

PREMIER MINISTRE
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

Étude de la détection histochimique de la
cystéine désulfhydrase du sac vitellin des
oiseaux

par

F. CHAPEVILLE et L. KHAU VAN KIEN

Rapport CEA n° **2046**

1961

CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE SACLAY

CEA 2046 - CHAPEVILLE F., KHAU VAN KIEN L.

Etude de la détection histochimique de la cystéine désulphydrase du sac vitellin des oiseaux (1961).

Sommaire. — Nous avons mis au point une méthode qui permet la détection histochimique de la cystéine désulphydrase du sac vitellin de l'embryon de poulet. L'enzyme est localisé en présence d'un sel de plomb par le sulfure de plomb formé in situ à partir de l'hydrogène sulfuré libéré de la cystéine. Les images obtenues sont histologiques et permettent la mise en évidence de l'enzyme dans les différents types de cellules de l'endoderme.

CEA 2046 - CHAPEVILLE F., KHAU VAN KIEN L.

Study of the histochemical detection of cysteine desulphydrase in the vitelline sac of birds (1961).

Summary. — We have developed a method for the histochemical detection of cysteine desulphydrase in the vitelline sac of the chicken embryo. The enzyme is localized in the presence of a lead salt by lead sulphide formed in situ from hydrogen sulphide liberated from the cysteine. The micrographs obtained are histological and show the presence of the enzyme in the different types of endoderm cell.

F. CHAPEVILLE et L. KHAU VAN KIEN

*Département de Biologie, Commissariat à l'Énergie Atomique
Centre d'Études Nucléaires de Saclay, Gif, sur Yvette*

**ÉTUDE DE LA DÉTECTION HISTOCHIMIQUE
DE LA CYSTÉINE DÉSULFHYDRASE
DU SAC VITELLIN DES OISEAUX**

EXTRAIT DES

ANNALES D'HISTOCHIMIE

(*Ann. Histochem.* 1960 - 5 : 2, pp. 171-175)

ÉTUDE DE LA DÉTECTION HISTOCHIMIQUE DE LA CYSTÉINE DÉSULFHYDRASE DU SAC VITELLIN DES OISEAUX

F. CHAPEVILLE et L. KHAU VAN KIEN

avec la collaboration technique de H. Bernard

*Département de Biologie, Commissariat à l'Énergie Atomique
Centre d'Études Nucléaires de Saday, Gif. sur Yvette.*

Nous avons essayé de rechercher et localiser histochemiquement un nouvel enzyme : la cystéine désulfhydrase, récemment mis en évidence par l'un de nous dans le sac vitellin de l'embryon de Poulet (1).

Différente des autres désulfhydrases connues jusqu'à présent (2), elle permet la synthèse de la taurine à partir du sulfate minéral. Le mécanisme de cette synthèse, est le suivant : les cellules épithéliales réduisent le sulfate en sulfite, ce dernier se fixe ensuite sur le carbone β de la chaîne organique issue de la cystéine désulfhydrée pour former de l'acide cystéique. Puis la réaction se continue dans le sac vitellin ou en dehors par la décarboxylation de l'acide et formation de la taurine.

L'enzyme que nous étudions intervient dans la deuxième réaction et donne un dégagement d'hydrogène sulfuré, qui sera visualisé. Il n'existe que pendant la période embryonnaire et disparaît après la résorption du sac vitellin.

Notre étude de détection histoenzymologique s'est appuyée sur les données biochimiques recueillies grâce aux études antérieures effectuées sur des broyats, homogénats et des préparations enzymatiques purifiées. La cystéine désulfhydrase du sac vitellin a pour caractéristiques :

1° d'être assez stable, de résister à l'action de l'alcool, l'acétone et des solvants histologiques ;

2° de présenter une étroite spécificité pour la L cystéine, qu'elle attaque en présence du sulfite, alors que les autres sont inhibées par celui-ci ;

3° elle agit au maximum à pH 8,5 et à 38° en présence du phosphate de pyridoxal son coenzyme, son action est inhibée par les réactifs du groupement carbonyle (hydrazine, hydroxylamine) et aussi par l'acide trichloroacétique et les agents oxydants.

Après des premiers essais de mise en évidence *in vivo*, nous avons mis au point plusieurs techniques de détection utilisant des pièces fixées à l'alcool ou à l'acétone à zéro degré, et des pièces à l'état frais et congelées à -25°,



Fig. 1.

Méthode de détection de la Cystéine de sulfhydrase du sac vitellin de Poulet — fixation à l'acétone — coupe à la paraffine, au niveau de la paroi du sac vitellin.

pour éviter l'autolyse des tissus du sac vitellin.

Le réactif utilisé est le suivant :

chlorhydrate de cystéine	450 mg
sulfite de soude	312 mg
acétate de plomb	50 mg
phosphate de pyridoxal	traces
acétate de cobalt	10 mg
alcool polyvinilique	10 g
tampon Triss (pH 8,5 — $1 \cdot 10^{-5}$ M)	100 cc

C'est un liquide clair légèrement verdâtre, très visqueux grâce à l'alcool polyvinilique, il évite la diffusion de l'enzyme et limite le déplacement des produits de réaction, problème délicat de notre détection. Il est sensibilisé

par une faible quantité de cobalt, qui avec le plomb donne des images plus noires. Assez stable il peut se conserver plusieurs jours au frais et subir des durées d'incubation assez longues.



Fig. 2.

Méthode de détection de la Cystéine désulfhydrase du sac vitellin de Poulet — fixation de l'acétone — coupe à la paraffine — au niveau d'une villosité

Une première technique, destinée à réaliser simultanément des localisations macroscopiques et microscopiques, utilise surtout des pièces fixées (alcool ou acétone) qu'on incube après préparation avant l'inclusion à la paraffine. Une amélioration des résultats limitant la diffusion des produits de réaction dans la masse du tissu a été obtenue par l'imprégnation préalable et à froid des tissus fixés par de l'acétate de plomb — 50 mg pour 100 cc — en solution hydroacétonique au demi. Après élimination de l'acétone par lavage avec du tampon Tris froid, on laisse revenir à la température ordinaire dans le réactif, puis on incube à 38°. La réaction est terminée en 4 à 6 heures ou plus selon l'importance de la pièce. Après lavage, et déshydratation, on inclut à la paraffine, en même temps que le témoin inactivé par l'acide trichloracétique à 2% ou de l'hydroxylamine à 10 mg pour 100 cc.

Une deuxième technique utilise la détection soit sur coupe de pièces fixées et incluses à la paraffine, soit des coupes de tissus frais (cryostat). Les coupes à l'état frais ont l'avantage de donner après une courte incubation 15 minutes à 1 heure une réponse directe de l'enzyme proche de l'état vivant, mais comme les images que nous avons obtenues sont moins belles momentanément nous les avons utilisées surtout pour des contrôles. Les localisations étant identiques à celle des coupes classiques à la paraffine, notre étude de localisation de l'enzyme sera effectuée sur ces dernières.

Les résultats de nos observations sur des fragments de sac vitellin d'embryon de Poulet, plus particulièrement dans la région vasculaire médiane du sac avec de nombreuses villosités, montrent que la cystéine désulphydrase est localisée uniquement dans toute la couche des cellules épithéliales endodermiques de la paroi du sac et au niveau des cellules épithéliales des villosités. Elle est absente dans la mince couche mésodermique. Les vaisseaux et leurs éléments sont négatifs, il en est de même des axes des villosités et leurs capillaires.

Dans les différentes cellules épithéliales de la paroi du sac vitellin et des villosités, tantôt cubiques ou côniques, tantôt cylindriques ou pyriformes, on observe une localisation cytoplasmique positive assez dense, malgré la turgescence et la vacuolisation de beaucoup d'entre elles. L'enzyme se retrouve surtout, et le plus souvent, dans la région apicale plus ou moins bombée des cellules, parfois sur les parois latérales, ou bien dans la région basale. Cette localisation différente dépend de la turgescence cellulaire, de la situation des grosses vacuoles, qui se forment par fusion des petites. Le cytoplasme interstitiel est parfois encore représenté par un mince réseau ténu de grains de sulfure de plomb. A l'intérieur du cytoplasme des cellules épithéliales de la paroi, le support de l'activité enzymatique apparaît sous 3 aspects :

1° Sous la forme de petites granulations formées de grains diffus et nombreux répartis dans le cytoplasme et souvent tassés dans la région apicale de la cellule;

2° des formations plus grossières assez noires et nettement individualisées, moins nombreuses, réparties en différents points de la cellule;

et enfin, 3° çà et là, des inclusions plus ou moins volumineuses, légèrement noirâtres, comme recouvertes par un léger voile de grains de sulfure. Ces formations se retrouvent également dans les cellules épithéliales des villosités et où les grosses cellules turgescents prédominent. Ces localisations histochimiques du support de l'activité enzymatique paraissent correspondre avec les trois sortes de granulations observées sur les coupes colorées à l'hémalum-éosine et à l'azan de Heidenhain. Les premières doivent correspondre aux granulations bleutées colorées par le bleu d'aniline,

les deuxièmes aux granules colorées par l'orange G, et les troisièmes sont des formations colorées en rouge par l'azan et semblent correspondre aux débris de grains de vitellus. Nous n'avons pas pu vérifier cette correspondance, car le sulfure disparaît lors des colorations, mais ces granulations paraissent être identifiables par leurs aspects, dimensions et situations cellulaires. Des colorations avec le noir Soudan et le réactif de Schiff sur tissus frais ont montré que les lipides dans les cellules épithéliales du sac vitellin ont une répartition cytoplasmique assez au voisinage de l'enzyme, mais de façon plus ou moins diffuse, ils sont abondants au niveau des grosses vacuoles.

En résumé, la détection histochimique de la cystéine désulfhydrase du sac vitellin de l'embryon de Poulet, avec les diverses techniques, permet d'obtenir des localisations cellulaires. Les images des techniques fines confirmées par l'examen des tissus frais montrent que l'enzyme se retrouve dans le cytoplasme (et non sur la membrane) au niveau de 3 types d'enclaves correspondant à celles des colorations histologiques. La diversité des images de localisations de l'enzyme dans les cellules du sac vitellin et des villosités montre qu'elles peuvent refléter les différents stades de l'activité cellulaire, l'excrétion progressive de l'enzyme vers le vitellus, et aussi suggérer dans une certaine mesure des phénomènes diastatiques, liés avec leur capacité de phagocytose.

BIBLIOGRAPHIE

1. CHAPEVILLE F. et FROMAGEOT P. — Formation de sulfite, d'acide cystéique et de taurine à partir de sulfate par l'œuf embryonné. *Biochem. Biophys. Acta*, 1957, 26 : 538-558.
2. FROMAGEOT Cl. — Désulfhydrases, in « The Enzymes ». *Summer et Myrback Edit.*, 1 : 2e partie. *Acad. Press*, N. Y., 1951, p. 1237.
3. CHAPEVILLE F. et FROMAGEOT P. — Mécanisme de la formation enzymatique de l'acide cystéique à partir de cystéine et de sulfite en présence de préparations de sac vitellin et de vitellus d'œufs embryonnés d'Oiseaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1958, 40 : 1965-1972.

FIN