

PREMIER MINISTRE
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

**Méthode nouvelle de préparation par voie
biologique de quelques substances soufrées
marquées au soufre-35**

par

F. CHAPEVILLE, H. MAIER-HUSER et P. FROMAGEOT

Rapport CEA n° 2181

1962

**CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE SACLAY**

CEA 2181 - CHAPEVILLE F., MAIER-HUSER H., FROMAGEOT P.

Méthode nouvelle de préparation par voie biologique de quelques substances soufrées marquées au soufre-35 (1962).

Sommaire. — Des travaux antérieurs ont montré l'aptitude du sac vitellin d'œufs embryonnés d'oiseaux à réaliser les réactions suivantes :

- a) réduction du sulfate en sulfite ;
- b) fixation du sulfite sur la chaîne carbonée issue de la désulfhydratation de la L-cystéine avec formation de l'acide L-cystéique ;
- c) décarboxylation de l'acide L-cystéique en taurine.

Le système enzymatique responsable de la réaction b a été purifié ; il catalyse aussi l'échange du soufre de la cystéine avec celui du sulfure minéral.

Les auteurs ont utilisé ces données pour la préparation de substances

CEA 2181 - CHAPEVILLE F., MAIER-HUSER H., FROMAGEOT P.

A new biological method for preparing certain sulphurated substances labelled with S^{35} (1962).

Summary. — Previous investigations have shown that the yolk-sac of embryonic birds' eggs can be used to produce the following reactions :

- (a) reduction of sulphate to sulphite ;
- (b) fixation of the sulphite on the carbon chain produced by the desulfhydration of L-cysteine, with formation of L-cysteic acid ;
- (c) decarboxylation of the L-cysteic acid into taurine. The enzymatic system which causes reaction (b) has been purified. It also acts as a catalyst in the sulphur-exchange between the cysteine and the mineral sulphide.

The authors have utilized these data in preparing sulphurated

soufrées marquées au ^{35}S : taurine ^{35}S , L-cystine ^{35}S et acide L-cystéique ^{35}S . Pour chacun de ces trois corps, ils décrivent les réactions chimiques mises en jeu, les modes opératoires de fabrication, les conditions expérimentales d'extraction et de contrôle de la pureté, ainsi que les résultats obtenus tant pour les rendements que pour les activités spécifiques obtenues.

substances labelled with S^{35} , L-cysteine S^{35} and L-cysteic acid S^{35} . For each of the three, they discuss the chemical reactions involved, the methods of preparation, the experimental conditions of extraction and purity-control, together with the yields and specific activities obtained.

MÉTHODE NOUVELLE DE PRÉPARATION PAR
VOIE BIOLOGIQUE DE QUELQUES SUBSTANCES
SOUFRÉES MARQUÉES AU SOUFRE-35

F. CHAPEVILLE, H. MAIER-HUSER ET P. FROMAGEOT
CENTRE D'ÉTUDES NUCLÉAIRES DE SACLAY
FRANCE

Reprinted from
"RADIOISOTOPES IN THE PHYSICAL SCIENCES AND INDUSTRY"

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY
VIENNA 1962

MÉTHODE NOUVELLE DE PRÉPARATION PAR VOIE BIOLOGIQUE DE QUELQUES SUBSTANCES SOUFRÉES MARQUÉES AU SOUFRE-35

F. CHAPEVILLE, H. MAIER-HUSER ET P. FROMAGEOT

CENTRE D'ÉTUDES NUCLÉAIRES DE SACLAY

FRANCE

Abstract — Résumé — Аннотация — Resumen

A new biological method for preparing certain sulphurated substances labelled with S^{35} . Previous investigations have shown that the yolk-sac of embryonic birds' eggs can be used to produce the following reactions: (a) reduction of sulphate to sulphite; (b) fixation of the sulphite on the carbon chain produced by the desulphydration of *L*-cysteine, with formation of *L*-cysteic acid; (c) decarboxylation of the *L*-cysteic acid into taurine. The enzymatic system which causes reaction (b) has been purified. It also acts as a catalyst in the sulphur-exchange between the cysteine and the mineral sulphide.

The authors have utilized these data in preparing sulphurated substances labelled with S^{35} : taurine S^{35} , *L*-cysteine S^{35} and *L*-cysteic acid S^{35} . For each of the three, they discuss the chemical reactions involved, the methods of preparation, the experimental conditions of extraction and purity-control, together with the yields and specific activities obtained.

Nouvelle méthode de préparation par voie biologique de quelques substances soufrées marquées au soufre-35. Des travaux antérieurs ont montré l'aptitude du sac vitellin d'œufs embryonnés d'oiseaux à réaliser les réactions suivantes: a) réduction du sulfate en sulfite, b) fixation du sulfite sur la chaîne carbonée issue de la désulphydation de la *L*-cystéine avec formation de l'acide *L*-cystéique, c) décarboxylation de l'acide *L*-cystéique en taurine. Le système enzymatique responsable de la réaction b a été purifié; il catalyse aussi l'échange du soufre de la cystéine avec celui du sulfure minéral.

Les auteurs ont utilisé ces données pour la préparation de substances soufrées marquées au ^{35}S : taurine ^{35}S , *L*-cystine ^{35}S et acide *L*-cystéique ^{35}S . Pour chacun de ces trois corps, ils décrivent les réactions chimiques mises en jeu, les modes opératoires de fabrication, les conditions expérimentales d'extraction et de contrôle de la pureté, ainsi que les résultats obtenus tant pour les rendements que pour les activités spécifiques obtenues.

Новый метод изготовления биологическим путем некоторых серосодержащих веществ, меченных серой-35. Предыдущие работы показали способность вителлинового мешка птичьих эмбриональных яиц осуществлять следующие реакции: а) восстановление сульфата в сульфит, б) фиксацию сульфита на углеродной цепи, происшедшей от сульфгидрации левовращающего цистеина с образованием левовращающей цистеиновой кислоты, с) декарбоксилирование левовращающей цистеиновой кислоты в таурин. Энзимная система, ответственная за реакцию б, была очищена; она также катализирует обмен серы цистеина с серой сернистого минерала.

Авторы использовали эти данные для изготовления серосодержащих веществ, меченных серой-35: таурин S^{35} , левовращающего цистина и левовращающей цистеиновой кислоты S^{35} . Для каждого этого вещества авторы описывают действующие химические реакции, промышленные методы изготовления, экспериментальные условия экстракции и контроля чистоты, а также результаты, полученные как для выходов, так и для полученных удельных активностей.

Nuevas biosíntesis de algunos compuestos de azufre marcados con azufre-35. Trabajos anteriores han demostrado que la membrana vitelina de los huevos fecundados de pájaro es capaz de realizar las reacciones siguientes: *a*) reducción de sulfatos a sulfitos, *b*) fijación de sulfito en la cadena de átomos de carbono resultante de la desulfhidratación de la L-cisteína con formación de ácido L-cisteico, *c*) descarboxilación del ácido L-cisteico para dar taurina. Los autores han purificado el sistema enzimático responsable de la reacción *b*). Este sistema cataliza también el intercambio de azufre entre la cisteína y el sulfuro inorgánico.

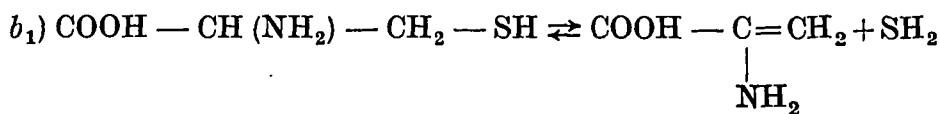
Los autores se basan en estos datos para preparar sustancias azufradas marcadas con ^{35}S : taurina- ^{35}S , L-cistina- ^{35}S y ácido L-cisteico- ^{35}S . Describen las reacciones químicas que intervienen en cada uno de los tres casos, así como los métodos empleados en la síntesis, las condiciones experimentales de extracción y de control de la pureza, y los resultados obtenidos en cuanto a rendimiento y actividades específicas alcanzados.

Introduction

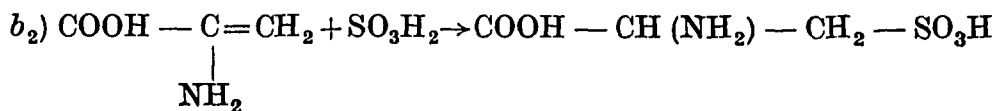
MACHLIN, PEARSON et DENTON [1], après injection de sulfate ^{35}S à un œuf embryonné de poule, en ont isolé de la taurine marquée au ^{35}S , démontrant ainsi l'aptitude de l'œuf embryonné à réaliser la synthèse de la liaison S-C à partir du soufre minéral. Nous avons montré, *in vivo* et *in vitro* [2], que cette synthèse de taurine comportait trois étapes principales: *a*) la réduction du sulfate en sulfite, *b*) la fixation du sulfite sur une chaîne tricarbonée et aminée provenant de la désulfhydratation de la cystéine, et *c*) la décarboxylation de l'acide cystéique en taurine.

La première de ces réactions a lieu exclusivement dans les cellules endodermiques du sac vitellin; dans l'état actuel, elle est liée à l'intégrité de ces cellules. Elle nécessite la présence d'oxygène. Le système enzymatique catalysant la réaction *b*, qui a été mis en évidence dans ces mêmes cellules endodermiques dès les premiers stades du développement du sac vitellin [3], apparaît ensuite dans le jaune; il peut être extrait de l'ensemble sac vitellin et jaune et purifié [4]. Les préparations obtenues sont stables.

L'utilisation de telles préparations enzymatiques a permis de montrer que la fixation du sulfite sur la chaîne tricarbonée provenant de la désulfhydratation de la cystéine est une réaction qui comporte deux étapes: la première, *b*₁, correspond à une désulfhydratation réversible de la cystéine [5]:



La seconde, *b*₂, correspond à la fixation irréversible du sulfite sur la chaîne carbonée et aminée, dont la structure est voisine de celle de l'acide α -amino-acrylique:



On remarquera que la chaîne tricarbonée impliquée dans ces réactions reste fixée à la surface de l'enzyme; en conséquence, l'acide cystéique obtenu en présence de sulfite est de la forme L naturelle. En outre, d'autres composés soufrés

peuvent réagir avec cette chaîne carbonée. C'est le cas, par exemple, de la cystéine elle-même; on obtient alors de la lanthionine.

Enfin, la dernière réaction participant à la biosynthèse de la taurine par l'œuf embryonné de poule, la décarboxylation de l'acide cystéique, est catalysée par un enzyme dont la localisation n'est pas aussi rigoureuse que celle des enzymes précédents. La décarboxylase de l'acide cystéique est présente dans le sac vitellin comme dans divers tissus de l'embryon [6].

Le présent travail montre qu'à l'aide de ces données on peut, par synthèse biologique, obtenir la taurine ^{35}S , l'acide L-cystéique ^{35}S , et la L-cystine ^{35}S à partir, respectivement, de sulfate, de sulfite et de sulfure marqué par ^{35}S .

Préparation de la taurine ^{35}S

Principe. On met à profit la présence simultanée dans le sac vitellin d'œufs embryonnés de poule, des enzymes catalysant les réactions *a*, *b* et *c*. On introduit des ions SO_4^- sous forme de $^{35}\text{SO}_4\text{H}_2$ sans entraîneur. Il se forme ainsi du sulfite ^{35}S , dont la réaction avec la cystéine, normalement présente dans les tissus, conduit à la formation d'acide cystéique ^{35}S . Sa décarboxylation donne naissance à de la taurine ^{35}S , d'activité spécifique extrêmement élevée. On ajoute au mélange réactionnel de la taurine ordinaire, et après homogénéisation on extrait une taurine marquée dont l'activité spécifique dépend de la quantité d'entraîneur ajoutée.

EXEMPLE

Matériel biologique. On prélève les sacs vitellins d'œufs embryonnés de poule âgés de 17—18 jours. On les coupe en quatre morceaux et on les lave à 37° avec une solution aqueuse de NaCl à 0,9% pour éliminer la plus grande partie du jaune. On prend soin au cours de cette opération de ne pas écraser les tissus.

Incubation. On prend 3 erlenmeyers de 200 ml; dans chacun, on introduit 10 ml d'une solution tampon de phosphates de sodium, M/15 pH 7,65, 10 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 5,1 mc de $^{35}\text{SO}_4\text{H}_2$ sans entraîneur et les fragments correspondant à deux sacs vitellins (environ 7 g de tissus frais). On place ces erlenmeyers bouchés par du coton à 37° , et on les agite pendant 15 h. A la fin de l'incubation, on réunit les contenus des erlenmeyers et on ajoute comme entraîneur 100 mg de taurine pure non marquée.

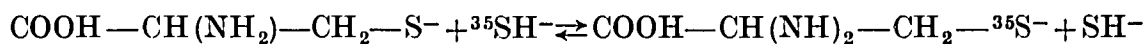
Extraction. Pour éliminer les protéines, on chauffe le milieu à 70°C et on ajoute de l'alcool chaud jusqu'à une concentration d'environ 60%; après quelques minutes, on centrifuge. Le culot est suspendu dans de l'eau distillée. On chauffe à nouveau, et on ajoute dans les mêmes conditions de l'alcool jusqu'à une concentration de 70%. Après centrifugation, on réunit les deux extraits alcooliques, et on concentre sous vide à 30 ml. La solution est dégraissée par du chloroforme. La phase aqueuse est centrifugée et concentrée à 20 ml. Elle est passée sur une colonne ($1,8 \times 14$ cm) de Dowex 50 X 8 (forme H). On lave la résine avec 80 à 100 ml d'eau, et on réunit le filtrat et les eaux de lavage, qui contiennent la taurine ^{35}S . Après concentration, on passe cette solution sur une colonne ($1,8 \times 10$ cm) de Dowex 2 X 8 (forme OH). On lave la colonne avec 80 à 100 ml d'eau. Le pH de l'effluent est alors voisin de 7,3. On ajoute sur la colonne 50 ml d'acide acétique N, et on règle la vitesse d'écoulement à 1,5 ml/min. Le pH de l'effluent reste voisin de 7,3. Ce traitement élimine des pigments jaunes et des substances radioactives inconnues qui ne réagissent pas avec la ninhydrine.

Ces solutions sont rejetées. L'élution de la taurine est obtenue en poursuivant l'addition d'acide acétique N sur la colonne. Après que l'on a recueilli 50 ml, l'effluent ne réagit plus avec la ninhydrine. L'éluat est évaporé à sec, sous vide, et l'acide acétique est complètement éliminé par plusieurs additions d'eau suivies d'évaporations. On redissout la taurine ^{35}S dans 5 ml d'eau et on élimine par filtration un résidu insoluble. Le filtrat est évaporé à sec en présence de P_2O_5 . Le résidu est extrait deux fois à 0° par 2,5 ml d'alcool absolu. L'alcool élimine les pigments. La taurine est recristallisée dans de l'alcool à 60%.

Résultat. On obtient ainsi la taurine ^{35}S . Rendement: 88 mg. Activité spécifique: 12 mc/mme. La taurine ainsi isolée se révèle pure par chromatographie sur papier (solvant: butanol tertiaire, acide formique, eau, 75, 10, 15) et par électrophorèse sur papier (tampon: citrate phosphate 0,2 M, pH 2,7, 7 V/cm, 3 h).

Préparation de la L-cystine ^{35}S

Principe. La cystéine-désulfhydrase du sac vitellin d'œufs embryonnés catalyse l'échange du soufre du groupe thiol de la L-cystéine contre le soufre du sulfure minéral présent dans le milieu:



Cet échange étant enzymatique, la cystéine ^{35}S obtenue est de la forme L. Elle est isolée à l'état de cystine ^{35}S .

EXEMPLE

Matériel biologique. On utilise une préparation purifiée de cystéine-désulfhydrase, isolée par les méthodes déjà décrites [4] de sacs vitellins et de jaunes d'œufs embryonnés de poule âgés de 18 jours. A partir de 1 kg du matériel biologique initial, on obtient environ 10 g de cystéine-désulfhydrase, sous forme d'une poudre légèrement jaune, stable à -20° pendant au moins un an. 1 mg d'une telle préparation enzymatique synthétise par heure environ 5 μmole d'acide cystéique ^{35}S dans les conditions suivantes [4]: 1 mg de la préparation enzymatique en solution dans 1 ml de solution aqueuse de NaCl à 0,9%, 50 μmole de chlorhydrate de cystéine dissous dans 1 ml d'eau et neutralisé, 50 μmole de sulfite ^{35}S de sodium dissous dans 1 ml d'eau et 2 ml de tampon tris 0,5 M pH 8, t 37° sous azote.

Incubation. Dans un récipient muni d'un bouchon rodé on introduit 150 ml d'une solution de 0,05 M pH 9 de trihydroxyméthylaminométhane, 2 mmole de cystéine (HCl), 2 mmole de $^{35}\text{SNa}_2$ (représentant 2 mc), 500 mg de préparation enzymatique, 2 mg de phosphate de pyridoxal et 5 μmole de bromure de cétyltriméthylammonium (Cétavlon) qui empêche le développement microbien. On vérifie le pH et on le réajuste éventuellement à 9, avec HCl N/10 ou NaOH N/10. On ferme le récipient et on l'agite à 38° pendant 24 heures.

A la fin de l'incubation, on introduit dans le récipient 5 ml de HCl concentré et on chasse l'excès de SH_2 présent. La solution ainsi privée d' H_2S est passée sur une colonne ($1,8 \times 14$ cm) de Dowex 50 X 8 forme H. La résine est lavée à l'eau; les protéines se retrouvent dans les filtrats et dans les eaux de lavage; ces solutions sont rejetées. La L-cystéine ^{35}S fixée sur la résine est éluée par HCl 4 N. On recueille une solution de L-cystine ^{35}S qui est évaporée à sec sous vide, ce qui élimine l'acide chlorhydrique libre. Après redissolution dans l'eau, on précipite la cystine à pH 4—5.

Résultats. On obtient 0,7 mmole de L-cystine ^{35}S (correspondant à 1,4 mmole de cystéine); sa radioactivité spécifique est de 0,4 mc/mmole (théorique: 0,5 mc/mmole). L'électrophorèse sur papier de cette cystine ne met en évidence qu'une tache radioactive, réagissant à la ninhydrine.

Il est clair que la radioactivité spécifique de la L-cystine ^{35}S est fonction non seulement de la radioactivité spécifique du sulfure utilisé, mais aussi du rapport de sa concentration vis-à-vis de celle de la L-cystéine introduite.

Préparation de l'acide L-cystéique ^{35}S

Principe. La désulfhydratation de la cystéine en présence de sulfite ^{35}S et de la cystéine désulfhydrase isolée du sac vitellin et du jaune de l'œuf embryonné conduit à la substitution irréversible du groupe thiol de la cystéine par un groupe sulfoné. L'acide cystéique ^{35}S ainsi formé est de la forme L. C'est d'ailleurs par cette réaction que l'on mesure, dans des conditions particulières, l'activité de la désulfhydrase. La préparation de l'acide L-cystéique ^{35}S met en œuvre sensiblement les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour la préparation de la L-cystine ^{35}S , modifiées cependant comme suit: tampon tris 0,05 M pH 8,5; concentration de la cystéine, 1,5 fois la concentration du sulfite employée et incubation sous azote. A la fin de l'incubation, on obtient ainsi une solution ne renfermant comme seuls acides aminés que la cystéine initiale et de l'acide cystéique ^{35}S . Celui-ci est isolé par fixation sur une colonne ($1,4 \times 14$ cm) de Dowex 2 X 8 forme OH. Le lavage de la colonne par un excès d'acide acétique N élimine la protéine, le tampon tris et la cystéine résiduels. L'acide cystéique ^{35}S est élué par de l'acide chlorhydrique 2 N. Après élimination de l'acide chlorhydrique, l'acide cystéique ^{35}S est cristallisé dans de l'acide acétique pur. Le rendement en acide cystéique ^{35}S est de l'ordre de 70%.

RÉFÉRENCES

- [1] MACHLIN, J. L., PEARSON, P. B. et DENTON, C. A. *J. biol. Chem.* 212 (1955) 469.
- [2] CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P. *Biochim. biophys. Acta* 26 (1957) 538.
- [3] CHAPEVILLE, F. et KHAU VAN KIEN, L. *Ann. Histochimie* 5 (1960) 171.
- [4] CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 42 (1960) 877.
- [5] CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 40 (1958) 1965.
- [6] SIMONNET, G., CHAPEVILLE, F. et FROMAGEOT, P. *Bull. Soc. Chim. biol. (Paris)* 42 (1960) 891.

DISCUSSION

B. E. Gordon (United States of America) asked how much usable product was normally isolated.

P. Fromageot said that the quantities usually prepared were of the order of 80—120 mg.

FIN