

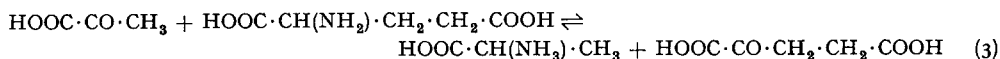
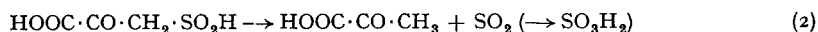
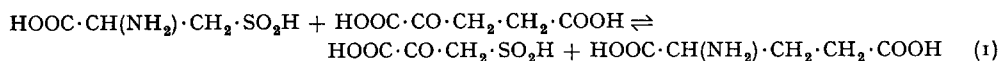
LA FORMATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE CYSTÉINESULFINIQUE À PARTIR DE SULFITE

par

FRANÇOIS CHAPEVILLE ET PIERRE FROMAGEOT

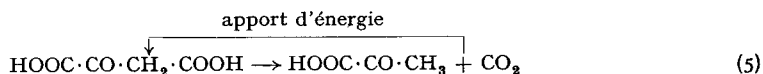
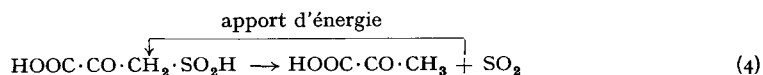
*Service de Biologie, Commissariat à l'Energie Atomique, Fort de Châtillon,
Fontenay aux Roses, Seine (France)*

Il a été montré précédemment¹ que, chez les animaux supérieurs, la désulfination de l'acide cystéinesulfonique libérant le soufre sous forme de sulfite avec formation d'alanine, est la résultante des réactions suivantes:



Toutes les substances participant à cet ensemble, sauf l'acide β -sulfinylpyruvique, ont été identifiées². Le fait que l'acide β -sulfinylpyruvique n'ait pu jusqu'ici être caractérisé dans les milieux enzymatiques est vraisemblablement dû à sa labilité. Mais son rôle d'intermédiaire dans les réactions précédentes ne paraît faire aucun doute.

L'analogie des formules de l'acide β -sulfinylpyruvique et de l'acide oxaloacétique conduit à se demander si, malgré des différences de structures électroniques qui peuvent exister dans les groupes COOH et le groupe SOOH, l'acide β -sulfinylpyruvique ne serait pas susceptible de se former, à partir de SO_2 et d'acide pyruvique, par une réaction biologique dont le mécanisme serait comparable à celui qui est en jeu dans la formation de l'acide oxaloacétique à partir de CO_2 et d'acide pyruvique:



Le présent travail montre la formation d'acide cystéinesulfonique à partir de sulfite, dans une préparation de rein de lapin, sans qu'il soit encore possible d'en préciser le mécanisme.

La démonstration du phénomène doit tenir compte de l'extrême labilité de l'acide β -sulfinylpyruvique, dont on peut supposer la formation transitoire, labilité qui ne donne guère d'espoir d'isoler cet acide lui-même. Il convient donc de le transformer éventuelle-

ment, en une substance plus stable. Pour ce faire, nous avons utilisé l'acide glutamique, qui, s'il est en concentration suffisante, assure en présence de la transaminase correspondante, la formation d'acide cystéinesulfonique à partir de l'acide β -sulfinylpyruvique (réaction (1) de droite à gauche). L'acide β -sulfinylpyruvique serait donc ainsi rapidement transformé, dès sa formation. Toutefois, il convient de remarquer que ce procédé n'est pas sans inconvénient: l'acide glutamique réagit non seulement avec l'acide β -sulfinylpyruvique, mais aussi avec l'acide pyruvique, donnant naissance, dans ce dernier cas, à de l'alanine et soustrayant ainsi une fraction notable de l'acide pyruvique capable de fixer le sulfite sur le carbone β . En outre, le sulfite réagit spontanément avec l'acide pyruvique et avec l'acide α -cétoglutarique provenant de la transamination entre l'acide glutamique et l'acide pyruvique, pour donner les composés bisulfoniques correspondants, ce qui diminue encore la quantité d'acide pyruvique et de sulfite, susceptibles de réagir pour donner l'acide β -sulfinylpyruvique. D'autre part, ignorant la valeur de la plupart des constantes d'équilibre des réactions (1) à (4), il nous est impossible de prévoir la quantité d'acide β -sulfinylpyruvique susceptible de se former dans des conditions déterminées. Il convient d'ajouter que la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéinesulfonique (3) finalement synthétisé, est un autre facteur pouvant diminuer la quantité de cet acide susceptible d'être mis en évidence. Il en résulte que, de toute façon, la quantité d'acide cystéinesulfonique finalement obtenue, restera faible. Or, ignorant le mécanisme énergétique mis en oeuvre dans la fixation de SO_2 , nous n'avons jusqu'ici étudié cette réaction que dans un milieu suffisamment complexe pour qu'il renferme naturellement les différentes sources d'énergie utilisables pour les réactions en question.

Malgré ces difficultés, la formation enzymatique d'acide cystéinesulfonique à partir de sulfite a été établie qualitativement avec certitude. Nous avons utilisé du soufre 35 radioactif comme indicateur. L'acide cystéinesulfonique a été caractérisé par son comportement lors de chromatographies et d'ionophorèses sur papier et, a été identifié par ses réactions avec la ninhydrine, l'iodoplatinate, par la radioactivité de son soufre et par son oxydation en acide cystéique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Préparation du sulfite de sodium marqué par ^{35}S

On part de 0.5 ml de solution aqueuse d'acide sulfurique radioactif (^{35}S), sans entraîneur, dont la radioactivité est de 1.1 mc par ml, auquel on ajoute 0.3 ml d'acide sulfurique concentré (34 N) ordinaire et 0.5 g de tournure de cuivre. On chauffe le tout jusqu'à amorçage de la réaction et on aspire le SO_2 formé dans 5 ml d'alcool à 95° refroidi à -10° , contenant 0.5 g de NaOH. Le sulfite de sodium précipite; il est recueilli par filtration, lavé à l'alcool absolu, séché sous vide: on obtient 430 mg d'un produit renfermant 320 mg de $^{35}\text{SO}_3\text{Na}_2$. Dans nos conditions de mesure, 1 μmol de sulfite donne 7200 impulsions/minute.

Préparation enzymatique

On utilise une poudre acétonique du rein de lapin obtenue par deux macérations successives des organes frais broyés, à 0° dans dix fois leur poids d'acétone, puis par dessiccation sous vide.

Disposition des expériences

Les milieux étudiés contiennent tous 1 g de préparation enzymatique en suspension dans 14 ml d'une solution tampon de phosphates 0.05 M à pH 7.3, contenant 0.3 % de NaCl; leur volume total final est ajusté à 22 ml par addition d'eau distillée. En outre, ils renferment:

Milieu I: 250 μmol de $^{35}\text{SO}_3\text{Na}_2$; 250 μmol de pyruvate de sodium; 250 μmol de glutamate de sodium.

Milieu II: Le milieu II est identique au milieu I, sauf en ce que la préparation enzymatique a été inactivée par ébullition pendant 10 minutes.

Bibliographie p. 420.

Milieu III: 250 μ mol de $^{35}\text{SO}_3\text{Na}_2$; 250 μ mol de glutamate de sodium.

Milieu IV: 250 μ mol de $^{35}\text{SO}_3\text{Na}_2$; 250 μ mol de pyruvate de sodium.

Milieu V: 250 μ mol de $^{35}\text{SO}_3\text{Na}_2$; 250 μ mol de L-alanine; 250 μ mol de glutamate de sodium.

Tous ces milieux sont maintenus à 38° sous azote pendant trois heures.

Au bout de ce temps, on centrifuge à froid et on élimine les protéines solubles par ultrafiltration jusqu'à siccité, à 0°, à travers de la cellophane, sous 5 kg d'azote. On obtient ainsi environ 18 ml de liquide dont on prélève 10 ml pour les opérations suivantes. Pour éliminer les sulfites, on traite le filtrat par l'iode (0.7 à 1.2 ml d'une solution 0.1 M), en arrêtant l'addition de la solution d'iode dès que le temps de décoloration de l'iode introduit dépasse 10 secondes, à 21°. On transforme ainsi la totalité du sulfite resté libre en sulfate, sans oxyder sensiblement l'acide cystéinesulfinique en acide cystéique. On introduit ensuite un léger excès de baryte 0.1 M, l'excès de baryte étant éliminé par barbotage de CO_2 . Un tel traitement permet de se débarrasser des sulfites et de la majeure partie des phosphates, sans éliminer une quantité notable d'acide cystéinesulfinique. Les précipités, séparés par centrifugation, sont lavés à l'eau chaude et les eaux de lavage sont réunies au liquide clair. Les solutions obtenues sont concentrées sous vide, amenées exactement à 2 ml et finalement clarifiées par centrifugation. Leur contenu est analysé par chromatographies sur papier et par ionophorèses sur papier.

Chromatographies sur papier

Les chromatographies, unidimensionnelles, descendantes, sont faites sur papier Whatman No. 1, avec deux types de solvants: phénol-eau (80:20) et butanol — acide formique — eau (75:10:15). Pour obtenir une séparation convenable de l'acide cystéinesulfinique, dont le R_F dans ces deux solvants est très faible, on laisse les solvants déborder largement du papier, la durée des chromatographies étant de l'ordre de 72 heures: on élimine ainsi une série d'acides aminés, apportés par la préparation enzymatique et qui n'ont pas d'intérêt ici. Les R_F des autres constituants des milieux sont calculés à partir de celui de l'alanine. Par suite de la dessalification imparfaite des solutions, les chromatogrammes obtenus présentent parfois des défauts; aussi, après les avoir séparées par une première chromatographie, avons-nous élué les substances intéressantes et les avons-nous soumises à une nouvelle chromatographie qui a toujours donné alors des résultats satisfaisants. La révélation des substances chromatographiées est faite par détection de leur radioactivité éventuelle, par leur réaction à la ninhydrine et par leur action réductrice vis-à-vis de l'iodoplatinate⁴. Il convient de remarquer ici que pour obtenir de bons résultats avec l'iodoplatinate dans le cas d'une chromatographie faite à l'aide de phénol, le papier doit être maintenu plusieurs jours à l'air libre dans des conditions telles que toute trace de phénol ait disparu.

Ionophorèses sur papier

Les ionophorèses sont faites à 20° sur papier Whatman N° 4, sous 6.7 volts/cm, pendant 4 à 6 heures; les tampons utilisés sont les suivants: véronal sodique à pH 8.6⁵; ammoniac-acide acétique à pH 4.7⁶; phosphate-citrate à pH 3.2⁵; phosphate-citrate à pH 2.9⁵. La révélation des substances est effectuée par détection de leur radioactivité et par leur réaction à la ninhydrine; l'action réductrice vis-à-vis de l'iodoplatinate étant fortement inhibée par les sels présents, ce réactif n'a pas été utilisé ici.

Oxydation par l'acide performique

Pour caractériser de façon plus sûre encore, l'acide cystéinesulfinique, nous avons oxydé ce dernier en acide cystéique par l'acide performique⁷. Cette oxydation a porté soit directement sur le milieu I après incubation, soit sur la substance séparée se comportant sur les chromatogrammes comme l'acide cystéinesulfinique et élue de ces chromatogrammes.

RÉSULTATS

Les chromatogrammes des Figs. 1 et 2 montrent que dans tous les milieux, sauf le milieu II, il apparaît une substance radioactive, réagissant à la ninhydrine et à l'iodoplatinate comme l'acide cystéinesulfinique; les R_F de cette substance, tels qu'ils se manifestent lors des chromatographies directes des divers milieux (chromatogrammes A, C, D, E, A', C', D', E') sont sensiblement inférieurs aux R_F de l'acide cystéinesulfinique témoin (chromatogrammes F, F'); mais après élution, la substance, chromatographiée à nouveau, possède des R_F identiques à ceux de l'acide cystéinesulfinique témoin (chromatogrammes G, G', H, H'). Les différences observées entre les R_F de l'acide cystéinesulfinique témoin et ceux de la substance étudiée, dans le cas des chromato-

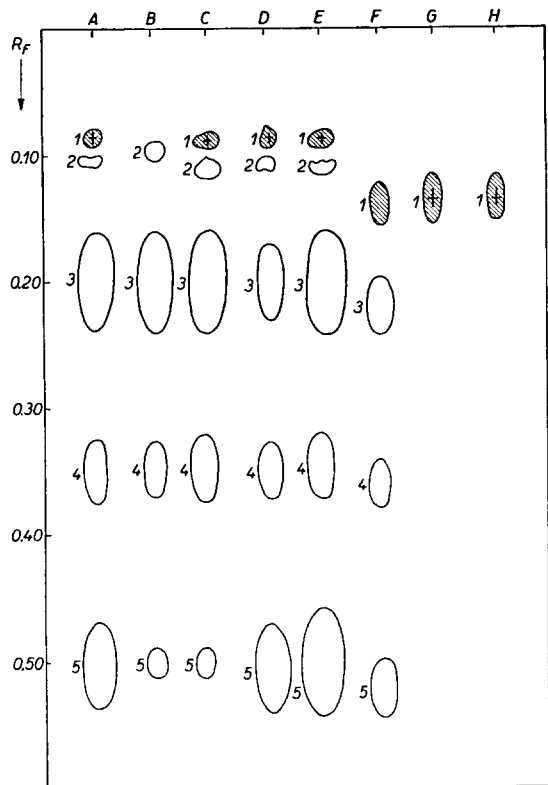


Fig. 1. Schéma des chromatogrammes obtenus dans le phénol-eau. Les taches correspondantes aux substances révélabes à la ninhydrine sont représentées par leurs contours, et à l'iodoplatinate par des hachures; le signe + indique que la substance est radioactive. 1. acide cystéine-sulfinique; 2. acide aspartique; 3. acide glutamique; 4. glycocolle; 5. alanine.

A. milieu I; B. milieu II; C. milieu III; D. milieu IV; E. milieu V; F. solution-témoin; G. éluat de la tache 1 de A; H. éluat de la tache 2 de A' (voir Fig. 2).

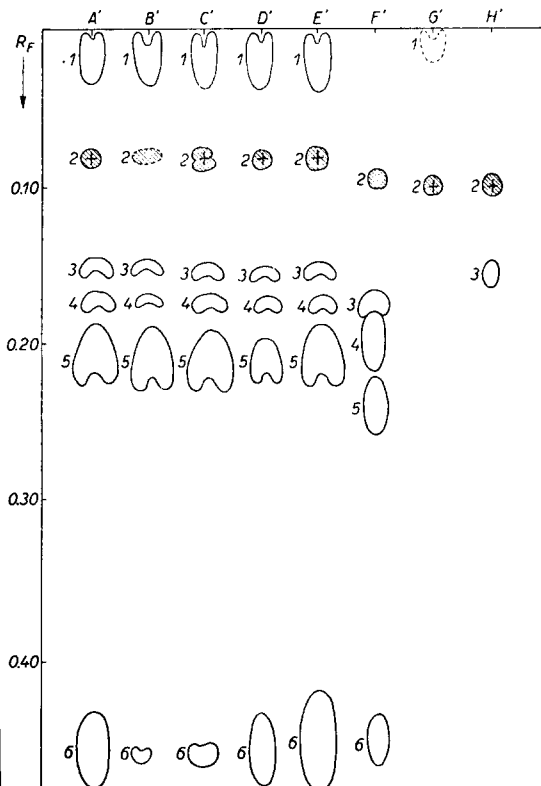


Fig. 2. Schéma des chromatogrammes obtenus dans le butanol-acide formique-eau. 1. taches d'origine indéterminée; 2. acide cystéine-sulfinique; 3. acide aspartique; 4. glycocolle; 5. acide glutamique; 6. alanine.

A', B', C', D', E', F' correspondent respectivement à A, B, C, D, E, F, de la Fig. 1; G' éluat de la tache 2 de A'; H' éluat de la tache 1 de A (voir Fig. 1). Pour le reste, mêmes explications que pour la Fig. 1.

grammes A C D E et A' C' D' E' sont évidemment dues à l'influence de sels, absents dans les chromatogrammes G, G', H et H'. La substance radioactive formée, correspondant aux taches 1 des chromatogrammes des Figs. 1 et 2 est donc bien l'acide cystéine-sulfinique. Une confirmation de cette identification est donnée par les chromatogrammes de la Fig. 3, montrant que la substance en question, par oxydation performique, se transforme intégralement en acide cystéique. Enfin, une nouvelle preuve de la formation de l'acide cystéine-sulfinique est apportée par les résultats des ionophorèses sur papier, illustrées par la Fig. 4.

Dans quelques expériences, une très faible tache correspondant à l'acide cystéine-sulfinique a été observée sur les chromatogrammes du milieu II, après révélation soit à la ninhydrine, soit à l'iodoplatinate; c'est la tache qui est représentée schématiquement

en pointillé sur la Fig. 2. Cette tache n'a jamais présenté de radioactivité; en outre, son apparition n'est qu'occasionnelle. Elle doit être attribuée, semble-t-il, à des traces d'acide cystéinesulfinique susceptibles d'être apportées par la préparation enzymatique utilisée. De toute façon, il ne peut s'agir d'acide cystéinesulfinique synthétisé au cours de l'expérience.

Ainsi donc, dans tous les milieux, sauf dans le milieu II, il se forme de l'acide cystéinesulfinique radioactif. L'absence de formation de cet acide dans le milieu II prouve qu'il s'agit d'une réaction enzymatique. Les quantités relatives d'acide cystéinesulfinique isolé par chromatographies, mesuré par radioactivité, sont sensiblement les mêmes que la réaction ait lieu en présence d'acide pyruvique ou non. Dans tous les

milieux, il apparaît donc que le facteur limitant la formation de l'acide cystéine sulfinique est autre que la concentration des substances ajoutées et, en particulier, de l'acide pyruvique. Ce facteur limite correspond vraisemblablement à l'insuffisance d'énergie utilisable pour la synthèse; des expériences sont actuellement en cours dans cette direction.

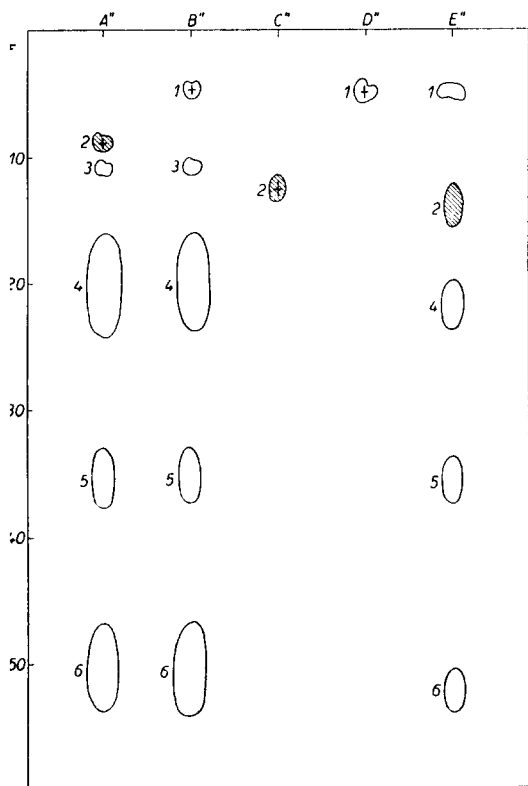


Fig. 3. Schéma des chromatogrammes des substances résultant de l'oxydation par l'acide performique; 1. acide cystéique; 2. acide cystéinsulfinique; 3. acide aspartique; 4. acide glutamique; 5. glycocolle 6. alanine.

A'', milieu I; B'', milieu I oxydé; C'', éluat de la tache 2 de A''; D'', éluat de la tache 1 de B''; E'', solution-témoin. Pour le reste, mêmes explications que pour la Fig. 1.

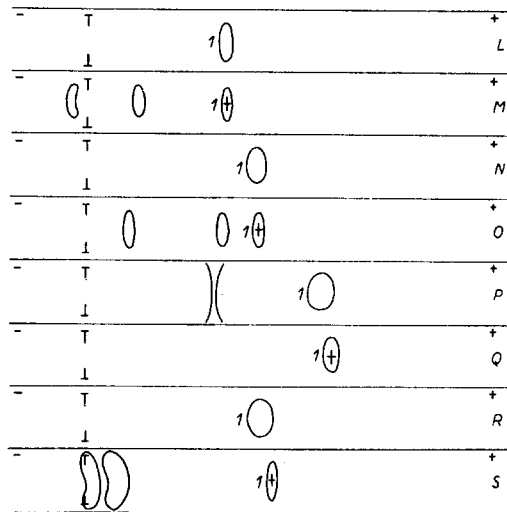


Fig. 4. Schéma des ionophorèses. pH 8.6, durée 4 h: L. solution-témoin d'acide cystéinesulfinique; M. éluat de la tache 2 de A'. pH 4.7, durée 5 h: N. solution-témoin d'acide cystéinesulfinique; O. éluat de la tache 1 de A'. pH 3.2, durée 6 h 1/2; P. solution-témoin d'acide cystéinesulfinique; R. éluat de la tache 1 de A'. pH 2.9, durée 5 h: S. milieu I.

RÉSUMÉ

Une poudre acétonique de rein de lapin mise à incuber à pH 7.3, sous azote, et à 38°, en présence de sulfite marqué au soufre, d'acide pyruvique et d'acide glutamique conduit à la formation enzymatique d'une substance marquée, qui se comporte par chromatographie sur papier dans divers

solvants, par ionophorèse sur papier à divers pH, comme l'acide cystéinesulfinique. L'oxydation performique de cette substance donne lieu à un composé identique par chromatographie sur papier à l'acide cystéique. La condensation du sulfite sur une molécule organique présente certaines analogies avec la fixation du CO_2 sur l'acide pyruvique, mais son mécanisme intime n'a pas encore été élucidé.

SUMMARY

An acetonic powder of the kidney of rabbit incubated at pH 7.3, under nitrogen, at 38° , in the presence of sulphur-labelled sulphite, pyruvic acid and glutamic acid leads to the enzymic formation of a labelled substance, which is shown by paper chromatography using various solvents and by paper ionophoresis at various pH's to behave like cysteinesulphinic acid. The performic oxidation of this substance yields a compound shown by paper chromatography to be identical to cysteic acid. The condensation of sulphite on an organic molecule has certain analogies with the fixation of CO_2 by pyruvic acid, but its mechanism has not yet been elucidated.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Inkubation von Aceton-trockenpulver der Kaninchenniere bei pH 7.3, unter Stickstoff und bei 38°C führt in Gegenwart von Schwefel-markiertem Sulfit, Brenztraubensäure und Glutaminsäure zur enzymatischen Bildung einer markierten Substanz, die sich papierchromatographisch unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel und papierelektrophoretisch bei verschiedenen pH's wie Cysteinsulfinsäure verhält. Die Oxydation dieser Substanz mit Perameisensäure führt zur Bildung einer Verbindung, die sich papierchromatographisch mit Cysteinsäure identisch erwies. Die Kondensation von Sulfit mit einem organischen Molekül hat gewisse Ähnlichkeit mit der Bindung von CO_2 durch Brenztraubensäure, aber der Mechanismus der Reaktion ist noch nicht geklärt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. CHATAGNER, B. BERGERET, T. SÉJOURNÉ ET CL. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 340.
- ² F. CHATAGNER, Communication personnelle.
- ³ F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Compt. rend.*, 232 (1951) 448.
- ⁴ G. TOENNIES ET J. J. KOLB, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
- ⁵ M. STEINER, in E. BAMANN UND K. MYRBÄCK, *Die Methoden der Fermentforschung*, 1 (1941) 761.
- ⁶ C. H. W. HIRS, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 679.
- ⁷ J. M. MÜLLER, J. G. PIERCE, H. DAVOLL ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 309.

Reçu le 12 avril 1954