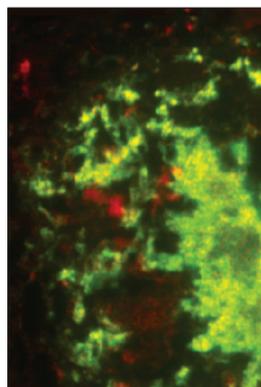


H₂S, un nouveau neuromodulateur

Pierre Kamoun

> Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est produit dans de nombreux tissus, et notamment dans le cerveau, où il joue un rôle de neuromodulateur. H₂S augmente ainsi les réponses mises en jeu par les récepteurs NMDA et facilite l'induction d'une potentialisation à long terme dans l'hippocampe. L'altération de la concentration de l'activateur physiologique de la cystathionine β synthase, enzyme responsable de la synthèse d'H₂S dans le cerveau, explique la diminution de la concentration d'H₂S dans les cerveaux de sujets atteints de maladie d'Alzheimer. L'hyperproduction d'H₂S décrite chez les sujets trisomiques 21 est probablement liée à l'hyperexpression de cette même enzyme, dont le gène est localisé sur le chromosome 21. <



le gène de la CBS a été invalidé [9] est extrêmement abaissé, ce qui indique que la production de H₂S dans les différentes parties du cerveau est presque exclusivement contrôlée par la CBS [10].

Laboratoire de Biochimie médicale B, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75743 Paris Cedex 15, France.
pierre.kamoun@nck.ap-hop-paris.fr

Les voies du catabolisme de l'H₂S sont schématisées sur la Figure 2.

Actions physiologiques d'H₂S

La première démonstration du rôle physiologique d'H₂S a été apportée en 1996 [8] et son rôle a été explicité dans des revues récentes [11, 12]. La concentration physiologique d'H₂S dans le cerveau est relativement élevée (50 à 160 μM) [1-3]. Des concentrations plus élevées (supérieures à 320 μM) inhibent la transmission synaptique dans l'hippocampe, alors qu'H₂S à concentration physiologique facilite l'induction d'une potentialisation à long terme (LTP pour *long-term potentiation*) quand il est ajouté pendant une stimulation téτανique faible. Grâce à l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate), on a pu démontrer que l'induction d'une potentialisation à long terme par H₂S nécessitait l'activation des récepteurs NMDA, comme celle induite par la stimulation téτανique. L'effet d'H₂S est spécifique et ne peut être obtenu avec un thiol physiologique (cystéine) ou non physiologique (dithiothréitol) [8]. Un rôle physiologique a donc été attribué à H₂S dès 1996, comme il

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) a longtemps été considéré comme une substance toxique. Ce n'est que depuis 1989 que sa production endogène chez l'homme et les mammifères a été mise en évidence, en particulier dans les structures cérébrales [1-3]. Ce fait a suggéré que H₂S pouvait avoir un rôle physiologique, comme deux autres gaz, le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO). Depuis cette date, plusieurs publications ont précisé le mode d'action d'H₂S qui est maintenant classé parmi les neuromessagers atypiques [4].

Métabolisme de H₂S

Chez les mammifères, H₂S peut être formé à partir de cyst(é)ine selon trois voies de biosynthèse, impliquant notamment les enzymes cystathionine β synthase (CBS) et cystathionase (CSE) (Figure 1). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques permet de déterminer pour chaque tissu la voie prépondérante de biosynthèse d'H₂S. Pour le foie, la production d'H₂S semble majoritairement liée à la CSE [5, 6]; il en est de même pour les entérocytes [7] et pour le rein [5]. L'inhibition de la CSE ne modifie pas la production d'H₂S dans le cerveau [8]; par ailleurs, le contenu en H₂S des cerveaux de souris dont

l'avait été auparavant aux autres neuromodulateurs gazeux, NO et CO [4]. Le mécanisme d'action a été ensuite précisé sur des cellules neuronales et gliales en culture, où des concentrations physiologiques d'H₂S augmentent la production d'AMPc, et dans les oocytes de xénope, où des récepteurs NMDA exprimés à la membrane sont modulés de manière spécifique par H₂S [13].

Ces résultats suggèrent un mécanisme selon lequel une protéine kinase A, activée par l'AMPc, phosphorylerait des récepteurs NMDA qui, stimulés, seraient responsables de l'induction d'une potentialisation à long terme dans l'hippocampe. Le mécanisme d'action AMPc-dépendant d'H₂S diffère donc de ceux de NO et CO qui sont GMPc-dépendants. La libération de CRH (*corticotropin releasing hormone*) par l'hypothalamus est inhibée par H₂S. Celle-ci a été démontré *in vitro* sur explants hypothalamiques, mais aussi *in vivo* chez le rat: la stimulation de la CBS par son activateur physiologique, la S-adénosylméthionine (SAM), injectée par voie intra-péritonéale, accroît la production intracérébrale d'H₂S et inhibe la libération dans le plasma de corticostérone après exposition de l'animal au froid [14, 15].

Le contrôle de la biosynthèse intracérébrale d'H₂S par la CBS est également assuré par la SAM. Récemment, une diminution très nette (50% des valeurs normales) de la concentration intracérébrale d'H₂S a été observée dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer [16]. L'activité CBS cérébrale est normale chez ces malades mais la concentration de SAM n'est que de 30% de celle des sujets témoins. Un autre mécanisme de mise en jeu de la synthèse intracérébrale d'H₂S a été décrit: une stimulation neuronale, les ionophores Ca²⁺ ou le glutamate provoquent un influx de Ca²⁺ dans les neurones, d'où une activation de la calmoduline. Le complexe calmoduline-Ca²⁺ se fixe sur une séquence de 19 acides aminés de la CBS. Cette séquence est très conservée dans toutes les protéines pouvant fixer la calmoduline [10]. La biosynthèse intracérébrale d'H₂S par la CBS est donc soumise à un double contrôle exercé par la SAM et par le Ca²⁺.

Un effet de vasorelaxation d'H₂S sur les muscles lisses a été observé. Par ailleurs, H₂S à faible concentration multiplie par plus de 10 l'effet vasorelaxant de NO [17] sur les tissus aortiques. Alors que NO et CO peuvent être libérés à la fois par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses des vaisseaux, H₂S n'est synthétisé par la cystathionase qu'à partir des cellules musculaires lisses [18]. NO est un modulateur de la production

endogène d'H₂S dans les cellules musculaires lisses des vaisseaux car il augmente l'expression du gène de la cystathionase et exerce un effet direct de stimulation sur cette activité enzymatique [18]. H₂S semble agir directement sur les canaux K⁺ ATP-dépendants (K_{ATP}) des cellules musculaires lisses des vaisseaux, car son effet est totalement inhibé par la glibenclamide, une substance connue pour bloquer l'action du canal K_{ATP} [18].

Des interrelations ont pu être mises en évidence entre les neuromodulateurs gazeux, NO et CO et la CBS [19]: NO peut se fixer sur la CBS et inhiber son activité enzymatique. Cependant, les différences d'affinité de NO pour la CBS et sa cible habituelle, une guanylyl cyclase, ne sont pas en faveur d'une fixation de NO sur la CBS à l'état physiologique. A l'inverse, l'affinité de la CBS pour CO est très grande: la CBS est-elle la cible physiologique de CO au niveau cérébral? Cette question est pour l'heure sans réponse [19].

La CBS est codée par un gène situé sur le chromosome 21 (21q22.3) et l'activité enzymatique de la CBS est augmentée d'environ 1,5 fois dans les fibroblastes des sujets atteints de trisomie 21 par rapport aux témoins

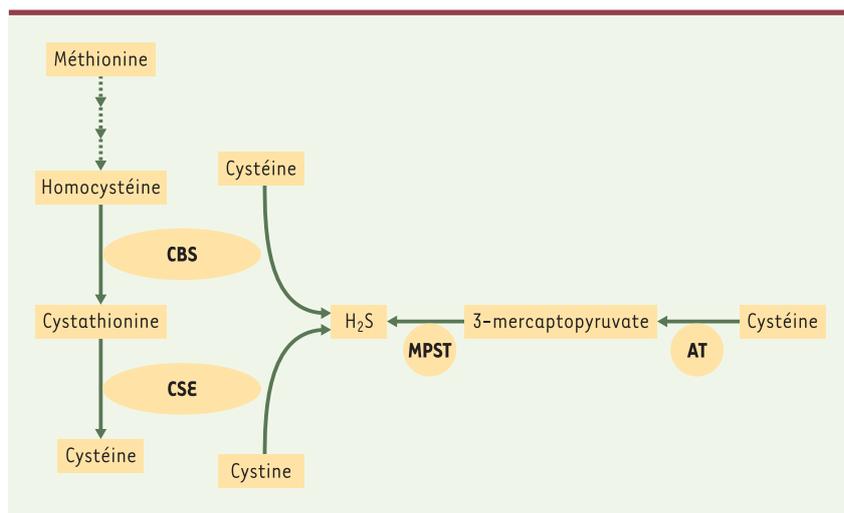


Figure 1. Biosynthèse d'H₂S. Trois voies de biosynthèse de H₂S ont été identifiées. Deux d'entre elles font intervenir des enzymes appartenant à la voie de transsulfuration qui permet la biosynthèse de cystéine à partir d'une méthionine ayant perdu son méthyle au cours d'une réaction de méthylation. Cette voie de transsulfuration implique la condensation de l'homocystéine, produit de déméthylation de la méthionine, avec une molécule de sérine pour former la cystathionine. Celle-ci est ensuite coupée en cystéine et homosérine. Les deux enzymes successivement impliquées dans cette voie sont la cystathionine β synthase (CBS) et la cystathionase (CSE). La réaction de transsulfuration est cytosolique: la CBS produit H₂S à partir de cystéine [Cys] alors que la cystathionase produit H₂S à partir de la cystine [(Cys)₂] produit d'oxydation de la cystéine [5, 25, 26]. La troisième voie de biosynthèse de H₂S est à la fois cytosolique et mitochondriale: elle implique une transamination, par l'aminotransférerase (AT), de la cystéine en son céto-acide, le 3-mercaptopyruvate, puis la libération de H₂S, à partir du 3-mercaptopyruvate, par la 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST) [27-30].

[20]. Cette augmentation d'activité induit une diminution du substrat physiologique de la CBS, l'homocystéine, dans le plasma de sujets atteints de trisomie 21 [21]. Le retard mental est progressif dans cette maladie: les trisomiques 21 naîtraient avec une intelligence normale mais celle-ci déclinerait progressivement au cours de la première année. L'hypothèse d'une hyperproduction de H_2S [22] chez les trisomiques 21 est confortée par l'observation d'une production de thiosulfate deux à trois fois plus élevée chez ces sujets que chez les sujets témoins [23, 24]. Par ailleurs, la production dans les globules rouges de sulfhémoglobine nécessite à la fois la présence d' H_2S et de méthémoglobine. La mesure de la sulfhémoglobine dans les globules rouges de trisomiques 21 a donc été utilisée pour vérifier l'hyperproduction d' H_2S . La sulfhémoglobine érythrocytaire est très significativement augmentée chez les trisomiques 21 [24].

Conclusions

L'ensemble de ces résultats indique qu'il existe une hyperproduction d' H_2S dans la trisomie 21. Des études

complémentaires sont nécessaires pour déterminer les effets toxiques possibles de cette hyperproduction chez les sujets atteints de trisomie 21. ♦

REMERCIEMENTS

Ce travail a été aidé par un contrat de la Fondation Jérôme Lejeune Paris.

SUMMARY

H_2S , a new neuromodulator

The formation of H_2S from cyst(e)ine is catalyzed by three enzymes, cystathionine β synthase, cystathionase, and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. In the liver, kidney, enterocytes and vascular smooth muscle cells, H_2S is principally synthesized by cystathionase. In contrast, it is synthesized by cystathionine β synthase in the brain and partially by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in cardiac tissue. H_2S is catabolized, essentially in mitochondria by thiosulfate reductase. The sulfite generated is then oxidized to sulfate by sulfite oxidase. The amount of thiosulfate excreted in the urine is the best indicator of H_2S biosynthesis, together with sulfhemoglobin determination in erythrocytes. H_2S acts as a neuromodulator in the brain, increasing responses mediated by NMDA receptors, facilitating the induction of

long-term potentiation in the hippocampus. H_2S also acts as a vasodilator, acting directly on ATP-dependent potassium channels in vascular smooth muscle cells. The concentration of H_2S is abnormally low in the brains of subjects with Alzheimer's disease, due to changes in the concentration of the physiological activator of cystathionine β synthase. The overproduction of H_2S described in subjects with Down's syndrome probably results from the overproduction of cystathionine β synthase, as the gene encoding this protein is located on chromosome 21. ♦

RÉFÉRENCES

1. Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, et al. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: Post-mortem studies and two case reports. *J Anal Toxicol* 1989; 13: 105-9.
2. Warenaia MW, Goodwin LR, Benishin CG, et al. Acute hydrogen sulfide poisoning: Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 973-81.
3. Savage JC, Gould DH. Determination of sulfides in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1990; 526: 540-5.
4. Baranano DE, Ferris CD, Snyder SH. Atypical neural messengers. *Trends Neurosci* 2001; 24: 99-106.

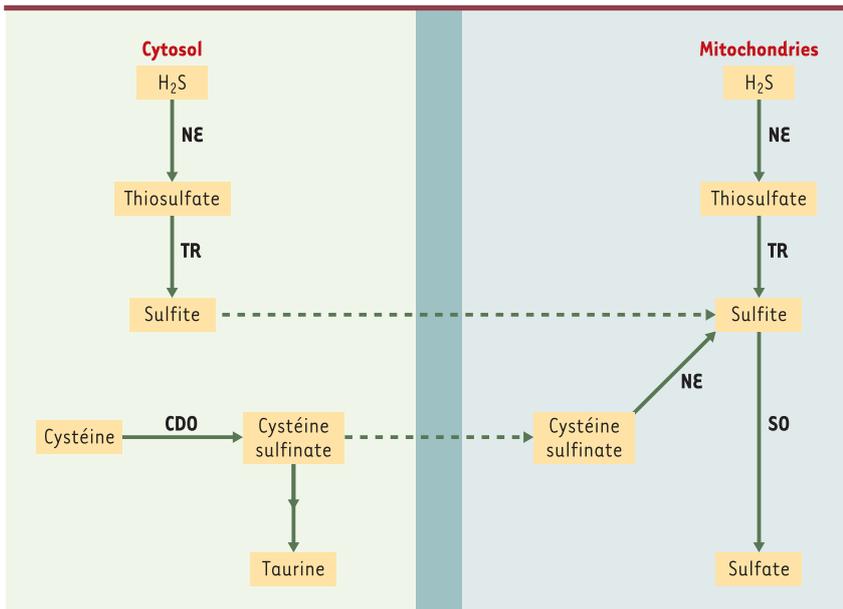


Figure 2. Catabolisme d' H_2S . Dans le foie de rat, l'oxydation de H_2S en thiosulfate est catalysée par des composés hémiques des métalloprotéines et la ferritine [31, 32]. La principale enzyme du catabolisme du thiosulfate est la thiosulfate réductase (TR), enzyme dont le cofacteur est le glutathion réduit, et la localisation surtout mitochondriale [33]. Les sulfites formés par ce catabolisme sont transformés dans les mitochondries en sulfates par la sulfite oxydase (SO). L'excrétion de thiosulfate dans l'urine constitue le meilleur indicateur de la biosynthèse de H_2S ou d'une intoxication accidentelle par H_2S [34, 35]. L'origine des sulfites, donc des sulfates, est double: à partir d' H_2S d'une part, et à partir du catabolisme de la cystéine par la voie de la cystéine dioxygénase (CDO), d'autre part. NE: non enzymatique.

5. Stipanuk MH, Beck PW. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydration in liver and kidney of the rat. *Biochem J* 1982; 206: 267-77.
6. Stipanuk MH, De la Rosa J, Hirschberger LL. Catabolism of cyst(e)ine by rat renal cortical tubules. *J Nutr* 1990; 120: 450-8.
7. Coloso RM, Stipanuk MH. Metabolism of cyst(e)ine in rat enterocytes. *J Nutr* 1989; 119: 1914-24.
8. Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 1996; 16: 1066-71.
9. Watanabe M, Osada J, Aratani Y, et al. Mice deficient in cystathionine β -synthase: Animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 1585-9.
10. Eto K, Ogasawara M, Umemura K, et al. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 2002; 22: 3386-91.
11. Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. *Mol Neurobiol* 2002; 26: 13-9.
12. Wang R. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter. *FASEB J* 2002; 16: 1792-8.
13. Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 129-33.
14. Dello Russo C, Tringali G, Ragazzoni E, et al. Evidence that hydrogen sulfide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: *in vitro* and *in vivo* studies in the rat. *J Neuroendocrinol* 2000; 12: 225-33.
15. Navarra P, Dello Russo C, Mancuso C, et al. Gaseous neuromodulators in the control of neuroendocrine stress axis. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917: 638-46.
16. Eto K, Asada T, Arima K, et al. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 293: 1485-8.
17. Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 237: 527-31.
18. Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. The vasorelaxant effect of H(2)S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *EMBO J* 2001; 20: 6008-16.
19. Taaka S, Banerjee R. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *J Inorg Biochem* 2001; 87: 245-51.
20. Chadeaux B, Rethore MO, Raoul O, et al. Cystathionine β synthase: Gene dosage effect in trisomy 21. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 128: 40-4.
21. Chadeaux B, Ceballos I, Hamet M, et al. Is absence of atheroma in Down syndrome due to decreased homocysteine levels? *Lancet* 1988; 2: 741.
22. Kamoun P. Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Med Hypoth* 2001; 57: 389-92.
23. Belardinelli MC, Chabli A, Chadeaux B, Kamoun P. Urinary sulfur compounds in Down's Syndrome. *Clin Chem* 2001; 47: 1500-1.
24. Kamoun P, Belardinelli MC, Chabli A, et al. Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down's syndrome. *Am J Med Genet* 2003; 116A: 310-1.
25. Yamanashi T, Tuboi S. The mechanism of the L-cysteine cleavage reaction catalyzed by rat liver gamma-cystathionase. *J Biochem* 1981; 89: 1913-21.
26. Stipanuk MH. Metabolism of sulfur-containing aminoacids. *Ann Rev Nutr* 1986; 6: 179-209.
27. Koj A, Frendo J, Wojczak I. Subcellular distribution and intramitochondrial localization of three sulfurtransferases in rat liver. *FEBS Lett* 1975; 57: 42-66.
28. Ubuka T, Yuasa S, Ishimoto Y, Shimomura M. Desulfuration of L-cysteine through transamination and transsulfuration in rat liver. *Physiol Chem Phys* 1977; 9: 241-6.
29. Ogasawara Y, Isoda S, Tanabe S. Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat. *Biol Pharm Bull* 1994; 17: 1535-42.
30. Nagahara N, Ito T, Kitamura H, Nishino T. Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis. *Histochem Cell Biol* 1998; 110: 243-50.
31. Sorbo B. On the formation of thiosulfate from inorganic sulfide by liver tissues and heme compounds. *Biochim Biophys Acta* 1958; 27: 324-9.
32. Ubuka T, Ohta J, Yao WB, et al. L-cysteine metabolism in a mercaptopyruvate pathway and sulfate formation in rat liver mitochondria. *Amino Acids* 1992; 2: 143-55.
33. Westley J. Rhodanese and the sulfane pool. In: Jacoby WB, ed. *Enzymatic basis of detoxication*, vol. 2. New York: Academic Press, 1980: 245-62.
34. Beauchamp Jr RO, Bus JS, Popp JA, et al. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1984; 13: 25-97.
35. Kangas J, Savolainen H. Urinary thiosulphate as an indicator of exposure to hydrogen sulphide vapour. *Clin Chim Acta* 1987; 164: 7-10.

TIRÉS À PART
P. Kamoun