

- Rapport C.E.A. n° 440 -

Service de Biologie

UTILISATION DES SULFITES PAR L'ANIMAL SUPERIEUR

par

P. FROMAGEOT et F. CHAPEVILLE

Communication du C.E.A. à la Conférence de Genève

- Août 1955 -



UTILISATION DES SULFITES PAR L'ANIMAL SUPERIEUR

Par MM. P. FROMAGEOT (\*) & F. CHAPEVILLE (\*\*)

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 Schmidt (1), ni Bostrom et Aqvist (2) n'ont pu trouver une incorporation nette dans la cystine du foie de la radioactivité du sulfate utilisé. Dziewiatkowski (3), chez des rats jeunes, a observé au contraire une incorporation du soufre radioactif du sulfate marqué, sans entraîneur. Après injection à des poulets, Machlin (4) arrive à la même conclusion. Les résultats de Dziewiatkowski (3) 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 réduit, comme c'est manifeste dans les travaux de Block (5) 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 cystéine sulfinique (6). Ce dernier peut provenir soit d'une réaction inverse de celle qui conduit à l'acide pyruvique et au  $SO_2$ , soit d'un tout autre ensemble de réactions, donnant naissance à la cystine dont on sait que l'acide cystéine sulfinique provient facilement (7), soit enfin d'un échange entre la molécule de sulfite et le groupe sulfinyl de l'acide cystéine sulfinique (8).

Dans le présent travail, nous avons comparé chez le lapin l'incorporation de sulfate et de sulfite radioactifs dans l'acide cystéine sulfinique, la taurine et la cystine. Les animaux ont été

---

(\*) Service de Biologie du C.E.A.

(\*\*) Service de Biologie du C.E.A.

éviscérés ou stérilisés pour éviter toute interférence de s bactéries du tube digestif. Nous avons examiné aussi la possibilité d'un échange entre le sulfite marqué et le groupe sulfinyl de l'acide cystéine sulfinique 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 cystéine sulfinique, par une réaction inverse de la désulfination, et que la cystine provient de l'acide cystéine sulfinique par réduction.

## PARTIE EXPERIMENTALE.

1°/ Le sulfite utilisé provient soit de Harwell, soit du service des Radioéléments, du C.E.A. à Châtillon, où il est obtenu par réduction de sulfate par le phosphore rouge. La radioactivité du sulfite comme 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 : un lapin mâle âgé de deux mois, pesant 1300 g. est soumis à la diète hydrique pendant 48h. pendant lesquelles il reçoit en quatre injections sous-cutanées 100 ml. de serum glucosé isotonique ainsi que quatre lavements avec chaque jour 100 ml. d'eau salée à 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. 9h. et 18h. après, on injecte à nou-

veau du sulfite marqué. Au total, l'animal reçoit 20 ml. d'une solution aqueuse contenant 400 mg. de  $\text{SO}_3\text{Na}_2$  dont la radioactivité est de 1,3 mc. (125.000.000 coups).

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.

24 h. après la dernière injection de sulfite, on sacrifie l'animal. Après un ensemençement 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.

**PRELEVEMENT & TRAITEMENT DES ORGANES.**

Dans un cas comme dans l'autre, immédiatement après la

---

\* 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., Thréonine 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 Tyndallisation.

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, coeur, estomac vide, enfin le cerveau. Sauf la peau, les organes sont découpés en morceaux et plongés dans l'eau bouillante pendant 10 mn. On en fait un extrait aqueux selon la technique d'Awapara (8), de façon que 1 ml. de cet extrait corresponde à 10 g.

La peau et les fractions insolubles provenant de l'opération précédente sont deshydratées par l'acétone, séchées et hydrolysées 12 h. à reflux par de l'acide chlorhydrique 6 N 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 Dziwiatkowski, le reste est analysé par chromatographie et ionophorèse sur papier (6).

Dans les hydrolysats, on isole la cystine par la même méthode (3). La bile (5 ml.) recueillie au cours des expériences sur les lapins anesthésiés est hydrolysée par l'acide chlorhydrique 6 N pendant 12 h. à 100° en tube scellé. L'hydrolysate, évaporé sous vide, repris par l'eau est passé sur une colonne d'Amberlite I R 4 B (1 x 15 cm.), préalablement lavé avec l'acétique N et à l'eau. Le filtrat est passé sur une colonne de permutite 50(1x15cm) 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)

## RESULTATS :

### Acide cystéine sulfinique.

Dans les lapins sacrifiés 28h. après la fin de l'injection du sulfite, nous n'avons pas pu déceler la présence d'acide cystéine sulfinique dans les extraits aqueux du foie, du rein, du muscle et du cerveau.

Chez les animaux sacrifiés trente minutes après la fin de l'injection du sulfite, on a pu caractériser dans l'extrait aqueux du foie et du rein, par chromatographie sur papier et par ionophorèse sur papier (6) dans deux lapins sur cinq, l'acide cystéine sulfinique. Les taches correspondant à cette substance, dans la chromatographie sur papier dans le butanol normal, acide formique, eau, sont éluées et soumises à l'ionophorèse sur papier à pH 2.7 pendant 5 h. (6). On élue la zone correspondant à l'acide cystéine sulfinique, l'éluat sert au dosage par la méthode de Moore et Stein de l'acide cystéine sulfinique contenu, ainsi qu'à la mesure de la radioactivité, l'activité spécifique de l'acide cystéine sulfinique est de : 780 cpm/mg.

### Taurine.

Après purification sur colonne d'amberlite et de permutite de l'hydrolysate 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 cpm/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 ci-dessous :

Organe	Cystine - activité spécifique en cpm/mg		
	Après injection de sulfate	après injection de sulfite	
	Après 30 minutes	Après 30mn	Après 28h.
Peau	0,80	0,8	7
Viscères	-	-	17
Foie-rein (protéine)	0,6	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 l'échange entre le groupe sulfinyl de l'acide cystéine sulfinique et le sulfite, nous montrons 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 cystéine sulfinique (700 cpm/mg), de la cystine (100 cpm/mg) et de la taurine (420cpm/mg) isolés, on peut conclure que l'acide cystéine sulfinique est un précurseur de la cystine et de la taurine. Il en résulte que l'acide cystéine sulfinique peut être réduit dans l'organisme en cystéine. L'oxydation de cette dernière est donc réversible. Que l'activité

spécifique de la taurine, de la bile soit supérieure à celle de la cystine, peut s'expliquer en admettant soit que la décarboxylation de l'acide cystéine sulfinique et son oxydation ultérieure est plus rapide que sa réduction en cystéine, soit que la taurine peut se synthétiser directement à partir de sulfate, provenant de l'oxydation du sulfite introduit, soit enfin que la taurine préformée peut échanger son soufre contre celui du sulfate radioactif présent.

Les résultats que Machlin (9) obtient après injection de  $SO_4$  chez le poulet et dans l'oeuf fécondé semblent confirmer ces deux dernières hypothèses. Mais il n'est pas possible d'extrapoler ces résultats obtenus chez l'oiseau ou le lapin, car il n'est pas certain que les mammifères et les oiseaux aient un métabolisme du soufre semblable.

Si l'utilisation du soufre à l'état de sulfite pour la synthèse de la cystine, par l'intermédiaire de l'acide cystéine sulfinique, ne fait pas de doute, la radioactivité totale retrouvée dans ces acides aminés reste faible en comparaison de la radioactivité introduite.

Ceci peut s'expliquer par la faible radioactivité spécifique du sulfite injecté et par le fait que le sulfite introduit peut se condenser avec un métabolite essentiel, par combinaison bisulfitique, ce qui retire tant ce métabolite que le sulfite de la synthèse biologique de l'acide cystéine sulfinique. D'autre part, il est possible que l'ion sulfite se comporte comme l'ion sulfate dont on sait que s'il diffuse vite dans les liquides interstitiels, il pénètre lentement dans les cellules. Il en résulte que le sulfite peut être en grande partie oxydé en sulfate (10) avant d'être susceptible d'être incorporé. Enfin, 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.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) TARVER H., SCHMIDT C.L.A., J Biol. Chem. 130 : 67 (1939)
- (2) BOSTRÖM H, AQVIST S., Acta Chem. Scand. 6 : 1557 (1952)
- (3) DZIEWIATKOWSKI D.D., J. Biol. Chem. 207 : 18? (1954)
- (4) MACHLIN L.J., PEARSON P.B., DENTON C.A., BIRD H.R.  
J. Biol. Chem. 205 : 213 (1953)
- (5) BLOCK R.J., STEKOL J.A. LOOSLI J.K. Arch. Biochem. and  
Biophys. 33 : 353 (1951)
- (6) CHAPEVILLE F., FROMAGEOT P., Biochim. Biophys. Acta  
14 : 415 (1954)
- (7) CHAPEVILLE F., FROMAGEOT P., Biochim. Biophys. Acta  
16 : (1955)
- (8) CHAPEVILLE F., FROMAGEOT P. Expériences Inédites
- (9) MACHLIN L.J., PEARSON P.B., DENTON C.A., J. Biol. Chem.  
212 : 469 (1955)
- (10) HEIMBERG M., FRIDOVICH T., HANDLER P., J. Biol. Chem.  
204 : 913 (1953)



**FIN**