

## 156. Quelques aperçus concernant l'oxydation du soufre organique chez les animaux supérieurs

par Cl. Fromageot et M. A. Royané.

(12 VI 46)

On sait que le soufre de la cystéine introduite chez les animaux supérieurs par ingestion ou par injection, ou produite dans leurs tissus par réduction ou hydrolyse de la cystine, est finalement oxydé en sulfate ou en taurine<sup>1</sup>). Considérant les relations existant entre la minéralisation du soufre et son oxydation, on constate que ces relations correspondent à plusieurs possibilités:

1<sup>o</sup> — le soufre peut être détaché de la molécule organique avant toute oxydation. Ce détachement qui donne naissance à de l'hydrogène sulfuré, se fait sous l'action de la cystéine-désulfhydrase<sup>2</sup>). L'hydrogène sulfuré ainsi libéré est susceptible d'être oxydé en sulfate, cette oxydation se faisant par des stades successifs dont il ne sera pas question ici.

2<sup>o</sup> — le soufre peut être partiellement oxydé tout en restant relié à la molécule organique; cette oxydation va jusqu'au stade acide sulfinique  $R-SO_2H$ . A ce stade, le soufre se sépare de la molécule organique puis est oxydé en sulfate.

3<sup>o</sup> — le soufre, tout en restant en combinaison organique, est oxydé au maximum, ce qui aboutit à la formation d'acide cystéique  $R-SO_3H$ . Le soufre n'est plus alors détaché de la molécule organique: cette dernière est décarboxylée sous l'action de la cystéico-décarboxylase<sup>3</sup>); dans ce cas, le soufre oxydé est excrété sous forme de taurine.

La présente communication, préliminaire, concerne le mécanisme de la scission du soufre de l'acide cystéine-sulfinique, mécanisme encore mal connu. Le seul fait expérimental bien acquis actuellement, se rapportant à cette scission, est la formation, en aérobiose, de sulfate à partir d'acide cystéine-sulfinique, par des broyats ou des extraits de foie de rat<sup>1</sup>). Cette oxydation a conduit Medes<sup>4</sup>) à envisager l'existence d'un enzyme, la sulfinico-oxydase (sulphinic acid oxidase) qui en serait responsable. Mais il est difficile d'admettre qu'un seul ferment puisse à la fois scinder l'acide cystéine-sulfinique en une molécule organique sans soufre, et en un corps soufré minéral, puis oxyder celui-ci en sulfate. Cette difficulté n'a d'ailleurs pas

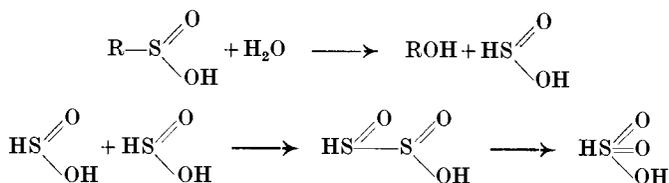
<sup>1</sup>) Cl. Fromageot, Exposés Annuels de Biochimie médicale **6**, 281—301 (1946).

<sup>2</sup>) C. V. Smythe, Advances in Enzymology **5**, 237 (1945).

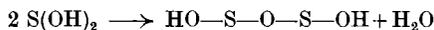
<sup>3</sup>) H. Blaschko, Biochem. J. **36**, 571 (1942); **39**, 76 (1945).

<sup>4</sup>) G. Medes, Biochem. J. **33**, 1559 (1939).

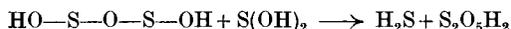
échappé à *Medes* et *Floyd*<sup>1)</sup> qui ont proposé deux hypothèses pour expliquer cette formation de sulfate. La première de ces hypothèses met en œuvre les réactions suivantes:



le thiosulfate formé s'oxydant ensuite facilement en sulfate<sup>2)</sup>. Cette hypothèse est intéressante, car elle pourrait fournir l'une des explications de la présence constante des thiosulfates dans l'urine des animaux supérieurs<sup>3)</sup>. La deuxième hypothèse de *Medes* et *Floyd* s'appuie sur la transformation de l'acide sulfoxylique en acide disulfoxylique, en solution alcaline<sup>4)</sup>.



L'acide disulfoxylique réagirait à son tour avec une nouvelle molécule d'acide sulfoxylique pour donner de l'acide pyrosulfureux



dont on sait qu'il se transforme facilement en sulfate.

Etant donné le caractère hypothétique de ces réactions, nous avons repris la question expérimentalement, en étudiant d'une part la genèse éventuelle du thiosulfate chez l'animal à partir d'acide cystéine-sulfinique, et en essayant d'autre part de mettre en évidence par voie enzymatique, *in vitro*, le premier produit de scission de l'acide cystéine-sulfinique.

### I. Production de thiosulfate chez le lapin après injection d'acide cystéine-sulfinique.

Voici, à titre d'exemple, le détail d'une expérience mettant en évidence la genèse de thiosulfate chez le lapin à partir de l'acide cystéine-sulfinique.

Un lapin mâle, adulte (3,300 kg.) est soumis à un régime aussi pauvre que possible en soufre, mais bien équilibré d'autre part (régime constitué essentiellement par des carottes et du gâteau de maïs). L'urine de l'animal est recueillie chaque jour, mesurée, puis analysée en ce qui concerne sa teneur en soufre total (méthode de *Folin*), sulfates totaux, thiosulfate (méthode de *Fromageot* et *Royer*<sup>5)</sup> et méthode de *Zorkendörfer*<sup>6)</sup>; ces deux méthodes se contrôlent mutuellement et donnent des résultats pratiquement identiques) et sulfocyanure (méthode de *Hartner*<sup>7)</sup>. Par suite de l'ingestion du régime en question,

<sup>1)</sup> *G. Medes* et *N. Floyd*, *Biochem. J.* **36**, 259 (1942).

<sup>2)</sup> *W. Nyiri*, *Bioch. Z.* **141**, 160 (1923).

<sup>3)</sup> *Cl. Fromageot* et *A. Royer*, *Enzymol.* **11**, 361 (1945).

<sup>4)</sup> *H. Bassett* et *R. G. Durrant*, *Soc.* **1927**, 1401.

<sup>5)</sup> *Cl. Fromageot* et *A. Royer*, *Enzymol.* **11**, 253 (1944).

<sup>6)</sup> *W. Zorkendörfer*, *Bioch. Z.* **278**, 191 (1935).

<sup>7)</sup> *F. Hartner*, *Mikroch.* **16**, 141 (1935).

l'excrétion du thiosulfate baisse, atteint un niveau minimum et s'y maintient tant que l'animal ne reçoit pas d'autre source de soufre. On attend une huitaine de jours pour être sûr de la régularité de l'excrétion du thiosulfate, puis à l'aide d'un dispositif convenable, on injecte par voie intraveineuse (veine marginale de l'oreille) 280 ml. d'une solution  $39,25 \times 10^{-3}$  M de cystéine-sulfinate de sodium, ce qui correspond à un apport de 351 mg. de soufre de l'acide sulfinique. Cette injection est faite à raison de 80 ml. environ à l'heure. On recueille l'urine, ainsi que celle des jours suivants, l'animal étant toujours soumis au même régime. Les résultats obtenus, calculés en mg. de soufre excrétés par 24 heures, sont représentés par les diagrammes de la figure 1.

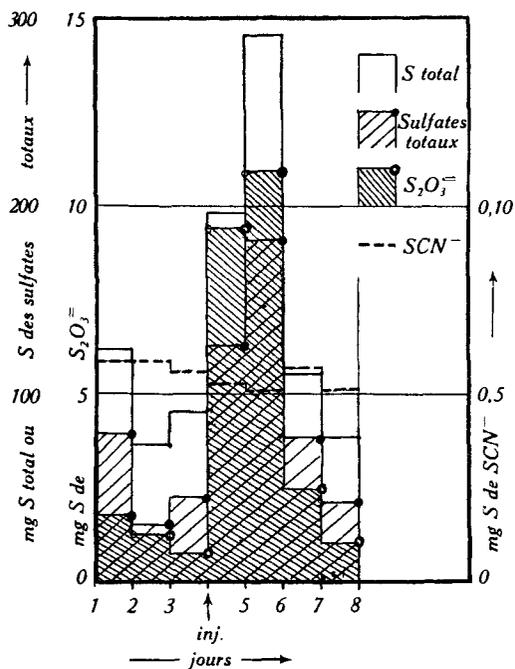


Fig. 1.

Ces résultats sont très nets : ils montrent en particulier, de façon indiscutable, la genèse de thiosulfate après l'injection d'acide cystéine-sulfinique. Calculé par rapport à la quantité d'acide cystéine-sulfinique injecté, la proportion de thiosulfate formé est faible, de l'ordre de 5,5%. Mais cette faiblesse même s'explique par le rôle de corps intermédiaire joué par le thiosulfate. Les résultats précédents semblent ainsi correspondre à première vue à la première hypothèse de *Medes et Floyd*. Il était alors utile de reprendre la même étude in vitro, par voie enzymatique.

## II. Production de sulfite par scission enzymatique de l'acide L-cystéine-sulfinique.

La caractérisation des produits de la scission enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique est faite de la façon suivante : on prépare avec les précautions habituelles un

broyat de foie de lapin. On en introduit environ 10 gr. (soit 1,7 gr. poids sec) dans une cellule du modèle utilisé au laboratoire<sup>1</sup>). Cette cellule contient en outre une solution de phosphate tampon M/30 à p<sub>H</sub> 7,3, en quantité telle que le volume total de la suspension soit de 20 ml. A cette suspension, on ajoute une quantité déterminée de cystéinate de sodium. D'autre part, des cellules témoins sont préparées, contenant soit une suspension de broyat de foie dans la solution tampon de phosphate, sans acide cystéine-sulfonique, soit une solution de cystéine-sulfinate de sodium dans la solution de phosphate, soit une suspension de broyat de tissu dans la solution de phosphate placé au bain-marie bouillant pendant 10 minutes avant l'introduction de sulfinate de sodium. L'ensemble est placé pendant deux heures au thermostat à 38°. Après ce temps, on dose séparément dans chaque cellule le thiosulfate éventuellement formé et les autres substances soufrées réductrices: SO ou SO<sub>2</sub>, qui prendraient naissance par acidification du milieu si celui-ci contenait du sulfoxylate ou du sulfite (dosage iodométrique). Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau I.

Tableau I.

1. Foie broyé 10 gr. + cystéine-sulfinate de Na  $0,66 \times 10^{-3}$  mol. + atmosphère N<sub>2</sub>.
2. Foie broyé 10 gr. + cystéine-sulfinate de Na  $0,33 \times 10^{-3}$  mol. + atmosphère N<sub>2</sub>.
3. Foie broyé 10 gr. traité au bain-marie + cystéine-sulfinate de Na  $0,33 \times 10^{-3}$  mol. + atmosphère N<sub>2</sub>.
4. Foie broyé 10 gr. + atmosphère N<sub>2</sub>.
5. Foie broyé 10 gr. + cystéine-sulfinate de Na  $0,66 \times 10^{-3}$  mol. + air.
6. Foie broyé 10 gr. + air.
7. Cystéine-sulfinate de Na  $0,66 \times 10^{-3}$  mol. + atmosphère N<sub>2</sub>.

N° des essais	S de S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>=</sup> (mgr.)	Sol. d'iode (ml.)
1	0,13	24,0
2	0,22	15,3
3	0,22	0,7
4	0,09	0,4
5	0,10	16,2
6	0,04	0,0
7	0,02	0,1

Il ressort de ces résultats que, dans les conditions expérimentales réalisées, il ne se produit pas de thiosulfate. Mais, en revanche, il apparaît des quantités importantes de substance titrable à l'iode et ce, uniquement dans les cellules contenant la suspension de tissus non soumise préalablement au bain-marie bouillant, et maintenue en contact avec le cystéine-sulfinate de sodium. On a là la preuve qu'il s'agit bien ici d'une réaction fermentaire.

Pour déterminer la nature de la substance réductrice titrable à l'iode, nous avons opéré de la façon suivante: au cours d'expériences faites comme il vient d'être dit, on recueille dans un flacon laveur la substance volatile réductrice, on la titre par l'iode puis, en milieu franchement chlorhydrique, on précipite par addition de chlorure de baryum, le sulfate formé par action oxydante de l'iode. Connaissant la quantité d'iode utilisé pour le dosage, et la quantité de sulfate de baryum formé, il est facile de savoir si l'on a à faire à du sulfoxylate ou à du sulfite. Le tableau II indique les résultats obtenus.

<sup>1</sup>) P. Desmuelle et Cl. Fromageot, *Enzymol.* **6**, 80 (1939).

Tableau II.

ml. sol. I 0,1 N . . . . .	16,2
millimol. SO <sub>2</sub> correspondantes . .	0,081
millimol. SO correspondantes . .	0,0405
mgr. SO <sub>4</sub> Ba calculés pour SO <sub>2</sub> .	18,9
mgr. SO <sub>4</sub> Ba calculés pour SO .	9,45
mgr. SO <sub>4</sub> Ba trouvés . . . . .	20,0

Ces résultats montrent de façon indiscutable qu'il s'agit bien ici de sulfite. Il serait encore prématuré de tirer de ces résultats des conclusions définitives: en particulier, il est difficile de dire si le sulfite provient immédiatement de la scission enzymatique de l'acide cystéine-sulfinique, ou s'il prend naissance à partir d'acide sulfoxylique, par transformation ultérieure de ce dernier, qui serait alors la première substance résultant de la scission de l'acide sulfinique. Des expériences sont actuellement en cours pour résoudre ce point.

## RÉSUMÉ.

L'injection intraveineuse d'acide cystéine-sulfinique chez le lapin provoque un accroissement important de la quantité de thiosulfate excrété par l'urine. D'autre part, l'acide cystéine-sulfinique, mis en contact avec du foie broyé de lapin, est scindé avec formation de sulfite, par suite d'une réaction fermentaire dont le mécanisme n'est pas encore élucidé.

Lyon, Laboratoire de Chimie biologique, Institut de Chimie de l'Université.

### 157. Les substances agissant sur la résistance et la perméabilité capillaires et la notion de vitamine P

par M. Javillier et J. Lavollay.

(28 V 46)

Nous limitons cet exposé à certaines notions établies par plusieurs chercheurs associés aux efforts de nos laboratoires depuis que, en novembre 1939, l'un de nous, préoccupé par la recherche d'agents pouvant limiter les hémorragies des blessures de guerre<sup>1</sup>), orienta ses collaborateurs vers l'étude de la «vitamine P», mise en évidence en 1936 par M. *Szent-Györgyi*.

D'après ce savant, la vitamine P accroît la résistance et diminue la perméabilité aux protéines des vaisseaux capillaires. Elle était présentée sous forme d'un extrait de citron, la «citrine», dont les constituants n'étaient pas en proportion constante et dont l'activité fut