

UTILISATION DES SULFITES PAR L'ANIMAL SUPÉRIEUR

par

F. CHAPEVILLE, P. FROMAGEOT, A. BRIGELHUBER ET M. HENRY

*Service de Biologie du Commissariat à l'Energie Atomique, Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay,
Gif-sur-Yvette (France)*

L'utilisation du soufre sous forme oxydée et minérale, par l'organisme supérieur, pour la synthèse de la cystine, a fait l'objet de plusieurs travaux. NI TARVER ET SCHMIDT¹, NI BOSTROM ET AQVIST² n'ont pu trouver une incorporation nette dans la cystine du foie de la radioactivité du sulfate utilisé. DZIEWIATKOWSKI³, chez des rats jeunes, a observé au contraire une incorporation du soufre radioactif du sulfate marqué, sans entraîneur. Après injection à des poulets, MACHLIN⁴ arrive à la même conclusion. Les résultats de DZIEWIATKOWSKI³ et ceux des auteurs précédents ne sont pas contradictoires puisque les conditions expérimentales choisies par DZIEWIATKOWSKI étaient beaucoup plus favorables à la mise en évidence d'un phénomène qui reste discret. On peut se demander d'une part si la flore bactérienne du tube digestif ne peut être rendue responsable de cette transformation du sulfate en composé organique éduit, comme c'est manifeste dans les travaux de BLOCK⁵ sur les ruminants, et d'autre part, si ce n'est pas le soufre à l'état de sulfite et non de sulfate qui peut être incorporé. Nous avons montré *in vitro* que de la poudre acétonique de rein de lapin était capable d'utiliser le soufre radioactif à l'état de sulfite pour former de l'acide cystéinesulfinique⁶. Ce dernier peut provenir soit d'une réaction inverse de celle qui conduit à l'acide pyruvique et au SO₂, soit d'un tout autre ensemble de réactions, donnant naissance à la cystine dont on sait que l'acide cystéinesulfinique provient facilement⁷, soit enfin d'un échange entre la molécule de sulfite et le groupe sulfinyl de l'acide cystéinesulfinique. Dans le présent travail, nous avons comparé chez le lapin l'incorporation de sulfate et de sulfite radioactifs dans l'acide cystéinesulfinique, la taurine et la cystine. Les animaux ont été éviscérés ou stérilisés pour éviter toute interférence des bactéries du tube digestif. Nous avons examiné aussi la possibilité d'un échange entre le sulfite marqué et le groupe sulfinyl de l'acide cystéinesulfinique chez le lapin. Nous en concluons qu'il n'y a pas d'échange net, que le sulfite, mais pas le sulfate, est utilisé pour la synthèse d'acide cystéinesulfinique, et que la cystéine provient de l'acide cystéinesulfinique par réduction.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Le sulfite utilisé provient soit de Harwell, soit du service des Radioéléments, du C.E.A. de Chatillon, où il est obtenu par réduction de sulfate par le phosphore rouge. La radioactivité du sulfite comme celle du sulfate est ajustée de façon que l'on ait 1.3 mc pour 400 mg de produit cristallisé.

2. Pour éviter toute influence de la flore microbienne intestinale, les animaux sont, soit stérilisés, soit éviscérés.

a. *Préparation de l'animal par stérilisation.* On a traité trois animaux de la façon suivante:

Bibliographie p. 354.

Un lapin mâle âgé de deux mois pesant 1300 g est soumis à la diète hydrique pendant 48 h pendant lesquelles il reçoit en quatre injections sous-cutanées 100 ml de sérum glucosé isotonique ainsi que quatre lavements avec chaque jour 100 ml d'eau salée à 0.9% pour accélérer l'évacuation du contenu intestinal. L'animal est ensuite anesthésié au Nembutal et après une laparotomie, on procède à un lavage complet du tube digestif. Dans ce but, on fait deux ouvertures l'une dans l'estomac, la seconde dans le gros intestin. Après avoir évacué et lavé l'estomac avec une solution de Tyrode à 38°, on introduit une sonde dans le pylore et dans le rectum. Sous une faible pression, on fait passer environ deux litres de la solution de Tyrode qui sont évacués par l'ouverture du gros intestin. Lorsque la solution est complètement limpide, on arrête le lavage. Par une suture en surjet et une suture d'enfouissement, on ferme les deux plaies. On introduit dans l'estomac et dans divers points de l'intestin 25 ml d'une solution contenant 0.5 g d'auréomycine et 2 g de SO_4Na_2 non marqué. On suture finalement la paroi abdominale et la peau. Deux heures après le réveil de l'animal, on lui fait une première injection intra-veineuse du sulfite marqué. 9 h et 18 h après, on injecte à nouveau du sulfite marqué. Au total, l'animal reçoit 20 ml d'une solution aqueuse contenant 400 mg de SO_3Na_2 dont la radioactivité est de 1.3 mc (125,000,000 impulsion/minute). En même temps, on lui injecte sous la peau une solution nutritive constituée de 200 ml d'une solution d'acides aminés* et 75 ml de sérum glucosé isotonique. 28 h après la dernière injection de sulfite, on sacrifie l'animal. Après un ensemencement sur bouillon du contenu intestinal de l'animal et incubation à 38° pendant 48 h, le milieu de culture est parfaitement limpide.

b. *Préparation de l'animal par éviscération.* Un lapin identique au précédent, soumis à la diète hydrique pendant 24 h, est anesthésié et soumis à la respiration artificielle. Après une laparotomie, on introduit une sonde dans le canal cholédoque pour recueillir la bile. Puis, on ligature les vaisseaux intestinaux, on sectionne au niveau du pylore et de la partie terminale du colon flottant l'intestin que l'on retire. Après cette opération, l'animal reçoit en injection continue pendant 40 minutes, dans la veine jugulaire 10 ml de solution aqueuse contenant 400 mg de sulfite marqué, représentant 1.3 mc et simultanément dans la veine de l'oreille 200 mg d'acide glutamique et 100 mg d'acide pyruvique, dissous dans 40 ml d'eau. 30 minutes après la fin des injections, on sacrifie l'animal. L'expérience a été répétée 5 fois.

PRÉLÈVEMENT ET TRAITEMENT DES ORGANES

Dans un cas comme dans l'autre, immédiatement après la mort, on prélève la peau dont on coupe les poils, les muscles de la cuisse, le foie et les reins et on réunit les autres viscères, poumon, cœur, estomac, enfin le cerveau. Sauf la peau, les organes sont découpés en morceaux et plongés dans l'eau bouillante pendant 10 min. On en fait un extrait aqueux selon la technique d'Awapara⁶ de façon que 1 ml de cet extrait corresponde à 10 g de tissu frais. La peau et les fractions insolubles provenant de l'opération précédente sont déshydratées par l'acétone, séchées et hydrolysées 12 h à reflux par de l'acide chlorhydrique 6N renfermant 10% d'acide formique, à raison de 25 ml d'acide pour 1 g de tissu sec. Pour ce traitement, les parties insolubles du foie et du rein sont réunies. Les 4/5 des extraits aqueux du rein et du foie sont réunis et utilisés pour l'isolement de la cystine libre selon la technique de DZIEWIATKOWSKI⁸, le reste est analysé par chromatographie et ionophorèse sur papier⁹. Dans les hydrolysats, on isole la cystine par la même méthode. La bile (5 ml) recueillie au cours des expériences sur les lapins anesthésiés est hydrolysée par l'acide chlorhydrique 6N pendant 12 h à 100° en tube scellé. L'hydrolysat évaporé sous vide, repris par l'eau est passé sur une colonne d'Amberlite IR4B (1 x 15 cm), préalablement lavé avec l'acétique N et à l'eau. Le filtrat est passé sur une colonne de permutite 50 (1 x 15 cm) forme H (HCl N). Dans le filtrat se trouve la taurine, caractérisée par chromatographie sur papier dans les solvants suivants:

Butanol normal, acide formique, eau (75:10:15); phénol, eau (80/20); butanol tertiaire, acide formique, eau (75:10:15).

RÉSULTATS

Acide cystéinesulfinique

Dans aucun des lapins stérilisés, sacrifiés 28 h après la fin de l'injection du sulfite, nous n'avons pu déceler la présence d'acide cystéinesulfinique dans les extraits aqueux

* Leucine 200 mg, isoleucine 100 mg, tyrosine 500 mg, tryptophane 400 mg, acide glutamique 1 g, histidine 200 mg, proline 300 mg, glycine 1 g, valine 200 mg, arginine 200 mg, tréonine 200 mg pour 250 ml d'eau. On chauffe au bain-marie bouillant 10 minutes. Après refroidissement et passage sur papier filtre, on met la solution en ampoules et stérilise par tyndalisation.

du foie, du rein, du muscle et du cerveau. Dans deux sur cinq des animaux éviscérés, sacrifiés trente minutes après la fin de l'injection du sulfite, on a pu caractériser l'acide cystéinesulfinique dans l'extrait aqueux du foie et du rein, par chromatographie sur papier⁶. Les taches correspondant à cette substance, dans la chromatographie sur papier dans le butanol normal, acide formique, eau, sont élues et soumises à l'ionophorèse sur papier à pH 2.7 pendant 5 h⁶. On élue la zone correspondant à l'acide cystéinesulfinique, l'éluat sert au dosage par la méthode de MOORE ET STEIN⁸ de l'acide cystéinesulfinique contenu, ainsi qu'à la mesure de la radioactivité. L'activité spécifique de l'acide cystéinesulfinique est de: 780 impulsions/minute/mg.

Examen de la possibilité d'échange entre le groupe sulfinyl de l'acide cystéinesulfinique et le sulfite

La possibilité d'échange par voie non enzymatique entre le groupe sulfinyl de l'acide cystéine-sulfinique et le sulfite a été examinée avec du sulfite radioactif; on a constaté qu'aucune radioactivité n'était mesurable dans l'acide cystéine sulfinique isolé. L'échange par voie enzymatique reste néanmoins possible. Pour le mettre en évidence, on a injecté à un lapin mâle pesant 1950 g, 150 mg d'acide cystéinesulfinique et 100 mg de sulfite de Na radioactif, (radioactivité injectée: 2 millicurie) en solution aqueuse, dans la veine de l'oreille, 30 minutes après la fin de l'injection, on sacrifie l'animal, prélève le foie et les reins dont on a fait un extrait aqueux selon le mode opératoire d'Awapara.

Résultats. Dans l'extrait aqueux du foie on ne retrouve pas d'acide cystéine-sulfinique, trente minutes après la fin de l'injection de cette substance; par contre, on observe la présence de fortes quantités d'hypotaurine non radioactive. De l'extrait aqueux du rein, on peut isoler de petite quantité d'acide cystéinesulfinique. Sa radioactivité est trop faible pour être mesurée. On peut conclure de ces résultats qu'il n'y a pas d'échange entre le groupe sulfinyl de l'acide cystéinesulfinique et le sulfite. La dilution de l'acide cystéinesulfinique formé par l'activité métabolique de l'organisme, par l'acide cystéinesulfinique non radioactif injecté explique l'absence de radioactivité dans ce composé isolé.

Taurine. Après purification sur colonne d'amberlite et de permutite de l'hydrolysat de la bile des lapins anesthésiés, le filtrat renfermant la taurine est soumis à une chromatographie préparative sur papier dans le phénol-eau. Après élution des zones du papier correspondant à la taurine, on dose cet acide aminé par la ninhydrine et mesure la radioactivité. L'activité spécifique est de 420 i.p.m./mg. Dans les expériences faites avec du sulfate (1.3 mc/400 mg) nous n'avons pu déceler ni acide cystéine-sulfinique, ni taurine radioactive.

Cystine. L'activité spécifique de la cystine isolée des divers organes est donnée dans le Tableau I:

TABLEAU I
ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE LA CYSTINE ISOLÉE DE DIVERS ORGANES

Organe	Cystine	Activité spécifique en I.p.m./mg	
	Après injection de sulfate	Après injection de sulfite	
Peau	0.80	0.8	7
Viscères	—	—	17
Foie-rein (protéine)	0.60	8.6	20
Muscle	0.98	0.9	8.6
Foie-rein (extrait soluble)	5	100	—

DISCUSSION

Ayant exclu la possibilité de synthèses bactériennes dans le tube digestif et celle d'un échange entre le groupe sulfinyl de l'acide cystéinesulfinique et le sulfite, on constate que le soufre du sulfite est utilisé par le lapin pour la synthèse de la cystine alors que le soufre à l'état de sulfate, de même radioactivité spécifique n'est pas incorporé dans cet acide aminé. De la comparaison des activités spécifiques de l'acide cystéinesulfinique (700 i.p.m./mg), de la cystine (100 i.p.m./mg) et de la taurine (420 i.p.m./mg) isolés au bout d'un même temps (30 min), on peut conclure que l'acide cystéinesulfinique est un précurseur de la cystine et de la taurine. Il en résulte que l'acide cystéinesulfinique peut être réduit dans l'organisme en cystine. L'oxydation de cette dernière en l'acide sulfinique est donc biologiquement réversible. Que l'activité spécifique de la taurine de la bile soit supérieure à celle de la cystine, peut s'expliquer en admettant que la décarboxylation de l'acide cystéinesulfinique et son oxydation ultérieure est plus rapide que sa réduction en cystéine. Si l'utilisation du soufre à l'état de sulfite pour la synthèse de la cystine, par l'intermédiaire de l'acide cystéinesulfinique, ne fait pas de doute, la radioactivité totale retrouvée dans ces acides aminés ne représente qu'une proportion très faible de la radioactivité introduite. Ceci peut s'expliquer par le fait que le sulfite est rapidement oxydé en sulfate⁹, dont on sait que s'il diffuse vite dans les liquides interstitiels, il pénètre lentement dans les cellules. Il est possible aussi que la perméabilité cellulaire à l'égard de l'ion sulfite soit faible, comme pour l'ion sulfate. Enfin, on peut penser que l'ion sulfite peut être bloqué sous diverses formes, telles que les combinaisons bisulfitiques. De plus, il est probable que l'activité du système synthétique mis en évidence ici, est dirigé par les besoins de l'organisme animal en acides aminés soufrés et que l'incorporation du sulfite doit être accrue chez des animaux très jeunes ou carencés en acides aminés soufrés.

RÉSUMÉ

Ayant exclu la possibilité de synthèses bactériennes dans le tube digestif et celle d'un échange entre le groupe sulfinyl de l'acide cystéinesulfinique et le sulfite, on constate que le soufre du sulfite est utilisé par le lapin pour la synthèse de la cystine, alors que, dans les mêmes conditions, le soufre à l'état de sulfate, de même radioactivité spécifique, n'est pas incorporé dans cet acide aminé. De la comparaison des activités spécifiques relatives de l'acide cystéinesulfinique, de la cystine et de la taurine isolés après un même temps, on peut conclure que l'acide cystéinesulfinique est un précurseur de la cystine et de la taurine. Il apparaît que l'acide cystéinesulfinique peut ainsi être réduit dans l'organisme en cystine. L'oxydation de cette dernière en l'acide sulfinique est donc *biologiquement* réversible.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. TARVER ET C. L. A. SCHMIDT, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 67.
- 2 H. BOSTRÖM ET S. AQVIST, *Acta Chem. Scand.*, 6 (1952) 1557.
- 3 D. D. DZIEWIATKOWSKI, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 181.
- 4 L. J. MACHLIN, P. B. PEARSON, C. A. DENTON ET H. R. BIRD, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 213.
- 5 R. J. BLOCK, J. A. STEKOL ET J. K. LOOSLI, *Arch. Biochem. Biophys.*, 33 (1951) 353.
- 6 F. CHAPEVILLE ET P. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 415.
- 7 F. CHAPEVILLE ET P. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 275.
- 8 S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- 9 M. HEIMBERG, I. FRIDOVICH ET P. HANDLER, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 913.

Reçu le 10 août 1955