

REFERENCES

- ¹ H. Z. SABLE, P. B. WILDER, A. E. COHEN AND M. R. KANE, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 156.
- ² I. LIEBERMAN, A. KORNBERG AND E. S. SIMMS, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 429.
- ³ L. I. HECHT, V. R. POTTER AND E. HERBERT, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 134.
- ⁴ H. KLENOW, E. LICHTLER AND B. ANDERSEN, *Acta Chem. Scand.*, 10 (1956) 159.
- ⁵ Z. DISCHE, in E. CHARGAFF AND N. J. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. I, Academic Press, New York, 1955, p. 285.
- ⁶ S. P. COLOWICK AND H. M. KALCKAR, *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 117.
- ⁷ W. MEJBAUM, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 117.
- ⁸ C. H. FISKE AND Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 66 (1925) 375.
- ⁹ A. C. PALADINI AND L. F. LELOIR, *Biochem. Z.*, 51 (1952) 426.
- ¹⁰ P. PLESNER, *Acta Chem. Scand.*, 9 (1955) 197.
- ¹¹ P. PLESNER, unpublished results.
- ¹² J. G. BUCHANAN, *Nature*, 168 (1951) 1091.
- ¹³ R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM AND V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 23.
- ¹⁴ B. L. HORECKER, P. Z. SMYRNIOTIS AND J. E. SEEGMILLER, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 383.
- ¹⁵ H. VON EULER AND L. HAHN, *Svensk Kem. Tidskr.*, 58 (1946) 251.

Received March 27th, 1956

LA FORMATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE CYSTÉINESULFINIQUE À PARTIR DE SULFITE PAR L'EMBRYON DE VEAU

P. FROMAGEOT, F. CHAPEVILLE ET L. PETIT

Service de Biologie, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, Seine & Oise (France)

Un précédent travail¹ a montré que la poudre acétonique de rein de lapin est capable d'assurer, par voie enzymatique, la condensation de sulfite radioactif et d'une molécule organique, sous forme d'acide cystéinesulfinique. Par la suite, on a observé le même phénomène *in vivo*, chez le lapin². Dans ce dernier cas, on a isolé après administration de sulfite marqué non seulement de l'acide cystéinesulfinique ³⁵S, mais aussi de la cystine ³⁵S et de la taurine ³⁵S.

Nous avons repris l'examen de cette condensation du sulfite ³⁵S en présence de foie d'embryon de veau, *in vitro*. La plus forte activité spécifique du sulfite ³⁵S employé a permis l'addition d'acide cystéinesulfinique comme entraîneur. On peut alors en préparer un dérivé, l'acide dinitrophénylcystéique, qui confirme l'identité du produit isolé et en mesurer la quantité. On observe aussi, à la fin de l'incubation, la présence de composés organiques soufrés non aminés et qui ne sont pas des esters de l'acide sulfurique.

En ce qui concerne la nature de la molécule organique susceptible, chez l'animal supérieur, de fixer le sulfite pour donner ensuite plus ou moins directement l'acide cystéinesulfinique, nous avons admis précédemment¹ que l'acide pyruvique puisse jouer un tel rôle, par analogie avec son aptitude à fixer le CO₂ pour donner l'acide oxalacétique. D'autre part, ROBERTS et coll.³ ont montré que chez *E. coli*, la sérine

est capable de réagir avec le thiosulfate pour fournir de la cystéine. Il était donc intéressant de le comparer à la synthèse de l'acide cystéinesulfinique en présence de pyruvate et en présence de sérine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

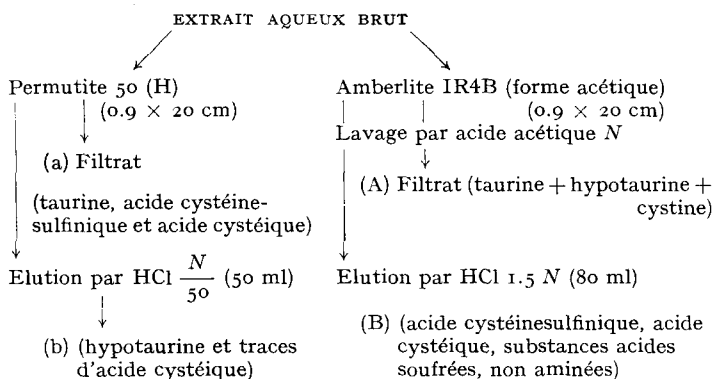
Le sulfite ^{35}S de sodium est obtenu comme il a été indiqué en¹. Sa radioactivité correspond à environ 250,000 i.p.m. par μmole dans nos conditions de mesure.

Préparation enzymatique

Du foie d'embryon de veau âgé d'environ cinq mois est broyé avec deux fois son poids de tampon phosphate de potassium 0.05 M à pH 7.3, contenant 0.3% de KCl. Il a été montré en effet que l'ion K^+ favorise la pénétration de l'ion SO_4^{--} à travers la membrane cellulaire⁴ et il est possible que cela soit aussi vrai pour l'ion SO_3^{--} .

Disposition des expériences

On fait incuber dans chaque cas à 38° C et sous courant d'azote contenant moins de 0.02 % d'oxygène, pendant 30 ou 60 minutes dans des cellules de Desnuelle: 5 g de broyat de foie, 10 ml de tampon, 16 μmoles de sulfite ^{35}S de sodium. De plus, dans les expériences de la série I, on ajoute 250 μmoles de pyruvate de sodium et 250 μmoles de glutamate de sodium¹; dans la série II on ajoute seulement 250 μmoles de sérine. Après incubation, on additionne le mélange de 100 ml d'alcool éthylique absolu bouillant et de 500 μg d'acide cystéinesulfinique non marqué comme entraîneur. On poursuit l'ébullition pendant 10 minutes. On laisse refroidir à la glacière pendant une nuit et on centrifuge. On distille sous vide l'alcool qui contient le surnageant et soumet la solution aqueuse obtenue à l'extraction par le chloroforme. La solution privée de graisses est alors analysée comme le montre le Schéma I.



Toutes les fractions sont concentrées sous vide à sec et reprises par quelques ml d'eau.

Du filtrat (a) de la permutite, on isole la taurine à l'état de DNP-taurine. L'éluat (b) de la permutite est soumis à l'électrophorèse sur papier à pH 2.7¹.

Du filtrat (A) de l'amberlite, on obtient la cystine par précipitation du mercaptide cuivreux⁵. Après élimination du cuivre, on transforme la cystine en dinitrophényl(DNP)-dérivé⁶. Puis la taurine et l'hypotaurine sont isolées à l'état de DNP-taurine; en effet, l'hypotaurine en présence de fluorodinitrobenzène (FDNB) est oxydée et on ne retrouve que de la DNP-taurine, de sorte que la DNP-taurine issue du filtrat de l'amberlite correspond et à la taurine et à l'hypotaurine présentes initialement, la taurine servant d'entraîneur.

De l'éluat (B) de l'amberlite, on isole l'acide cystéinesulfinique sous forme d'acide DNP-cystéique. Dans ce cas aussi, le FDNB agit comme oxydant. Une partie de l'éluat (B), enfin, est chromatographiée directement dans le butanol tertiaire-acide formique-eau (75:10:15).

Les DNP-amino-acides, DNP-taurine et acide DNP-cystéique sont purifiés par chromatographies successives sur papier (Schleicher et Schüll No. 2043 B) dans les solvants suivants: butanol normal-acide formique-eau (75:10:15); pyridine-alcool isoamylique-eau (25:28:21)⁷. La mesure de la densité optique de l'acide DNP-cystéique est faite dans l'alcool éthylique renfermant 10% d'acide acétique à 340 μm , l'extinction moléculaire étant de $1.49 \cdot 10^4$.

Bibliographie p. 17.

RÉSULTATS

Filtrat (a) de la permutite

La DNP-aurine obtenue, chromatographiée successivement dans les solvants indiqués, se révèle non radioactive. Très proche de la zone où la DNP-aurine se localise, on trouve une substance non aminée et radioactive qui ne se sépare bien de la DNP-aurine que si l'on développe le chromatogramme assez longtemps. Ainsi, dans le *n*-butanol-acide formique-eau, le R_F de la DNP-aurine est 0.30, celui de la substance radioactive de 0.34.

Eluat (b) de la permutite

L'ionophorèse de l'éluat (b) de la permutite montre une bande correspondant à l'acide cystéique ^{35}S et une tache radioactive, réagissant avec la ninhydrine et l'iodoplatinate, qui correspond à l'hypotaaurine.

Filtrat (A) de l'amberlite

La DNP-aurine préparée qui correspond à la somme de l'hypotaaurine formée et de la taurine préexistante est aussi chromatographiée comme celle isolée du filtrat de la permutite. Puis, comme purification supplémentaire, on hydrolyse en tube scellé par de l'ammoniaque concentrée⁸ et chromatographie dans le phénol-eau. La taurine ainsi obtenue se révèle légèrement radioactive et la radioactivité décelée par autoradiographie coïncide exactement avec la coloration obtenue par la ninhydrine. Ceci confirme le résultat de l'ionophorèse et démontre qu'il se forme, au cours de l'incubation tant dans les séries I que II, de l'hypotaaurine.

DPN-N-cystine: isolée du filtrat (A) de l'amberlite et purifiée par chromatographie, l'autoradiographie du chromatogramme montre qu'il n'y a pas de radioactivité associée à cette substance (exposition de 1 mois qui permet de détecter 3 i.p.m. au-dessus du mouvement propre au compteur, dans nos conditions de mesure).

Eluat (B) de l'amberlite

L'autoradiographie du chromatogramme sur papier dans le butanol tertiaire-acide formique-eau de l'éluat de l'amberlite, présente l'aspect donné par la Fig. 1. On y distingue des zones radioactives appelées A, A', B, C. La zone A éluee et rechromatographiée dans le butanol-acide formique-eau, ne contient aucune substance réagissant à la ninhydrine. La zone A' est constituée d'acide cystéinesulfonique et d'acide cystéique d'une part, et d'une substance radioactive d'autre part, qui ne réagit pas avec la ninhydrine. L'acide cystéinesulfonique et l'acide cystéique présents dans la zone A' sont tous deux radioactifs. Le chromatogramme dans le phénol de la zone B éluee, conduit à la détection de diverses substances radioactives. La zone C, enfin, dont la radioactivité est trois fois supérieure à celle de la zone A', correspond à des substances qui ne réagissent pas avec la ninhydrine, ni avec le nitrate d'argent ammoniacal. Ces substances sont de plus très acides, à en juger par leur rétention par l'amberlite IR4B, et par leur forte migration vers l'anode au cours d'électrophorèse sur papier à pH 2.7, migration supérieure à celle de l'acide cystéique. Éluées du papier et rechromatographiées dans la pyridine-alcool isoamylique-eau, ces substances donnent lieu à un chromatogramme dont l'autoradiographie est reproduite par la Fig. 2. Si on les soumet à l'hydrolyse chlorhydrique, il n'y a pas libération de sulfate,

mais une modification de structure apparaît, et l'on obtient des chromatogrammes différents. La nature de ces composés est actuellement inconnue. On peut seulement dire qu'aucun n'est identique à l'acide iséthionique, ni aux produits provenant de l'action de l'acide nitreux sur l'acide cystéique. Parmi les produits issus de la zone C traitée par l'acide chlorhydrique, apparaît un constituant non cétonique (X) dont les R_F sont:

- 0.69 dans la pyridine-alcool *iso*amylique-eau.
- 0.55 dans le phénol-eau.
- 0.77 dans le butanol tertiaire-acide formique-eau.
- 0.50 dans le *n*-butanol-acide formique-eau.

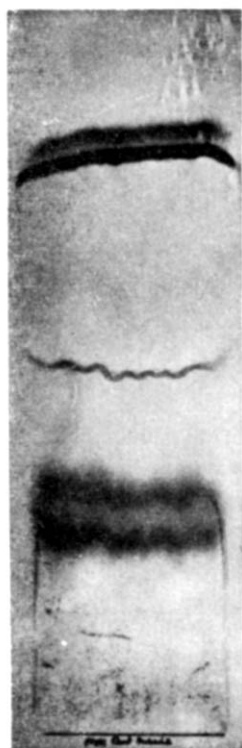


Fig. 1. Autoradiographie du chromatogramme sur papier de l'éluat de l'amberlite par HCl 1.5 N.

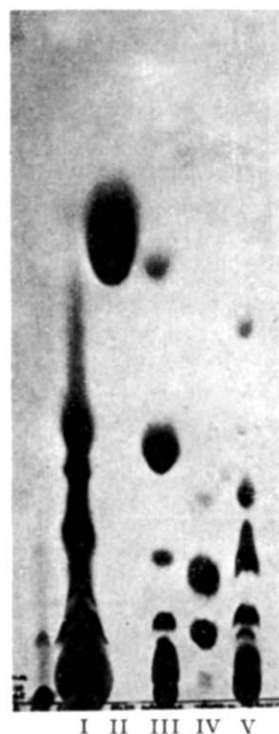


Fig. 2. Autoradiographie d'un chromatogramme dans le mélange: pyridine-alcool *iso*amylique-eau. I: zone C de la Fig. 1. II: Produit (X). III: Produits formés par action de l'acide nitreux sur l'acide cystéique ^{35}S . IV: Produits formés par l'action de l'acide nitreux sur la taurine ^{35}S . V: Produits non aminés provenant de l'incubation de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ et d'embryon de poulet *in vitro*.

Signalons que la substance qui correspond à cette tache se forme en quantités relativement importantes par incubation de sulfite et de foie de poisson (*Carassius*), dans les conditions décrites pour le foie d'embryon de veau. De plus, si on fait incuber l'ensemble des substances non aminées qui forment la zone C (Fig. 1) avec du broyat d'embryons de lapin âgés de huit jours, on obtient une substance aminée, réductrice et radioactive qui, à l'ionophorèse sur papier à pH 8.6 et à pH 2.7 se comporte comme l'acide cystéinesulfinique.

L'acide DNP-cystéique qui provient de la réaction de l'éluat de l'amberlite avec le FDNB, est purifié comme on l'a dit. La radioactivité spécifique de l'acide cystéinesulfinique isolé à l'état d'acide DNP-cystéique au cours de diverses expériences dans

lesquelles la radioactivité spécifique du sulfite ^{35}S est la même, est donnée dans le Tableau I.

TABLEAU I
RADIOACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE L'ACIDE CYSTÉINESULFINIQUE
(en i.p.m./mg)

Expériences	Série I		Série II	
	30 minutes	60 minutes	30 minutes	60 minutes
A	159,000	92,000		
B	18,500	15,500	11,500	2,120
C	29,500	10,300	16,600	2,140

DISCUSSION

Que l'animal supérieur puisse synthétiser à partir de sulfite ^{35}S de l'acide cystéinesulfinique ^{35}S avait été précédemment démontré¹. Cet acide est mis en évidence ici après dilution par de l'acide cystéinesulfinique non marqué, à l'état de DNP-dérivé de l'acide cystéique. L'acide cystéique que l'on détecte par chromatographie de l'éluat de l'amberlite provient certainement pour la plus grande part d'une oxydation en cours de manipulations. En effet, il ne se forme pas de taurine ^{35}S d'une façon détectable. On observe au contraire de l'hypotaurine ^{35}S . Ce fait prouve que le foie d'embryon de veau possède une décarboxylase active sur l'acide cystéinesulfinique. On admet qu'une telle décarboxylase peut être aussi, quoiqu'à un moindre degré, active sur l'acide cystéique⁹. Si l'acide cystéique dont on constate la présence sur le chromatogramme de l'éluat de l'amberlite, se formait au cours de l'incubation, il devrait conduire à une certaine formation de taurine ^{35}S , ce qui n'est pas. On admettra donc que la radioactivité trouvée sous forme d'acide DNP-cystéique provient de l'acide cystéinesulfinique présent à la fin de l'incubation. Ceci permet de calculer la quantité de cette substance existant dans le milieu au moment de l'arrêt des réactions enzymatiques. En effet, pour une radioactivité spécifique de sulfite ^{35}S de $2.4 \cdot 10^6$ i.p.m./mg, on doit obtenir un acide cystéinesulfinique d'activité spécifique $1.97 \cdot 10^6$ i.p.m./mg; puisqu'il n'y a pas de réduction de cet acide en cystine ^{35}S , il n'y a pas d'apport d'acide cystéinesulfinique ^{35}S de radioactivité spécifique différente. De plus, la quantité d'acide cystéinesulfinique non marqué naturellement présente dans le foie est très faible, et négligeable par rapport à la quantité ajoutée (500 μg) comme entraîneur. On en conclut, par exemple dans l'expérience B, qu'après 30 minutes on retrouve 0.47 μg d'acide cystéinesulfinique dans la série I et 0.29 μg dans la série II. On peut dire aussi que l'on retrouve sous forme d'acide cystéinesulfinique, 0.2 % et 0.1 % de la radioactivité introduite à l'état de sulfite. Ce rendement est de 1.6 % pour l'expérience A (30 minutes – série I). Les différences dans le broyage du tissu hépatique, comme les variations des races des embryons et des saisons de prélèvement, peuvent rendre compte en partie de la variabilité des rendements. Néanmoins, on retrouve régulièrement moins d'acide cystéinesulfinique après 60 minutes qu'après 30 minutes. Ceci indique qu'un facteur essentiel de la synthèse disparaît rapidement, alors que la destruction de l'acide cystéinesulfinique, soit par décarboxylation, soit par désulfination, poursuit son cours. De plus, les rendements sont meilleurs en présence de pyruvate

qu'en présence de sérine. Cela peut être rapporté au fait que la sérine est une molécule moins proche que le pyruvate, de la structure de l'accepteur de sulfite, ou à une réaction parallèle de la sérine sur un facteur essentiel de la condensation du sulfite et de son accepteur. Nos résultats ne permettent pas de choisir entre ces deux hypothèses.

RÉSUMÉ

Un broyat de foie d'embryon de veau, mis à incuber à 38° C sous azote avec du sulfite de sodium ³⁵S, du pyruvate et de l'acide glutamique, conduit à la formation d'acide cystéinesulfinique ³⁵S, isolé à l'état de DNP-dérivé. On trouve aussi de l'hypotaurine ³⁵S, mais pas de taurine ³⁵S ni de cystine ³⁵S. On a mesuré la quantité d'acide cystéinesulfinique existant dans le milieu à la fin de l'incubation. En présence de sérine, cette quantité est notablement plus faible.

D'autre part il apparaît au cours de l'incubation du sulfite avec le foie d'embryon de veau des substances soufrées organiques, non aminées, dont une ou plusieurs peuvent être, soit directement, soit indirectement transformées en un produit dont les caractéristiques à l'ionophorèse sur papier sont celles de l'acide cystéinesulfinique.

Il est établi enfin, que dans les conditions employées, l'acide cystéinesulfinique n'est pas réduit en cystine. *In vivo* au contraire, la réduction est possible².

SUMMARY

Incubation of ground embryonic calf liver under nitrogen at 38° C with ³⁵S-labelled sodium sulphite, pyruvate and glutamic acid, leads to the formation of ³⁵S-cysteinesulphinic acid, isolated as the DNP-derivative. ³⁵S-hypotaurine is also found, but not ³⁵S-taurine or ³⁵S-cystine. The amount of cysteinesulphinic acid present in the medium at the end of the incubation has been measured. In the presence of serine this amount is noticeably less.

In the course of the incubation of the sulphite with embryonic calf liver, organic sulphur compounds without amino groups are also formed. Of these, one or more can be transformed, either directly or indirectly, into a product whose properties on paper ionophoresis are the same as those of cysteinesulphinic acid.

Finally it has been established that under the conditions employed, cysteinesulphinic acid is not reduced to cystine. *In vivo*, on the contrary, this reduction is possible².

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. CHAPEVILLE ET P. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 415.
- ² F. CHAPEVILLE, P. FROMAGEOT, M. HENRI ET A. BRIGELHUBER, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 351.
- ³ R. B. ROBERTS, P. A. ABELSON, D. B. COWIE, E. T. BOTTON ET R. J. BRITTEN, *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, No. 607 (1955).
- ⁴ L. J. DEYRUP ET H. H. USSING, *J. Gen. Physiol.*, 38 (1955) 599.
- ⁵ S. D. ROSSOUW ET T. J. WILKEN-JORDEN, *Biochem. J.*, 29 (1935) 219.
- ⁶ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ⁷ K. HEYNS ET W. KÖNIGSDORF, *Z. physiol. Chem.*, 295 (1953) 244.
- ⁸ A. G. LOWTHER, *Nature*, 167 (1951) 767.
- ⁹ J. AWAPARA ET W. J. WINGO, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 189.

Reçu le 2 avril 1956