

DÉSULFINICATION ET DÉCARBOXYLATION ENZYMATIQUES DE L'ACIDE L-CYSTÉINE-SULFINIQUE: SA TRANSFORMATION QUANTITATIVE EN ALANINE ET EN HYPOTAURINE

par

BERNADETTE BERGERET ET FERNANDE CHATAGNER

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

On sait que l'acide L-cystéine-sulfinique est susceptible d'être scindé, *in vitro*, en alanine et anhydride sulfureux, par la désulfinicase existant dans le foie¹. Etudiant cette réaction, en utilisant un extrait aqueux de poudre acétonique de foie de lapin, nous avons constaté que la quantité d'acide cystéine-sulfinique disparu était toujours notablement supérieure à celle qui correspondait à l'alanine formée. Il existe donc une réaction de dégradation de l'acide L-cystéine-sulfinique autre que la désulfinication, et s'exerçant sur lui parallèlement à cette dernière. Nous avons indiqué brièvement² qu'il s'agissait d'une décarboxylation, donnant naissance à un nouvel acide sulfinique aminé, l'hypotaurine. Dans le présent travail, mesurant simultanément la désulfinication et la décarboxylation de l'acide L-cystéine-sulfinique par un extrait de foie, nous montrons que ces deux réactions rendent compte de la totalité de l'acide L-cystéine-sulfinique disparu, et nous indiquons quelques observations qui permettent de caractériser l'hypotaurine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Disposition des expériences

La solution enzymatique est obtenue par extraction de 1 partie (en poids) de poudre acétonique de foie de lapin par 10 parties d'eau distillée, pendant 30 minutes à 0°.

L'extrait de levure est obtenu par traitement de 1 partie (en poids) de levure fraîche de boulangerie par 1 partie d'eau distillée, pendant 4 minutes, à l'ébullition.

La solution tampon utilisée est le mélange classique de phosphates, à pH 7.3 (concentration finale $M/30$). La solution d'acide cystéine-sulfinique contient 124 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ de cystéine-sulfinate de sodium.

Sauf dans le cas des mesures faites avec l'appareil de Warburg, le milieu réactionnel est contenu dans les grandes cellules (environ 50 ml) utilisées habituellement¹, sous atmosphère d'azote; les expériences sont faites à 35°, et durent 2 heures.

Dosages

Le dosage de l'anhydride sulfureux est fait directement, après prélèvement, sous atmosphère d'azote, d'une fraction aliquote du mélange réactionnel, et selon la technique déjà décrite¹.

Les dosages de l'alanine, de l'acide L-cystéine-sulfinique et des autres substances intéressantes ici sont faits de la façon suivante: 5 ml du mélange réactionnel sont portés au bain-marie bouillant pendant cinq minutes; les protéines coagulées sont éliminées par centrifugation; le liquide clair est acidifié par HCl N à pH voisin de 5 et amené à 10 ml; il est alors chromatographié sur une colonne d'alumine activée par HCl, selon la technique de FROMAGEOT, JUTISZ ET LEDERER³. Dans le filtrat se trouvent les acides aminés "neutres", en particulier l'alanine et l'hypotaurine. L'acide L-cystéine-sulfinique est retenu sur la colonne; son éluution se fait d'abord par NaOH $N/2$ puis par NaOH $N/10$, comme dans le cas de l'acide aspartique, dont le comportement est ici tout à fait analogue à celui de l'acide L-cystéine-sulfinique.

Bibliographie p. 146.

Les dosages de l'alanine et de l'acide L-cystéine-sulfinique se font comme il a été dit précédemment¹. Le dosage de l'azote aminé total du groupe des acides aminés "neutres" est fait, dans le filtrat, selon VAN SLYKE-NEILL⁴.

Le dosage du CO₂ est fait par la méthode manométrique de Warburg. Pour éviter toute erreur due au dégagement parallèle de SO₂, le dosage de CO₂ a été fait dans des conditions telles qu'aucune désulfurification n'ait eu lieu, au cours d'expériences particulières: la solution enzymatique est ici dialysée, préalablement à son emploi, contre de l'eau distillée, pendant 7 heures à 0°. Dans ces conditions la solution enzymatique perd la totalité de son action de désulfurification, mais garde une partie de son activité décarboxylante. La solution tampon de phosphates est ici à pH 6.8 (concentration finale *M*/30) et le volume total du milieu réactionnel, contenant 37 μmol de cystéine sulfinate de Na, est de 4.0 ml. Le contenu des cellules de l'appareil de Warburg est, après la fin de la mesure du dégagement de CO₂, soumis aux divers dosages qui viennent d'être décrits.

RÉSULTATS

Un premier groupe de déterminations a porté sur les quantités de SO₂, d'alanine et d'acides aminés "neutres" autres que l'alanine, formées en présence d'extrait de levure. Le détail des expériences et les résultats obtenus montrent que les quantités de SO₂ et d'alanine formées sont bien à peu près les mêmes, mais que la quantité d'acides aminés "neutres" apparue est notablement supérieure à celle de l'alanine.

TABLEAU I

QUANTITÉS (μmol) PRÉSENTES DANS CHAQUE CELLULE ET BILAN DE SO₂, ALANINE, ACIDES AMINÉS NEUTRES TOTAUX, FORMÉS À PARTIR DE L'ACIDE L-CYSTÉINE-SULFINIQUE, APRÈS 2 HEURES À 35°

Contenu des cellules (ml)		Cellules I		Cellules II	
Solution enzymatique		10		10	
Extrait de levure		8		8	
Solution tampon pH 7.3		5		5	
Solution d'ac. cystéine-sulfinique		0		2 (248 μmol)	
Eau		2		0	
Cellule	SO ₂	Alanine	Ac. aminés neutres	Ac. aminés neutres — alanine	
Exp. A					
I	3	70	317	247	
II	78	148	418	270	
II-I	75	78	101	23	
Exp. B					
I	1	69	486	417	
II	77	137	636	499	
II-I	76	68	150	82	

Un deuxième groupe de dosages a inclus celui de l'acide cystéine-sulfinique. Nous avons dû, ici, supprimer l'addition d'extrait de levure qui nuit considérablement à la précision du dosage de l'acide cystéine-sulfinique, cette suppression entraînant, en contre-partie, une diminution de l'intensité de la désulfurification. Le détail des expériences et les résultats obtenus sont donnés dans le tableau II.

Les chiffres du tableau II confirment une fois de plus l'équivalence entre alanine et SO₂ formés; ils montrent en outre que la quantité d'acide cystéine-sulfinique disparue est pratiquement égale à celle de la totalité des acides aminés "neutres" formés.

Un troisième groupe de dosages a porté sur la décarboxylation de l'acide cystéine-

TABLEAU II

QUANTITÉS (μmol) PRÉSENTES DANS CHAQUE CELLULE, ET BILAN DE SO_2 , ALANINE, ACIDES AMINÉS NEUTRES TOTAUX, FORMÉS, ET DE L'ACIDE L-CYSTÉINE-SULFINIQUE DISPARU, APRÈS 2 HEURES À 35°

Contenu des cellules (ml)		Cellule I	Cellule II	
Cellule	SO_2	Alanine	Ac. aminés neutres	Ac. cystéine-sulfinique
Solution enzymatique		10	10	
Solution tampon pH 7.3		5	5	
Solution ac. cystéine-sulfinique		0	2	
Eau		10	8	
I	4	23	86	65
II	54	79	190	211
II-I	50	56	104	102

sulfinique indépendamment de toute désulfinication, cette dernière réaction ayant été supprimée par dialyse préalable de la préparation enzymatique, comme il a été dit plus haut. Le détail et les résultats de ces dosages, indiqués dans le Tableau III, montrent qu'ici les quantités de CO_2 et d'acides aminés "neutres" formés sont d'une part égales entre elles, et d'autre part égales à la quantité d'acide cystéine-sulfinique disparu; l'acide aminé neutre formé, autre que lalanine, dans les expériences du présent travail, provient donc bien de la décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique.

TABLEAU III
DÉCARBOXYLATION DE L'ACIDE CYSTÉINE-SULFINIQUE

Contenu des cellules (ml)		Cellule I	Cellule II
Cellule	$\mu\text{mol CO}_2$ dégagées	$\mu\text{mol ac. aminé dans le filtrat}$	$\mu\text{mol ac. aminé dans l'éluat}$
Préparation enzymatique dialysée		1.75	1.75
Sol. tampon phosphates pH 6.8		1.75	1.75
Sol. cystéine-sulfinate de sodium (64 $\mu\text{mol/ml}$)		0.00	0.50
Eau		0.5	0.0
I	0	22.8	8.3
II	15.0	37.1	30.6
$\mu\text{mol CO}_2$ formées à partir de l'ac. cystéine-sulfinique		$\mu\text{mol ac. aminé neutre apparues dans le filtrat}$	$\mu\text{mol ac. cystéine-sulfinique consommées}$
15.0		14.3	14.9

Caractérisation des produits formés au cours de la désulfinication et de la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique

Pour la caractérisation des substances résultant des actions enzymatiques subies par l'acide cystéine-sulfinique, on prépare divers milieux et solutions que l'on maintient dans les conditions suivantes:

- I. Milieu de la cellule I du Tableau II maintenu 2 heures à 35° .
- II. Milieu de la cellule II du Tableau II maintenu 2 heures à 35° .
- III. Milieu de la cellule I du Tableau II, chauffé 4 minutes à 90° , puis maintenu 2 heures à 35° .
- IV. Milieu de la cellule II du Tableau II chauffé 4 minutes à 90° avant l'introduction d'acide cystéine-sulfinique, puis, après celle-ci, maintenu 2 heures à 35° .

Bibliographie p. 146.

V. Solution de 20 mg de β -alanine dans 10 ml d'une solution normale de NH_4Cl .

VI. Solution de 20 mg des acides aminés suivants: acide aspartique, acide glutamique, glycocolle et alanine, dans 10 ml d'une solution normale de NH_4Cl .

Ces milieux sont ensuite éventuellement débarrassés des protéines par coagulation de ces dernières par la chaleur (4 minutes à 100°). Un même volume ($\sim 10 \mu\text{l}$) de chacune des solutions est alors chromatographié sur papier (Whatman no 1) avec du phénol à 1% de NH_3 . Les chromatogrammes sont révélés soit par une solution de ninhydrine à 0,2% dans le butanol normal (acides aminés), soit par le réactif à l'iodoplatinate⁵ (présence de soufre lié à une fonction réductrice).

L'ensemble des résultats obtenus avec les divers chromatogrammes est donné dans le schéma de la Fig. 1.

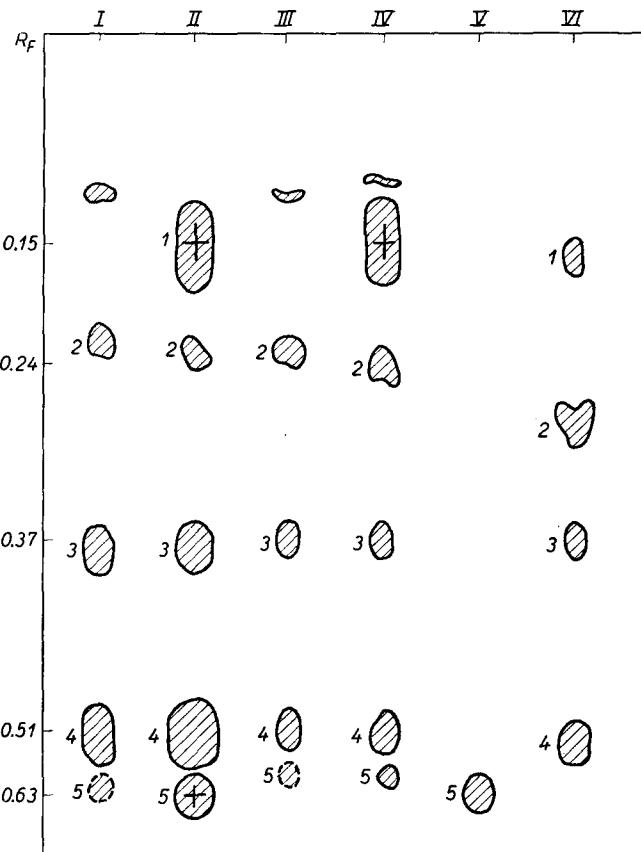


Fig. 1. Les taches révélées uniquement par la ninhydrine sont simplement hachurées. Les taches révélées à la fois par la ninhydrine et l'iodoplatinate sont hachurées et marquées d'une croix.

Commentaires concernant les différentes taches:

I-2 non déterminée; I-3 glycocolle; I-4 alanine; I-5 tache d'origine inconnue n'apparaissant qu'irrégulièrement et n'étant en tous cas jamais ni étendue ni intense; la substance responsable de cette tache ne réagit pas à l'iodoplatinate.

II-1 acide cystéine-sulfinique; II-2 non déterminée; II-3 glycocolle; II-4 alanine; II-5 hypotaurine.

III-2 non déterminée; III-3 glycocolle; III-4 alanine; III-5 comme I-5.

IV-1 acide cystéine-sulfinique; IV-2 non déterminée; IV-3 glycocolle; IV-4 alanine; IV-5 comme I-5.

V-5 β -alanine.

VI-1 acide aspartique; VI-2 acide glutamique; VI-3 glycocolle; VI-4 alanine.

Avant de discuter ces chromatogrammes, il convient de rappeler certains résultats que nous n'avons pas fait figurer ici, à savoir: 1. que la taurine, qui se révèle à la ninhydrine mais non pas à l'iodoplatinate, se place sensiblement au niveau du glycocolle; 2. que l'acide cystéine-sulfinique, qui se révèle à la ninhydrine et à l'iodoplatinate, se place sensiblement au niveau de l'acide aspartique.

L'examen du schéma ci-contre montre que:

1. La quantité d'alanine contenue dans la solution enzymatique active additionnée d'acide cystéine-sulfinique est de beaucoup supérieure à celle des autres solutions enzymatiques: solution active non additionnée d'acide cystéine-sulfinique, ou solutions enzymatiques traitées par la chaleur et additionnées ou non d'acide cystéine-sulfinique; ainsi se trouve confirmés qualitativement les résultats quantitatifs des tableaux précédents.

2. Il apparaît une tache importante (II-5) dans le cas des solutions enzymatiques actives additionnées d'acide cystéine-sulfinique; cette tache correspond à une substance réagissant à la fois à la ninhydrine et à l'iodoplatinate. Cette substance contient donc une fonction NH_2 et du soufre sous une forme encore réductrice. Elle a d'autre part sensiblement le même R_F que la β -alanine. Enfin, les résultats quantitatifs trouvés plus haut indiquent que la substance en question prend naissance par décarboxylation de l'acide cystéine-sulfinique. On est ainsi conduit à admettre qu'il s'agit ici du corps de formule $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2\text{H}$ auquel nous avons donné le nom d'hypotaurine.

CONCLUSIONS

L'ensemble des résultats du présent travail montre qu'il existe dans de foie des animaux supérieurs deux systèmes enzymatiques agissant sur l'acide cystéine-sulfinique en absence d'oxygène; l'un, constitué par la désulfinitase dont le coenzyme est facilement dissociable, provoque la formation d'alanine et de SO_2 ; l'autre, formé par une décarboxylase dont le coenzyme est moins dissociable que le précédent, produit de l'hypotaurine et du CO_2 . Ces deux réactions correspondent quantitativement à l'acide cystéine-sulfinique disparu au cours des expériences.

RÉSUMÉ

L'étude de l'action d'une préparation enzymatique de foie de lapin sur l'acide L-cystéine-sulfinique en absence d'oxygène, montre l'existence, dans le foie des animaux supérieurs, de deux systèmes enzymatiques agissant sur cet acide en anaérobiose: l'un constitué par la désulfinitase dont le coenzyme est facilement dissociable, provoque la formation d'alanine et de SO_2 ; l'autre, formé par une décarboxylase dont le coenzyme est moins dissociable que le précédent, aboutit à la formation d'hypotaurine et de CO_2 . La somme de ces deux réactions correspond quantitativement à l'acide cystéine-sulfinique disparu au cours des expériences. L'hypotaurine est caractérisée par son comportement au cours de la chromatographie sur papier et par ses réactions avec la ninhydrine et l'iodoplatinate.

SUMMARY

The study of the action of an enzymatic preparation of rabbit liver on L-cysteine sulphinic acid, in the absence of oxygen, shows the existence, in the liver of higher animals, of two enzymatic systems acting on this acid; one is formed by the desulfinicase from which the co-enzyme is easily dissociated, provoking the formation of alanine and SO_2 ; the other, formed by a decarboxylase from which the co-enzyme is less easily dissociated, yielded hypotaurine and CO_2 . The sum of these two reactions corresponds quantitatively with the cysteine-sulphinic acid which disappeared during the experiments. The hypotaurine is characterised by paper chromatography and by its reactions with ninhydrin and iodoplatinate.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der Wirkung eines Enzympräparates aus Kaninchenleber auf die L-Cysteinsulfinsäure in Abwesenheit von Sauerstoff zeigt, dass in der Leber der höheren Tiere zwei Enzymsysteme vorkommen, die in Anaerobiose auf diese Säure wirken. Das eine ist die Desulfinicase deren Coenzym leicht dissoziierbar ist und bewirkt die Bildung von Alanin und von SO_2 . Das andere ist eine Decarboxylase deren Coenzym weniger dissoziierbar ist als das erstgenannte und bewirkt die Bildung von Hypotaurin und CO_2 . Die Summe dieser beiden Reaktionen entspricht quantitativ der im Laufe dieser Versuche verschwundenen Menge an Cysteinsulfinsäure. Das Hypotaurin ist durch sein Verhalten bei der Papierchromatographie und seine Reaktionen mit Ninhydrin und Jodoplatinat gekennzeichnet.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ CL. FROMAGEOT, F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 294.
- ² F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Compt. rend.*, 232 (1951) 448.
- ³ M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Médec. et Biol.*, 5 (1947) 229.
- ⁴ D. VAN SLYKE ET J. NEILL, *J. Biol. Chem.*, 61 (1924) 523;
D. VAN SLYKE, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 425.
- ⁵ H. M. WINEGARD, G. TOENNIES ET R. J. BLOCK, *Science*, 108 (1948) 506.

Reçu le 15 octobre 1951