 1975a, b ; Esch et Allison, 1978 ; Pougeois et coll., 1979 ; Lauquin et coll., 1980),  $\alpha$  étant néanmoins nécessaire pour l'activité ATPasique (rôle régulateur). En ce qui concerne les sous-unités plus petites, la sous-unité  $\gamma$  est nécessaire pour un assemblage fonctionnel de  $\alpha$  et  $\beta$ . Les sous-unités  $\delta$  et  $\epsilon$  servent de protéines de fixation entre  $F_1$  et  $F_0$  et fonctionnent aussi dans le mécanisme de fermeture du canal de transport des  $H^+$  du secteur  $F_0$  (Kagawa et coll., 1980).

### $F_0$

Le secteur  $F_0$  est difficile à étudier en raison du caractère hydrophobe de ses composants. Il se compose d'au moins 3 sous-unités différentes. Fonctionnellement,  $F_0$  sert de canal pour le passage des protons lors du fonctionnement de l'ATPase. Hinkle et Horstman (1971) et Schipakin et coll. (1976) ont montré que des particules submitochondriales appauvries en facteur  $F_1$  devenaient perméables aux protons, et que cette perméabilité était abolie par l'addition de  $F_1$  ou d'oligomycine ou de dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), deux inhibiteurs du secteur  $F_0$  de l'ATPase. Des expériences similaires ont été décrites sur les bactéries (Altendorf et coll., 1974) et sur les chloroplastes (Mc Carty et Racker, 1967). Une seule sous-unité du secteur  $F_0$  a été caractérisée en détail à partir de  $F_0$  de différentes provenances : la protéine qui fixe le DCCD (Cattell et coll., 1971 ; Fillingame, 1975).

### ATPase- $F_1$ ET SITES DE FIXATION DES NUCLEOTIDES

L'ATPase- $F_1$  possède des sites multiples de fixation pour les nucléotides (pour revue voir Harris, 1978). Leur nombre et leur nature restent à définir avec exactitude et le tableau II regroupe des résultats de la littérature. En général, parmi les nucléotides fixés à l'ATPase on distingue des nucléotides faiblement liés ("loose") et fortement liés ("tight"). Les nucléotides faiblement liés sont échangeables rapidement avec des nucléotides ajoutés et ils peuvent s'éliminer par des précipitations successives de la protéine avec du sulfate d'ammonium ou du poly(éthylène glycol). Parmi ces nucléotides, Hilborn et Hammes (1973) ont, les premiers, défini deux classes

<u>BF<sub>1</sub></u>					
<i>S. faecalis</i>					
Abrams et coll., 1973	2	fermement liés :	1	ADP + 1	ATP
<i>A. faecalis</i>					
Adolfson et Moudrianakis, 1976	1	fermement lié :	1	ADP	
<i>E. coli</i>					
Maeda et coll., 1976	2,6	fermement liés :	0,4	ADP + 2,2	ATP
<u>CF<sub>1</sub></u>					
<i>Epinard</i>					
Harris et Slater, 1975	2	fermement liés :	1	ADP + 1	ATP
Carlier et Hammes, 1979	1	fermement lié :	1	ADP	
<u>F<sub>1</sub></u>					
<i>Coeur de boeuf</i>					
Hilborn et Hammes, 1973	2	faiblement liés			
Harris et coll., 1973	5	fermement liés :	2	ADP + 3	ATP
Garrett et Penefsky, 1975	3	fermement liés :	2	ADP + 1	ATP
Leimgruber et Senior, 1976	2	fermement liés :	2	ADP	
Harris et coll., 1977	3	fermement liés :	1	ADP + 2	ATP
Slater et coll., 1979	4	faiblement liés			
	3	fermement liés :	1	ADP + 2	ATP

Tableau II : Nucléotides présents dans les ATPases solubles isolées.

de sites de fixation : la première classe d'affinité moyenne ( $K_d = 10^{-4}M$ ) correspondrait au site catalytique de l'enzyme et la seconde classe d'affinité plus forte ( $10^{-6}M$ ) pourrait avoir un rôle régulateur. Les nucléotides fortement liés ne s'échangent pratiquement pas avec le milieu extérieur, cependant des traitements particuliers comme une chromatographie sur un gel de Sephadex en présence de glycérol (50 %) permettent d'obtenir une ATPase-F<sub>1</sub> dépourvue de nucléotides. Les nucléotides fortement liés ne participent pas directement à la catalyse, ils jouent sans doute un rôle de stabilisation de l'enzyme.

Une approche de la compréhension du mécanisme de l'hydrolyse ou de la synthèse de l'ATP consiste à identifier et caractériser les sites de fixation des substrats sur l'ATPase-F<sub>1</sub> qui catalysent ces réactions. Une des méthodes pour avoir des informations sur la topologie d'un site de fixation de la protéine est le marquage par affinité. Il consiste en l'utilisation d'un ligand analogue au vrai substrat, mais qui porte une fonction



chimique réactive, capable de se lier de manière covalente sur le site récepteur. Les analogues de nucléotides (Yount, 1975 ; Scheit, 1980) portant une fonction chimique réactive peuvent être rassemblés dans 2 grandes catégories :

- 1/ Dérivés chimiquement réactifs sans activation : par exemple, les dialdéhydes nucléotides.
- 2/ Dérivés réactifs après activation : par exemple, azido-nucléotides photo-activables.

Le groupe réactif peut être introduit sur la partie adénine, le ribose ou la chaîne phosphate. Les analogues de nucléotides qui présentent des modifications chimiques au niveau du ribose sont particulièrement intéressants, en effet des transformations de cette portion du nucléotide modifient peu la reconnaissance par l'ATPase (Russell et coll., 1976 ; Lunardi et coll., 1977).

Dans le but d'étudier les sites de fixation des adénine nucléotides sur l'ATPase-F<sub>1</sub> des mitochondries de coeur de boeuf et en tenant compte des avantages cités ci-dessus, nous avons choisi d'étudier les dérivés 2'-3' dialdéhyde (Easterbrook-Smith et coll., 1976). Ces analogues sont le produit de l'oxydation du ribose des adénine nucléotides par le periodate. La présence des groupements aldéhydiques donne une possibilité de réaction de ces dérivés avec toute lysine située dans, ou près, des sites de fixation des nucléotides, en établissant une base de Schiff.

CHAPITRE I

MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

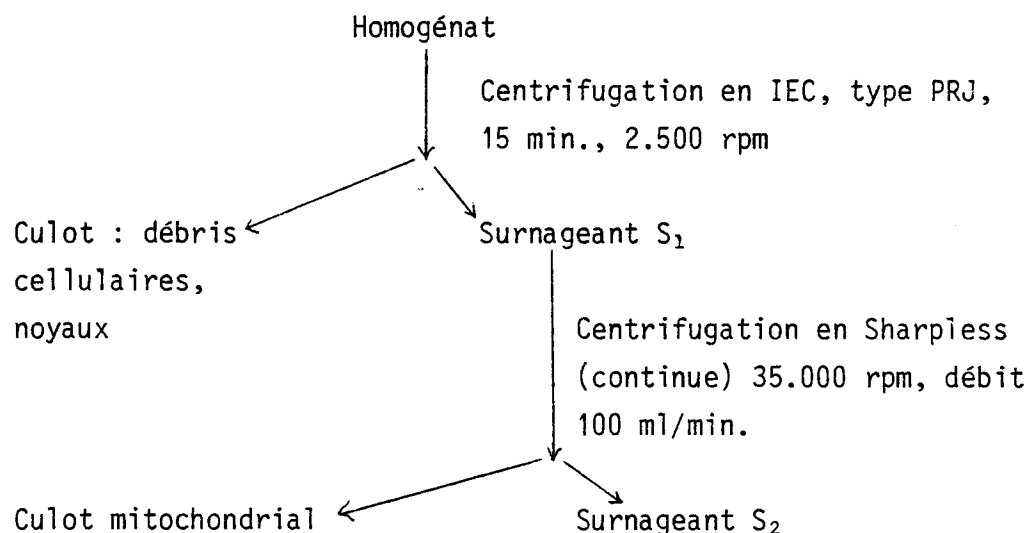
## I.A. PREPARATIONS BIOLOGIQUES

### I.A.1. Isolement des mitochondries de coeur de boeuf

La technique suivie est basée sur celle décrite par Smith (1967). Les coeurs de boeuf sont prélevés dès la mort des animaux et toutes les opérations ultérieures sont faites à 4° C.

Les coeurs sont débarrassés du tissu adipeux qui les entoure et sont découpés en petits cubes d'environ 3 cm<sup>3</sup>. Le matériel ainsi obtenu est broyé dans un hachoir (Moulinex), le broyat tombe dans une solution constituée de saccharose 0,25 M et de phosphate dipotassique 10 mM (4 litres par coeur). Un broyage plus fin est obtenu avec un "Waring Blendor" pendant 45 secondes à vitesse maximale. Le pH est ajusté à 7,4 en rajoutant environ 1/100 (v/v) de Tris-base M.

L'homogénat cellulaire obtenu est alors centrifugé pendant 15 minutes dans une centrifugeuse PR-J (I.E.C.) à 2.500 rpm. Le surnageant, filtré sur une double épaisseur de gaze hydrophile, est centrifugé en continu (centrifugeuse Sharpless) tournant à 35.000 rpm avec un débit d'environ 100 ml/min. Le culot de mitochondries est remis en suspension (homogénéisation au Potter-Elvehjem) dans une solution de saccharose 0,25 M et Tris-SO<sub>4</sub> 5 mM pH 7,4, à une concentration protéique de l'ordre de 50 mg/ml. Le rendement est de 5 à 7 g de protéines par coeur. Les mitochondries sont conservées à - 80° C. Le schéma suivant résume les différentes opérations :



### I.A.2. Isolement de l'ATPase-F<sub>1</sub> des mitochondries de coeur de boeuf

L'isolement de l'ATPase-F<sub>1</sub> a été fait suivant la technique décrite par Vogel (1979) ou bien Knowles et Penefsky (1972a).

#### a/ Purification de F<sub>1</sub> par la technique de Vogel (1979)

Cette méthode consiste en une purification en 3 étapes. Toutes les opérations sont effectuées à 4° C.

#### Etape I : détachement de l'ATPase par sonication

5 g de mitochondries sont décongelées et diluées à une concentration de 20 mg/ml dans un tampon (I) : Tris-HCl 1,0 mM, pH 8,0, EDTA 2,5 mM, ATP 1,0 mM et méthanol 20 % (v/v). La suspension obtenue est soumise aux ultrasons (Branson Sonifier B12) pendant 15 minutes à la puissance maximale et par fractions de 150 ml dans une cellule Rosette d'un volume de 250 ml. Pendant ce traitement la cellule est refroidie dans un bain eau-glace. La température atteint 30 à 35° C dans les premières 7,5 minutes et à la fin du traitement environ 50° C. Après refroidissement, le matériel est centrifugé à 105.000 g (Spinco, Rotor 30, 30.000 rpm) pendant 60 minutes et le surnageant est recueilli.

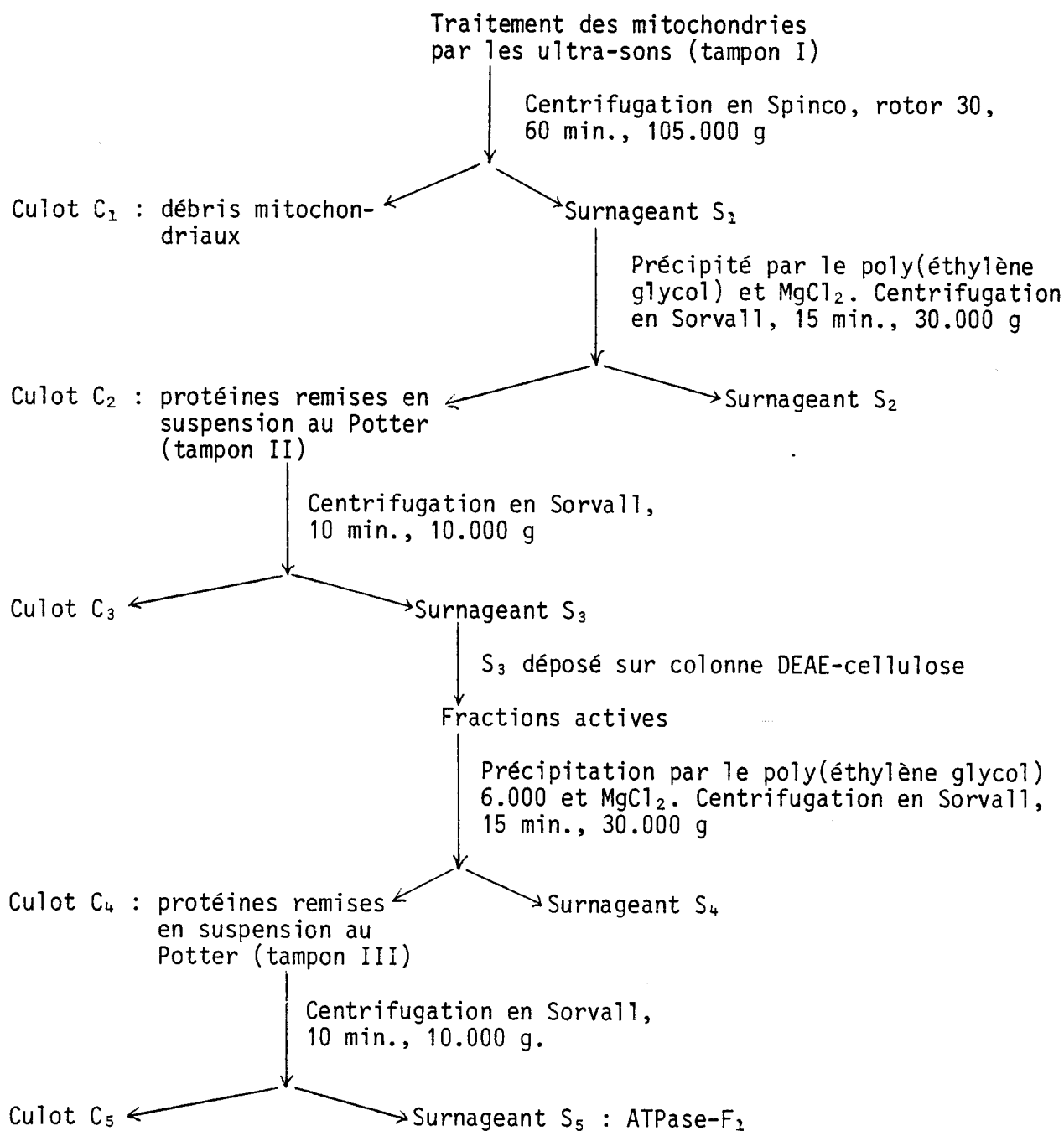
#### Etape II : précipitation par le poly(éthylène glycol)

A chaque 100 ml de surnageant jaune clair sont ajoutés doucement et en agitant 25 ml de poly(éthylène glycol) 6.000 50 % (p/p) et MgCl<sub>2</sub> à une concentration finale de 2,5 mM. Après une demi-heure, le précipité, collecté par une centrifugation de 15 minutes à 30.000 g (Sorvall), est remis en suspension dans le tampon (II) : Tris-HCl 50,0 mM, pH 8,0, 2-mercaptoéthanol 2,5 mM et méthanol 20 % (v/v). Cette suspension est clarifiée par centrifugation à 10.000 g pendant 10 minutes (Sorvall).

#### Etape III : chromatographie sur DEAE-cellulose

Le surnageant jaune de l'étape antérieure est déposé sur une colonne de DEAE-cellulose (DE-52, Whatman) (2,5 x 8,0 cm), laquelle est équilibrée avec le tampon II. La protéine est éluée par un gradient linéaire qui s'établit entre 100 ml de 0,15 M Tris-HCl pH 8,0 et 100 ml 0,5 M Tris-HCl

pH 8,0, les deux solutions contenant 2,5 mM 2-mercaptoéthanol et 20 % (v/v) méthanol. Des fractions de 4 ml sont collectées. Les fractions actives sont rassemblées et concentrées par précipitation avec le poly(éthylène glycol) 6.000 50 % (p/p) et  $MgCl_2$  2,5 mM comme à l'étape II. Le culot ainsi obtenu est remis en suspension (20 à 30 mg/ml) dans le tampon III : MOPS 50,0 mM, pH 7,5, 2-mercaptoéthanol 2,5 mM et méthanol 20 % (v/v). L'enzyme est conservée plusieurs mois congelée dans l'azote liquide. L'activité spécifique de  $F_1$  ainsi préparé est de l'ordre de 40-60  $\mu$ moles de  $P_i$  libéré par minute et par mg. 5 g de mitochondries permettent d'obtenir 70-90 mg  $F_1$ . Le schéma suivant montre les différentes étapes d'isolement de  $F_1$ .



L'ATPase ainsi produite n'est pas entièrement dépourvue d'inhibiteur d'ATPase. La figure 2 montre une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS d'une préparation de  $F_1$ . Il n'y a pas une bonne résolution entre  $\alpha$  et  $\beta$  à cause de la quantité de protéine déposée (20  $\mu\text{g}$  de protéine). On peut noter que l'ATPase contient de l'inhibiteur naturel de l'ATPase ( $IF_1$ ).

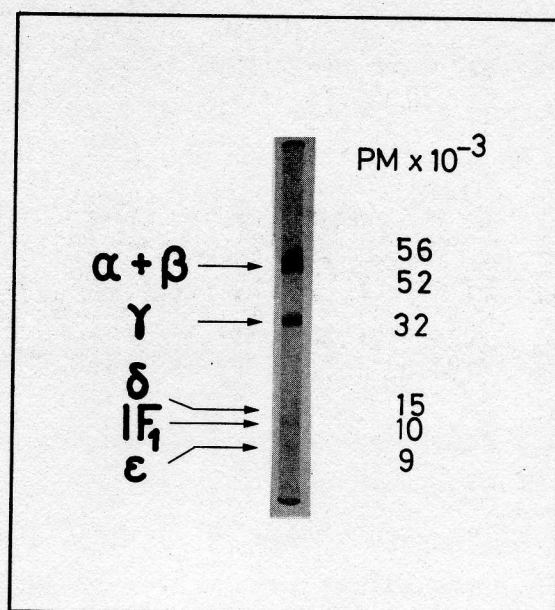


Figure 2 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, de  $F_1$  isolé suivant la méthode de Vogel (1979). La quantité de  $F_1$  analysée est de 20  $\mu\text{g}$  de protéine. La concentration des gels est de 7,5 % en polyacrylamide et la composition du tampon de migration est : Tris 25 mM - glycolle 0,19 M pH 8,4 (voir "Matériel et Méthodes").

b/ Purification de  $F_1$  par la technique de Knowles et Penefsky (1972a)

Cette méthode consiste en une purification en 5 étapes et le  $F_1$  produit est dépourvu d'inhibiteur d'ATPase.

Etape I : préparation de particules submitochondriales

5 g de mitochondries sont décongelées et diluées à une concentration de 30 mg/ml dans un tampon : Saccharose 0,25 M, Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Des fractions de 70 ml de cette suspension sont placés dans un b cher de 100 ml, lequel est refroidi dans un bain glace-eau pendant 4 minutes d'exposition aux ultrasons (Branson Sonifier B12)   la puissance maximale. Ce traitement aboutit   la rupture de la plupart des mitochondries. Les membranes rompues se referment pour former des particules submitochondriales.  $F_1$  est sur la

face externe de ces vésicules, ceci veut dire que la polarité de la membrane dans les particules est inversée par rapport à celle de mitochondries intactes. Les mitochondries entières sont éliminées par une centrifugation à 17.000 rpm pendant 15 minutes (Sorvall) à 4° C. Le surnageant, qui contient les particules submitochondriales, est centrifugé à 30.000 rpm pendant 90 minutes (Rotor 30). Les particules sont sédimentées par cette centrifugation à haute vitesse et le culot est repris dans un tampon : Saccharose 0,25 M Tris-HCl 10 mM pH 7,5, à une concentration de 20 mg/ml. Ces particules mitochondriales peuvent être conservées à - 80° C pendant plusieurs mois sans perte d'activité.

#### Etape II : détachement des protéines faiblement attachées

Les particules de l'étape antérieure sont décongelées et des fractions de 50 ml sont transférées dans un bécher de 100 ml, lequel est placé dans un bain d'eau à 25° C, et soumis pendant 50 secondes aux ultrasons, à la puissance maximale. Le matériel traité est centrifugé pendant 90 minutes à 30.000 rpm à 25° C (Rotor 30). Le culot obtenu est repris dans du saccharose 0,1 M à une concentration de 30 mg/ml.

#### Etape III : détachement de F<sub>1</sub>

A la suspension de particules sont ajoutés de l'ATP et de l'EDTA à des concentrations finales de 4 mM et 2 mM respectivement, et le pH ajusté à 9,2 avec NH<sub>4</sub>OH M. La suspension est laissée toute une nuit à température ambiante. Cette suspension, réajustée à pH 9,2 si nécessaire, est alors soumise aux ultrasons pendant 10 minutes à la puissance maximale, dans une cellule Rosette d'un volume de 150 ml, laquelle est maintenue dans un bain d'eau à 40° C. A la fin du traitement, la température de la suspension ne doit pas dépasser 50° C. Toutes les étapes ultérieures sont conduites à 25° C. La suspension est ensuite centrifugée pendant 90 minutes à 58.000 rpm dans un rotor 60 Ti (Beckman) et le surnageant jaune clair qui contient F<sub>1</sub> est recueilli.

#### Etape IV : précipitation acide

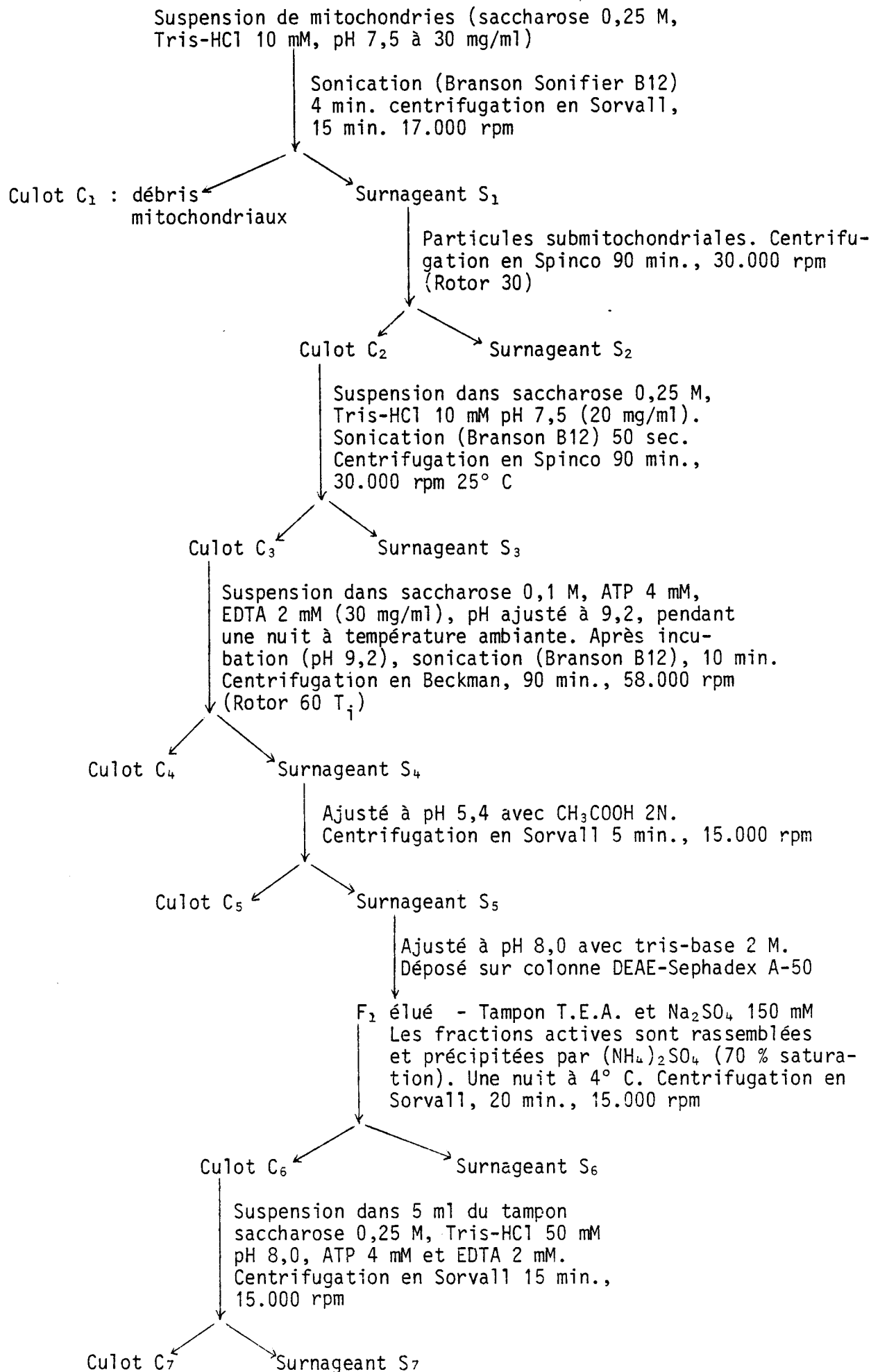
Le surnageant de l'étape antérieure est ajusté à pH 5,4 avec l'acide acétique 2 N. La solution est centrifugée à 15.000 rpm pendant

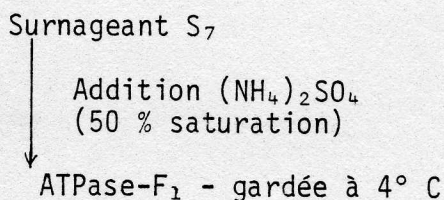
5 minutes (Sorvall - Rotor SS<sub>1</sub>). Le surnageant est recueilli et le pH ajusté à 8,0 avec une solution de Tris-base 2 M. Cette étape doit se faire en moins de 10 minutes.

Etape V : chromatographie sur DEAE-Sephadex

6 g de DEAE-Sephadex A-50 sont mis à gonfler dans un litre d'eau distillée et filtrés sur un entonnoir à verre fritté. Ensuite, le gel lavé avec 400 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 est mis dans une éprouvette de 250 ml. Le volume est ajusté à 250 ml par addition de 5 ml d'EDTA 0,1 M, 5 ml d'ATP 0,2 M, 5 ml Tris-HCl 1 M, pH 8,0 et de l'eau distillée. Le gel est dégazé et sert à couler une colonne de 5 cm de diamètre et 6 cm de haut. La colonne est lavée avec 100 ml du tampon (T.E.A.) : Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, ATP 4 mM, EDTA 2 mM. Le surnageant de l'étape antérieure est déposé sur la colonne, laquelle retient F<sub>1</sub>. La colonne est lavée d'abord par 100 ml du tampon T.E.A., puis par 400 ml du même tampon contenant Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 mM. Finalement, F<sub>1</sub> est élué par un tampon T.E.A. contenant Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 mM. L'éluat est recueilli par fractions de 5 ml. Les fractions actives sont rassemblées et du sulfate d'ammonium ajouté à une concentration finale de 70 % de saturation. La solution est laissée une nuit à 4° C. Le précipité est récolté par une centrifugation à 15.000 rpm pendant 20 minutes (Sorvall) à 4° C et repris à 20° C dans un tampon : Saccharose 0,25 M, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, ATP 4 mM, EDTA 2 mM. Cette solution est clarifiée par centrifugation à 20° C et 15.000 rpm pendant 15 minutes. Du sulfate d'ammonium est ajouté au surnageant de cette dernière centrifugation pour obtenir 50 % de saturation. La suspension de F<sub>1</sub> ainsi obtenue est stockée à 4° C. L'activité spécifique de F<sub>1</sub> est de l'ordre de 60 à 80 µmoles de P<sub>i</sub> libéré par minute et par mg. 5 g de mitochondries permettent d'obtenir de 20 à 30 mg de F<sub>1</sub>. Le schéma suivant montre les différentes étapes d'isolement de F<sub>1</sub> selon la technique de Knowles et Penefsky (1972a).







La figure 3 montre une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS de F<sub>1</sub> isolé selon la méthode de Knowles et Penefsky (1972a), ainsi que les gels correspondants aux particules de départ et à la fraction solubilisée après traitement par les ultrasons.

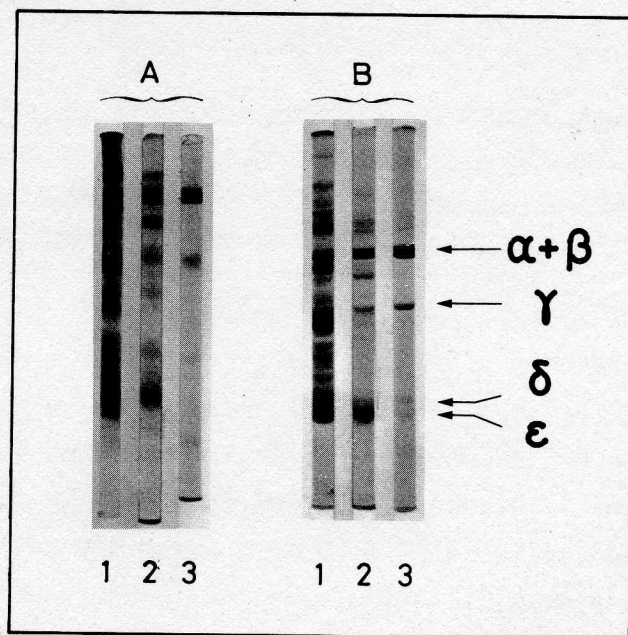


Figure 3 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS de particules submitochondriales (1), de la fraction solubilisée après passage aux ultrasons (2) et de F<sub>1</sub> (3) isolé suivant la méthode de Knowles et Penefsky (1972a).

Pour chaque gel, la quantité de protéine analysée est de 10 µg. La concentration en polyacrylamide est de 7,5 % (A) et 10 % (B) et les tampons de migration sont les suivants :

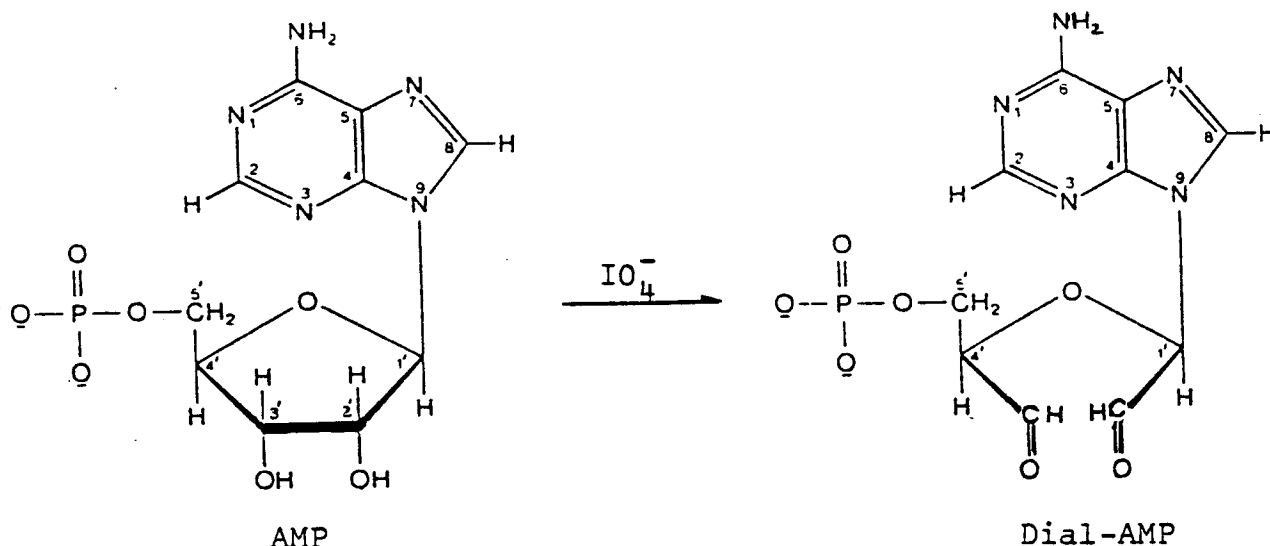
A Tampon phosphate 0,1 M, pH 7,1.

B Tris 25 mM, glycolle 0,19 M, pH 8,4.

### I.A.3. Synthèse des dialdéhydes nucléotides

#### a/ Synthèse des dial-nucléotides non radioactifs

La méthode utilisée est celle décrite par Easterbrook-Smith et coll. (1976). Elle consiste en l'oxydation des hydroxyles 2' et 3' du ribose du nucléotide par le periodate, comme montre le schéma ci-dessous, pour l'AMP :



Les nucléotides : AMP, ADP ou ATP (0,5 mmole), sont solubilisés dans l'eau distillée. Le pH est alors ajusté à 7,0 et la concentration, mesurée par spectrophotométrie, est ajustée à 0,2 M. Le coefficient d'absorption molaire utilisé pour les nucléotides est :  $\epsilon = 15.400$  à 259 nm pH 7,0. Puis du métaperiodate de sodium (0,55 mmole) est ajouté et le mélange réactionnel est incubé pendant une heure à 4° C, à l'obscurité. La réaction est arrêtée par 0,25 mmole de glycérol et la solution est déposée sur une colonne de Sephadex G10 à 4° C ( $\emptyset$  1,5 cm x 35 cm) équilibrée dans de l'eau distillée. La colonne est éluée avec l'eau distillée et des fractions de 2 ml sont recueillies. Le spectre des fractions est déterminé de 210 à 310 nm contre un témoin d'eau distillée. La concentration des dial-nucléotides est déterminée par spectrophotométrie, en mesurant l'absorbance à 259 nm et utilisant la valeur de  $15.400 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  pour le coefficient d'absorption. Seule la première moitié du pic élué est gardée et stockée à - 80° C.

*b/ Synthèse du dial-nucléotide radioactif*

L'ADP radioactif uniformément marqué par le carbone 14 ( $^{14}\text{C}$  ADP, CEA, Saclay) a été utilisé. Son activité spécifique est de 212 mCi/mmmole. Dans ces conditions 0,5 mole d'ADP est soumise à une réaction d'oxydation par 1 mole de métaperiodate de sodium. Ensuite les opérations sont les mêmes

que pour les produits non marqués. Après élution de la colonne de Sephadex G10, la radioactivité est mesurée sur des fractions de 10  $\mu$ l et seule la première moitié du pic élué est conservée à - 80° C.

c/ Pureté des dial-nucléotides

La pureté des produits est contrôlée par chromatographie ascendante sur couches minces de polyéthylèneimine cellulose (PEI-cellulose, Schleicher and Schuell FC 1440).

On utilise deux différents systèmes de solvants, KP<sub>i</sub> 0,75 M, pH 3,5 et HCOOH 1,9 M-LiCl 0,1 M. Les dial-nucléotides qui réagissent avec la PEI-cellulose sont réduits préalablement, en présence d'un excès de 10 fois de KBH<sub>4</sub>. La figure 4A et B, montre une seule tache visible en lumière ultraviolette, pour les dial-nucléotides réduits par KBH<sub>4</sub> indiquant que les produits sont purs. Des chromatographies semblables avec un dépôt 10 fois plus élevé, montrent la présence de traces de produits de réduction du dial-ADP, dial-AMP et adénosine, dial-AMP et adénosine et adénosine pour le dial-ATP, dial-ADP et dial-AMP respectivement. Ces résultats sont à rapprocher aussi du fait que les dial-nucléotides peuvent perdre la chaîne phosphate comme cela avait été observé par Lowe et coll. (1979a) pour le dial-ATP.

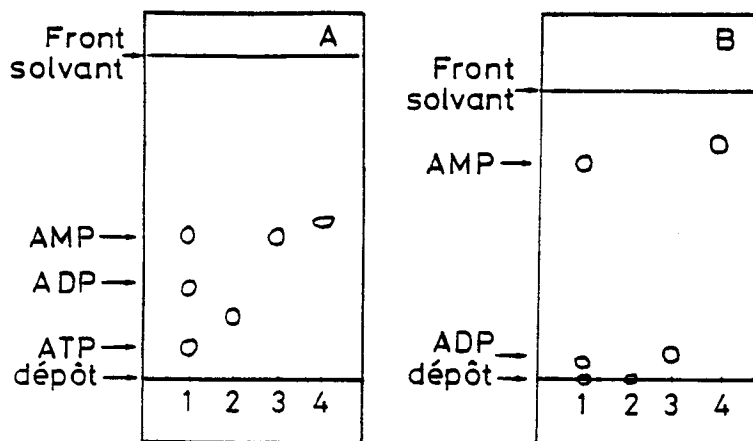


Figure 4 : Chromatographie sur couche mince de PEI-cellulose des dialdéhydes-nucléotides.

Phase de chromatographie : A) KP<sub>i</sub> 0,75 M pH 3,5

B) LiCl 0,1 M - HCOOH 1,9 M

Dépôt : 5 nmoles d'ATP, ADP, AMP (1), de dial-ATP (2), de dial-ADP (3) ou de dial-AMP (4) préalablement réduits par KBH<sub>4</sub> (voir texte).

Durée de la migration : 60 minutes.

Pour le ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP, la pureté est confirmée par chromatographie, dans les mêmes conditions, suivie par une autoradiographie. La figure 5A et B, montre les autoradiographies des chromatographies dans les deux systèmes de solvants. On voit que le ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP montre des traces de dial-AMP et adénosine et de même le ( $^{14}\text{C}$ ) ADP montre des traces de ( $^{14}\text{C}$ ) AMP. Dans tous les cas, la pureté des dial-nucléotides est supérieure à 90 %.

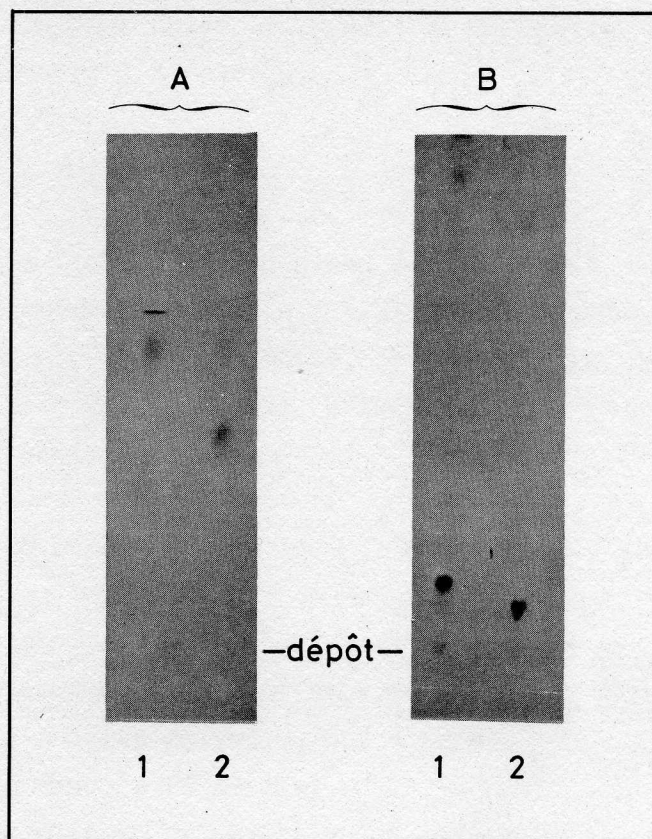


Figure 5 : Chromatographie du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP sur couche mince de PEI cellulose : autoradiographie.

Phase de chromatographie : A) KP, 0,75 M pH 3,5

B) LiCl 0,1 M - HCOOH 1,9 M

Les dépôts correspondent à 12 nmoles de ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP (1) ou de ( $^{14}\text{C}$ ) ADP (2), la durée de la migration est de 60 minutes et le temps d'exposition de l'autoradiographie est de 24 heures sur film Kodak "No-Screen".

## I.B. PRINCIPALES TECHNIQUES UTILISEES

### I.B.1. Dosage des protéines

Les dosages des protéines ont été faits suivant la méthode du biuret (Gornall et coll., 1949) ou la méthode de Bradford (1976). La méthode du biuret a été utilisée pour doser les protéines membranaires et la technique de Bradford pour mesurer l'ATPase-F<sub>1</sub>.

#### a/ Méthode du Biuret

Dans cette technique le cholate de sodium est utilisé pour solubiliser les protéines membranaires. Le sulfate de cuivre dans un milieu alcalin réagit avec les groupes peptidiques, en formant des complexes dont la couleur bleue violacée est, dans une certaine limite, proportionnelle à la concentration en protéines.

#### Mode opératoire

A une prise aliquote, contenant de 0,5 à 2 mg de protéines (20 à 100 µl), sont ajoutés successivement et avec agitation après chaque addition :

0,2 ml de cholate de sodium à 4 % (p/v)

2,5 ml de soude à 10 % (p/v)

0,3 ml de sulfate de cuivre à 1 % (p/v)

Après 15 minutes, la densité optique est mesurée à 540 nm contre un blanc des réactifs sans protéine. La concentration des protéines est estimée par rapport à une courbe étalon de sérum albumine bovine. Dans les conditions décrites ci-dessus, 1 mg de protéine a une absorbance de 0,085.

#### b/ Méthode de Bradford

Cette méthode utilise la fixation sur les protéines d'un colorant : le bleu de Coomassie G-250. Ce colorant en milieu acide et à l'état libre a une couleur rouge orangée. Cette couleur tourne au bleu quand le colorant se fixe sur les protéines, provoquant une augmentation d'absorption à 595 nm.

### Mode opératoire

A une prise aliquote, contenant de 5 à 25 µg de protéines (5 à 50 µl), sont ajoutés avec agitation 2,5 ml du réactif de Bradford, qui contient pour 1 litre de volume final : 100 mg de bleu de Coomassie, 50 ml d'éthanol à 95 %, 100 ml d'acide phosphorique à 85 % (p/v) et de l'eau distillée q.s.p. 1 litre. Après 2 minutes, la densité optique est mesurée à 595 nm contre un blanc sans protéine. La concentration des protéines est estimée par rapport à une courbe étalon de sérum albumine bovine. Dans les conditions décrites ci-dessus, 5 µg de protéines ont une absorbance de 0,105 et la courbe étalon est linéaire jusqu'à 20 µg de protéine.

#### 1.B.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS

La technique décrite par Weber et Osborn (1969) a été utilisée pour contrôler le degré de pureté de l'ATPase-F<sub>1</sub>. La séparation des protéines par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS dépend des poids moléculaires des différentes chaînes peptidiques. Il existe une relation linéaire entre le logarithme du poids moléculaire et la mobilité électrophorétique (Shapiro et coll., 1967).

### Mode opératoire

La composition des gels de polyacrylamide est la suivante :

Acrylamide	7,3 ou 9,73 % (p/v)
Bis-acrylamide	0,20 ou 0,27 % (p/v)
SDS	0,1 % (p/v)
TEMED	0,01 % (p/v)
Persulfate d'ammonium	0,05 % (p/v)
Phosphate de sodium pH 7,1	0,1 M

Le mélange est introduit dans des tubes de verre préalablement siliconés de 12 cm de hauteur et 0,6 cm de diamètre. On ajoute au sommet de la colonne de gel 100 µl de n-butanol pour obtenir une surface plane après la polymérisation, qui est achevée en 20 minutes à la température ambiante. Le tampon de migration est alors introduit dans les compartiments anodique et cathodique. La composition de ce tampon est :

Phosphate de sodium	0,1 M
SDS	0,1 % (p/v)
pH final	7,1

Les échantillons contenant de 5 à 100 µg de protéines sont au préalable dépolymérisés et réduits par incubation en présence de :

SDS	1	% (p/v)
2-mercaptoéthanol	1	% (v/v)
Glycérol	10	% (v/v)
Bleu de bromophénoï	0,05	% (p/v)

Le colorant (bleu de bromophénoï) est ajouté pour suivre le front de migration. Le volume maximal du dépôt est de 100 µl. Les échantillons sont déposés sur la surface des gels à travers le tampon de migration. La migration s'effectue pendant 18 heures en utilisant une intensité de 5 mA par gel. Un autre système d'électrophorèse a été employé dans lequel le tampon phosphate du gel et le tampon de migration sont remplacés par un tampon : Tris 25 mM, glycolle 0,19 M, pH 8,4. La migration s'effectue alors pendant 3 heures en utilisant une intensité de 2 mA par gel. Après migration, les gels sont extraits des tubes et colorés en utilisant deux bains successifs de colorant. La composition de ces solutions est pour la solution I : Alcool isopropylique 25 % (v/v), acide acétique 10 % (v/v), bleu de Coomassie R250 0,05 % (p/v) et pour la solution II : Alcool isopropylique 10 % (v/v), acide acétique 10 % (v/v) et bleu de Coomassie R250 0,005 % (p/v). Après 2 heures de coloration pour chaque solution, à la température ambiante, la décoloration des parties non protéiques s'effectue dans une solution d'acide acétique 10 % (v/v)

### I.B.3. Mesure de la radioactivité par scintillation en milieu liquide

La radioactivité est mesurée par comptage par scintillation en milieu liquide dans un compteur Intertechnique SL 30.

A chaque échantillon de volume inférieur ou égal à 1 ml, sont ajoutés 10 ml de mélange scintillant (Patterson et Greene, 1965), dont la composition est la suivante :

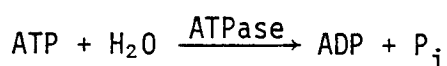


Toluène	6 litres
Triton X-100	3 litres
2,5-Diphényloxazole (PPO)	24 g
1,4-Di-(2-méthyl-5-phényloxazoly)-benzène (POPOP)	0,6 g

La quantité réelle de radioactivité d'un échantillon est déterminée en tenant compte du rendement de comptage de l'appareil. Ce rendement est déterminé par l'addition après comptage, d'un standard interne qui est du ( $^{14}\text{C}$ ) toluène dont l'activité spécifique est connue avec précision. Donc la radioactivité est exprimée en désintégrations par minute (dpm).

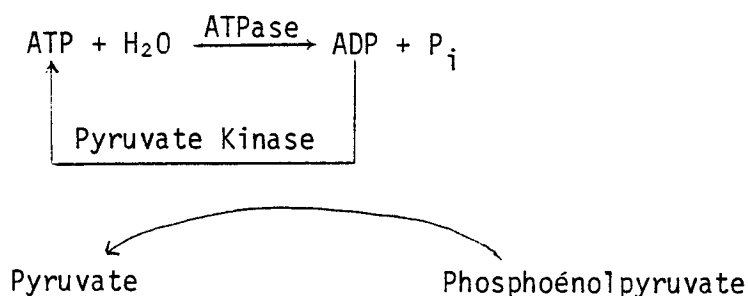
#### I.B.4. Dosage de l'activité ATPasique

L'ATPase- $F_1$  catalyse la réaction d'hydrolyse d'ATP, montrée ci-dessous :



##### a/ Mesure du phosphate libéré

La mesure de l'activité ATPasique est faite d'une façon indirecte par le dosage de l'ion  $\text{P}_i$ , puisque le nombre de moles d'ATP hydrolysées est égal au nombre de moles de phosphate inorganique libérées. Le milieu dans lequel cette activité est mesurée contient un système régénérateur d'ATP, qui permet d'avoir un niveau constant de ce nucléotide et évite l'accumulation d'ADP qui pourrait inhiber l'ATPase. Le schéma suivant montre ce système :



Le  $\text{P}_i$  libéré est déterminé par la méthode de Fiske et Subbarow (1925). Le principe de ce dosage repose sur la transformation de  $\text{P}_i$  en phosphomolybdate qui, en présence d'un agent réducteur, donne naissance à un dérivé de couleur

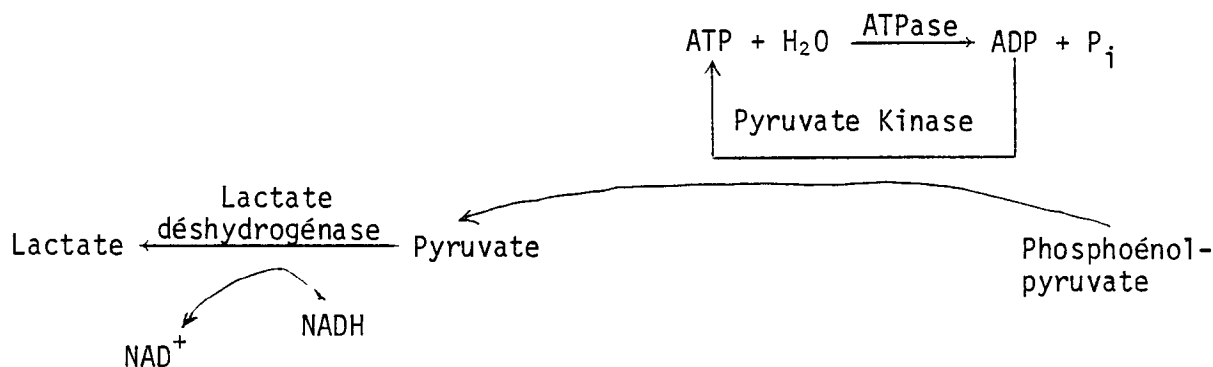
bleue absorbant à 660 nm. La mesure de l'activité ATPasique est faite à 30° C, dans un volume de 0,5 ml. La composition du milieu réactionnel est :

Tris-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 8,0	50 mM
ATP	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Pyruvate Kinase	17 µg
Phosphoénolpyruvate (sel de tricyclohexylammonium)	5 mM

La réaction débute par l'addition de l'ATPase-F<sub>1</sub> (1 à 3 µg de protéine) et est stoppée après 5 minutes par l'addition de 100 µl d'acide perchlorique 2,5 N. Ensuite sont ajoutés : 1,4 ml d'eau distillée, 250 µl d'une solution contenant du molybdate d'ammonium (6 % (p/v)) dans l'acide sulfurique 4,8 N et 250 µl d'une solution contenant du sulfate de p. méthylaminophénol (E1on) (1 % (p/v)) et du bisulfite de sodium (3 % (p/v)). La coloration se développe pendant 15 minutes à la température ambiante. La densité optique est mesurée à 660 nm contre un tube témoin sans ATPase-F<sub>1</sub>. Dans ces conditions, 250 nmoles de phosphate inorganique correspondent à une densité optique de 0,360.

*b/ Dosage de l'ATPase par réaction enzymatique couplée*

L'activité ATPasique a été aussi déterminée par test spectrophotométrique, couplant la réaction ATPasique avec une déshydrogénase à NADH. Cette méthode a été principalement utilisée quand les mesures sont faites à de faibles concentrations d'ATP. La réaction se passe à 30° C, dans un volume de 2 ml. Le milieu réactionnel comporte non seulement un système régénérateur d'ATP : phosphoénolpyruvate et pyruvate kinase, mais aussi de la lactate déshydrogénase et du NADH permettant la réduction du pyruvate en lactate.



Dans ces conditions, pour chaque mole d'ATP hydrolysée une mole de NADH est oxydée en  $\text{NAD}^+$  et on mesure la disparition de la densité optique à 340 nm. La composition de ce milieu est :

Tris-HCl	50,0 mM
Saccharose	240,0 mM
NADH	0,2 mM
$\text{MgCl}_2$	1,0 mM
Phosphoénolpyruvate	2,0 mM
Pyruvate Kinase	50,0 $\mu\text{g}$
Lactate Déshydrogénase	25,0 $\mu\text{g}$
KCl	10,0 mM
$\text{NaHCO}_3$	10,0 mM
pH final	8,0

Après addition de  $F_1$  (1 à 3  $\mu\text{g}$  de protéine), la réaction est commencée par l'addition d'ATP à la concentration requise (0,005 à 1,0 mM).

Une unité d'activité ATPasique est définie comme la quantité de protéine qui hydrolyse 1  $\mu\text{mole}$  d'ATP par minute.

L'activité spécifique est exprimée en unités par mg de protéine.

#### 1.B.5. Mesures de fluorescence de l'aurovertine

L'aurovertine D est purifiée à partir de cultures de *Calcarisporium arbuscula* (N R RL 3705) (Satre et coll., 1980). Elle est gardée à  $-20^\circ\text{C}$  en solution éthanolique, protégée de la lumière. La concentration de l'aurovertine est déterminée en utilisant un coefficient molaire de 35.100 à 368 nm. La fluorescence de l'aurovertine est mesurée à  $25^\circ\text{C}$  dans 2 ml de saccharose 0,25 M, Tris-HCl 10,0 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM pH 7,5 avec un fluorimètre Perkin-Elmer M PF 2A. La longueur d'onde d'excitation est de 365 nm et la longueur d'onde d'émission est de 470 nm.

#### 1.B.6. Technique de centrifugation-filtration

La séparation entre le ligand attaché à  $F_1$  et le ligand libre a été faite selon la technique de centrifugation associée à une filtration sur gel décrite par Penefsky (1977). Cette méthode utilise les propriétés

de tamisage des gels Sephadex. En fonction de leur taille, ils laisseront passer directement les molécules au-dessus d'un poids moléculaire déterminé mais retarderont les molécules de petite taille. Dans notre cas, nous avons utilisé le gel Sephadex G-50 (fine) qui permet le passage de  $F_1$  ou  $F_1$  + ligand associé mais par contre entraîne le piégeage du ligand libre. Du Sephadex G-50, prégonflé dans un tampon Tris- $H_2SO_4$  50 mM pH 8,0 pendant 24 heures, est introduit dans des seringues plastiques de 1 ml (type seringue à insuline) équipées avec un disque de polyéthylène poreux. La seringue placée dans un tube conique est centrifugée 2 minutes à 800 rpm dans une centrifugeuse I.E.C. Clinical équipée d'un rotor à godets basculants. Pour placer le Sephadex dans le milieu convenable, le gel est recouvert avec le tampon choisi et recentrifugé. Cette opération est répétée au moins deux fois. Puis l'échantillon, d'un volume compris entre 100 et 150  $\mu$ l est déposé au sommet de la colonne de gel essoré. Après centrifugation, l'ATPase et des ligands éventuellement associés sont recueillis dans le volume de liquide exclus de la colonne. La récupération de la protéine est supérieure à 80 %. Cette technique de centrifugation-filtration a également été utilisée pour dessaler les échantillons d'ATPase et échanger le tampon d'incubation.

CHAPITRE II

CINÉTIQUE D'INACTIVATION DE L'ATPASE-F<sub>1</sub>

---

PAR LES DIALDÉHYDE-NUCLÉOTIDES

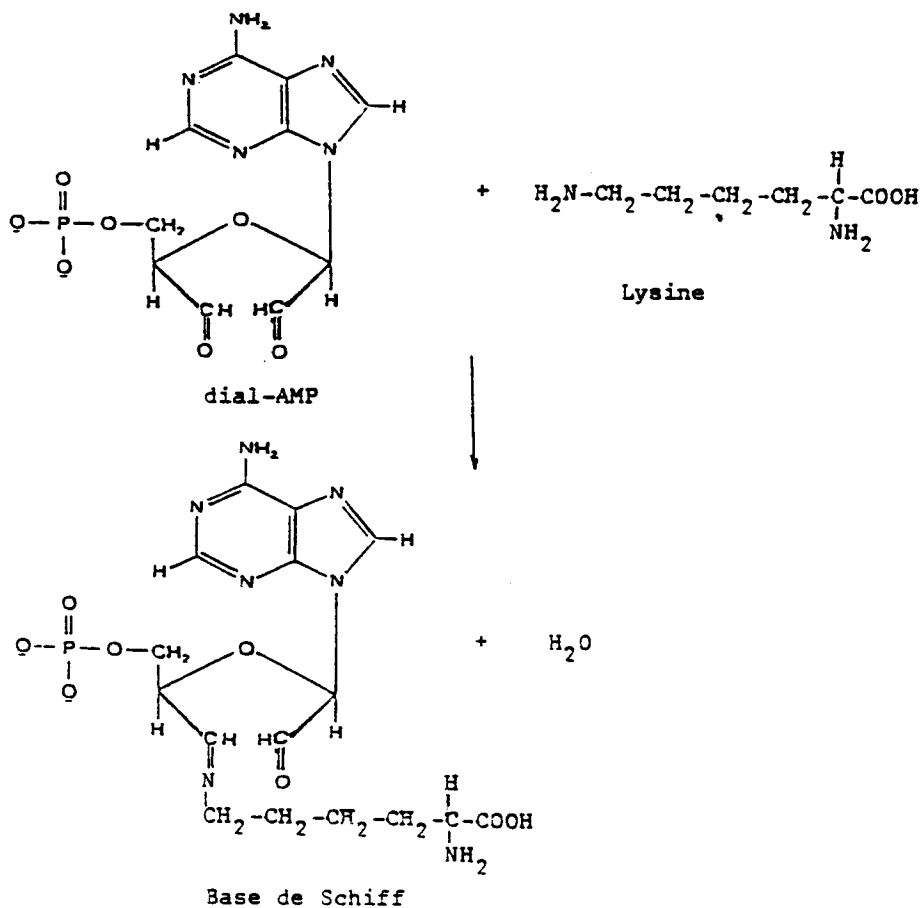
---

## II.A. INTRODUCTION

L'ATPase contient des sites de fixation des nucléotides, dont l'étude avec des marqueurs d'affinité peut apporter des informations concernant la chimie de ces sites.

Dans ce travail, nous avons utilisé comme analogues des adénine nucléotides, les dialdéhyde nucléotides, lesquels ont été considérés comme de bonnes sondes dans le cas de la pyruvate carboxylase (Easterbrook-Smith et coll., 1976), de la DNA-polymérase (Salvo et coll., 1976), des aminoacyl-tRNA synthétases (Fayat et coll., 1978 ; Hountondji et coll., 1979) ou de l'ATPase de *Mycobacterium phlei* (Kumar et coll., 1979) entre autres.

Ces analogues structuraux des nucléotides se fixent de manière covalente sur l'enzyme : une base de Schiff se forme par réaction d'un des aldéhydes du nucléotide oxydé avec un résidu  $\epsilon$ -aminé d'une lysine de la région du site de fixation comme le montre le schéma suivant dans le cas du dial-AMP.



## II.B. HYDROLYSE DU DIAL-ATP PAR $F_1$

Une preuve de la reconnaissance du site catalytique de  $F_1$  par le dial-ATP, est apportée par la mise en évidence de l'hydrolyse du dial-ATP par l'enzyme. Pour étudier l'hydrolyse du dial-ATP, la réaction a été effectuée en présence de tampon Tris qui, en établissant une base de Schiff avec le dial-nucléotide, empêche l'inactivation de l'enzyme.

Les tracés en double inverse des vitesses d'hydrolyse de l'ATP et du dial-ATP en fonction des concentrations de l'ATP et du dial-ATP sont présentés sur la figure 6 A et B. Les valeurs de la vitesse maximale d'hydrolyse ( $V_{max}$ ) et des  $K_m$  pour l'ATP et dial-ATP sont indiquées dans le tableau III. Selon ces valeurs, il apparaît que si l'affinité de  $F_1$  pour le dial-ATP n'est que peu modifiée, par contre la vitesse maximale d'hydrolyse est environ 50 fois moins rapide que celle de l'ATP-Mg<sup>++</sup>. Probablement le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> se positionne sur l'enzyme d'une façon qui ne favorise pas la réaction d'hydrolyse.

## II.C. CINETIQUE D'INACTIVATION PAR LES DIAL-NUCLEOTIDES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION

$F_1$  a été mis en incubation avec les dial-nucléotides et les mesures de l'activité ATPasique en fonction du temps sont faites comme suit : la réaction est déclenchée par l'addition de l'ATPase (20  $\mu$ g) dans des tubes qui contiennent du TEA 0,1 M pH 8,0 et des dial-nucléotides à différentes concentrations dans un volume final de 200  $\mu$ l. A des temps déterminés des fractions aliquotes de 20  $\mu$ l sont prélevées et additionnées à 480  $\mu$ l du milieu utilisé pour le dosage de l'ATPase (voir page 27). Après 5 minutes à 30°C, la réaction est arrêtée par 100  $\mu$ l d'acide perchlorique 2,5 N.

Nos résultats montrent que l'incubation de  $F_1$  avec le dial-AMP, dial-ADP, dial-ATP ou dial-ATP-Mg<sup>++</sup> aboutit à une diminution de l'activité ATPasique, laquelle dépend de la concentration des dial-nucléotides et du temps d'incubation (figures 7 et 8).

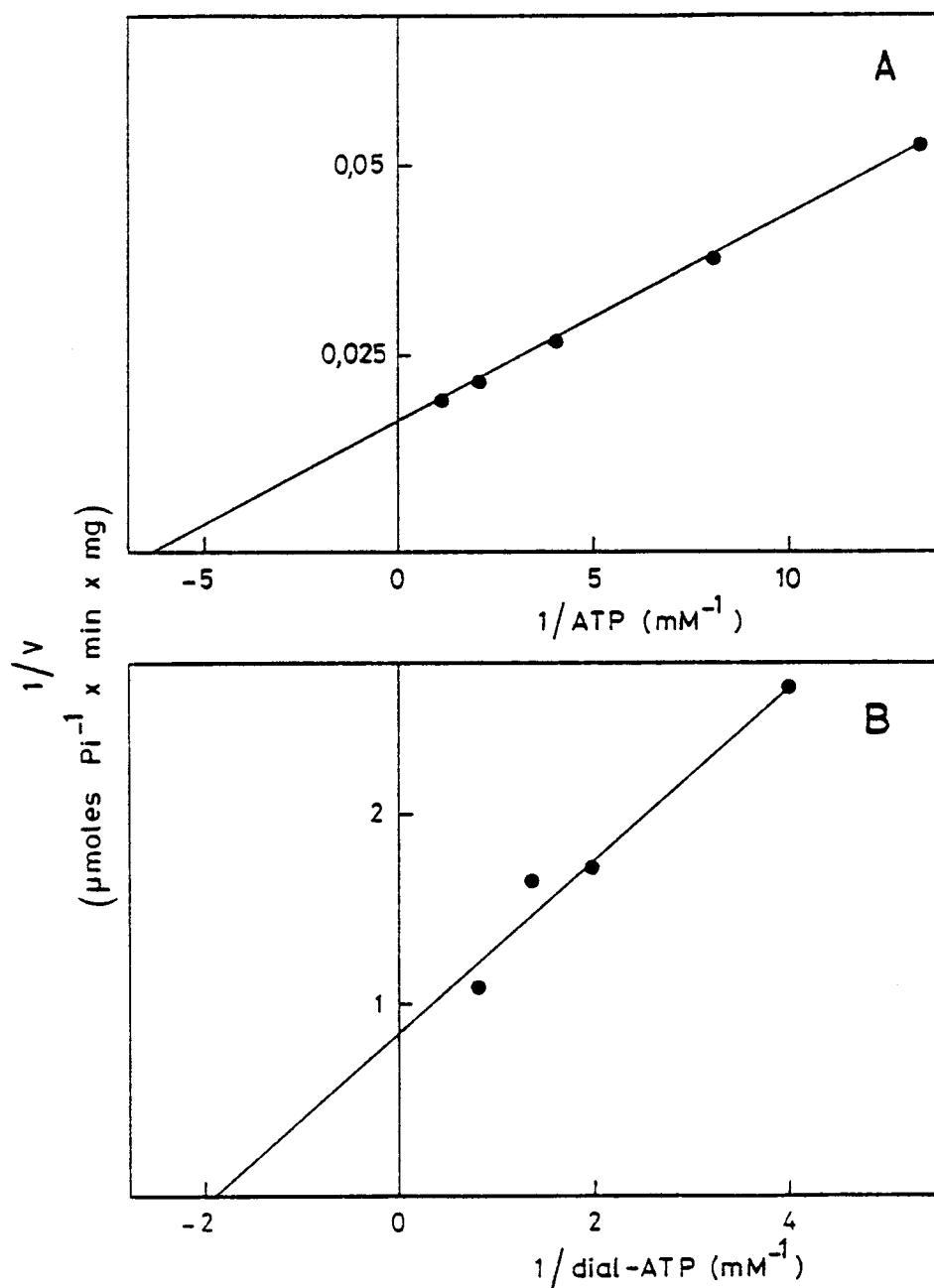


Figure 6 : Détermination de la vitesse d'hydrolyse de l'ATP (A) et du dial-ATP (B) en fonction de la concentration de l'ATP et dial-ATP - Tracés en double inverse selon Lineweaver-Burk.

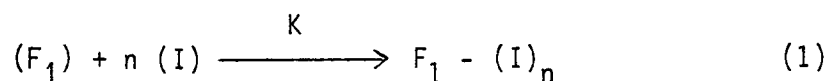
L'activité ATPasique a été mesurée spectrophotométriquement à 30°C suivant les conditions décrites dans le chapitre "Matériel et Méthodes".



	$K_m$ (mM)	$V_{(max)}$ ( $\mu$ moles/min/mg protéines)
ATP	0,16	58,80
dial-ATP	0,52	1,16

Tableau III : Paramètres cinétiques pour l'ATP et dial-ATP calculés à partir de la figure 6.

Nous pouvons supposer que l'inactivation de l'ATPase est due à la réaction de  $n$  molécules de dialdéhyde-nucléotide par site actif de  $F_1$  selon l'équation ci-dessous :



La vitesse d'inactivation est donc :

$$\frac{-d(F_1)}{dt} = K (F_1) (I)^n \quad (2)$$

où :

$(F_1)$  est la concentration des sites catalytiques de  $F_1$  ;

$n$  est le nombre de molécules de dial-nucléotide réagissant par site actif ;

$(I)$  est la concentration du dial-nucléotide libre ;

$K$  est la constante de vitesse ;

$F_1 - (I)_n$  est le complexe  $F_1$ -dial-nucléotide inactif.

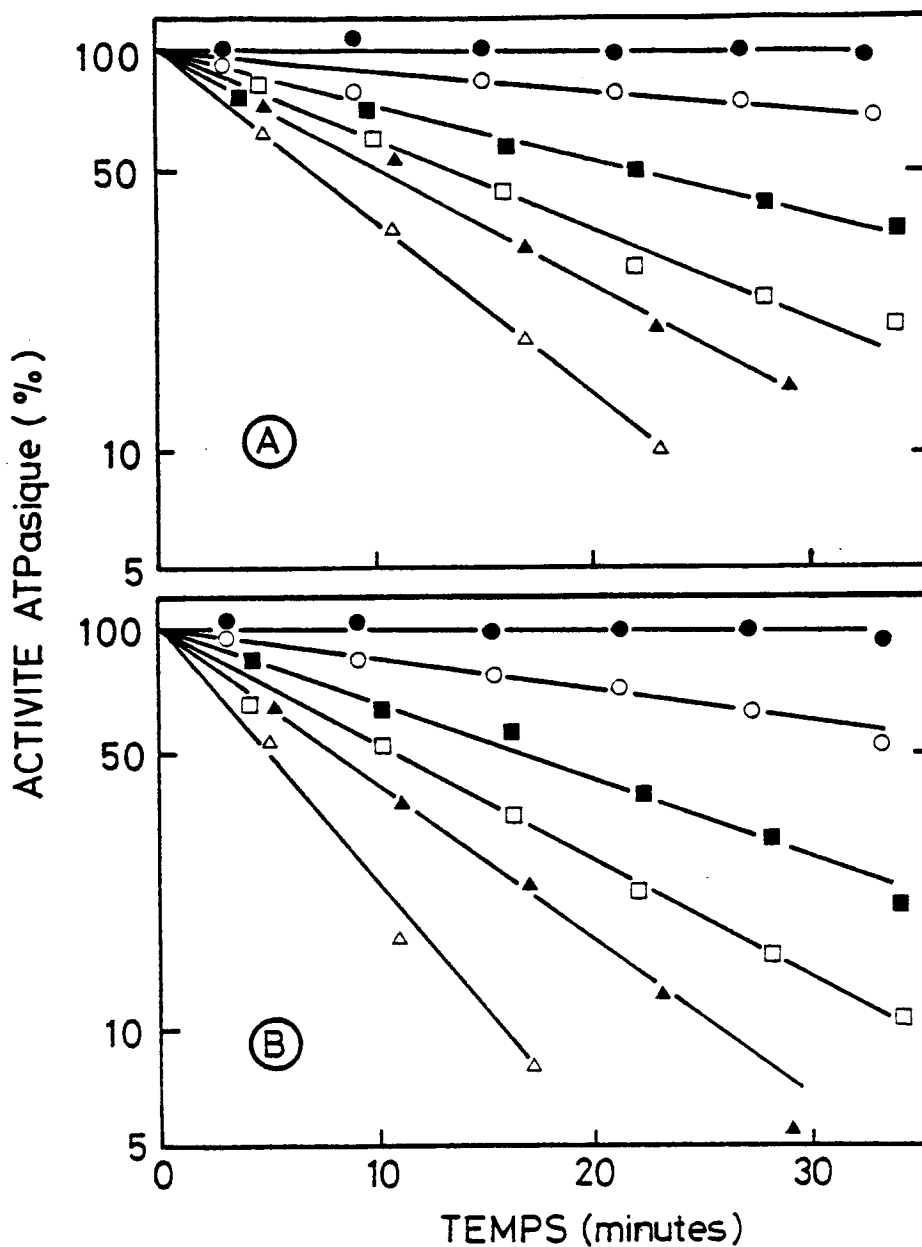


Figure 7 : Inactivation de l'activité ATPasique par différentes concentrations de dial-AMP (A) et de dial-ADP (B).

L'ATPase-F<sub>1</sub> à une concentration finale de 100 µg/ml est mise en incubation à 30°C dans une solution qui contient TEA 0,1 M pH 8,0 et les concentrations suivantes de dial-AMP (A) et dial-ADP (B) : 0,25 mM (○—○) ; 0,5 mM (■—■) ; 1,0 mM (□—□) ; 1,5 mM (▲—▲) et 3,0 mM (△—△). Des fractions aliquotes de 20 µl sont prélevées à intervalles réguliers et l'activité ATPasique est mesurée. Le pourcentage d'inhibition est calculé par rapport à un contrôle sans dial-AMP ou sans dial-ADP (●—●). Ces résultats sont représentés en coordonnées semi-logarithmiques.

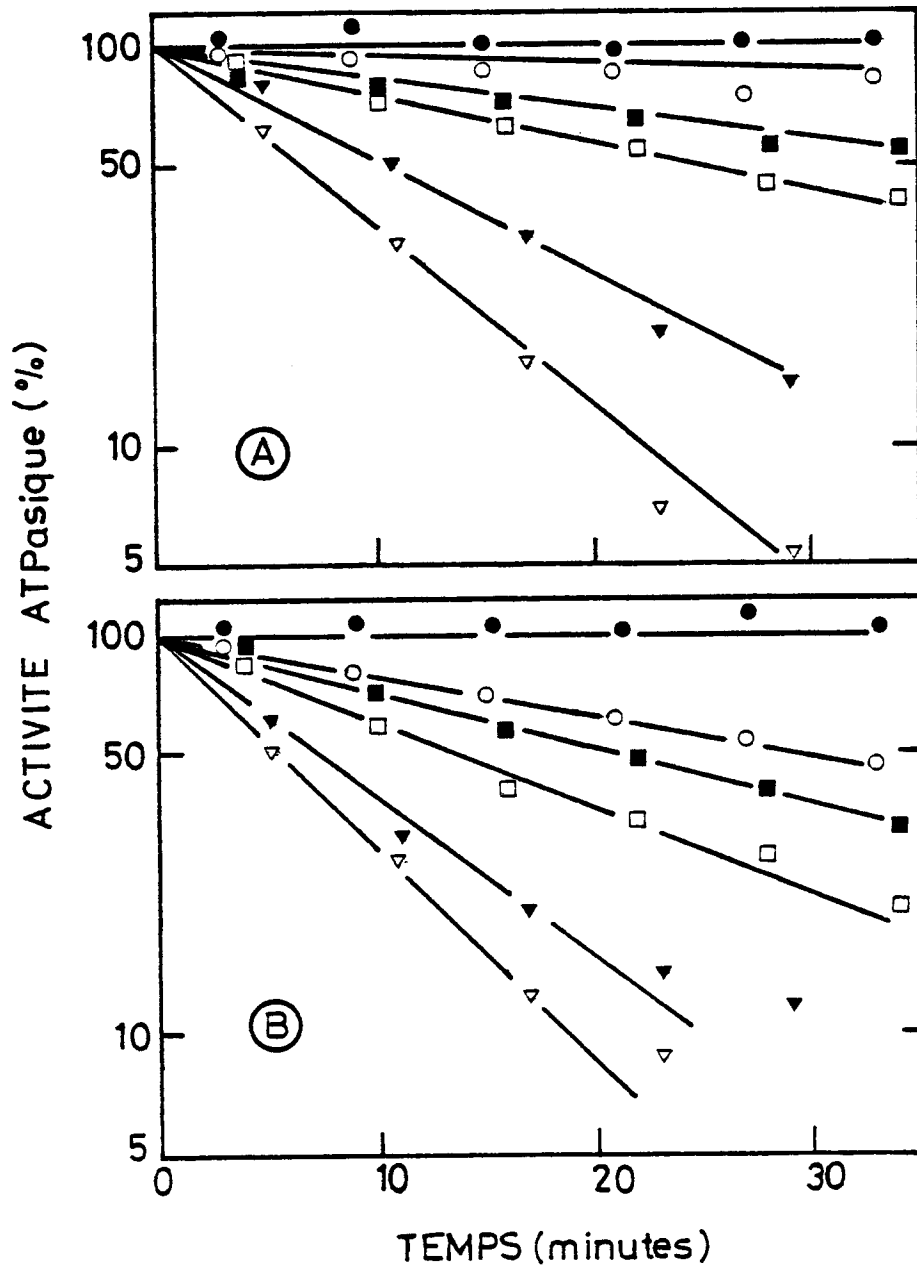


Figure 8 : Inactivation de l'activité ATPasique par différentes concentrations de dial-ATP (A) et de dial-ATP-Mg<sup>++</sup> (B).

Les conditions d'essai sont les mêmes que celles de la figure 7. Les concentrations du dial-ATP et du dial-ATP-Mg<sup>++</sup> sont : contrôle (●—●) ; 0,25 mM (○—○) ; 0,5 mM (■—■) ; 1,0 mM (□—□) ; 3,0 mM (▼—▼) et 5,0 mM (▽—▽).

Expérimentalement, la concentration du dial-nucléotide : (I) est en excès par rapport à l'enzyme, donc sa concentration est considérée comme constante pendant la cinétique d'inactivation et on peut écrire :

$$K' = K (I)^n, \text{ donc :}$$

$$\frac{d (F_1)}{(F_1)} = - K' dt \quad (3)$$

L'intégration de l'équation (3) donne :

$$(F_1) = (F_1)_0 e^{-K't} \quad (4)$$

$(F_1)_0$  étant la concentration totale des sites catalytiques au temps  $t = 0$ .

Comme la vitesse de l'ATPase  $V_i$  au temps  $t$  est proportionnelle à  $(F_1)$  et la vitesse maximale  $V_0$  est proportionnelle à  $(F_1)_0$ , nous avons :

$$V_i = V_0 e^{-K't} \quad (5)$$

et

$$\ln \frac{(V_i)}{(V_0)} = - K't \quad (6)$$

donc le tracé en coordonnées semi-logarithmiques de la diminution de l'activité ATPasique en fonction du temps doit être linéaire ce qui correspond à ce qui est observé expérimentalement.

Les temps correspondant à 50 % d'inactivation enzymatique ( $t_{1/2}$ ) sont mesurés directement sur les graphiques de la perte d'activité ATPasique en fonction du temps (Figures 7 et 8). Le tableau IV montre les  $t_{(1/2)}$  pour les différents dial-nucléotides mesurés dans des conditions expérimentales identiques.

Le dial-ADP est l'analogue inactivant le plus efficacement l'enzyme, il est environ 2,5 fois plus actif que le dial-ATP et 1,5 fois plus que le dial-AMP. Le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> est un inhibiteur plus efficace que le dial-ATP. Son efficacité est similaire à celle du dial-AMP, bien qu'à concentration plus faible (0,25 mM), il soit plus actif.

[Dial-nucléotide] mM	t <sub>1/2</sub> (minutes)			
	Dial-AMP	Dial-ADP	Dial-ATP	Dial-ATP-Mg <sup>++</sup>
0,25	58	40	91	30
0,5	22	16	42	22
1,0	14	10	25	14
1,5	11	8	-	-
3,0	7	5	12	8
5,0	-	-	7	6

Tableau IV : Les valeurs des temps de demi-inactivation (t<sub>1/2</sub>) ont été déterminées à partir des courbes d'inactivation<sup>2</sup> de l'ATPase-F<sub>1</sub> représentées en figures 7 et 8 pour différentes concentrations de dial-nucléotides.

Les données d'inactivation permettent de calculer le nombre de molécules de dial-nucléotides réagissant par site actif de F<sub>1</sub>.

Pour  $V_i = \frac{V_0}{2}$ ,  $t = t_{1/2}$  et en portant ces valeurs dans l'équation (5) nous avons :

$$\frac{V_0}{2} = V_0 e^{-K(I)^n t_{1/2}} \quad (7)$$

$$\ln 2 = K (I)^n t_{1/2} \quad (8)$$

donc :

$$\log t_{1/2} = - n \log (I) + \log (\ln 2) - \log K \quad (9)$$

Le graphique du  $\log t_{(1/2)}$  en fonction du  $\log$  de la concentration d'inhibiteur est une ligne droite, dont la pente est égale au nombre de molécules d'inhibiteur qui réagissent avec le site catalytique pour former un complexe inactivé. La figure 9 (A,B,C et D) montre que des droites sont effectivement obtenues et que leur pente est de environ 1 pour le dial-AMP, dial-ADP et dial ATP et est égale à 0,6 pour le dial-ATP-Mg<sup>++</sup>.

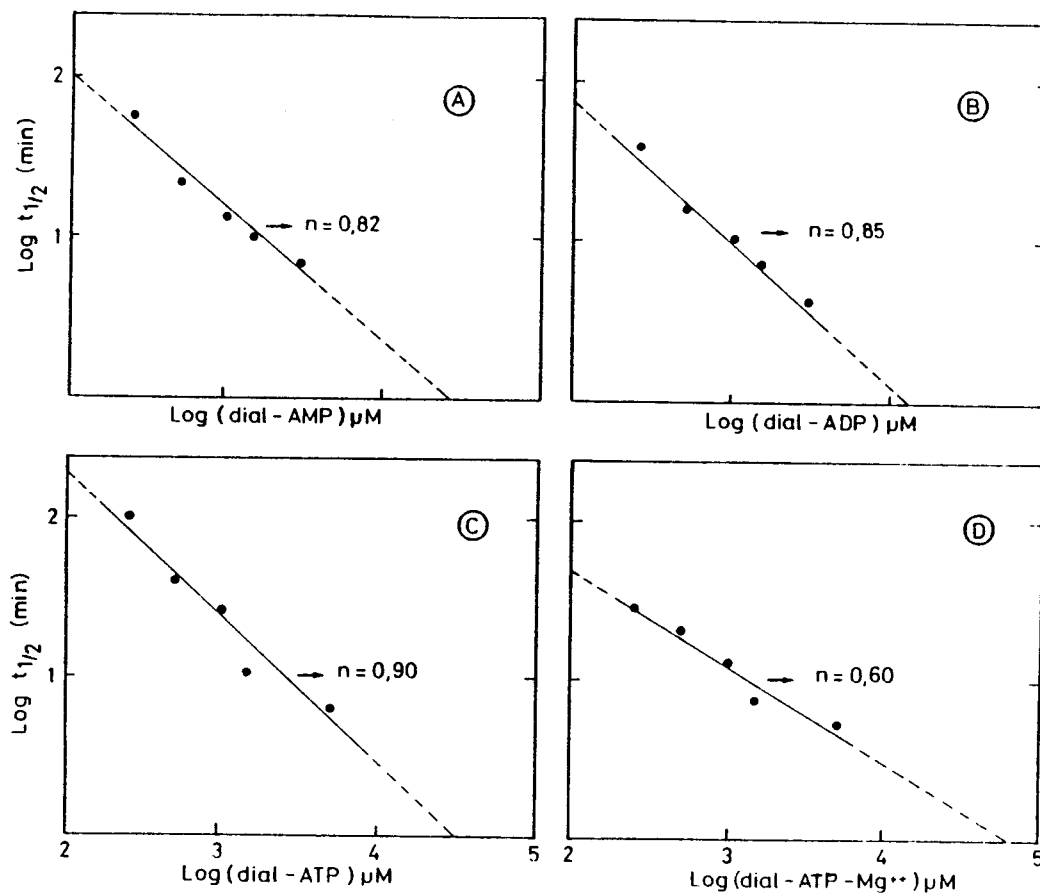


Figure 9 : Détermination du nombre de molécules de dial-nucléotide réagissant par site actif de  $F_1$ .

Représentation du  $\log$  du temps de demi-inactivation ( $t_{1/2}$ ) exprimé en minutes en fonction du  $\log$  de la concentration ( $\mu\text{M}$ ) correspondante de dial-AMP (A), de dial-ADP (B), de dial-ATP (C) et de dial-ATP-Mg<sup>++</sup> (D). Les  $t_{(1/2)}$  ont été mesurés à partir des figures 7 et 8. La pente des droites est représentée par n.

En considérant que la réaction d'inactivation se passe comme indiqué à l'équation (1) : c'est-à-dire, sans formation d'un complexe non-covalent intermédiaire et pour  $n = 1$ , on peut démontrer que le tracé de  $t_{(1/2)}$  en fonction de l'inverse de la concentration d'inhibiteur, est une droite passant par l'origine.

En reprenant l'équation (8) nous avons :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \times \frac{1}{(I)} \quad (10)$$

La figure 10 (A,B,C et D) montre les graphiques des temps de demi-inactivation en fonction de l'inverse de la concentration des dial-nucléotides.

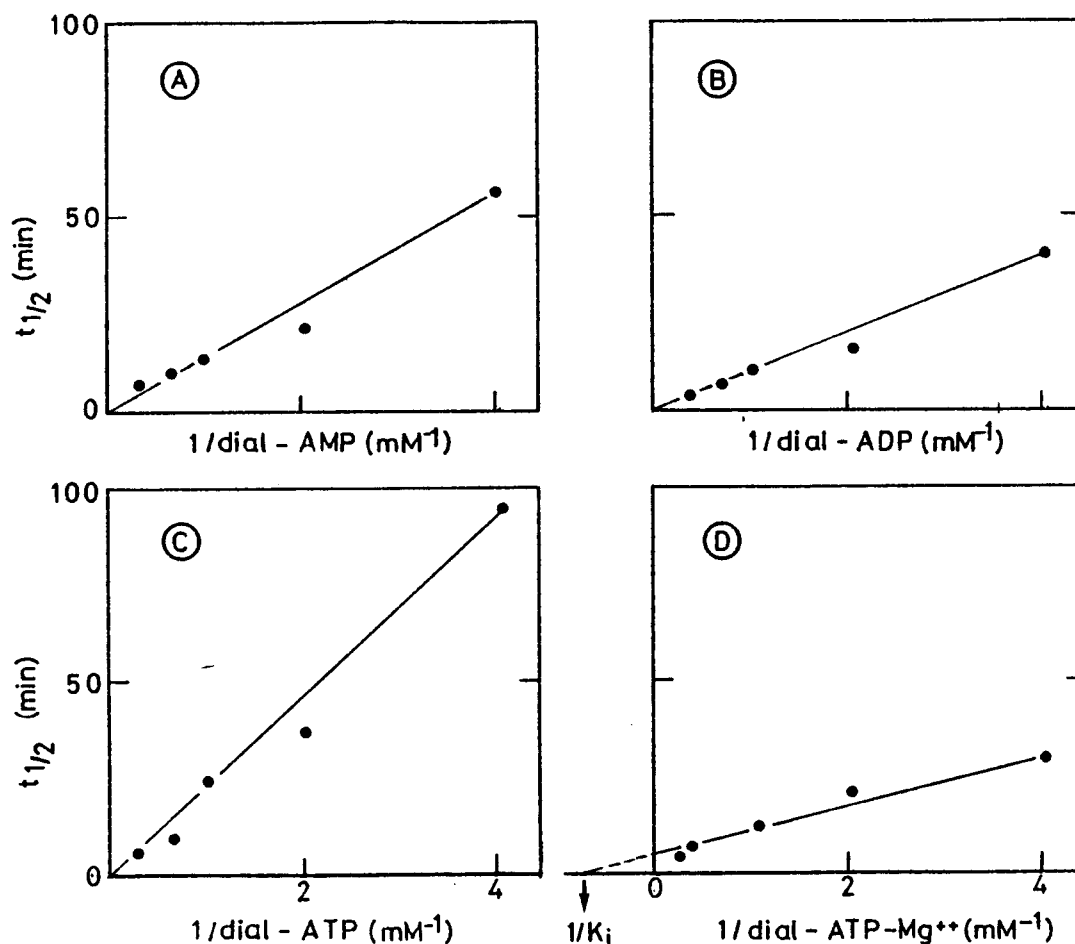
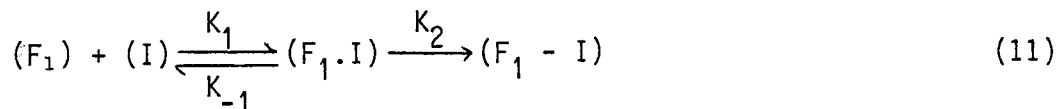


Figure 10 : Présence ou non d'une étape intermédiaire lors de l'inactivation de  $F_1$  par les dial-nucléotides.

Représentation des temps de demi-inactivation ( $t_{1/2}$ ) exprimés en minutes en fonction de l'inverse des concentrations ( $\text{mM}^{-1}$ ) correspondantes du dial-AMP (A), dial-ADP (B), dial-ATP (C) et dial-ATP-Mg<sup>++</sup> (D). Les  $t_{(1/2)}$  ont été mesurés à partir des figures 7 et 8.

Dans tous les cas, sauf pour le dial-ATP-Mg<sup>++</sup>, nous avons des droites qui passent par l'origine. Donc, pour le dial-ATP-Mg<sup>++</sup>, il faut considérer la possibilité de formation d'un complexe intermédiaire préalablement à l'inactivation selon l'équation suivante :



Dans ce cas, nous avons :

$$K = \frac{(F_1) (I)}{(F_1 \cdot I)} \quad (12)$$

$$\frac{d (F_1 - I)}{dt} = K_2 (F_1 \cdot I) \quad (13)$$

où :

(F<sub>1</sub>) est la concentration des sites catalytiques de l'ATPase ;

(I) est la concentration du dial-ATP-Mg<sup>++</sup> libre ;

(F<sub>1</sub>·I) est la concentration du complexe non-covalent (actif) entre l'ATPase et le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> ;

(F<sub>1</sub> - I) est la concentration du complexe covalent (non actif) de l'ATPase et dial-ATP-Mg<sup>++</sup> ;

K est la constante d'équilibre (K = K<sub>-1</sub> / K<sub>1</sub>) ;

K<sub>2</sub> est la constante de vitesse de l'étape d'inactivation.

A chaque instant, la concentration totale des sites catalytiques de l'ATPase (F<sub>1</sub>)<sub>0</sub> peut s'écrire :

$$(F_1)_0 = (F_1) + (F_1 \cdot I) + (F_1 - I) \quad (14)$$

(F<sub>1</sub>) et (F<sub>1</sub>·I) sont les formes catalytiquement actives de l'enzyme et (F') = (F<sub>1</sub>) + (F<sub>1</sub>·I).



donc :

$$\frac{d (F_1 - I)}{dt} = \frac{- d (F')}{dt} \quad (15)$$

D'autre part, d'après (12) :

$$(F_1 - I) = \frac{(F')}{\frac{K}{(I)} + 1} \quad (16)$$

En reportant les valeurs des équations (15) et (16) dans l'équation (13) nous avons :

$$\frac{- d (F')}{dt} = K_2 \cdot \frac{(F')}{\frac{K}{(I)} + 1} \quad (17)$$

Par intégration, nous obtenons :

$$(F') = (F_1)_0 \exp \left[ - \frac{K_2 \times t}{\frac{K}{(I)} + 1} \right] \quad (18)$$

Comme la vitesse de l'ATPase au temps t :  $V_i$ , est proportionnelle à  $(F') = (F_1) + (F_1 - I)$  et la vitesse maximale :  $V_0$ , est proportionnelle à  $(F_1)_0$ , on peut dire :

$$V_i = V_0 \exp \left[ - \frac{K_2 \times t}{\frac{K}{(I)} + 1} \right] \quad (19)$$

et

$$\ln \frac{(V_i)}{(V_0)} = - \left( \frac{K_2}{\frac{K}{(I)} + 1} \right) t \quad (20)$$

(I) est en excès par rapport à l'enzyme, donc sa concentration est considérée constante pendant la cinétique d'inactivation et on a :

$$\ln \frac{(V_i)}{(V_0)} = - K'' t \quad (21)$$

où

$$K'' = \left( \frac{K_2}{\frac{K}{(I)} + 1} \right)$$

Donc, l'équation (21) est semblable à l'équation (6) qui indique également une cinétique de pseudo-premier ordre. En reprenant l'équation (19) et pour  $V_i = \frac{V_0}{2}$ ,  $t = t_{(1/2)}$  :

$$\frac{V_0}{2} = V_0 \exp \left[ - \frac{K_2 \times t}{\frac{K}{(I)} + 1} \right] \quad (22)$$

$$\ln 2 = \left( \frac{K_2}{\frac{K}{(I)} + 1} \right) t_{1/2} \quad (23)$$

et

$$t_{1/2} = \left( \ln 2 \times \frac{K}{K_2} \right) \frac{1}{(I)} + \frac{\ln 2}{K_2} \quad (24)$$

Si  $\frac{\ln 2}{K_2} = T_{\min}$  (temps minimal d'inactivation pour une concentration infinie de (I)), nous avons simplement :

$$t_{1/2} = T_{\min} K \frac{1}{(I)} + T_{\min} \quad (25)$$

Dans le cas où nous avons la formation d'un complexe intermédiaire non covalent, le tracé de  $t_{(1/2)}$  en fonction de l'inverse de la concentration d'inhibiteur est une droite qui ne passe pas par l'origine.

Avec le dial-ATP-Mg<sup>++</sup>, les données de la figure 10 D indiquent un  $t_{(1/2)}$  d'inactivation minimal de 6 minutes et une constante de dissociation pour la formation d'un intermédiaire non covalent d'environ 1 mM. En fait, les résultats présentés pour le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> (Figures 9 et 10 D)

peuvent provenir de son hydrolyse par  $F_1$ . A son effet propre se superpose progressivement les effets du dial-ADP produit, ce que justifierait une cinétique particulière (voir page 33).

L'effet du complexe dial-ADP-Mg<sup>++</sup> a été testé. Il n'y a aucune différence entre les cinétiques d'inactivation par le dial-ADP ou dial-ADP-Mg<sup>++</sup> (données non montrées).

En ce qui concerne les résultats d'inactivation trouvés pour ces dial-nucléotides, il paraît surprenant que le dial-AMP puisse être reconnu par l'ATPase, puisque l'AMP ne l'est pas (Harris, 1978). Les analogues d'ADP et ATP avaient déjà été employés comme marqueurs d'affinité, mais pas le dial-AMP. On peut suggérer que l'ouverture du cycle du ribose se passe de telle façon que après oxydation des hydroxyles 2' et 3', sa conformation soit semblable à celle de l'ADP, justifiant son efficacité pour l'inactivation de  $F_1$ .

En ce qui concerne le dial-ATP, le même raisonnement peut être considéré, sa taille serait plus grande que celle de l'ATP, entraînant un mauvais positionnement de cet analogue au site de fixation. Ceci pourrait expliquer que le dial-ATP soit moins efficace que le dial-ADP.

#### II.D. CINÉTIQUE D'INACTIVATION PAR LES DIAL-NUCLEOTIDES EN FONCTION DU pH

Les dial-nucléotides se fixent sur  $F_1$  en réagissant avec un groupe  $\epsilon$ -aminé d'un résidu lysine. Une base de Schiff s'établit entre le groupe aminé non protoné et le groupe aldéhydique du dial-nucléotide comme le montre le schéma de la page 32. Donc, la réactivité sera favorisée dans des conditions où le groupe  $\epsilon$ -aminé est non protoné, et le pH du milieu jouera un rôle important dans le processus d'inactivation par ces analogues des nucléotides. Pour évaluer l'effet du pH, des mesures cinétiques ont été faites à différents pH.

Les figures 11 et 12 montrent l'inactivation de l'activité ATPasique en présence d'une concentration fixe de dial-nucléotide, le pH du milieu d'incubation variant de 7,0 à 9,0.

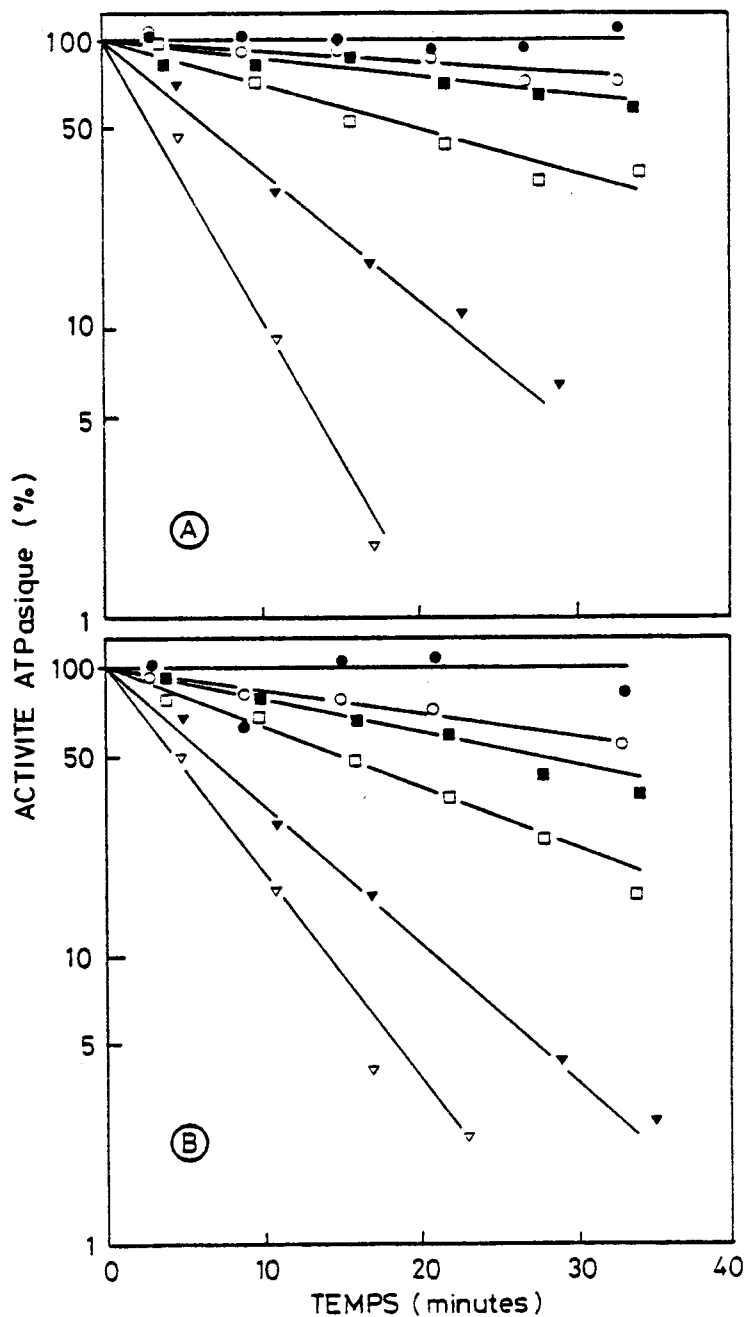


Figure 11 : Cinétiques d'inactivation de l'activité ATPasique par le dial-AMP (A) et le dial-ADP (B) à différents pH.

$F_1$  (0,1 mg protéine/ml) a été mis en incubation avec du dial-AMP 0,5 mM (A) ou du dial-ADP 0,62 mM (B) à 30°C, dans un tampon TEA 0,1 M à différents pH : 7,0 (○—○) ; 7,5 (■—■) ; 8,0 (□—□) ; 8,5 (▼—▼) et 9,0 (▽—▽). Des fractions de 20  $\mu$ l sont prélevées à intervalles réguliers et l'activité ATPasique est mesurée par rapport à un contrôle sans dial-AMP ou dial-ADP à pH 8,0 (●—●). Cette figure représente en coordonnées semi-logarithmiques l'activité ATPasique (%) en fonction du temps.

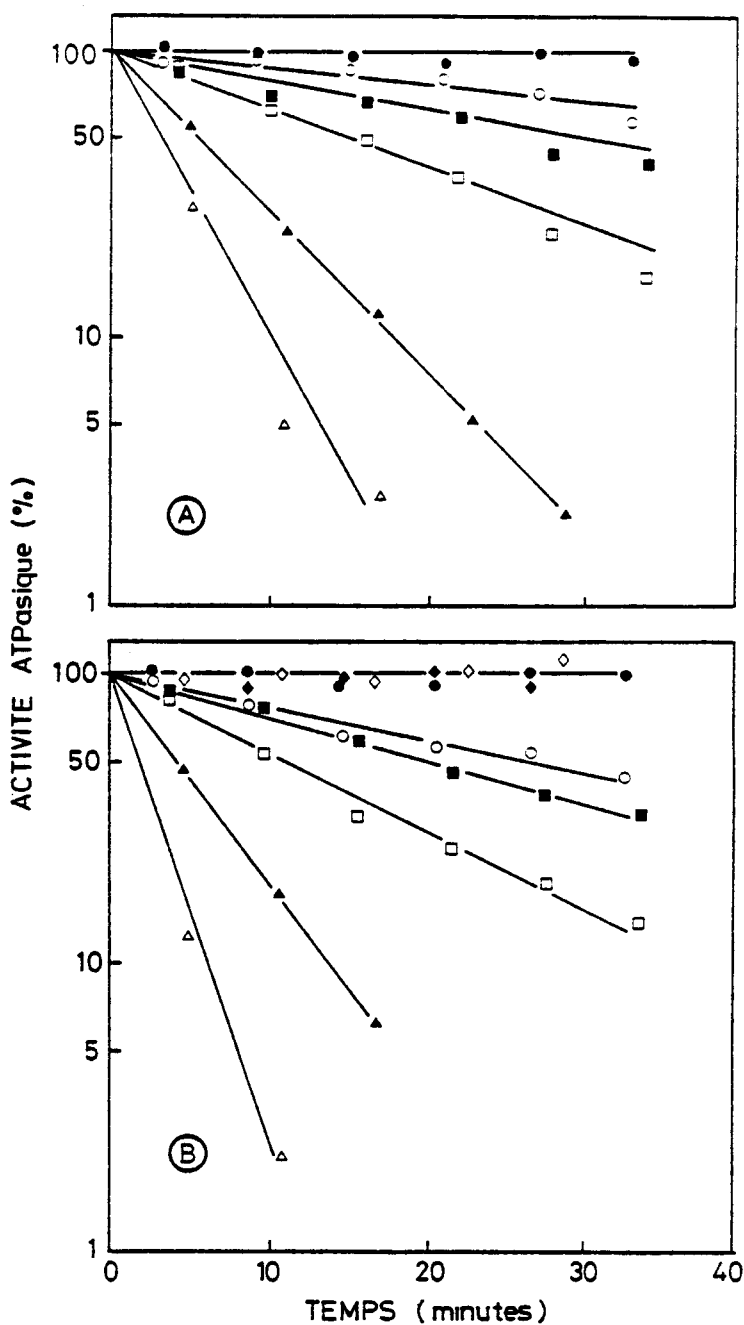


Figure 12 : Cinétiques d'inactivation de l'activité ATPasique par le dial-ATP (A) et dial-ATP-Mg<sup>2+</sup> (B) en fonction du pH.

Les conditions d'essai sont les mêmes que celles de la figure 11, sauf que la concentration du dial-ATP et dial-ATP-Mg<sup>2+</sup> est de 2,0 mM. Les valeurs du pH sont : 7,0 (○—○) ; 7,5 (■—■) ; 8,0 (□—□) ; 8,5 (▲—▲) et 9,0 (△—△). Des courbes contrôles sont faites à pH 8,0 (●—●) et la partie (B) montre des courbes contrôles à pH 7,0 (◇—◇) et pH 9,0 (◆—◆).

L'inactivation augmente en fonction de la basicité du pH. En effet, plus le pH est basique, plus grande est la concentration de  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> lysine non protonée, facilitant la formation de la base de Schiff. Dans ces conditions de pH, l'activité enzymatique reste stable en l'absence de dial-nucléotide. Le tableau V rassemble les temps de demi-inactivation mesurés directement à partir de ces figures, dans des conditions semblables du pH, pour des concentrations de 0,5 mM pour le dial-AMP, 0,62 mM pour le dial-ADP et 2,0 mM pour les dial-ATP et dial-ATP-Mg<sup>++</sup>. La vitesse d'inactivation est augmentée de 8 à 24 fois à pH 9,0 par rapport à pH 7,0. La figure 13 montre les graphiques de log t<sub>(1/2)</sub> en fonction du pH.

pH	t <sub>(1/2)</sub> (minutes)			
	Dial-AMP 0,5 mM	Dial-ADP 0,62 mM	Dial-ATP 2,0 mM	Dial-ATP-Mg <sup>++</sup> 2,0 mM
7,0	72	39	53	26
7,5	47	28	32	20
8,0	20	16	16	12
8,5	7	7	6	4
9,0	3	5	3	2

Tableau V : Les valeurs des temps de demi-inactivation (t<sub>1/2</sub>) ont été déterminées à partir des courbes d'inactivation de l'ATPase-F<sub>1</sub> représentées en figures 11 et 12 pour les différentes valeurs de pH.

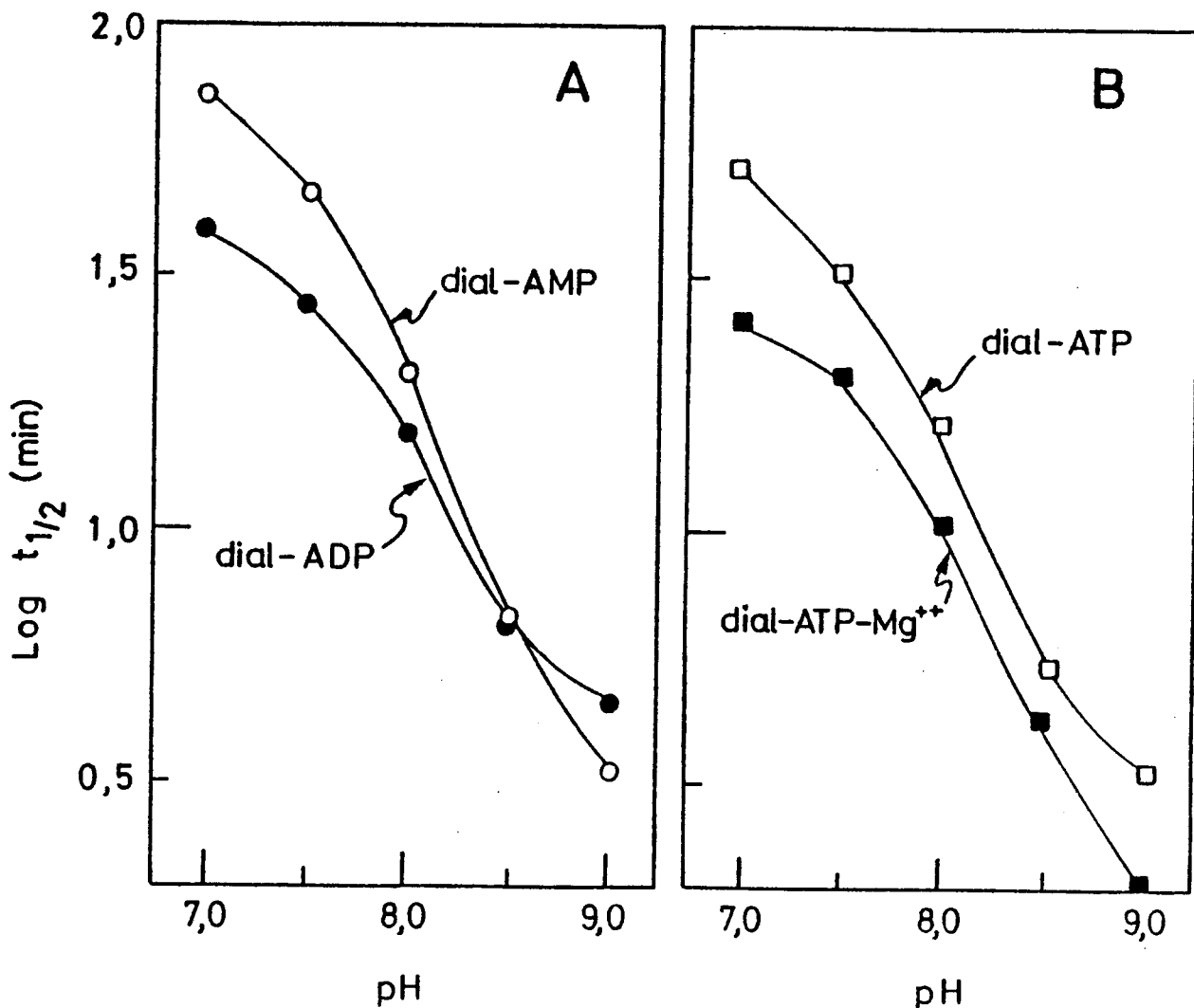


Figure 13 : Variation du temps de demi-inactivation de  $F_1$  par le dial-AMP et par le dial-ADP (A), par le dial-ATP et par le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> (B) en fonction du pH.

Les valeurs des temps de demi-inactivation ( $t_{1/2}$ ) sont exprimées en minutes et sont calculées à partir des tracés semi-logarithmiques de la perte d'activité ATPasique en fonction du temps et pour différents pH. Les données expérimentales sont représentées dans les figures 11 et 12 respectivement.

Ces courbes peuvent être interprétées comme reflétant la titration d'un résidu qui n'est réactif que sous sa forme non-protonée. Dans tous les cas il y a une inflexion vers environ pH 8,0, qui peut correspondre au  $pK_a$  d'un groupe  $\epsilon-NH_2$  d'un résidu lysine. Cette valeur de  $pK_a$  est inférieure de 2 unités environ par rapport à un groupe  $\epsilon-NH_2$  lysine typique (Edsall, 1965). La valeur trouvée est du même ordre que le  $pK_a$  de l'inactivation de glutamate déshydrogénase par réaction du pyridoxal avec une lysine de l'enzyme (Piszkiwicz et Smith, 1971). Cette valeur faible peut être due à la localisation du résidu lysine dans un site hydrophobique. Un autre facteur qui doit être aussi considéré, est la présence de groupes cationiques dans l'environnement du résidu  $\epsilon-NH_2$ , qui retardent l'addition d'une charge positive supplémentaire.

La valeur 8,0 du pH a été en général choisie pour les essais ultérieurs pour tenter de réduire la possibilité de réaction non-spécifique, des dial-nucléotides avec des résidus  $\epsilon-NH_2$  lysine situés à la surface de la protéine.



CHAPITRE III

FIXATION DU ( $^{14}\text{C}$ ) DIAL-ADP SUR L'ATPASE- $F_1$

PROTECTION PAR LES ADÉNINE NUCLÉOTIDES

### III.A. INTRODUCTION

Le but des expériences décrites dans le présent chapitre est de déterminer les caractéristiques de fixation de dérivés de nucléotides radioactifs en fonction de l'inactivation. Pour faire ces mesures, nous avons choisi le dial-ADP radioactif, le dérivé le plus efficace, comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent.

### III.B. INACTIVATION PAR LE DIAL-ADP : PROTECTION PAR L'ADP ET L'ATP

L'effet protecteur des nucléotides naturels (AMP, ADP, ATP) pendant le processus d'inactivation de  $F_1$  par le dial-ADP a été mesuré. Les effets de diverses concentrations d'AMP, ADP ou ATP sont présentés sur la figure 14. L'ADP et l'ATP fournissent des protections similaires. L'AMP ne montre pas d'effet de protection pendant l'inactivation par le dial-ADP. Donc, ces résultats satisfont un des critères d'un bon marqueur d'affinité, c'est-à-dire une protection par les vrais substrats (Meloche, 1967). La figure 15 montre le tracé de la perte d'activité ATPasique en fonction du temps en présence et en absence de 10 mM ATP. La vitesse d'inactivation en présence de 10 mM ATP est diminuée d'environ trois fois par rapport à la vitesse d'inactivation en l'absence de ce nucléotide. Cette figure correspond aux conditions expérimentales qui ont été employées pour mesurer la fixation de ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP, seul ou en présence d'ATP ou d'ADP, comme nous le verrons dans le paragraphe suivant (III.C.).

### III.C. STOECHIOMETRIE DE LA FIXATION DE ( $^{14}\text{C}$ ) DIAL-ADP

Pour connaître la stoechiométrie de fixation de l'analogue d'ADP, la fixation du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP a été mesurée lors de l'inactivation de l'activité ATPasique. La fixation du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP sur l'ATPase a été mesurée dans les conditions suivantes : l'ATPase (environ 1 mg/ml) est mise en incubation à 30°C dans un milieu qui contient : tampon TEA 0,1 M pH 8,0,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  5,0 mM et ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP 50 à 100  $\mu\text{M}$ . A intervalles réguliers, des prises d'essai de 100  $\mu\text{l}$

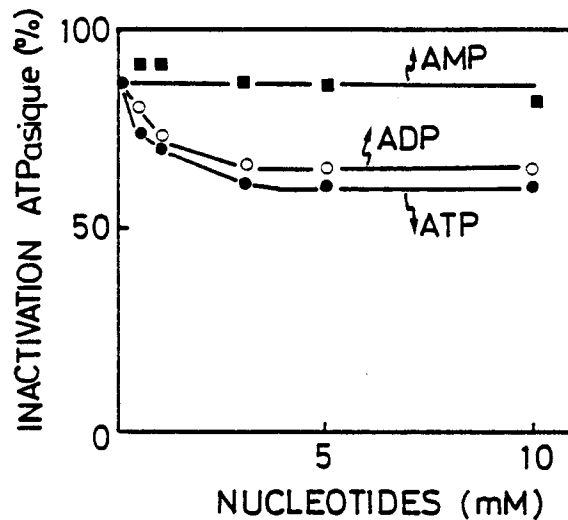


Figure 14 : Effet protecteur des adénine-nucléotides (AMP, ADP, ATP) lors de l'inactivation par le dial-ADP.

$F_1$  (0,8 mg protéine/ml) est mis en incubation dans un milieu contenant 0,5 mM de dial-ADP, tampon TEA 0,1 M pH 8,0,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  5,0 mM et des concentrations croissantes de 0,5 à 10,0 mM d'AMP, ADP ou ATP comme indiqué sur la figure. Un contrôle est réalisé sans dial-ADP. Après une incubation d'une demi-heure à 30°C, des prises d'essais sont effectuées diluées 20 fois dans un tampon Tris-HCl 50,0 mM pH 7,5 et l'activité ATPasique est mesurée sur une fraction de 40  $\mu\text{l}$  comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

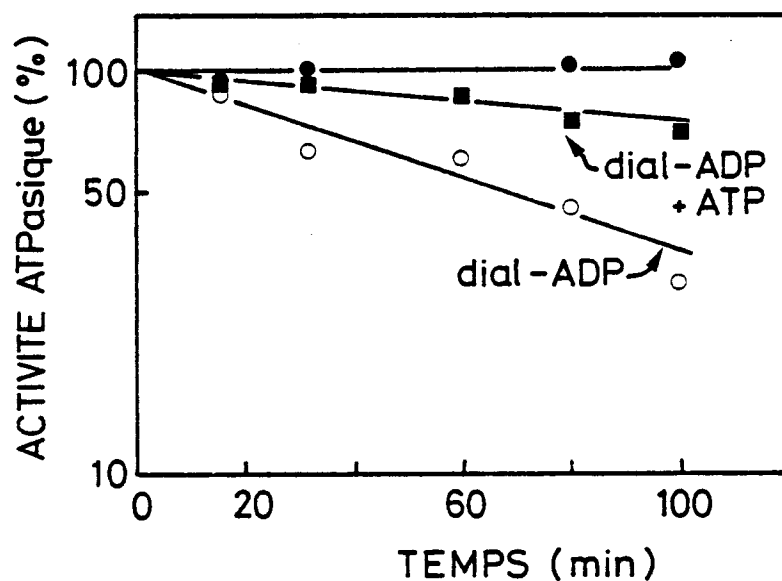
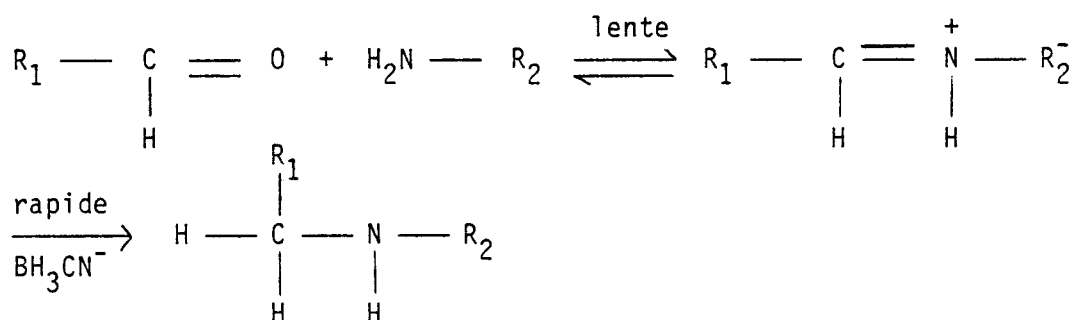


Figure 15 : Inactivation de l'activité ATPasique par le ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP : protection par l'ATP.

$F_1$  (0,8 mg protéine/ml) est mis en incubation dans un milieu contenant 80,0  $\mu\text{M}$  de ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP, TEA 0,1 M pH 8,0,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  5,0 mM en présence et en absence d'ATP (10,0 mM). Des prises d'essais sont effectuées à intervalles réguliers (20 min.) et sont diluées avec Tris-HCl 50,0 mM pH 8,0, puis l'activité ATPasique est mesurée comme décrit dans "Matériel et Méthodes".

sont déposées sur des colonnes de Sephadex G-50 (fine) préalablement équilibrées avec du Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, un tampon qui peut réagir avec le dial-ADP en excès. Les échantillons sont élués par centrifugation (800 rpm/2 min.) et l'activité ATPasique, la radioactivité et la concentration de protéines sont mesurées dans les éluats qui contiennent le dial-ADP lié à l'ATPase. Des contrôles sont faits en mesurant la radioactivité des éluats, dans lesquels  $F_1$  est remplacé par du tampon TEA 0,1 M pH 8,0, et les valeurs de radioactivité trouvées sont soustraites des premières. La présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  dans ce milieu vient assurer l'irréversibilité de la base de Schiff par réduction. Le  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  à pH alcalin (8,0) est capable de réduire le groupe imine de la base de Schiff mais laisse intacts les groupes 2'-3' aldéhydiques. Le schéma suivant montre la formation et la réduction de la base de Schiff en présence de  $\text{NaBH}_3\text{CN}$ . La réduction de la fonction imine elle-même n'est pas une réaction limitante (Borch et coll., 1971).



La figure 16 montre que la fixation du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP n'est pas sélective et par extrapolation pour 100 % d'inactivation nous trouvons environ 11 moles de dial-ADP/mole  $F_1$ . Donc, ces résultats indiquent qu'il est probable que non seulement les lysines éventuelles des sites de fixation des nucléotides sont bloquées, mais aussi d'autres résidus lysine de l'enzyme.

Une fixation importante de dial-ATP sur le  $F_1$  mitochondrial lors de l'inactivation a été observée par Lowe et coll. (1979b) ainsi que par Bragg et Hou (1980) et Bragg et coll. (1981) pour le  $F_1$  de *E. coli*. De même un autre analogue de nucléotide, le fluorosulfonylbenzoyladénosine se fixe sur  $F_1$  avec des stoechiométries aussi élevées que 14 moles/mole  $F_1$  et cela paradoxalement en présence d'ATP (Di Pietro et coll., 1979).

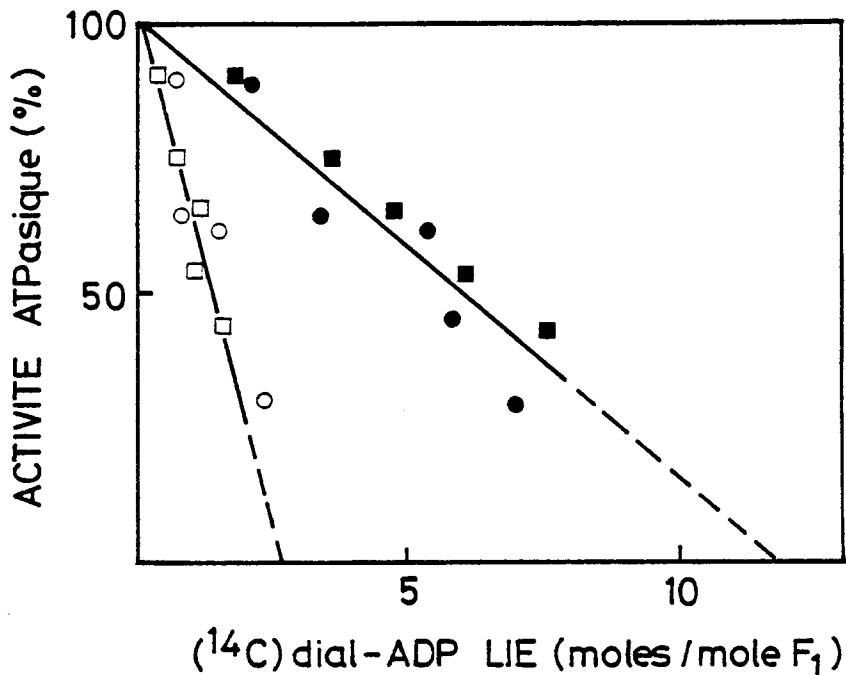


Figure 16 : Fixation du (<sup>14</sup>C) dial-ADP sur F<sub>1</sub>.

F<sub>1</sub> (0,8 mg protéine/ml) est mis en incubation à 30° C dans une solution contenant : (<sup>14</sup>C) dial-ADP 80,0 μM, TEA 0,1 M, pH 8,0, NaBH<sub>3</sub>CN 5,0 mM en absence ou en présence d'ATP ou d'ADP 10,0 mM. Un contrôle est réalisé ne contenant pas de dial-ADP. Toutes les 20 minutes, des prises d'essais de 100 μl sont effectuées et la séparation du (<sup>14</sup>C) dial-ADP libre ou (<sup>14</sup>C) dial-ADP lié à F<sub>1</sub> est faite sur des colonnes Sephadex G-50 (fine) équilibrées avec Tris-HCl 50,0 mM, pH 8,0. La radioactivité, l'activité ATPasique et le contenu en protéines sont mesurés dans des portions de l'éluat (voir "Matériel et Méthodes"). La fixation du (<sup>14</sup>C) dial-ADP à F<sub>1</sub> en absence de nucléotide froid (●-●, ■-■) représente la fixation totale (spécifique + non spécifique). La fixation du (<sup>14</sup>C) dial-ADP à F<sub>1</sub> en présence d'un excès de nucléotide froid représente la fixation non spécifique. La fixation spécifique du (<sup>14</sup>C) dial-ADP à F<sub>1</sub> (○-○, □-□) est déterminée par différence entre la fixation totale et la fixation non spécifique mesurée en présence d'ATP ou d'ADP respectivement.

Des essais ont été faits pour obtenir une fixation spécifique du dial-ADP par marquage différentiel. Ce marquage différentiel consiste à mesurer la fixation de ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP en présence et en absence d'ADP ou ATP. Si les vrais substrats (ADP, ATP) protègent les sites spécifiques de fixation, la modification chimique ne se passera qu'avec les résidus lysine périphériques, alors qu'en absence de ces nucléotides, tous les résidus lysine réagissent avec le ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP. La figure 16 montre la fixation spécifique trouvée dans ces conditions. Par extrapolation pour 100 % d'inactivation on a 3 moles de dial-ADP fixées par mole de l'ATPase- $F_1$ .

### III.D. MESURE DE LA FLUORESCENCE DE L'AUROVERTINE D EN PRESENCE DE L'ATPase- $F_1$ MODIFIEE PAR LE DIAL-ADP

L'aurovertine est une mycotoxine synthétisée par *Calcarisporium arbuscula*. Ce champignon produit toute une gamme d'aurovertines A,B,C,D... (Bertina, 1972), lesquelles ont des structures voisines et Osselton et coll., (1974) décrivent la purification de ces aurovertines. Il a été montré que le site de fixation de l'aurovertine était sur la sous-unité  $\beta$  de l'ATPase- $F_1$  mitochondriale (Muller et coll. 1977, Verschoor et coll., 1977). Ce composé est un inhibiteur puissant de la synthèse mitochondriale d'ATP aussi bien que de l'ATPase liée à la membrane ou soluble (Lardy et coll., 1964).

La structure de l'aurovertine D est figurée ci-dessous (figure 17).

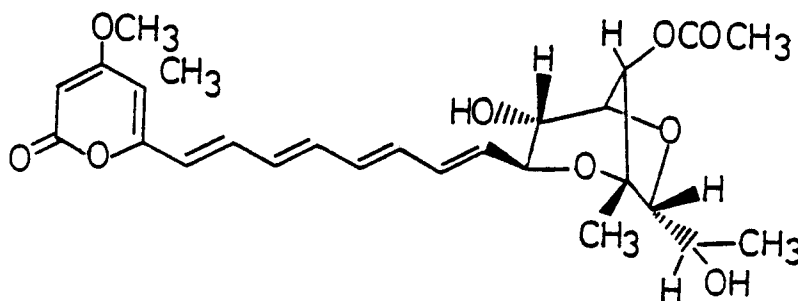


Figure 17 : Aurovertine D

L'aurovertine D est de plus utilisable comme sonde fluorescente spécifique de l'ATPase. En effet, l'intensité de fluorescence de l'aurovertine est fortement augmentée en présence d'ATPase et la fluorescence est modulée par les ligands de l'ATPase : l'ADP la stimule et l'ATP la diminue.

La figure 18 A montre un tracé de fluorescence de l'aurovertine D en présence de  $F_1$  et sa modification par les ligands : ADP, ATP et  $Mg^{++}$ . Cette figure montre une augmentation de fluorescence d'environ 30 fois après l'addition de  $F_1$ , par rapport au niveau de fluorescence de l'aurovertine seule. Cette augmentation est fonction à la fois de la concentration de l'aurovertine et de la protéine. L'addition d'ADP à faible concentration (0,2 mM) provoque une augmentation du niveau de fluorescence, tandis que l'addition d'ATP à forte concentration (2,0 mM) provoque une extinction de fluorescence. D'autre part, l'ion  $Mg^{++}$  (5 mM) provoque une augmentation de cette fluorescence.

La figure 18 B montre le profil de fluorescence de l'aurovertine D en présence de  $F_1$  partiellement inactivé par le dial-ADP. L'inactivation de l'enzyme par le dial-ADP n'empêche pas l'augmentation de fluorescence provoquée par la fixation de l'aurovertine sur  $F_1$ , indiquant que le site de fixation de l'aurovertine, qui se trouve au niveau de la sous-unité  $\beta$ , n'est pas modifié. La fixation du dial-ADP n'affecte pas l'augmentation de la fluorescence en réponse à l'addition d'ADP 0,2 mM ; par contre, l'addition d'ATP 2,0 mM n'entraîne plus la baisse de fluorescence comme pour le contrôle (figure 18 A). L'augmentation de la fluorescence par l'addition de  $MgCl_2$  5,0 mM n'est plus retrouvée ; on note même une légère diminution du niveau de fluorescence, ce qui peut signifier une modification du site de fixation de l'ion  $Mg^{++}$ . La perte de la réponse fluorescente après l'addition d'ATP 2,0 mM indique que la fixation du dial-ADP interfère directement avec la fixation d'ATP ou empêche indirectement sa fixation, à cause d'une modification conformationnelle. L'effet de l'inactivation par le dial-ADP a été étudié pour plusieurs degrés d'inactivation comme le montre la figure 19. La diminution de fluorescence ( $h_2$ ) en présence d'ATP, rapportée à la fluorescence de base ( $h_1$ ) est représentée sur la même figure. Cette figure montre que la perte de l'effet de l'ATP sur la fluorescence du complexe

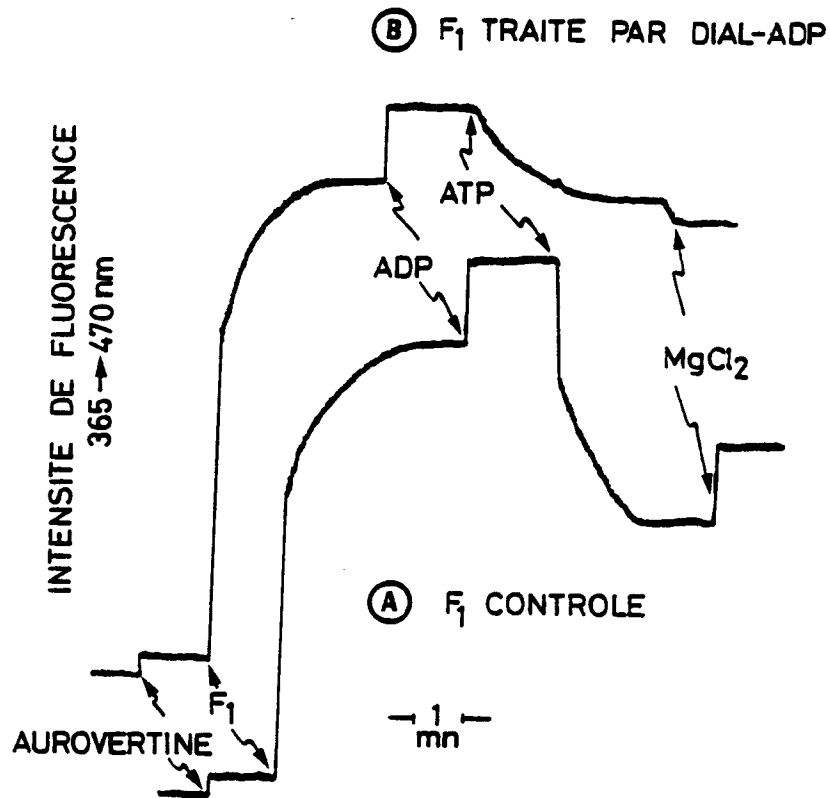


Figure 18 : Effet de l'ADP, de l'ATP et de MgCl<sub>2</sub> sur l'intensité de fluorescence de l'aurovertine en présence de F<sub>1</sub> natif (A) et de F<sub>1</sub> modifié par le dial-ADP (B).

F<sub>1</sub> (1,0 mg protéine/ml) est mis en incubation à 30°C, en présence de dial-ADP 0,45 mM, NaBH<sub>3</sub>CN 2,0 mM, TEA 0,1 M pH 8,0. Après 30 minutes, l'inactivation est de 74 %. La réaction est arrêtée par passage sur Sephadex G-50 (fine) équilibré en 20,0 mM Tris-HCl pH 7,5. 50 µg de F<sub>1</sub> natif ou inactivé par le dial-ADP sont alors placés dans 2 ml de milieu saccharose 0,2 M, Tris-HCl 10,0 mM pH 7,5, EDTA 0,5 mM pH 7,5 (la température est de 25°C). Des additions successives sont réalisées comme indiqué sur la figure. Les concentrations finales d'aurovertine D, d'ADP, ATP et MgCl<sub>2</sub> sont respectivement : 0,26 µM, 0,2 mM, 2,0 mM et 2,5 mM.



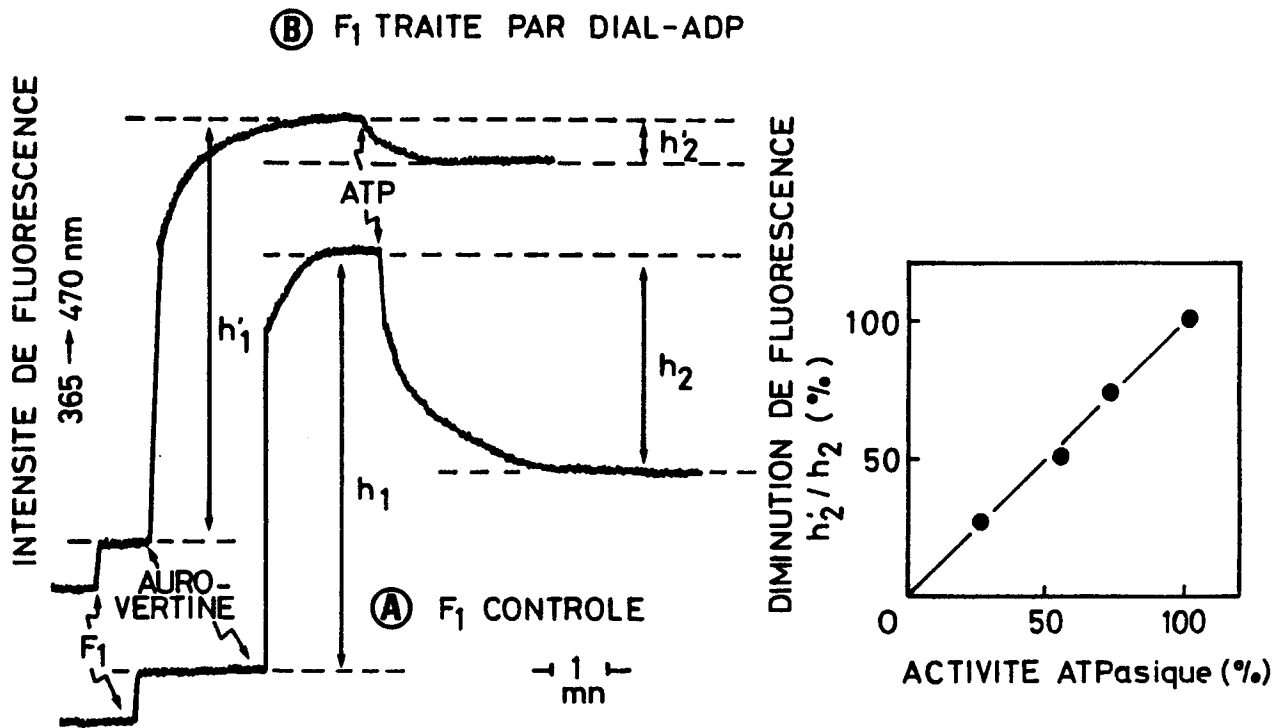


Figure 19 : Effet de l'ATP sur la diminution de fluorescence des complexes de l'aurovertine avec F<sub>1</sub> natif (A) et F<sub>1</sub> inactivé par le dial-ADP (B).

F<sub>1</sub> est inactivé à différents degrés par incubation pendant 10 minutes à 30°C avec les concentrations suivantes de dial-ADP : 0,05 ; 0,3 ; 0,5 ; 1,0 ; 3,0 mM et en présence de TEA 0,1 M pH 8,0 et NaBH<sub>2</sub>CN 2,0 mM. La réaction d'inactivation est arrêtée par centrifugation-filtration sur Sephadex G-50 (fine). L'activité ATPasique est mesurée comme décrit dans "Matériel et Méthodes". Les mesures de fluorescence sont réalisées en utilisant 35 µg de F<sub>1</sub> natif (tracé A) ou de F<sub>1</sub> inactivé à divers degrés par le dial-ADP (tracé B, exemple pour une valeur d'inactivation de 73 %) et une concentration d'aurovertine de 0,52 µM dans les conditions décrites dans la figure 18. Le graphique présente la diminution de fluorescence ( $h_2'$ ) provoquée par l'ATP et rapportée à la valeur du contrôle ( $h_2$ ) en fonction de l'activité ATPasique.

aurovertine- $F_1$  est proportionnelle à l'inactivation de l'ATPase par le dial-ADP. Ce résultat permet de penser que le site ATP sondé par l'aurovertine est probablement le site catalytique, qui serait modifié par le dial-ADP.

### III.E. LOCALISATION DU ( $^{14}\text{C}$ ) DIAL-ADP DANS LES SOUS-UNITES DE L'ATPase- $F_1$

Après inactivation par le ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP, la localisation de la radioactivité dans les diverses sous-unités de l'ATPase a été déterminée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Après migration, les gels sont congelés dans la carboglace puis découpés en tranches de 1 mm (découpeur de gels Joyce-Loebl). Avant mesure de la radioactivité, les tranches sont digérées par 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  15 % pendant 16 heures à 60°C.

La figure 20 montre le profil de radioactivité correspondant à l'incorporation du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP dans l'ATPase : le marquage n'est pas spécifique d'une sous-unité et l'ensemble des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  est marqué.

### III.F. FIXATION DE ( $^{14}\text{C}$ ) ADP SUR L'ATPase- $F_1$ INACTIVEE PAR LE DIAL-ADP

La fixation de l'ADP marqué par le carbone 14 a été mesurée sur l'ATPase- $F_1$  préalablement inactivée par incubation avec le dial-ADP.

L'ATPase- $F_1$  (2,0 mg protéine/ml) est mise en incubation dans un milieu qui contient : tampon TEA 0,1 M pH 8,0,  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  5,0 mM, en présence et en absence de 0,45 mM de dial-ADP. Après 30 minutes à 30°C, les échantillons sont déposés sur des colonnes de Sephadex G-50 (fine), préalablement équilibrées avec Tris-HCl 50,0 mM pH 7,5 et éluées par centrifugation (800 rpm/2 min.).

Après mesure de l'activité ATPasique, l'ATPase éluée est utilisée pour les essais de fixation de ( $^{14}\text{C}$ ) ADP. La concentration de  $F_1$  est de l'ordre de 0,5 à 1,0 mg/ml et la concentration de ( $^{14}\text{C}$ ) ADP varie de 1,0 à 300,0  $\mu\text{M}$ .

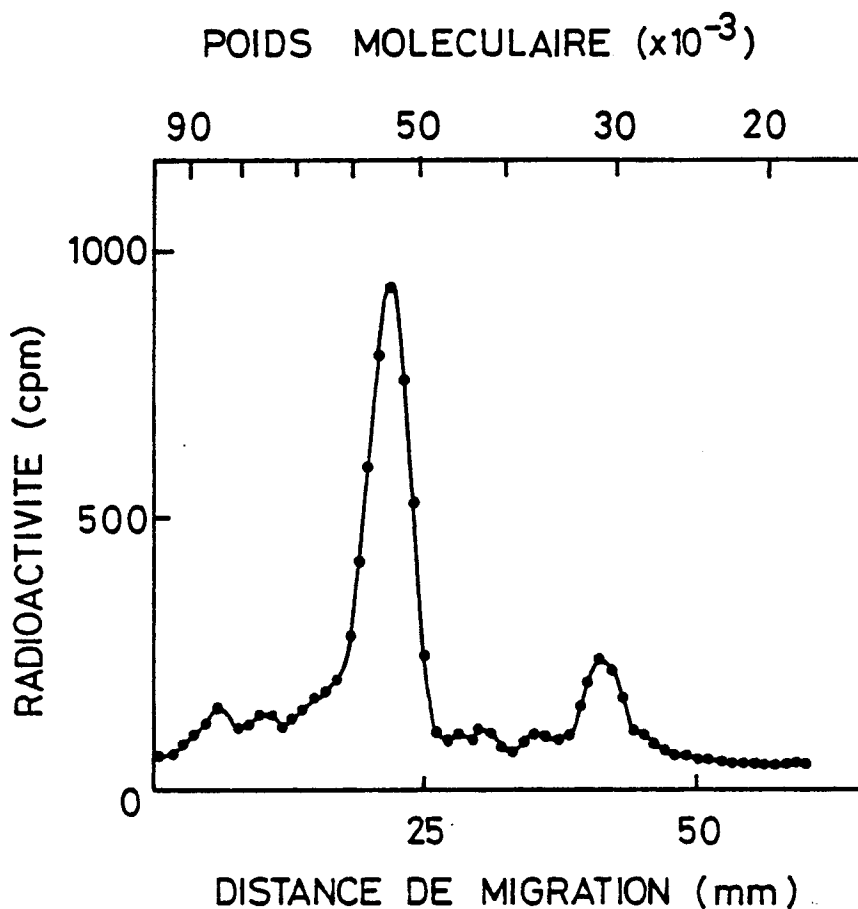


Figure 20 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, de F<sub>7</sub> marqué par le dial (<sup>14</sup>C) ADP.

L'ATPase (0,8 mg protéine/ml) est mise en incubation avec 80,0 μM de dial (<sup>14</sup>C) ADP en présence de TEA 0,1 M pH 8,0 et NaBH<sub>2</sub>CN 5,0 mM pendant 40 minutes (30 % inactivation). Après filtration-centrifugation sur Sephadex G-50, en Tris-HCl 50,0 mM pH 7,5, une prise d'essai de l'éluat est dénaturée en présence de SDS (voir "Matériel et Méthodes"). 48 μg de protéine sont alors soumis à une électrophorèse sur des gels de 7,5 % de polyacrylamide en tampon phosphate (voir "Matériel et Méthodes"). La figure présente le diagramme de la radioactivité retrouvée dans les différentes tranches de gel après découpage comme décrit dans le texte.

La fixation a été mesurée d'une part dans un milieu contenant du magnésium et d'autre part en l'absence de magnésium (milieu contenant de l'EDTA).

La composition de ces milieux est la suivante :

- . Milieu  $Mg^{++}$  : tampon Tris-HCl 50,0 mM,  $MgCl_2$  3,0 mM, pH 7,5.
- . Milieu EDTA : tampon Tris-HCl 50,0 mM, EDTA 1,0 mM, pH 7,5.

L'incubation est faite pendant 30 minutes à 30°C. Pour séparer le ( $^{14}C$ ) ADP lié à la protéine de l'ADP libre, les échantillons sont déposés sur des colonnes de Sephadex G-50 (fine), équilibrées avec les tampons d'incubation. Les échantillons sont élués par centrifugation (800 rpm/2 min.) et des fractions sont prélevées pour mesurer la radioactivité et la quantité de protéine.

La figure 21 A et B montre les courbes de fixation du ( $^{14}C$ ) ADP en présence de  $Mg^{++}$  (A) et EDTA (B). En ce qui concerne les courbes contrôle sur l'enzyme non inactivée, on vérifie qu'en présence de  $MgCl_2$ , il y a environ trois sites de fixation, soit un site de plus qu'en présence d'EDTA. Les courbes de fixation de ( $^{14}C$ ) ADP sur  $F_1$  préalablement inactivé sont similaires aux courbes contrôle. Il n'y a pas de corrélation entre une modification de ces sites et le degré d'inactivation de l'ATPase.

Les ( $^{14}C$ ) nucléotides fixés sur  $F_1$  ont été identifiés par chromatographie sur couche mince de PEI-cellulose. Comme cela est montré sur la figure 22, plus de 85 % de la radioactivité est bien identifiée comme étant du ( $^{14}C$ ) ADP. Des traces de ( $^{14}C$ ) AMP peuvent provenir d'une dégradation partielle de l'ADP pendant l'étape de chauffage (10 minutes, 95°C) lors de l'extraction des nucléotides liés.

Le tableau VI montre les valeurs du nombre de sites et des constantes d'affinité correspondantes ( $K_d$ ), déduites des données de fixation.

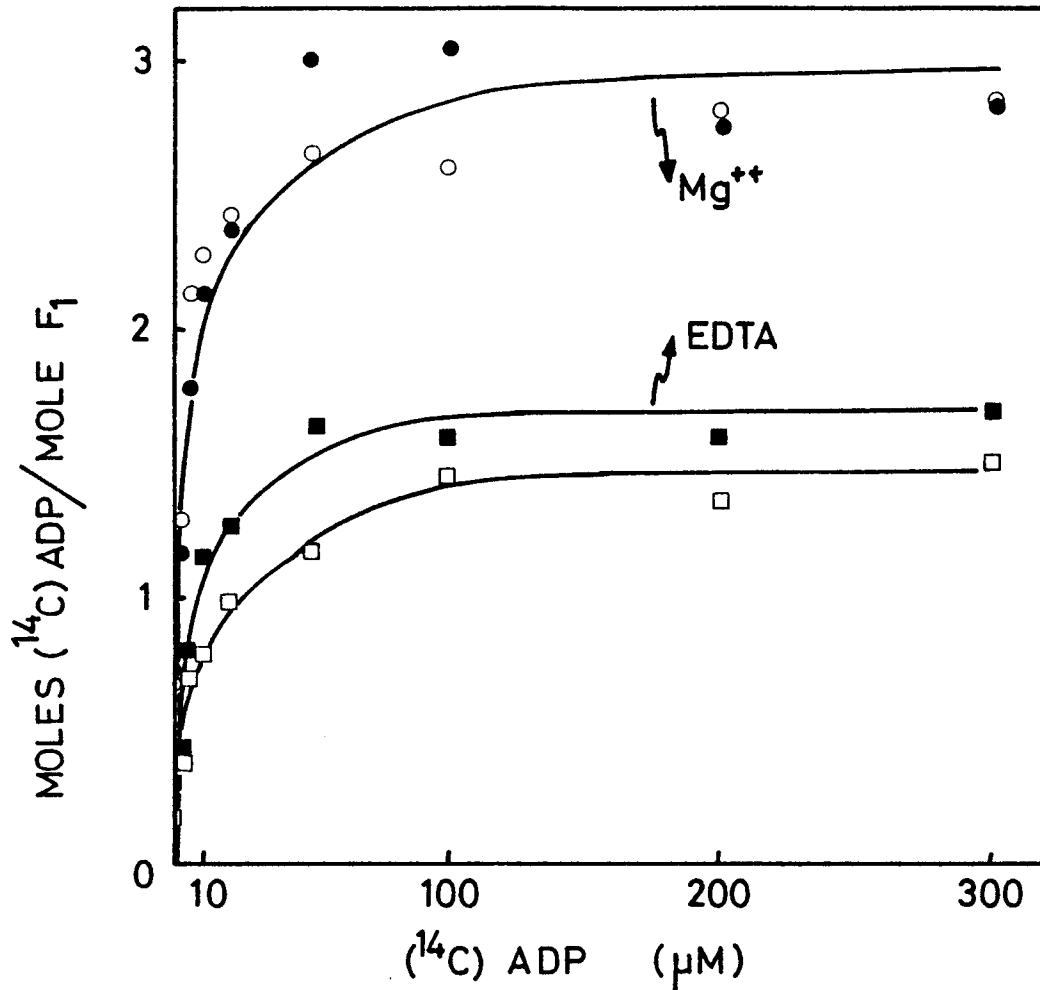


Figure 21 : Fixation du (<sup>14</sup>C) ADP sur F<sub>1</sub> natif et sur F<sub>1</sub> modifié par le dial-ADP.

80 µg de F<sub>1</sub> natif (●-●, ■-■) ou F<sub>1</sub> préalablement inactivé par le dial-ADP (○-○, □-□) (70 % inactivation) sont mis en incubation dans un milieu Tris-HCl 50,0 mM pH 7,5 en présence de MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM (●-●, ○-○) ou en présence d'EDTA 1,0 mM (■-■, □-□) et avec du (<sup>14</sup>C) ADP aux concentrations indiquées. Le volume final est 0,1 ml. Après 30 minutes d'incubation à 30° C, la séparation de l'ADP libre de l'ADP lié à F<sub>1</sub> est faite sur des colonnes de Sephadex G-50 (fine) équilibrées avec Tris-HCl 50,0 mM pH 7,5 contenant MgCl<sub>2</sub> 3,0 mM ou EDTA 1,0 mM selon les conditions préalables d'incubation. La radioactivité et le contenu en protéine sont mesurés sur des portions de l'éluat (voir "Matériel et Méthodes").

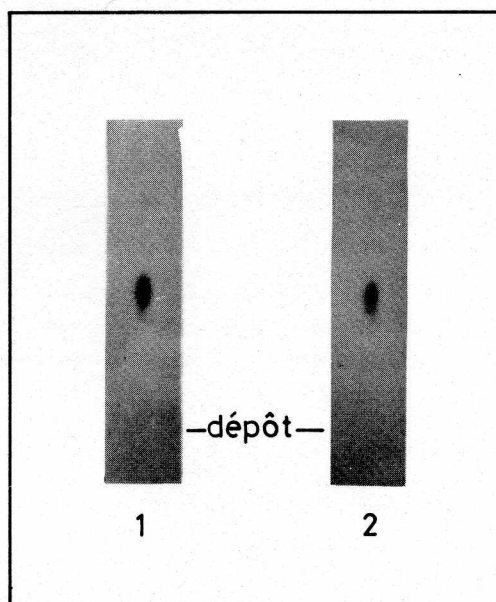


Figure 22 : Identification de la radioactivité liée à  $F_1$  après incubation avec le ( $^{14}C$ ) ADP.

La radioactivité associée à  $F_1$ , contenue dans les éluats obtenus après incubation avec  $300,0 \mu M$  ( $^{14}C$ ) ADP en milieu magnésium (1) ou en milieu EDTA (2), dans les conditions décrites dans la légende de la figure 21, a été analysée comme suit. De l'ATP, ADP, AMP et EDTA sont ajoutés à l'éluat pour obtenir des concentrations finales de  $1,0 \text{ mM}$  ATP, ADP et AMP, et  $5,0 \text{ mM}$  EDTA. L'ensemble est chauffé à  $95^\circ \text{ C}$  pendant 10 minutes pour dénaturer  $F_1$  puis refroidi dans la glace et centrifugé pendant 5 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf. Une portion de  $5 \mu l$  du surnageant, déposée sur une plaque de PEI-cellulose, est chromatographiée dans le système phosphate de potassium  $0,75 \text{ M}$ , pH  $3,5$  puis mise en autoradiographie pendant 24 heures avec un film Kodak "No-Screen".

	N moles ( $^{14}\text{C}$ ) ADP/mole $F_1$	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )
$F_1$ - $\text{MgCl}_2$ (*)	$2,9 \pm 0,6$	$4 \pm 2$
$F_1$ - EDTA (*)	$2,1 \pm 0,5$	$7 \pm 3$
$F_1$ -dial-ADP- $\text{MgCl}_2$	2,7	5,0
$F_1$ -dial-ADP-EDTA	1,5	2,0

Tableau VI : Fixation de ( $^{14}\text{C}$ ) ADP sur  $F_1$  : Nombre de sites (N) et constante de dissociation à partir de la figure 21.  
(\*) 3 expériences indépendantes.

Ces résultats sont à comparer avec ceux déjà obtenus par l'étude de la fluorescence du complexe  $F_1$ -aurovertine. Il avait alors été observé que l'inactivation préalable par le dial-ADP ne modifiait pas l'augmentation de fluorescence provoquée par l'addition d'ADP à un complexe  $F_1$ -aurovertine. Les données actuelles suggèrent que l'ATPase- $F_1$  possède des sites nucléotides "régulateurs" d'affinité élevée ( $K_d = 1$  à  $10 \mu\text{M}$ ) situés sur les sous-unités  $\alpha$  et des sites d'affinité plus réduite ( $K_d = 0,1$  à  $1,0 \text{ mM}$ ) situés sur les sous-unités  $\beta$  correspondant sans doute au site catalytique. Dans les expériences de fixation de ( $^{14}\text{C}$ ) ADP, la technique employée pour effectuer la séparation entre le ligand libre et le ligand lié à la protéine ne permet d'observer que les sites de fixation d'affinité élevée. Tout ADP lié à des sites d'affinité réduite se dissociera pendant la phase de filtration sur Sephadex G-50.

Les expériences décrites dans ce travail permettent de penser que le dial-ADP en plus de sa fixation importante sur des sites non spécifiques se fixe sur les sites nucléotides de faible affinité et qu'il ne reconnaît pas les sites de forte affinité qui restent disponibles pour fixer le ( $^{14}\text{C}$ ) ADP.

DISCUSSION ET CONCLUSION



Les analogues dialdéhydes des adénine nucléotides employés dans ce travail présentent une modification chimique au niveau du ribose dont le cycle est ouvert. Cette partie de la molécule nucléotidique semble moins importante dans le processus de reconnaissance enzyme-substrat que la base ou la chaîne phosphate, comme l'ont montré les travaux antérieurs sur l'ATPase-F<sub>1</sub>, utilisant d'autres analogues comme les arylazidonucléotides (Russell et coll., 1976 ; Lunardi et coll., 1977) ou les trinitrophénylnucléotides (Grubmeyer et Penefsky, 1981).

Les dérivés dialdéhydes peuvent se fixer de façon covalente sur l'ATPase dans la mesure où un groupe aminé comme un ε-NH<sub>2</sub> d'un résidu lysine se trouve favorablement placé. Dans ce cas une liaison imine (base de Schiff) se forme qui est facilement réduite par un agent de réduction comme le borohydrure de sodium.

La présence de résidus lysine dans les sites de fixation des nucléotides est fréquente ; sans doute un tel groupe basique sur la protéine permet une interaction de type électrostatique avec le chaînon polyphosphate du nucléotide.

Les dialdéhyde-nucléotides (dial-nucléotides) ont déjà été employés comme analogues pour l'étude de divers enzymes : 6-phosphogluconate déshydrogénase (Dallocchio et coll., 1976), pyruvate carboxylase (Easterbrook-Smith et coll., 1976), galactosyl transférase (Powell et Brew, 1976), adénylate aminohydrolase (Raggi et Raggi, 1976), DNA polymérase (Salvo et coll., 1976), phénol sulfotransférase (Borchardt et coll., 1978), aminoacyl-tRNA synthétases (Fayat et coll., 1978 ; Hountondji et coll., 1979), phosphofructokinase (Gregory et Kaiser, 1979), adénylcyclase (Westcott et coll., 1980).

En ce qui concerne les ATPases-F<sub>1</sub>, des articles ont été publiés alors que ce travail était en cours et les conclusions des divers auteurs ne sont pas toujours en accord.

Dans le cas de l'ATPase de *Mycobacterium phlei*, Kumar et coll. (1979) utilisent le dial-ATP et le dial-ADP. Pour obtenir une inactivation complète ils trouvent une stoechiométrie de 1 mole de dial-ATP fixé par mole d'enzyme. Le dial-ATP se fixe sur la sous-unité α mais par contre le

dial-ADP se fixe à la fois sur les deux plus grandes sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ .

Dans le cas de l'ATPase- $F_1$  de *E. coli*, Bragg et Hou (1980) et Bragg et coll. (1981) ont démontré que la fixation de dial-ADP ou du dial-ATP était largement non spécifique : plus de 20 moles de dial-nucléotide se fixent par mole d'enzyme.

L'ATPase- $F_1$  de mitochondries de coeur de boeuf a été étudiée par Kozlov et Milgrom (1980). Ils ont trouvé une fixation de 1 mole dial-ADP par mole d'enzyme, qui n'entraîne aucune modification de l'activité ATPasique. Cette fixation a été localisée sur la sous-unité  $\alpha$  et placée sur un site nucléotide non catalytique. Dans le cas de  $F_1$  lié à la membrane mitochondriale la fixation du dial-ADP est suivie d'une inhibition partielle de l'activité ATPasique de ces particules submitochondriales. Kozlov et Milgrom (1980) sur les bases de leurs expériences, proposent un mécanisme de synthèse de l'ATP où le site régulateur joue un rôle dans le transfert de l'ADP et du  $P_i$  vers le site catalytique localisé dans une région plus hydrophobique de la protéine.

Par contre, Lowe et coll. (1979b) montrent que l'interaction du dial-ATP sur la même ATPase- $F_1$  des mitochondries de coeur de boeuf n'est pas aussi spécifique que le suggéraient les résultats trouvés par Kozlov et Milgrom (1980) avec le dial-ADP et par exemple, lors de l'inactivation par le dial-ATP les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont marquées.

Le dial-ADP a également été employé par Baubichon et coll. (1981) qui ont obtenu une inactivation de l'ATPase des mitochondries de coeur de porc. Dans ce cas, le dial-ADP a été employé comme une sonde du site régulateur, responsable de l'inhibition "hystérétique" causée par l'ADP. Cependant aucune donnée n'a été présentée en ce qui concerne la fixation du ( $^{14}C$ ) dial-ADP.

Les résultats présentés dans cette thèse montrent que l'incubation de l'ATPase- $F_1$  avec les dial-nucléotides : dial-ATP, dial-ADP ou dial-AMP s'accompagne d'une inactivation progressive de l'activité ATPasique. L'ordre croissant d'efficacité des dérivés est : dial-ATP, dial-AMP et dial-ADP. Il convient cependant de signaler que l'emploi du dérivé dial-AMP n'a fait l'objet d'aucune publication.

Dans les conditions expérimentales employées qui utilisent un excès important de dial-nucléotide (dial-ATP, dial-ADP ou dial-AMP) par rapport à l'enzyme, les cinétiques sont de pseudo-premier ordre. De telles cinétiques de pseudo-premier ordre ont été montrées par Lowe et coll. (1979b) pour l'inactivation de l'ATPase-F<sub>1</sub> des mitochondries de coeur de boeuf par le dial-ATP, par Kumar et coll. (1979) dans le cas de l'ATPase de *Mycobacterium phlei* inactivée par le dial-ATP et par Bragg et Hou (1980) pour l'ATPase-F<sub>1</sub> de *E. coli* inactivée par le dial-ADP. L'analyse des vitesses d'inactivation en fonction de la concentration en dial-ADP par Bragg et Hou (1980) suggère que l'inactivation est due à la réaction d'une mole de dial-ADP par site actif. L'analyse des vitesses d'inactivation par le dial-ATP (Bragg et coll., 1981) est plus complexe. Après une phase de latence, l'inactivation qui se développe n'est plus de pseudo-premier ordre.

Dans le cas de nos résultats, l'analyse des vitesses d'inactivation en fonction des concentrations des dial-nucléotides montre que l'inactivation complète de l'enzyme correspond à la réaction d'une mole de dial-AMP, ADP ou ATP par site actif. Le dial-ATP en présence de magnésium fait exception (0,6 mole/site actif) ; mais dans ce cas, il faut tenir compte du fait que le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> est hydrolysé par l'ATPase et qu'à son action propre se superposent les effets du dial-ADP, son produit d'hydrolyse, et dont l'efficacité comme inactivateur est meilleure. On peut également penser que seul le dial-ATP (libre) est inactivateur. Le dial-ATP-Mg<sup>++</sup> étant en équilibre avec le dial-ATP (libre) il en résulte que la stoechiométrie de la réaction d'inactivation ne peut pas être déterminée avec précision en présence de Mg<sup>++</sup>.

Si les inactivations par les dial-ATP et dial-ADP étaient à prévoir, l'inactivation en présence de dial-AMP est surprenante si l'on sait que l'AMP lui-même ne se fixe pas sur F<sub>1</sub>. La spécificité de l'action du dial-AMP vue au niveau des mesures cinétiques (1 mole dial-AMP réagissant par site actif pour obtenir l'inactivation complète) est en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'ouverture du cycle du ribose par le periodate provoquerait une extension de la molécule de dial-AMP qui pourrait devenir alors voisine de la taille de la molécule d'ADP.

L'inactivation par les dial-nucléotides a été étudiée en fonction du pH (de pH 7,0 à pH 9,0). La vitesse d'inactivation est plus rapide aux pH les plus alcalins, ceci étant en accord avec l'établissement d'une base de Schiff lors de l'inactivation de l'ATPase. En effet pour que la liaison imine puisse s'établir il est nécessaire d'avoir la fonction amine sous sa forme  $\text{-NH}_2$ , forme qui devient prédominante au fur et à mesure que le pH augmente.

Les courbes de vitesse d'inactivation en fonction du pH indiquent que le  $\text{pK}_a$  de la réaction correspondant à l'étape limitante de l'inactivation est d'environ 8,0. Cette valeur est faible si on la compare à un  $\text{pK}_a$  de 10,0 pour la réaction typique de protonation d'un résidu  $\text{-NH}_2$  lysine  $\text{-NH}_2 + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{-NH}_3^+$ . Néanmoins des valeurs de  $\text{pK}_a$  aussi faibles que 8,0 ont déjà été trouvées pour l'inactivation d'autres enzymes par établissement d'une base de Schiff avec des lysines de la protéine. C'est le cas, par exemple, de la glutamate déshydrogénase inactivée par le pyridoxal (Piszkiwicz et Smith, 1971) et de la méthionyl tRNA synthétase inactivée par le dial-tRNA (Hountondji et coll., 1979). Le déplacement de la valeur du  $\text{pK}_a$  de l' $\epsilon\text{-NH}_2$  de la lysine est interprété sur la base d'un environnement hydrophobe ou bien de la présence de charges positives proches qui retardent la protonation du  $\text{-NH}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{-NH}_3^+$ .

Les expériences ultérieures ont utilisé le dial-ADP qui présente la plus grande efficacité d'inactivation vis-à-vis de l'activité ATPasique.

Une technique pour étudier les effets sur l'ATPase de l'inactivation par le dial-ADP a consisté à utiliser l'aurovertine comme sonde fluorescente spécifique. L'intensité de fluorescence du complexe  $\text{F}_1$ -aurovertine est sensible à l'addition des nucléotides. Cela permet de distinguer deux types de sites : un site de haute affinité qui fixe l'ADP et entraîne une augmentation de fluorescence, et un site d'affinité plus faible qui fixe l'ATP et entraîne une diminution de fluorescence. L'inactivation préalable par le dial-ADP ne modifie pas la réponse vis-à-vis de l'ADP mais par contre supprime la diminution de fluorescence en présence d'ATP. Cette expérience peut s'interpréter en supposant que le dial-ADP modifie le site de fixation de l'ATP mais pas le site de fixation de l'ADP. Ceci est en accord avec les mesures de fixation non-covalente du ( $^{14}\text{C}$ ) ADP qui ont montré que  $\text{F}_1$  préalablement inactivé par le dial-ADP conservait complètement les sites de fixation de haute affinité pour le ( $^{14}\text{C}$ ) ADP.

Contrastant avec l'apparente spécificité de l'action des dial-nucléotides déduite de cinétiques d'inactivation (1 mole dial-nucléotide par site catalytique pour 100 % d'inactivation) et des mesures de fluorescence de l'aurovertine (modification du site ATP mais pas du site ADP) la mesure directe de la fixation du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP lors de l'inactivation s'avère non-spécifique. Par extrapolation à 100 % d'inactivation, on trouve une fixation d'environ 11 moles de dial-ADP par mole d'enzyme. Les gels de polyacrylamide en présence de SDS montrent que la radioactivité incorporée se répartit sur les sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Parmi les 11 sites de fixation du ( $^{14}\text{C}$ ) dial-ADP il est possible de protéger 3 sites si l'incubation est faite en présence d'un excès d'ATP ou d'ADP.

Par rapport aux données de la littérature sur la fixation des ( $^{14}\text{C}$ ) dial-nucléotides les résultats obtenus dans cette thèse sont analogues à ceux publiés sur le  $F_1$ -mitochondrial par Lowe et coll. (1979b) et sur le  $F_1$  de la bactérie *E. coli* (Bragg et Hou, 1980 ; Bragg et coll., 1981). Il n'a pas été possible de reproduire les résultats de Kozlov et Milgrom (1980) qui montraient une incorporation spécifique de 1 dial-ADP par mole de  $F_1$  sans inactivation. Cependant, dans les données publiées dans la littérature, l'étude des sites de fixation des adénine nucléotides n'a jamais été abordée, comme dans cette thèse, grâce à la sonde fluorescente qu'est l'aurovertine D.

Les données actuelles sur les sites de reconnaissance des nucléotides sur l'ATPase- $F_1$  mitochondriale s'interprètent en considérant un site "régulateur" d'affinité élevée dont la fonction n'est pas vraiment connue avec précision. Ce site (site I, figure 23) situé sans doute sur les sous-unités  $\alpha$ , n'est pas modifiable par les dial-nucléotides soit parce que sa spécificité nécessite un nucléotide intact ou bien parce qu'il ne comporte pas de résidu lysine correctement placé pour établir une liaison imine. Ce site (I) reste disponible lors des mesures de fixation du ( $^{14}\text{C}$ ) ADP et des expériences de fluorescence de l'aurovertine.

Les dial-nucléotides peuvent par contre réagir avec le site catalytique (site II, figure 23). Ces sites situés sur la sous-unité  $\beta$  ont une affinité assez faible ( $K_d = 10^{-4}$  M), ce qui fait qu'ils ne sont pas mesurables par fixation non covalente de ( $^{14}\text{C}$ ) ADP par la technique de centrifugation-filtration. La fixation d'un dial-nucléotide sur le site catalytique s'accompagne de l'inactivation de l'enzyme. En plus de ces sites spécifiques, les dial-nucléotides peuvent réagir avec des sites non-spécifiques, qui correspondent à des groupes  $\epsilon\text{-NH}_2$  lysine facilement accessibles.

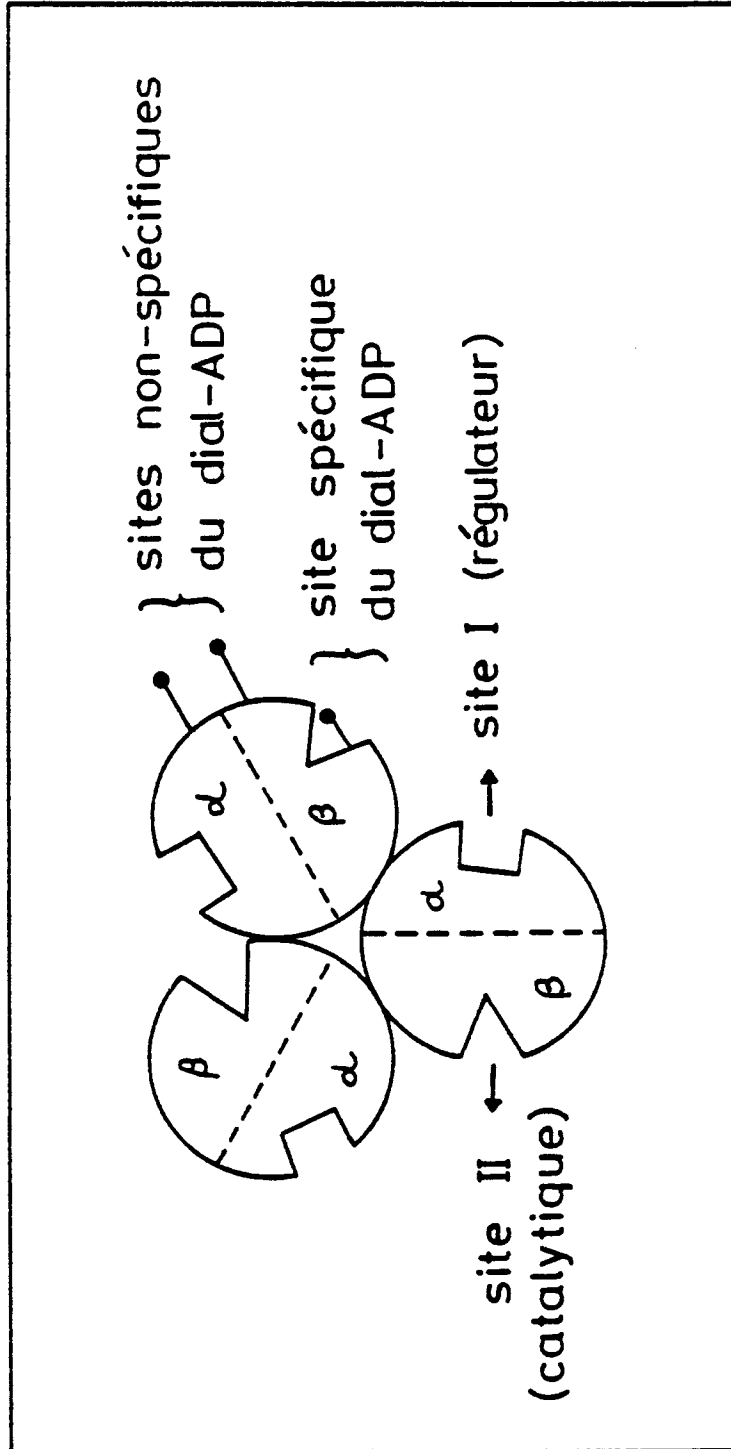


Figure 23 : Représentation schématique des sites de fixation de nucléotides sur F<sub>1</sub>.

BIBLIOGRAPHIE

(page 10)

- Abrams A., Nolan E.A., Jensen C. et Smith J.B. (1973).  
Tightly bound adenine nucleotide in bacterial membrane ATPase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 22-29.

(page 10)

- Adolfsen R. et Moudrianakis E.N. (1976).  
Binding of adenine nucleotides to the purified 13 S coupling factor of bacterial oxidative phosphorylation.  
Arch. Biochem. Biophys., 172, 425-433.

(page 9)

- Altendorf K., Harold F.M. et Simoni R.D. (1974).  
Impairment and restoration of the energized state in membrane vesicles of a mutant of *Escherichia coli* lacking adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem., 249, 4587-4593.

(page 7)

- Amzel L.M. et Pedersen P.L. (1978).  
Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. Crystallization and X-ray diffraction studies of the F<sub>1</sub>-component of the enzyme.  
J. Biol. Chem., 253, 2067-2069.

(page 7)

- Baird B.A. et Hammes G.G. (1976).  
Chemical cross-linking studies of chloroplast coupling factor I.  
J. Biol. Chem., 251, 6953-6962.

(page 68)

- Baubichon H., Godinot C., Di Pietro A. et Gautheron D.C. (1981).  
Competition between ADP and nucleotide analogues to occupy regulatory site(s) related to hysteretic inhibition of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 100, 1032-1038.

(page 56)

- Bertina R.M. (1972).  
The interaction of oligomycin and aurovertin with the ATPase complex in intact mitochondria.  
Ph. D. Thesis, Université d'Amsterdam.



(page 54)

- Borch R.F., Bernstein M.D. et Durst H.D. (1971).  
The cyanohydrinborate anion as a selective reducing agent.  
J. Am. Chem. Soc., 93, 2897-2904.

(page 67)

- Borchardt T., Wu S.E. et Schasteen C.S. (1978).  
Adenine 5'-diphosphate dialdehyde: an affinity labeling reagent for  
phenol-sulfotransferase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 81, 841-849.

(page 5)

- Boyer P.D. (1977).  
Coupling mechanisms in capture, transmission, and use of energy.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 957-966.

(page 24)

- Bradford M.M. (1976).  
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities  
of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal. Biochem., 72, 248-254.

(page 8)

- Bragg P.D. et Hou C. (1975).  
Subunit composition, function and spatial arrangement in the  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$   
activated adenosine triphosphatases of *Escherichia coli* and *Salmonella*  
*typhimurium*.  
Arch. Biochem. Biophys., 167, 311-321.

(pages 54, 68, 69, 71)

- Bragg P.D. et Hou C. (1980).  
A difference in the affinity labeling of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -activated ATPases  
of normal and *Unc A* strains of *Escherichia coli* by the 2',3'-dialdehyde  
derivative of adenosine 5'-diphosphate.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 952-957.

(pages 54, 68, 69, 71)

- Bragg P.D., Lotter H.S. et Hou C. (1981).  
Affinity labeling of purified  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -activated ATPase of *Escherichia coli* by the 2', 3'-dialdehydes of adenosine 5'-di and triphosphates.  
Arch. Biochem. Biophys., 207, 290-299.

(page 10)

- Carlier M.F. et Hammes G.G. (1979).  
Interaction of nucleotides with chloroplast coupling factor 1.  
Biochemistry, 18, 3446-3451.

(page 9)

- Cattell K.J., Lindop C.R., Knight I.G. et Beechey R.B. (1971).  
The identification of the site of action of N-N'-dicyclohexylcarbodiimide as a proteolipid in mitochondrial membranes.  
Biochem. J., 125, 169-177.

(page 8)

- Catterall W.A., Coty W.A. et Pedersen P.L. (1973).  
Adenosine triphosphatase from rat liver mitochondria. III. Subunit composition.  
J. Biol. Chem., 248, 7427-7431.

(page 67)

- Dallochio F., Negrini R., Signorini M. et Ripa M. (1976).  
Identification of the chemical groups involved in the binding of periodate-oxidized  $\text{NADP}^+$  to 6-phosphogluconate dehydrogenase.  
Biochim. Biophys. Acta, 429, 629-634.

(page 54)

- Di Pietro A., Godinot C., Martin J.C. et Gautheron D.C. (1979).  
Affinity labeling of catalytic and regulatory sites of pig heart mitochondrial  $\text{F}_1$ -ATPase by 5'-p-fluorosulfonylbenzoyl-adenosine.  
Biochemistry, 18, 1738-1745.

(page 5)

- Downie J.A., Gibson F. et Cox G.B. (1979).  
Membrane adenosine triphosphatases of prokaryotic cells.  
Ann. Rev. Biochem., 48, 103-131.

(pages 11, 20, 32, 67)

- Easterbrook-Smith S.B., Wallace J.C. et Keech D.B. (1976).  
Pyruvate carboxylase : affinity labelling of the magnesium adenosine triphosphate binding site.  
Eur. J. Biochem., 62, 125-130.

(page 50)

- Edsall J.T. (1965).  
Proteins as acids and bases.  
Dans "Proteins, amino acids and peptides" (Cohn E.J., Edsall J.T. Ed.)  
pp. 444-505, Hafner Publishing, New York.

(page 5)

- Ernster L. (1977).  
Chemical and chemiosmotic aspects of electron transport-linked phosphorylation.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 981-995.

(page 9)

- Esch F.S. et Allison W.S. (1978).  
Identification of a tyrosine residue at a nucleotide binding site in the  $\beta$  subunit of the mitochondrial ATPase with p-fluorosulfonyl [ $^{14}\text{C}$ ]-benzoyl-5'-adenosine.  
J. Biol. Chem., 253, 6100-6106.

(page 8)

- Farron F. (1970).  
Isolation and properties of a chloroplast coupling factor and heat-activated adenosine triphosphatase.  
Biochemistry, 9, 3823-3828.

(pages 32, 67)

- Fayat G., Fromant M. et Blanquet S. (1978).  
Aminoacyl-tRNA synthetases : affinity labeling of the ATP binding site by 2', 3'-ribose oxidized ATP.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2088-2092.

(page 9)

- Ferguson S.J., Lloyd W.J., Lyons M.H. et Radda G.K. (1975a).  
The mitochondrial ATPase. Evidence for a single essential tyrosine residue.  
Eur. J. Biochem., 54, 117-126.

(page 9)

- Ferguson S.J., Lloyd W.J. et Radda G.K. (1975b).  
The mitochondrial ATPase. Selective modification of a nitrogen residue  
in the  $\beta$  subunit.  
Eur. J. Biochem., 54, 127-133.

(page 9)

- Fillingame R.H. (1975).  
Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-reactive protein component  
of the adenosine 5'-triphosphate energy-transducing system of *Escherichia  
coli*.  
J. Bacteriol., 124, 870-883.

(page 27)

- Fiske C.H. et Subbarow Y. (1925).  
The colorimetric determination of phosphorus.  
J. Biol. Chem., 66, 375-400.

(page 10)

- Garrett N.E. et Penefsky H.S. (1975).  
Interaction of adenine nucleotides with multiple binding sites on beef  
heart mitochondrial adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem., 250, 6640-6647.

(page 8)

- Godinot C., Di Pietro A. et Gautheron D.C. (1975).  
Masking of co-operativity of nucleotide sites in pig heart mitochondrial  
ATPase ( $F_1$ ) by heating.  
FEBS Lett., 60, 250-255.

(page 24)

- Gornall A.G., Bardawill C.J. et David M.M. (1949).  
Determinations of serum albumin by means of biuret reaction.  
J. Biol. Chem., 177, 751-766.

(page 67)

- Gregory M.R. et Kaiser E.T. (1979).  
Inactivation of phosphofructokinase by dialdehyde-ATP.  
Arch. Biochem. Biophys., 196, 199-208.

(page 67)

- Grubmeyer C. et Penefsky H.S. (1981).  
The presence of two hydrolytic sites on beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem., 256, 3718-3727.

(page 10)

- Harris D.A., Rosing J., Van de Stadt R.J. et Slater E.C. (1973).  
Tight binding of adenine nucleotides to beef heart mitochondrial ATPase.  
Biochim. Biophys. Acta, 314, 149-153.

(page 10)

- Harris D.A. et Slater E.C. (1975).  
Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase of chloroplasts and their role in photophosphorylation.  
Biochim. Biophys. Acta, 387, 335-348.

(page 10)

- Harris D.A., Radda G.K. et Slater E.C. (1977).  
Tightly bound nucleotides of the energy-transducing ATPase, and their role in oxidative phosphorylation. II. The beef heart mitochondrial system.  
Biochim. Biophys. Acta, 459, 560-572.

(page 9)

- Harris D.A. (1978).  
The interactions of coupling ATPases with nucleotides.  
Biochim. Biophys. Acta, 463, 245-273.

(pages 9, 10)

- Hilborn D.A. et Hammes G.G. (1973).  
Equilibrium binding of nucleotides to beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase.  
Biochemistry, 12, 983-990.

(page 9)

- Hinkle P.C. et Horstman L.L. (1971).  
Respiration-driven proton transport in submitochondrial particles.  
J. Biol. Chem., 246, 6024-6028.

(pages 32, 67, 70)

- Hountondji C., Fayat G. et Blanquet S. (1979).  
Complete inactivation and labeling of methionyl-tRNA synthetase by  
periodate-treated initiator tRNA in the presence of sodium  
cyanohydridoborate.  
Eur. J. Biochem., 102, 247-250.

(page 8)

- Kagawa Y., Sone N., Yoshida M., Hirata H. et Okamoto H. (1976).  
Proton translocation ATPase of a thermophilic bacterium. Morphology,  
subunits and chemical composition.  
J. Biochem., 80, 141-151.

(page 9)

- Kagawa Y., Ohta S., Yoshida M. et Sone N. (1980).  
Functions of subunits of H<sup>+</sup>-ATPase.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 358, 103-117.

(pages 14, 16, 20)

- Knowles A.F. et Penefsky H.S. (1972a).  
The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase.  
Isolation procedures.  
J. Biol. Chem., 247, 6617-6623.

(pages 7, 8)

- Knowles A.F. et Penefsky H.S. (1972b).  
The subunit structure of beef heart mitochondrial adenosine triphospha-  
tase. Physical and chemical properties of isolated subunits.  
J. Biol. Chem., 247, 6624-6630.

(pages 68, 71)

- Kozlov I.A. et Milgrom Y.M. (1980).  
The non-catalytic nucleotide-binding site of mitochondrial ATPase is  
localized on the  $\alpha$ -subunit(s) of factor F<sub>1</sub>.  
Eur. J. Biochem., 106, 457-462.

(pages 32, 67, 69)

- Kumar G., Kalra V.K. et Brodie A.F. (1979).  
Affinity labeling of coupling factor-latent ATPase from *Mycobacterium phlei* with 2', 3'-dialdehyde derivatives of adenosine 5'-triphosphate and adenosine 5'-diphosphate.  
J. Biol. Chem., 254, 1964-1971.

(page 8)

- Lambeth D.O. et Lardy H.A. (1971).  
Purification and properties of rat liver adenosine triphosphatase.  
Eur. J. Biochem., 22, 355-363.

(pages 7, 56)

- Lardy H.A., Connelly J.L. et Johnson D. (1964).  
Antibiotics as tools for metabolic studies. II. Inhibition of phosphoryl transfer in mitochondria by oligomycin and aurovertin.  
Biochemistry, 3, 1961-1968.

(page 9)

- Lauquin G., Pougeois R. et Vignais P.V. (1980).  
4-azido-2-nitrophenyl phosphate, a new photoaffinity derivative of inorganic phosphate. Study of its interaction with the inorganic phosphate binding site of beef heart mitochondrial adenosine triphosphate.  
Biochemistry, 19, 4620-4626.

(page 10)

- Leimgruber R.M. et Senior A.E. (1976).  
Removal of "tightly bound" nucleotides from soluble mitochondrial adenosine triphosphatase ( $F_1$ ).  
J. Biol. Chem., 251, 7103-7109.

(page 22)

- Lowe P.N., Baum H. et Beechey R.B. (1979a).  
Preparation and chemical properties of periodate-oxidized adenosine triphosphate and some related compounds.  
Biochem. Soc. Trans., 7, 1131-1133.

(pages 54, 68, 69, 71)

- Lowe P.N., Baum H. et Beechey R.B. (1979b).  
Interactions between periodate-oxidized adenosine triphosphate and the mitochondrial adenosine triphosphatase.  
Biochem. Soc. Trans., 7, 1133-1136.

(pages 11, 67)

- Lunardi J., Lauquin G.J.M. et Vignais P.V. (1977).  
Interaction of azidonitrophenyl-aminobutyryl-ADP, a photoaffinity ADP analog, with mitochondrial adenosine triphosphatase. Identification of the labeled subunits.  
FEBS Lett., 80, 317-323.

(page 10)

- Maeda M., Kobayashi H., Futai M. et Anraku Y. (1976).  
Non-covalently bound adenine nucleotides in adenosine triphosphatase of *Escherichia coli*.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 228-234.

(page 9)

- Mc Carty R.E. et Racker E. (1967).  
The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N-N'-dicyclohexylcarbodiimide.  
J. Biol. Chem., 242, 3435-3439.

(page 52)

- Meloche H.P. (1967).  
Bromopyruvate inactivation of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconic aldolase. I. Kinetic evidence for active site specificity.  
Biochemistry, 6, 2273-2280.

(page 5)

- Mitchell P. (1961).  
Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.  
Nature, 191, 144-148.



(page 5)

- Mitchell P. (1966).  
Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation.  
Biol. Rev., 41, 445-502.

(page 5)

- Mitchell P. (1977).  
Vectorial chemiosmotic processes.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 996-1105.

(page 56)

- Muller J.L.M., Rosing J. et Slater E.C. (1977).  
The binding of aurovertin to isolated  $F_1$  (mitochondrial ATPase).  
Biochim. Biophys. Acta, 462, 422-437.

(pages 5, 7)

- Nelson N. (1976).  
Structure and function of chloroplast ATPase.  
Biochim. Biophys. Acta, 456, 314-338.

(page 56)

- Osselton M.D., Baum H. et Beechey R.B. (1974).  
Isolation, purification and characterization of aurovertin B.  
Biochem. Soc. Trans., 2, 200-203.

(page 26)

- Patterson M.S. et Greene R.C. (1965).  
Measurement of low energy  $\beta$ -emitters in aqueous solution by liquid  
scintillation counting emulsions.  
Anal. Chem., 37, 854-857.

(page 29)

- Penefsky H.S. (1977)  
Reversible binding of  $P_i$  by beef heart mitochondrial adenosine  
triphosphatase.  
J. Biol. Chem., 252, 2891-2899.

(page 5)

- Penefsky H.S. (1979).

Mitochondrial ATPase.

Dans "Advances in Enzymology" (Meister A., Ed.) 49, 223-280. John Wiley et Sons, New York.

(pages 50, 70)

- Piszkiwicz D. et Smith E.L. (1971).

Bovine liver glutamate dehydrogenase. Equilibria and kinetics of inactivation by pyridoxal.

Biochemistry, 10, 4538-4544.

(page 9)

- Pougeois R., Satre M. et Vignais P.V. (1979).

Reactivity of mitochondrial  $F_1$ -ATPase to dicyclohexylcarbodiimide. Inactivation and binding studies.

Biochemistry, 18, 1408-1413.

(page 67)

- Powell J.T. et Brew K. (1976).

Affinity labeling of bovine colostrum galactosyltransferase with a uridine 5'-diphosphate derivative.

Biochemistry, 15, 3499-3505.

(page 7)

- Pullman M.E., Penefsky H.S., Datta A. et Racker E. (1960).

Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.

I. Purification and properties of soluble, dinitrophenol-stimulated adenosine triphosphatase.

J. Biol. Chem., 235, 3322-3329.

(page 7)

- Pullman M.E. et Monroy G.C. (1963).

A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase.

J. Biol. Chem., 238, 3762-3769.

(pages 5, 6)

- Racker E. (1977).  
Mechanisms of energy transformations.  
Ann. Rev. Biochem., 46, 1006-1014.

(page 67)

- Raggi M.R. et Raggi A. (1976).  
Specific modification of the GTP binding sites of rat 5'-adenylic acid aminohydrolase by periodate-oxidized GTP.  
Biochim. Biophys. Acta, 445, 223-233.

(pages 11, 67)

- Russell J., Jeng S.J. et Guillory R.J. (1976).  
Arylazido aminopropionyl ATP\*, an active site directed photoaffinity reagent for mitochondrial adenosine triphosphatase.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 1225-1234.

(pages 32, 67)

- Salvo R.A., Serio G.F., Evans J.E. et Kimbal A.P. (1976).  
The affinity labeling of amino acids in or about the active center of DNA-dependent DNA polymerase I.  
Biochemistry, 15, 493-497.

(page 29)

- Satre M., Bof M. et Vignais P.V. (1980).  
Interaction of *Escherichia coli* adenosine triphosphatase with aurovertin and citreoviridin : inhibition and fluorescence studies.  
J. Bacteriol., 142, 768-776.

(page 11)

- Scheit K.H. (1980).  
Reactive derivatives of nucleotides.  
Dans "Nucleotides Analogs-Synthesis and Biological Function" (Wiley, Ed.)  
pp. 219-253, John Wiley et Sons, New York.

(page 9)

- Schipakin V., Chuclova E. et Evtodienko Y. (1976).  
Reconstruction of mitochondrial H<sup>+</sup>-transporting system in proteoliposomes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 69, 123-127.

(page 8)

- Senior A.E. et Brooks J.C. (1971).

The subunit composition of the mitochondrial oligomycin-insensitive ATPase.

FEBS Lett., 17, 327-329.

(page 7)

- Senior A.E. (1975).

Mitochondrial adenosine triphosphatase. Location of sulfhydryl groups and disulfide bonds in the soluble enzyme from beef heart.

Biochemistry, 14, 660-664.

(page 9)

- Senior A.E. (1979).

The mitochondrial ATPase.

Dans "Membrane Proteins in Energy Transduction" (Capaldi R.A., Ed.), pp. 233-278, Marcel Dekker, New York.

(page 25)

- Shapiro A.L., Vinuela E. et Maizel J.V. (1967).

Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 815-820.

(page 5)

- Slater E.C. (1977).

Mechanism of oxidative phosphorylation.

Ann. Rev. Biochem., 46, 1015-1026.

(page 10)

- Slater E.C., Kemp A., Van der Kraan J., Muller J.L.M., Roveri O.A., Verschoor G.J., Wagenvoord R.J. et Wielders J.P.M. (1979).

The ATP- and ADP-binding sites in mitochondrial coupling factor 1 and their possible role in oxidative phosphorylation.

FEBS Lett., 103, 7-11.

(page 13)

- Smith A.L. (1967).

Preparation, properties and conditions for assay of mitochondria.  
Methods Enzymol., 10, 81-86.

(page 8)

- Sone N., Yoshida M., Hirata H. et Kagawa Y. (1975).

Purification and properties of a dicyclohexylcarbodiimide-sensitive adenosine triphosphatase from a thermophilic bacterium.  
J. Biol. Chem., 250, 7917-7923.

(page 8)

- Tzagoloff A. et Meagher P. (1971).

Assembly of the mitochondrial membrane system. V. Properties of a dispersed preparation of the rutamycin-sensitive adenosine triphosphatase of yeast mitochondria.  
J. Biol. Chem., 246, 7328-7336.

(pages 7, 56)

- Verschoor G.J., Van der Sluis P.R. et Slater E.C. (1977).

The binding of aurovertin to isolated  $\beta$  subunit of  $F_1$  (mitochondrial ATPase). Stoichiometry of  $\beta$  subunit in  $F_1$ .  
Biochim. Biophys. Acta, 462, 438-449.

(pages 7, 8)

- Vogel G. et Steinhart R. (1976).

ATPase of *Escherichia coli* : purification, dissociation and reconstitution of the active complex from the isolated subunits.  
Biochemistry, 15, 208-216.

(pages 14, 16)

- Vogel G. (1979).

An improved method for the isolation of mitochondrial ATPase ( $F_1$ ) from beef heart.  
Methods Enzymol., 55, 317-319.

(page 25)

- Weber K. et Osborn M. (1969).

The reliability of molecular weight determinations by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

J. Biol. Chem., 244, 4406-4412.

(page 67)

- Westcoott K.R., Olwin B.B. et Storm D.R. (1980).

Inhibition of adenylate cyclase by the 2', 3'-dialdehyde of adenosine triphosphate.

J. Biol. Chem., 225, 8767-8771.

(page 8)

- Yoshida M., Sone N., Hirata H. et Kagawa Y. (1978).

Evidence for three  $\alpha$  subunits in one molecule of  $F_1$ -ATPase from thermophilic bacterium PS3.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 84, 117-122.

(page 11)

- Yount R.G. (1975).

ATP analogs.

Adv. Enzymol., 43, 1-56.

Dernière page d'une thèse

---

VU

Grenoble, le 31 Juillet 1981

Le Président de la thèse

*R. Douce*

R. DOUCE  
Professeur

Vu, et permis d'imprimer,

Grenoble, le 23.11.81

Le Président de l'Université Scientifique et Médicale

*Tanche*

Pour le Président,  
M. TANCHE  
Vice-Président Assesseur

