

RÉPERCUSSION D'UNE CARENCE EN VITAMINE B₆
 SUR LE MÉTABOLISME DE L'ACIDE L-CYSTÉINESULFINIQUE,
IN VITRO ET *IN VIVO*, CHEZ LE RAT

par

F. CHATAGNER, H. TABECHIAN ET B. BERGERET

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

Il a été établi que les principales dégradations subies par l'acide L-cystéine-sulfinique, aussi bien *in vitro* sous l'action de préparations enzymatiques obtenues à partir de foie (lapin) que, *in vivo* (rat), consistent essentiellement en une transamination désulfinante d'une part, et une décarboxylation d'autre part, conduisant, la première à la formation de sulfite, oxydé ultérieurement en sulfate, d'acide glutamique et d'alanine, et la seconde à la formation d'hypotaurine, oxydée ultérieurement en taurine^{1,2}. On admet que ces deux types de réactions enzymatiques nécessitent généralement le phosphate de pyridoxal comme coenzyme. Une des méthodes d'étude de l'influence du pyridoxal sur le métabolisme consiste à soumettre des animaux à un régime convenable, dépourvu de vitamine B₆, et de déterminer les effets dus à cette carence. En ce qui concerne les réactions de décarboxylation, des expériences significatives ont été effectuées par ROBERTS³ sur la décarboxylation de l'acide glutamique, et par BLASCHKO⁴ sur celle de l'acide cystéique. Quant aux réactions de transmination, leur étude a donné ici des résultats contradictoires: d'après SCHLENK ET SNELL⁵ l'intensité des transaminations serait nettement diminuée chez les animaux carencés, alors que d'après McHENRY *et al.*⁶ et KRITZMANN⁷ cette intensité ne semble pas influencée par la carence en question. Il nous a paru alors intéressant de rechercher quelles pourraient être les répercussions d'une carence en vitamine B₆ sur le métabolisme de l'acide L-cystéine-sulfinique, et de déterminer en particulier dans quelle mesure les deux principales voies de dégradation indiquées ci-dessus seraient modifiées par une telle carence. Le présent travail indique les premiers résultats de ces recherches, au cours desquelles le métabolisme du soufre a été étudié chez le rat, d'une part par l'analyse chromatographique des acides aminés des urines du rat normal et du rat carencé en vitamine B₆, d'autre part par la détermination *in vitro* de l'ampleur des réactions de transamination et de décarboxylation de l'acide L-cystéinesulfinique dans des préparations de foies provenant de rats normaux et de rats carencés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques

Traitements des animaux. De jeunes rats (Wistar) pesant entre 60 et 80 g sont séparés en deux groupes de chacun dix animaux. Chaque animal reçoit par jour 10 g d'un régime comprenant: 18% de caséine dévitaminée spéciale (Byla); 73% de saccharose; 5% de graisse (huile végétale hydrogénée, Astra); 4% du mélange de sels (8): chlorure de sodium 22 g; phosphate bicalcique hydraté 130 g; citrate de potassium 125 g; sulfate de magnésium 7 H₂O 30 g; citrate ferrique 5 g; "traces"

Bibliographie p. 318.

0.7 g. Les "traces" sont apportées par le mélange: iodure de potassium 12 g; fluorure de sodium 10 g; sulfate de manganèse anhydre 2 g; iodure cuivreux 1 g; alun de potassium anhydre 1 g. En outre, on ajoute à chaque kilo de régime: thiamine 10 mg, riboflavine 10 mg, pantothéate de calcium 40 mg, choline 500 mg, acide nicotinique 100 mg, acide *para*-aminobenzoïque 600 mg, inositol 1 g, biotine 25 µg, vitamine K 20 µg, *α*-tocophérol 10 mg.

Les animaux du groupe 1 (animaux témoins) reçoivent en plus par jour chacun 15 µg de vitamine B₆ (chlorhydrate de pyridoxine, Hoffmann-La Roche) ajoutés au régime sous forme de 1 ml de solution aqueuse; les animaux du groupe 2 (animaux carencés) reçoivent de la même manière 1 ml d'eau. L'introduction éventuelle d'acide L-cystéinesulfonique dans le régime est réalisée par addition de 1% d'acide cystéinesulfonique sous forme de sel de sodium. Tous les animaux disposent de papier filtre et d'eau ordinaire à volonté; ils sont pesés chaque semaine.

Analyse des acides aminés de l'urine. Les urines de 24 heures d'un rat témoin et d'un rat carencé sont recueillies dans des éprouvettes contenant quelques gouttes de chloroforme; les volumes obtenus varient entre 1 et 2 ml; à chaque liquide on ajoute alors, selon WESTALL⁹, trois fois son volume d'alcool et on laisse à la glacière pendant 24 heures, puis le précipité est éliminé par centrifugation; le liquide surnageant est concentré sous pression réduite et son volume est amené à 2 ml (liquide *L*). Ce liquide est chromatographié sur une colonne de 2 g de permutite 50. On sait que, dans ces conditions, seuls l'acide cystéinesulfonique, l'acide cystéique et la taurine passent dans le filtrat¹⁰; les autres acides aminés présents sont retenus sur la colonne d'où ils sont élus par 20 ml d'ammoniaque normale. Après concentration sous pression réduite, l'analyse des acides aminés du filtrat et de l'éluat est faite par chromatographie sur papier Whatman n° 1 en utilisant le phénol à 1% -NH₃ et le mélange butanol-acide formique-eau (75:15:10). Les chromatogrammes sont révélés, les uns par la ninhydrine, les autres par l'iodoplatinate. En outre, l'azote aminé total est dosé selon VAN SLYKE-NEILL.

Déterminations enzymatiques in vitro. Après avoir été maintenus au jeûne pendant 18 heures, les animaux témoins et les animaux carencés sont anesthésiés à l'éther puis sacrifiés par section de la carotide; leur foie est prélevé, et est immédiatement broyé au mortier en présence d'un peu de sable; on ajoute au broyat 10 à 12 ml d'eau distillée refroidie; la suspension obtenue est alors dialysée à 4° pendant 24 heures contre 10 litres d'une solution de bicarbonate de sodium à 100 mg par litre. Après dialyse, la suspension est filtrée sur laine de verre et le liquide est amené à un volume tel que 5 ml correspondent à 1 g de foie frais.

L'étude de la transamination désulfurante est faite dans les conditions optima précisées antérieurement¹: un volume total du milieu réactionnel de 12.5 ml contient 5 ml de solution enzymatique, 5 ml de solution tampon phosphate *M/15* pH 7.3, chlorure de magnésium 10⁻³ *M*, cystéinesulfonate de sodium 10⁻² *M*, α-cétoglutarate de sodium 10⁻² *M*, et, dans certains cas, du sel de calcium de phosphate de pyridoxal (Merck), 25 µg. Le tout, sous azote, est maintenu à 35° pendant 2 heures. Le dosage de SO₂ est effectué selon la méthode habituelle.

L'étude de la décarboxylation utilise les milieux enzymatiques préparés dans les conditions suivantes¹¹: un volume total du milieu réactionnel de 12.5 ml contient 5 ml de la solution enzymatique, 5 ml de solution tampon phosphate *M/15* pH 6.8, du cystéinesulfonate de sodium 10⁻² *M* et, dans certains cas, du sel de calcium de phosphate de pyridoxal à des concentrations variant de 25 µg à 2 mg, seul ou additionné de substances telles que adénosine-triphosphate, chlorure de magnésium 10⁻³ *M*, chlorhydrate de cystéine 10 mg. Le tout, sous azote, est maintenu à 35°, pendant 4 heures. Après ce temps, le liquide est déprotéinisé au bain-marie bouillant pendant quelques minutes; après filtration sur laine de verre, le pH de la solution est amené à 5 par quelques gouttes de HCl 2*N* et le volume est éventuellement ajusté à 10 ml. La moitié de ce liquide est chromatographiée sur une colonne de 5 g d'alumine acide¹². Dans ces conditions, l'hypotaurine passe dans le filtrat¹¹. Ce dernier est concentré à 10 ml sous pression réduite et chromatographié sur une colonne de 5 g de permutite 50. L'hypotaurine est retenue sur cette colonne; elle peut en être élue sélectivement par de l'acide chlorhydrique *N/500*¹⁰. Cet éluat de permutite est concentré à 12 ml; on en dose l'azote aminé, ce qui permet de déterminer la quantité d'hypotaurine formée. Une fraction de cet éluat est chromatographiée sur papier; les réactions à la ninhydrine et à l'iodoplatinate montrent que l'azote aminé éventuellement trouvé dans l'éluat, est bien uniquement celui de l'hypotaurine.

RÉSULTATS

Après avoir été soumis 2 mois aux régimes indiqués, les animaux témoins ont pris du poids (30 à 40 g); les animaux carencés, après avoir grossi pendant les 4 à 5 premières semaines, maigrissent progressivement jusqu'à retrouver à peu près leur poids initial au bout de 2 mois. Cet amaigrissement est concommettant à une perte d'appétit, un manque de vigueur; les animaux ont les pattes rouges et gonflées.

Analyse chromatographique des acides aminés soufrés de l'urine.

Les résultats obtenus ressortent de l'examen du schéma 1, résumant divers chromatogrammes obtenus à l'aide du phénol ammoniacal; sur ce schéma ne sont représentées que les taches correspondant à ceux des acides aminés qui nous intéressent ici. Ce schéma montre que l'urine du rat normal contient de grandes quantités de taurine, et presque toujours des quantités appréciables d'hypotaurine, alors que l'urine du rat carencé ne contient jamais ni taurine ni hypotaurine. Par contre, la chromatographie sur papier du liquide L obtenu à partir de l'urine du rat carencé révèle toujours la présence d'un acide aminé soufré, où le soufre est lié à une fonction réductrice, possédant un R_F d'environ 0.28 dans le solvant phénol-1% NH₃ et de 0.20 dans le solvant butanol-acide formique. Cette

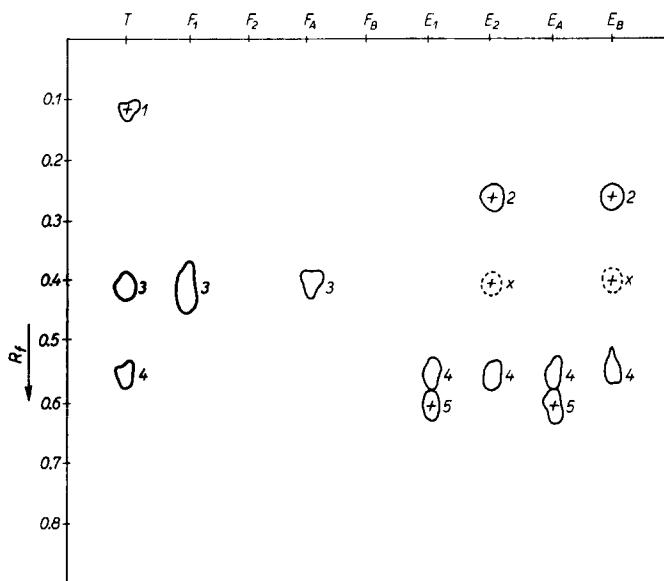


Fig. 1. Chromatogrammes obtenus sur papier Whatman n°1 à l'aide de phénol-1% NH₃

T = Solution témoin contenant: Acide cystéinesulfinique, taurine, alanine.

F_1 et E_1 = filtrat et éluat de permutite de l'urine de rat normal.

F_2 et E_2 = filtrat et éluat de permutite de l'urine de rat carencé.

F_A et E_A = filtrat et éluat de permutite de l'urine de rat normal, après ingestion d'acide cystéine-sulfinique.

F_B et E_B = filtrat et éluat de permutite de l'urine de rat carencé, après ingestion d'acide cystéine-sulfinique.

1 acide cystéinesulfinique; 2 "cystathionine"; 3 taurine; 4 alanine; 5 hypotaurine; x substance inconnue.

Les taches révélatables à la fois à la ninhydrine et à l'iodoplatinate sont marquées d'une croix.

substance n'existe pas dans l'urine du rat normal. Son comportement au cours de la chromatographie sur papier dans les deux solvants utilisés, est tout à fait analogue à celui de la cystathionine et, sans pouvoir encore affirmer son identité avec cette dernière, nous croyons intéressant de souligner ici cette similitude. En outre, il apparaît souvent, sur les chromatogrammes du même liquide L correspondant à des animaux carencés, une autre tache révélatable à la ninhydrine et à l'iodoplatinate, dont le R_F est d'environ 0.41 dans le phénol-1% NH₃ et de 0.04 dans le butanol-acide formique et dont la nature n'a pas encore été identifiée. La substance (x) responsable de cette tache est retenue sur

permutite et en est éluee par l'ammoniaque normale. Enfin, signalons que des traces de méthionine apparaissent quelques fois, et dans l'urine du rat normal et dans celle du rat carencé.

L'addition d'acide cystéinesulfinique au régime des rats normaux et à celui des rats carencés ne donne lieu à aucune apparition ni disparition de nouvel acide aminé soufré. Les chromatogrammes obtenus restent les mêmes. Le seul phénomène sensible, mais dont nous ne pouvons encore donner d'explication, est la diminution de l'azote aminé total de l'urine du rat, carencé ou non, après ingestion d'acide cystéinesulfinique.

Etude enzymatique, in vitro, de la transamination désulfurante.

Le tableau I indique les intensités des transaminations désulfurantes dues à l'action de préparations enzymatiques obtenues à partir de foies de rats témoins et de rats carencés.

TABLEAU I

PRODUCTION DE SO_2 À PARTIR D'ACIDE L-CYSTÉINESULFINIQUE PAR DES PRÉPARATIONS ENZYMATIQUES DE FOIES DE RATS NORMAUX ET DE FOIES DE RATS CARENCÉS EN VITAMINE B_6 , EXPRIMÉE EN $\mu\text{MOL.}$ DE $\text{SO}_2/\text{g FOIE FRAIS}/2\text{h}$

FN	FN + PP	FC	FC + PP
82	81	83	88
91	93	93	92
90	91	88	88
107	93	95	80
81	—	60	—

FN = Extrait de foie normal.

FC = Extrait de foie carencé en vitamine B_6 .

PP = 25 μg de sel de calcium de phosphate de pyridoxal.

Les chiffres de ce tableau montrent que, dans tous les cas, la formation de SO_2 reste pratiquement la même. L'addition de phosphate de pyridoxal aux préparations enzymatiques n'a pas d'effet sensible.

Etude enzymatique, in vitro, de la décarboxylation

Les dosages d'azote aminé, confirmés par les chromatogrammes, montrent que les préparations enzymatiques obtenues à partir d'animaux normaux, donnent toujours lieu à une production d'hypotaurine de l'ordre de 0.9 mg par gramme de foie frais en 4 heures, dans les conditions décrites plus haut. Au contraire, les préparations enzymatiques obtenues à partir d'animaux carencés ne donnent jamais lieu à la formation d'hypotaurine. L'addition de phosphate de pyridoxal, à faible ou forte concentration, en présence ou non de magnésium, d'adénosine-triphosphate ou de cystéine, ne modifie en rien ces résultats, qu'il s'agisse de préparations obtenues à partir des animaux témoins ou des animaux carencés.

DISCUSSION

Les résultats obtenus au cours des expériences précédentes mettent en évidence deux groupes de phénomènes: d'une part, ceux qui concernent le métabolisme des substances soufrées chez les animaux normaux et chez les animaux carencés en vitamine B_6 , indépendamment de toute ingestion d'acide cystéinesulfinique; et d'autre

part ceux qui correspondent à la répercussion de cette même carence sur les enzymes susceptibles d'agir, *in vitro*, sur l'acide cystéinesulfinique. Les analyses chromatographiques montrent la présence quasi permanente d'hypotaurine dans l'urine du rat normal. Cette hypotaurine pourrait être rapprochée de la substance G apparaissant dans les courbes d'analyses chromatographiques d'urine obtenues par STEIN¹³, substance dont le comportement sur résines échangeurs de cations (Dowex et Permutite 50), est analogue à celui observé pour l'hypotaurine¹⁰; on pourrait également rapprocher l'hypotaurine du produit trouvé par CAVALLINI dans l'urine de rats recevant dans leur alimentation de la L-cystine¹⁴, produit présentant des propriétés et des réactions semblables à celles de l'hypotaurine.

La présence de cystathionine dans l'urine du rat carencé en vitamine B₆ serait en accord avec les résultats de BINKLEY¹⁵ d'après lesquels la dégradation de la L-cystathionine en L-cystéine et acide α -aminobutyrique est effectué par un système enzymatique dont le coenzyme est le phosphate de pyridoxal. Si l'on considère que la cystathionine se forme à partir de la méthionine et que la caséine du régime contient 2.8% de méthionine et seulement 0.3% de cystine, on peut envisager l'ampleur du trouble du métabolisme soufré qui résulte du blocage de la dégradation de la cystathionine en cystéine.

Un des résultats essentiels obtenus dans les expériences précédentes est l'absence totale dans l'urine du rat carencé des produits de décarboxylation: hypotaurine et taurine. BLASCHKO⁴ a signalé récemment la disparition de taurine de l'urine du rat carencé en pyridoxine et attribue ce phénomène à une suppression de la décarboxylation de l'acide cystéique; les résultats des déterminations enzymatiques *in vitro* permettent d'affirmer maintenant que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique est aussi totalement supprimée par une carence en vitamine B₆. On peut alors penser que la disparition de la taurine s'explique non plus seulement par la suppression de la décarboxylation de l'acide cystéique, mais aussi par la suppression de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique. En outre si l'on considère d'une part que l'acide cystéinesulfinique est un produit intermédiaire dans la formation de l'acide cystéique à partir de la cystéine¹⁶, et d'autre part que l'oxydation de l'acide cystéinesulfinique en acide cystéique, au moins dans le foie et le rein du rat, est un phénomène limité¹⁷, on doit admettre que l'absence de taurine dans l'urine du rat carencé en vitamine B₆ est surtout due à la suppression de la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique. De nouveaux faits en faveur de cette manière de voir viennent d'être fournis par AWAPARA¹⁸. Cet auteur a établi par des expériences avec ³⁵S, que la décarboxylation s'exerce normalement dans l'organisme du rat sur l'acide cystéinesulfinique et non sur l'acide cystéique.

Quoique la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique soit supprimée par la carence en pyridoxine du régime, la dégradation de cet acide par l'organisme carencé reste cependant possible puisque, après son ingestion, on ne retrouve dans l'urine ni l'acide cystéinesulfinique lui-même, ni son produit d'oxydation, l'acide cystéique. Rapprochant cette observation du fait que la transamination désulfurante ne perd en rien de son importance chez les animaux carencés, on doit penser que la dégradation de l'acide cystéinesulfinique dans l'organisme carencé se produit essentiellement par transamination désulfurante; toutefois, si la formation de sulfite prouve que l'acide β -sulfinylpyruvique a été formé par transamination, on ne peut pas dire que le sort de l'acide pyruvique formé, et notamment sa transformation en alanine par transamination avec l'acide glutamique, reste insensible à la carence en question.

RÉSUMÉ

Le présent travail apporte les premiers résultats d'une étude de la répercussion d'une carence en vitamine B₆ sur le métabolisme de l'acide cystéinesulfinique chez le rat. Des analyses chromatographiques ont d'abord montré que, indépendamment de toute ingestion d'acide cystéinesulfinique, l'urine du rat normal contient de fortes quantités de taurine et une proportion notable d'hypotaurine; ces deux substances disparaissent complètement de l'urine du rat carencé, qui élimine par contre une substance se comportant comme la cystathionine. L'introduction de 1% d'acide cystéinesulfinique dans le régime n'entraîne pas l'apparition de ce même acide dans l'urine, donc, malgré la carence, cet acide est susceptible d'être métabolisé par le rat. Des déterminations enzymatiques faites *in vitro* avec des préparations de foies de rats carencés ont permis d'établir que si la décarboxylation est totalement supprimée, la transamination désulfurante a néanmoins lieu et possède une intensité analogue à celle obtenue avec des extraits de foies de rats recevant un régime normal.

SUMMARY

The present work reports the first results of a study of the repercussion of a vitamin-B₆ deficiency on the metabolism of cysteinesulphinic acid in the rat. Chromatographic analyses have first of all shown that, independent of all cysteinesulphinic acid uptake, the urine of normal rat contains large quantities of taurine and a notable proportion of hypotaurine; these two substances disappear completely from the urine of rats fed on a deficient diet, which excrete, however, a substance that behaves like cystathionine. The introduction of 1% cysteinesulphinic acid into the diet does not stop the appearance of this same acid in the urine, because, in spite of the deficiency in diet, this acid can be metabolised by the rat. Some enzymic determinations made *in vitro* with preparations of livers of rats fed on a deficient diet have established that, if decarboxylation is completely suppressed, the desulphinating transamination nevertheless takes place and possesses an intensity analogous to that obtained with extracts of livers of rats fed a normal diet.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit bringt die ersten Ergebnisse einer Untersuchung über die Rückwirkung eines Vitamin B₆-Entzugs auf den Cysteinsulfinsäurestoffwechsel bei der Ratte. Chromatographische Analysen zeigten zunächst, dass unabhängig von der Cysteinsulfinsäureaufnahme mit der Nahrung der Harn der Ratten normal grosse Mengen Taurin und einen bedeutenden Anteil Hypotaurin enthält. Die beiden Substanzen verschwinden vollständig aus dem Harn der Versuchstiere; sie scheiden dagegen eine Substanz aus, die sich wie Cystathionin verhält. Die Einbeziehung von 1% Cysteinsulfinsäure in die Nahrung verursacht nicht das Auftreten dieser selben Säuren im Harn, jedoch ist diese Säure trotz des Vitamin B₆-Entzugs geeignet metabolisiert zu werden. *In vitro* mit den Leberpräparaten der Versuchsratten unternommene enzymatische Bestimmungen erlauben festzustellen, dass, wenn die Decarboxylierung vollständig unterdrückt ist, die desulfurierende Transaminierung nichtsdestoweniger stattfindet und eine Intensität besitzt, die analog der von Leberextrakten normal ernährter Ratten ist.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. CHATAGNER, B. BERGERET, T. SÉJOURNÉ, C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 340.
- 2 F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Compt. rend.*, 232 (1951) 448.
- 3 E. ROBERTS, F. YOUNGER ET S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 277.
- 4 H. BLASCHKO, S. P. DATTA ET H. HARRIS, *Biochem. J.*, 54 (1953) XVII.
- 5 F. SCHLENK ET E. E. SNELL, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 425.
- 6 J. R. BEATON, R. M. BALLANTYNE, R. E. LAU, A. STECKLEY ET E. W. McHENRY, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 93.
- 7 M. G. KRITZMANN, *Biokhimiya*, 8 (1943) 85.
- 8 C. E. DALGLIESH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 3.
- 9 R. G. WESTALL, *Biochem. J.*, 52 (1952) 638.
- 10 B. BERGERET ET F. CHATAGNER, expériences inédites.
- 11 B. BERGERET ET F. CHATAGNER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 141.
- 12 C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- 13 W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 45.
- 14 D. CAVALLINI ET B. MONDOVI, *Giornale di Biochimica*, 1 (1951) 170.
- 15 F. BINKLEY, G. M. CHRISTENSEN ET W. N. JENSEN, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 109.
- 16 G. MEDES, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1559.
- 17 H. TABÉCHIAN, B. BERGERET ET F. CHATAGNER, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 615.
- 18 J. AWAPARA ET W. J. WINGO, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 189.

Reçu le 9 Novembre 1953