



HAL
open science

Oxydation du sulfure d'hydrogène par les cellules épithéliales coliques : Une voie métabolique de détoxication et de production d'énergie

Sabria Mimoun

► **To cite this version:**

Sabria Mimoun. Oxydation du sulfure d'hydrogène par les cellules épithéliales coliques : Une voie métabolique de détoxication et de production d'énergie. Autre. AgroParisTech, 2011. Français. NNT : 2011AGPT0077 . pastel-00777920

HAL Id: pastel-00777920

<https://pastel.hal.science/pastel-00777920>

Submitted on 18 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Doctorat ParisTech

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur

de

L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement
(AgroParisTech)

Spécialité : Physiologie de la nutrition

Présentée et soutenue publiquement par

Sabria Mimoun

Le 2 décembre 2011

Oxydation du sulfure d'hydrogène par les cellules épithéliales coliques : Une voie métabolique de détoxification et de production d'énergie

Directeur de thèse : François BLACHIER

Co-encadrant de thèse : Mireille ANDRIAMIHAJA

Composition du Jury

Professeur Daniel TOME, UMR 914 PNCA INRA/AGROPARISTECH

Docteur Jean-Pierre SEGAIN, CR, INRA/Nantes

Docteur Christophe Moinard, MC, Faculté de Pharmacie, Paris

Docteur Anne Jarry, CR INSERM, Nantes

Docteur Alain Couvineau, DR INSERM, Paris

Docteur François Blachier, DR INRA, UMR914 INRA/PNCA

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

« Il existe des conceptions vulgaires tout à fait suffisantes pour la vie pratique ; elles doivent même être la nourriture des hommes. Elles ne suffisent cependant pas à l'intelligence »

Averroès

Remerciements

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien, l'intérêt, la confiance et la gentillesse de tous les membres, passés et présents, de l'Unité UMR 914.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Daniel Tomé, qui me fait l'honneur de présider ce jury de thèse, et à qui j'exprime toute ma reconnaissance pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. J'adresse également à Monsieur Gilles Fromentin ma respectueuse considération.

Ma profonde gratitude est destinée à mes encadrants, Monsieur François Blachier et Madame Mireille Andriamihaja. Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et encadrée pendant ces années de recherche. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée en me confiant ce projet de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre compréhension pendant les moments difficiles. Je tiens à vous témoigner mon profond respect pour m'avoir transmis vos connaissances et enseigné les subtilités de la recherche, pour votre ouverture d'esprit qui m'a permis d'appréhender avec liberté ce travail de thèse. Les quelques années passées avec vous auront une influence certaine sur ma future carrière.

A Monsieur Jean-Pierre Segain et Monsieur Christophe Moinard qui ont accepté d'être les rapporteurs de ce travail. Eu égard à leur renommée scientifique, leur participation à ce jury constitue pour moi un honneur. Qu'ils en soient remerciés.

J'adresse mes vifs remerciements à Madame Anne Jarry et à Monsieur Alain Couvineau pour avoir accepté d'être les examinateurs de mon travail et pour avoir supervisé mon travail dans le cadre du comité de thèse.

Je remercie le professeur Benamouzig de m'avoir si généreusement reçue dans son service. Je remercie également tout le personnel et tous les médecins de l'hôpital Avicenne de leur gentillesse et de leur coopération. Un grand merci pour le docteur Calina Atanasiu dont les qualités humaines, la motivation et l'enthousiasme pour la recherche nous ont été d'une aide considérable. Merci à tous les malades du service de gastroentérologie.

J'adresse mes remerciements chaleureux à Monsieur Frédéric Bouillaud, le phare de la bioénergétique pour ses conseils avisés et pour m'avoir associée à son travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A toutes les personnes du laboratoire qui ont participé à ma formation pratique et à l'élaboration de mon savoir-faire technique, Catherine Chaumontet, Anne Blais, Véronique Mathé, Annaïg Lan, Jean-Marc Blouin, Michel Dubarry et Romy Fischer. Je vous suis très reconnaissante.

Il me tient à coeur de dédier ce travail à la mémoire de Marc Gubern.

Je remercie également les stagiaires Slim Bejaoui, Louis Hardy et Anne Sophie Gross qui ont participé à la réussite de ce travail. Un grand merci à tous les thésards qui, par leur sympathie et leur bonne humeur, ont égayé ces années de thèse.

A toutes les personnes qui me sont chères. A Mimi, tu as été d'une aide précieuse. Grâce à toi j'ai pu enfin me réconcilier avec la mitochondrie. Tous les bons moments de vie que j'ai partagés avec toi et avec toute ta famille me marqueront à jamais. Les longues journées passées au laboratoire, dans la pièce de culture ou devant l'oxygraphe, les moments de légèreté passés chez la tati à déguster tes samos et tes petits gâteaux resteront gravés à jamais dans ma mémoire. Encore merci. Merci à Najoua et au petit Ziad. Merci à Ali, Sofiane, tata Soumia, Kamila, Adila, Imène narjiss, Sanae et Lilia merci pour vos encouragements.

A Oran, la ville que j'aime... Les bruits de la ville, la chaleur de ses habitants, les parfums de la Méditerranée, sont autant de souvenirs qui me réchauffaient le coeur pendant les moments difficiles.

Finalement, un immense merci à toute ma famille, ma grand-mère, mes oncles, mes tantes. Je remercie mes parents, mes sœurs Zahira, Amel, Amina, Sarsourti, mon frère Yacine et la petite Seryne. Les dernières années n'ont pas toujours été faciles, et certains moments ont été très durs. Bien que vous soyez loin, vous avez toujours été là pour me soutenir. Vous êtes un véritable rayon de soleil dans ma vie. Je vous aime.

RESUME

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est un métabolite bactérien produit notamment par les bactéries sulfato-réductrices du côlon à partir des acides aminés soufrés, des sulfates/sulfites alimentaires et des sulfomucines. A fortes concentrations, le H₂S est un gaz toxique, de par sa capacité à inhiber la cytochrome c oxydase, et par conséquent, la respiration mitochondriale. A l'inverse, notre travail montre qu'à faibles concentrations, le H₂S induit une énergisation mitochondriale des cellules épithéliales coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} lui conférant aussi un rôle de substrat minéral énergétique. Dans ce travail, nous avons déterminé les concentrations de H₂S permettant l'oxydation/détoxication de H₂S par les cellules HT-29 Glc^{-/+} et celles provoquant une inhibition de la consommation d'oxygène. L'oxydation de H₂S nécessite la coopération entre la « *sulfide oxidation unit* » et la chaîne respiratoire. La capacité des cellules HT-29 Glc^{-/+} à oxyder le H₂S est associée à la présence des transcrits codant les enzymes constituant la « *sulfide oxidation unit* » : la *Sulfide Quinone Reductase* (SQR), la sulfure dioxygénase ou *Ethylmalonic encephalopathy 1* (ETHE1) et la *thiosulfate sulfur transferase* (TST). Nous avons démontré la priorité de l'oxydation de H₂S sur les substrats carbonés. En effet, nos résultats suggèrent que les électrons venant de la SQR sont transférés au pool d'ubiquinone aux dépens de ceux venant du complexe I. Nos résultats démontrent que la SQR joue un rôle déterminant pour l'oxydation de H₂S. De plus, la détoxication de H₂S par les cellules HT-29 Glc^{-/+} augmente au cours de la différenciation spontanée ou induite par un traitement au butyrate. L'augmentation de la détoxication de H₂S au cours de la différenciation est associée à une augmentation de la réserve respiratoire soulignant l'importance de la chaîne respiratoire comme composante de la fonction de détoxication de H₂S. En situation d'inhibition de la cytochrome c oxydase, la grande capacité des cellules coliques humaines à détoxifier le H₂S pourrait être en partie due à la présence d'un transfert réverse des électrons issus de l'oxydation de H₂S de la SQR vers le complexe I. Outre le butyrate, le zinc un autre composé de la lumière colique, exerce un effet protecteur contre la toxicité cellulaire de H₂S. Enfin, notre travail a mis en évidence une diminution de l'expression d'un gène codant pour une enzyme de la « *sulfide oxidation unit* » (la TST) dans le rectum comparée à différents segments du côlon, ce qui pourrait correspondre à des capacités de détoxication de H₂S différente en fonctions des segments du gros intestin humain.

Mots clés : H₂S, oxydation, cellules HT-29 Glc^{-/+}, « *sulfide oxidation unit* », mitochondrie

ABSTRACT

Hydrogen sulfide (H₂S) is a metabolite produced notably by colonic sulphate-reducing bacteria from alimentary sulfur-containing amino acids, sulfates / sulfites and sulfomucines. At high concentrations, H₂S is a toxic gas due to its ability to inhibit cytochrome c oxidase, and therefore mitochondrial respiration. In contrast, our study shows that at low concentrations, H₂S induces mitochondrial energization in human colonic epithelial cells HT-29 Glc^{-/+} assigning it a role as the first inorganic oxidative substrate in human cells. In this work, we have determined sulfide concentrations allowing sulfide oxidation/detoxification by HT-29 cells and those which inhibit oxygen consumption. The oxidation of H₂S requires cooperation between the "sulfide oxidation unit" and the respiratory chain. The capacity of HT-29 Glc^{-/+} to oxidize H₂S is associated with the presence of transcripts encoding the enzymes constituting the "sulfide oxidation unit": the sulfide quinone reductase (SQR), the sulfur dioxygenase or Ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1) and the thiosulfate sulfur transferase (TST). We demonstrate that the oxidation of H₂S takes precedence over the oxidation of carbon substrates. Indeed, our results suggest that electrons from SQR are transferred to the ubiquinone pool at the expense of those originating from the complex I. Our results point out that SQR represents a determinant factor in the oxidation of H₂S. In addition, the detoxification of H₂S by HT-29 Glc^{-/+} cells increases during spontaneous differentiation and differentiation induced by treatment with butyrate. The increase in the detoxification of H₂S during the differentiation is associated with an increase of the respiratory reserve pointing out the importance of the respiratory chain as a component of the detoxification function of H₂S. In situations of inhibition of cytochrome c oxidase, the capacity of human colon cells to detoxify H₂S could be due in part to the presence of a reverse transfer of electrons from the oxidation of H₂S to the SQR complex I. In addition to butyrate, zinc, another compound of the colonic lumen has a protective effect against cell toxicity associated with H₂S. Lastly, we have shown a decreased expression of the gene encoding an enzyme of the « sulfide oxidation unit » (TST) in the rectum compared to the other segments of human colon. This observation may correspond to different detoxification capacities towards H₂S according to the different parts of the human large intestine.

Keywords: H₂S, oxidation, HT-29 Glc^{-/+} cells, « sulfide oxidation unit », mitochondria

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES ABREVIATIONS.....	13
PREAMBULE.....	15
Introduction bibliographique.....	18
I.Sulfure d'hydrogène : molécule toxique et médiateur biologique	19
1.Généralités.....	19
1.1. H ₂ S dans l'environnement.....	19
1.1.1. Origine de H ₂ S.....	19
1.2. Propriétés physiques et chimiques de H ₂ S.....	20
1.2.1. Transport de H ₂ S	20
2.H ₂ S molécule toxique.....	20
2.1 Toxicité de H ₂ S.....	20
2.1.1. Exposition au H ₂ S.....	20
2.1.2. Toxicocinétique.....	21
2.1.3. Données toxicologiques	21
2.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires	22
2.2.1 Cytotoxicité de H ₂ S.....	22
2.2.2 Génotoxicité de H ₂ S.....	25
3.H ₂ S médiateur biologique.....	25
3.1. Production endogène de H ₂ S	26
3.1.1. Production de H ₂ S dans les différents tissus	27
3.1.2. Evaluation de la production de H ₂ S dans les tissus	27
3.1.3. Régulation de la production de H ₂ S par les « gazotransmetteurs »	28
3.2. Effets physiologiques de H ₂ S.....	28
3.2.1. Réponses liées au H ₂ S dans les différents tissus.....	29
3.2.2. Mécanismes moléculaires impliqués.....	30
3.2.3. Autres effets de H ₂ S.....	34
II.Le sulfure d'hydrogène dans le côlon	36
1.Le gros intestin.....	36
1.1. Organisation du gros intestin	36
1.1.1. Architecture macroscopique	36
1.1.2. Architecture microscopique	37
1.1.3. De l'aspect microscopique à l'aspect fonctionnel du côlon	38
1.2. Principales fonctions du côlon	38
1.3. Métabolites du côlon.....	39
1.3.1. Acides gras à chaînes courtes.....	39
1.3.2. Transport des acides gras à chaînes courtes.....	40
1.3.3. Butyrate.....	41
1.3.4. Autres AGCC.....	45

II.Le sulfure d'hydrogène dans le côlon	36
1.Le gros intestin.....	36
1.1. Organisation du gros intestin	36
1.1.1. Architecture macroscopique	36
1.1.2. Architecture microscopique	37
1.1.3. De l'aspect microscopique à l'aspect fonctionnel du côlon	38
1.2. Principales fonctions du côlon	38
1.3. Métabolites du côlon	39
1.3.1. Acides gras à chaînes courtes.....	39
1.3.2. Transport des acides gras à chaînes courtes.....	40
1.3.3. Butyrate.....	41
1.3.4. Autres AGCC.....	45
1.4. Méthodes d'exploration et d'étude du côlon	45
1.4.1. Coloscopie.....	45
1.4.2. Biopsies coliques humaines.....	45
1.4.3. Lignées de cellules cancéreuses coliques humaines.....	46
2. Le sulfure d'hydrogène dans le côlon.....	47
2.1. Production de H ₂ S dans le côlon.....	47
2.1.1. H ₂ S dans la lumière colique.....	47
2.1.2. Production endogène de H ₂ S.....	50
3. Effets de H ₂ S dans le côlon.....	52
3.1. Effets de H ₂ S sur les mitochondries	52
3.1.1. Mitochondrie.....	52
3.1.2. Effets de H ₂ S	56
3.2. Effets sur les cellules épithéliales coliques.....	58
3.2.1. Effets sur le métabolisme oxydatif	58
3.2.2. Effets sur la prolifération.....	59
3.3. Effets au niveau du côlon	60
3.3.1. Effets sur la physiologie.....	60
3.3.2. Implication dans les maladies du côlon	60
4.Détoxication de H ₂ S dans le côlon.....	62
4.1. Méthylation de H ₂ S	62
4.2. Oxydation en thiosulfate	63
 III.Oxydation/détoxication mitochondriale de H ₂ S dans les cellules épithéliales coliques.....	 65
1.Oxydation/détoxication de H ₂ S dans les mitochondries	65
1.1. Implication de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	66
1.2. Implication des enzymes de la « Sulfide oxidation unit »	66
2.Mécanismes d'adaptation mitochondriale au H ₂ S	68
2.1. Adaptation des cellules coliques humaines au H ₂ S	69
3.Modulation de la détoxication de H ₂ S dans les cellules épithéliales coliques	70
3.1. Modulation par le butyrate.....	70
3.2. Modulation par des facteurs de transcription.....	71
 Travaux réalisés.....	 73

Justification des travaux expérimentaux.....	74
Eléments de choix méthodologiques.....	76
1. Choix des concentrations de NaHS utilisées et du mode d'exposition.....	76
2. Choix des modèles cellulaires utilisés.....	76
3. Evaluation de la capacité des cellules à oxyder le H ₂ S.....	77
Article 1.....	78
1. Contexte et objectifs.....	78
2. Matériels et méthodes.....	79
3. Résultats et discussion.....	80
Article 2.....	94
1. Contexte et objectifs.....	94
2. Matériels et méthodes.....	95
3. Résultats et discussion.....	95
Résultats supplémentaires.....	126
1. Effet d'un prétraitement des cellules HT-29 Glc ^{-/+} au NaHS.....	126
Discussion générale et perspectives.....	127
Conclusion.....	140
Annexes.....	142
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS.....	156
Références bibliographiques.....	157

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** Réactions de dissociation de H₂S
- Figure 2 :** Transport de H₂S à travers les membranes lipidiques
- Figure 3 :** Effets toxiques de H₂S dans les cellules
- Figure 4 :** Cytotoxicité de H₂S dans les cellules CHO
- Figure 5 :** Déplétion des niveaux de glutathion réduit (GSH) dans des hépatocytes traités au NaHS
- Figure 6 :** Mise en évidence de l'effet génotoxique de H₂S par SCGE (ou test des comètes) dans les cellules FHs 74 Int
- Figure 7 :** Voies enzymatiques de production de H₂S
- Figure 8 :** Molécules cibles de H₂S
- Figure 9 :** Modifications chimiques des protéines par effet de H₂S
- Figure 10 :** Les différentes régions du gros intestin
- Figure 11 :** Muqueuse et sous-muqueuse coliques
- Figure 12 :** Présentation schématique du développement des cellules épithéliales du côlon
- Figure 13 :** Absorption des acides gras à chaînes courtes
- Figure 14 :** Voies d'utilisation du butyrate dans les colonocytes
- Figure 15 :** Effet et métabolisme du butyrate sur les cellules épithéliales coliques humaines HT-29 Glc^{-/+}
- Figure 16 :** Influence du jeûne et de la complémentation en carraghénanes ou en acétate de zinc sur la production de H₂S dans le caecum de rat
- Figure 17 :** Production de H₂S et expression des enzymes CBS et CSE dans les cellules WiDr dans le côlon de souris
- Figure 18 :** Production de H₂S dans le côlon de souris et effets des inhibiteurs de la CSE et de la CBS
- Figure 19 :** La chaîne respiratoire mitochondriale et la phosphorylation oxydative
- Figure 20 :** Phénomène de fuite de protons « proton leak »
- Figure 21 :** Structure du centre catalytique de la cytochrome c oxydase et sa réactivité avec le H₂S
- Figure 22 :** Inhibition de l'activité de la Cytochrome c oxydase par le NaHS
- Figure 23 :** Effet de NaHS sur les capacités oxydatives des cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+}

- Figure 24 :** Mise en évidence de l'effet hyperproliférant de H₂S et sur les cellules coliques humaines
- Figure 25 :** Effet de NaHS sur la prolifération des cellules coliques humaines
- Figure 26 :** Métabolisme de H₂S
- Figure 27 :** Métabolisation des gaz soufrés (H₂S, MES, DMS) par la muqueuse colique et par le foie de rat
- Figure 28 :** Oxydation mitochondriale de H₂S
- Figure 29 :** Transport d'électrons durant l'oxydation mitochondriale de H₂S chez le ver *Arenicola marina*
- Figure 30 :** Effets de la toxicité liée au H₂S sur les intermédiaires du cycle de Krebs
- Figure 31 :** Effets de H₂S sur l'expression de la protéine UCP2 et des sous unités de la cytochrome c oxydase dans les cellules coliques humaines
- Figure 32 :** Effets du butyrate sur l'activité et l'expression de la TST dans les cellules coliques humaines HT-29 parentales
- Figure 33 :** Effet de l'acide désoxyascorbique (DHA) sur l'inhibition de la respiration mitochondriale induite par le H₂S
- Figure 34 :** Effet d'un prétraitement des cellules HT-29 Glc^{-/+} au NaHS
- Figure 35:** Schéma récapitulatif de l'oxydation mitochondriale de H₂S (A) et des mécanismes d'adaptation mis en place dans les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} en présence de fortes concentrations de H₂S (B)
- Figure 36 :** Schéma récapitulatif des étapes de production des anticorps polyclonaux et monoclonaux anti peptide SQR

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Réponses physiologiques à l'exposition au H₂S chez l'Homme

Tableau 2 : Propriétés des trois « gazotransmetteurs » NO, CO et H₂S

Tableau 3 : Concentrations des acides gras à courte chaîne (acétate, propionate, butyrate) dans le contenu intestinal chez l'Homme

Tableau 4 : Concentrations fécales et luminales de H₂S chez des sujets volontaires et chez des animaux de laboratoire

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADP :	Adénosine-5'- diphosphate
ATP :	Adénosine-5'- triphosphate
ATPase :	F ₀ -F ₁ ATP synthase
CBS :	Cystathionine β-synthase
CHH :	O-(carboxymethyl) hydroxylamine hemihydrochloride
CSE :	Cystathionine γ-lyase
CO :	Monoxyde de carbone
COX-2 :	Cyclooxygénase-2
DMS :	Diméthylsulfure
DL-PAG :	DL-propargylglycine
DNP :	2,4-dinitrophénol
ETHE1 :	Ethylmalonic encephalopathy 1 (la sulfure dioxygénase)
FADH ₂ /FAD ⁺ :	Flavine adénine dinucléotide réduite/oxydée
FCCP :	p-trifluorométhoxycarbonylcyanide phénylhydrazone
GSH :	Glutathion réduit
H ₂ S :	Sulfure d'hydrogène
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HAT :	Histone acétyltransférase
HDAC :	Histone déacétylase
HMG-CoA synthase :	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA synthase
LPS :	Lipopolysaccharide
MAPK :	Mitogen activated protein kinase
MES :	Méthanethiol
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
MST ou MPST :	Mercaptopyruvate sulphur transferase
NAD :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NF-κB :	Nuclear factor κB
NO :	Monoxyde d'azote
Nrf-2 :	NF-E2-related factor 2

P-5- <i>P</i> :	Pyridoxal 5'-Phosphate
PI3K :	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC :	Protéine kinase C
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)
RSS :	Espèces réactives de soufre (Reactive sulfide species)
SAM :	S-adenosyl-méthionine
SOD :	Superoxyde dismutase
SQR :	Sulfide quinone oxydoreductase
STAT3 :	Signal transducer and activator of transcription 3
TNF α :	Tumor Necrosis Factor α
TRAIL :	Tumor Related Apoptosis-Inducing Ligand
TRPV :	Transient receptor potential
TST :	Thiosulfate sulfur transferase
Ub :	Ubiquinone
UCP :	Protéine découplante (UnCoupling Protein)

PREAMBULE

Les niveaux de consommation des protéines alimentaires varient selon les pays et en fonction des zones géographiques. Ils dépendent des habitudes alimentaires et culturelles ainsi que de l'accès (quantitatif et qualitatif) à la nourriture (Claudian, 1992). Dans les pays occidentaux, l'apport en protéines alimentaires varie entre 80 et 100g de protéines par jour, ce qui dépasse largement les valeurs d'apport journalier recommandées (0,83g de protéines/jour/kg de poids de corps) (Rand et al., 2003). Une des conséquences de la forte consommation de protéines est l'augmentation de la quantité de protéines alimentaires et endogènes qui franchissent la jonction iléo-caecale, ce qui entraîne une augmentation de la production de métabolites bactériens dérivant des acides aminés libérés des protéines par action des protéases et des peptidases luminales (endogènes et bactériennes). Parmi les métabolites bactériens, nombreux sont connus pour exercer des effets sur les cellules épithéliales coliques. Ces effets, bénéfiques ou délétères dépendent de nombreux facteurs incluant i. les concentrations luminales des métabolites, ii. la proportion de formes libres et liées, iii. la capacité des colonocytes à les métaboliser et iv. la capacité des métabolites à interférer avec les composés intracellulaires notamment en termes de cytotoxicité, génotoxicité, cycle cellulaire et métabolisme énergétique (Blachier et al., 2007). De ce point de vue, l'étude des effets du sulfure d'hydrogène (H₂S), composé produit par le microbiote et possédant des propriétés potentiellement toxiques s'inscrit dans un domaine de recherche en nutrition visant à évaluer les effets du niveau d'apport protéique sur la physiologie et la physiopathologie digestives par l'évaluation des effets de ces métabolites bactériens. C'est dans cette problématique de recherche que s'inscrit mon travail de thèse.

L'équipe de recherche au sein de laquelle j'ai réalisé mes travaux de doctorat s'est spécialisée au cours de ces dernières années dans l'étude des effets des métabolites bactériens et notamment des effets de H₂S sur les cellules épithéliales coliques. En effet, l'épithélium colique, couche monocellulaire à l'interface entre le milieu extérieur que représente la lumière colique et le milieu intérieur, constitue la porte d'entrée du H₂S bactérien dans l'organisme et joue un rôle prépondérant dans la détermination de son effet physiopathologique dans le côlon et peut être au niveau périphérique. Le H₂S est un composé luminal produit par les bactéries sulfato-réductrices du côlon principalement à partir des acides aminés soufrés donc des sulfates en provenance des protéines endogènes ou des protéines alimentaires non digérées (Gibson et al., 1988; Roediger et al., 1997). Le H₂S est

plutôt considéré comme un métabolite bactérien délétère car il est capable d'inhiber la cytochrome c oxydase mitochondriale donc la respiration cellulaire. De plus, des résultats obtenus par plusieurs auteurs ont incriminé le H₂S en concentrations excessives dans le risque de développement ou de récurrence des rectocolites hémorragiques (RCH) (Gibson et al., 1990; Jowett et al., 2004; Kitano et al., 1986; Watt and Marcus, 1970). Par ailleurs, notre équipe a montré récemment que le H₂S en fonction de sa concentration, exerçait un effet toxique mais servait également de substrat oxydatif aux cellules épithéliales coliques humaines (Goubern et al., 2007). Ces deux aspects du H₂S ont été bien élucidés chez les organismes moins évolués adaptés aux environnements riches en soufre (Volkel and Grieshaber, 1996). Par ailleurs, des études de la littérature ont rapporté des mécanismes de détoxication de H₂S similaires à ceux décrits chez le ver marin *Arenicola marina* dans les cellules de mammifère (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b). Ces mécanismes impliquent une voie reliant l'oxydation de H₂S par des enzymes de détoxication à la bioénergétique mitochondriale.

Mon travail de thèse traite une thématique de recherche à l'interface entre la nutrition, la bioénergétique mitochondriale et la physiologie épithéliale du côlon. Il a pour objectif de progresser dans la compréhension des mécanismes mis en place dans les cellules de mammifères et dans les cellules coliques humaines tout particulièrement pour faire face à la toxicité du H₂S en excès mais également lors de son utilisation en tant que substrat oxydatif à des concentrations moindres. Mon travail de thèse visait également à déterminer les concentrations « seuil » de H₂S lui permettant de passer d'un substrat oxydatif à un toxique métabolique dans les cellules. Ma thèse avait également pour objectif d'explorer à la lumière de ce qui a été rapporté chez d'autres organismes dans la littérature, les deux composantes de la voie de détoxication du H₂S et qui concernent les enzymes de l'oxydation du H₂S et la chaîne respiratoire mitochondriale dans les cellules coliques humaines. Un dernier objectif de ma thèse concernait l'étude d'une éventuelle modulation de la fonction de détoxication de H₂S dans les cellules épithéliales coliques humaines par des composés de la lumière colique.

Ma thèse comporte quatre grandes parties :

La première partie constituée de rappels bibliographiques a été élaborée en trois chapitres. Le premier chapitre montre que le H₂S, indépendamment de son effet de perturbateur métabolique éventuel constitue une molécule pouvant intervenir dans divers rôles physiologiques à plus faibles concentrations. Le second chapitre aborde les différents aspects des effets du H₂S dans un environnement plus complexe que constitue le contenu

luminal du côlon. La production, la régulation ainsi que les effets du H₂S sur le fonctionnement mitochondrial, la physiologie des cellules épithéliales coliques et, à une échelle plus large, sur la physiologie et la physiopathologie du côlon ont été également détaillés dans ce chapitre. Je me suis intéressée dans le troisième chapitre à l'état des connaissances concernant l'oxydation/détoxication de H₂S dans les cellules de mammifères.

La deuxième partie concerne l'étude expérimentale proprement dite. Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de l'oxydation de H₂S dans différentes lignées de cellules de mammifères et dans des mitochondries isolées à partir de différents tissus. Nous avons également vérifié la fonction associée à l'activité de la SQR humaine dans les cellules CHO initialement connues comme n'oxydant pas le H₂S. Les résultats de cette première étude ont fait l'objet d'un premier article. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'oxydation de H₂S dans les cellules coliques humaines. La régulation de la fonction de détoxication de H₂S en fonction de l'état de différenciation mais également suite à l'induction de la différenciation par le butyrate a été étudiée. Nous avons de plus examiné le rôle de cations chélatant le H₂S sur l'effet toxique de ce métabolite. Cette étude a été abordée *in vitro* à l'aide de la lignée cellulaire HT-29 Glc^{-/+} qui est issue d'un adénocarcinome colique humain. Finalement, notre partie expérimentale a été consacrée dans un troisième temps à la mesure de l'expression des gènes codant les enzymes de détoxication de H₂S dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} en fonction de leur degré de différenciation et dans différents segments du côlon humain. Dans ce dernier cas, les mesures d'expression génique ont été réalisées sur des biopsies prélevées chez des sujets sains. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un deuxième article.

La troisième partie de cette thèse est consacrée à la discussion générale et aux perspectives suivies d'une conclusion. Enfin un article de revue dont je suis co-auteur est présenté en annexe dans la quatrième et la dernière partie de ce travail.

Introduction bibliographique

I. Sulfure d'hydrogène : molécule toxique et médiateur biologique

1. Généralités

1.1. H₂S dans l'environnement

Le sulfure d'hydrogène (appelé également hydrogène sulfuré) H₂S est un gaz incolore à l'odeur fétide caractéristique "d'oeuf pourri". Il est abondant dans les sources et les lacs sulfureux, dans les zones de l'estran, les vasières et les mangroves. C'est un contaminant naturel dans le charbon, les gaz naturels, le pétrole et les gaz volcaniques et semble jouer un rôle dans le cycle biogéochimique du soufre.

1.1.1. Origine de H₂S

Le volcanisme constitue une source chimique naturelle de H₂S. Les phénomènes liés au volcanisme contribuent à l'enrichissement des eaux de source à la surface de la terre en H₂S et soufre. Ils contribuent également à l'abondance de H₂S dans les eaux profondes des sources hydrothermales au niveau des dorsales océaniques, où le H₂S représente, en absence de lumières solaires, l'unique ou la principale source d'énergie pour les bactéries présentes (Gaill, 1993).

Le H₂S peut également avoir une origine biogénique essentiellement dans les environnements limnétiques et dans les sédiments vaseux et marins. Dans les sédiments vaseux, le H₂S est produit à quelques millimètres en profondeur sous la surface où l'environnement est hypoxique voire anoxique. Ce sont les bactéries sulfato-réductrices anaérobies hétérotrophes qui produisent le H₂S au cours de la dégradation des dépôts naturels de matières organiques. Ainsi elles peuvent décomposer les algues, les fongicides, les pesticides et les fertilisants contenant du soufre et libérer du H₂S (Grieshaber and Volkel, 1998).

Dans l'industrie, le H₂S et d'autres formes de composés soufrés solubles, sont présents dans les déchets industriels des raffineries, des usines pétrochimiques et des usines de gaz. Le H₂S est également dégagé dans les processus de fabrication de pigments et de teintures, en tannerie et dans les usines de papier. Les eaux naturelles utilisées dans les bains thérapeutiques à des fins médicales peuvent aussi renfermer des concentrations élevées de H₂S.

1.2. Propriétés physiques et chimiques de H₂S

Le H₂S est un composé soluble dans l'eau et dans les lipides. Sa solubilité dans l'eau est de 80mM à 37°C. Il se dissocie en ion hydrosulfure (HS⁻) et en ion sulfure avec des valeurs de pKa respectives de 7,04 et 11,96 en solutions aqueuses (Figure 1). Au pH physiologique (pH : 7,4), le rapport HS⁻/H₂S est de 3/1 et deux tiers (69%) de H₂S sont alors sous forme d'anion hydrosulfure. La solubilité de H₂S dans les solvants lipophiles est 5 fois supérieure par rapport à sa solubilité dans les solutions aqueuses (Wang, 2002). Le H₂S est doté d'une grande réactivité chimique. Il réagit de façon spontanée mais lente avec l'oxygène et peut être oxydé pour former des produits variés comme le soufre élémentaire (S⁰), les sulfites (SO₃²⁻), les thiosulfates (S₂O₃²⁻) et les sulfates (SO₄²⁻). La demi-vie du H₂S dans une solution aqueuse saturée en oxygène est d'une demi-heure. L'autoxydation de H₂S est dépendante du pH. Elle est catalysée par des ions métalliques tels Ni²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺ et Fe³⁺.

1.2.1. Transport de H₂S

Le sulfure d'hydrogène sous sa forme hydrogénée non dissociée H₂S, passe au travers des membranes biologiques par simple diffusion. Il est important de souligner qu'aucun transport facilité via des transporteurs ou via des canaux ioniques ne semble être impliqué lors du transport membranaire de H₂S. Par ailleurs, l'ionisation du H₂S suggère une diffusion moindre comparée à celles d'autres gaz (le monoxyde d'azote NO ou le monoxyde de carbone CO). La diffusion libre du sulfure d'hydrogène nécessite en effet, un ajout de protons (protonation) qui transforme les formes ionisées prépondérantes du sulfure d'hydrogène (HS⁻) en forme gazeuse diffusible H₂S. Après passage au travers des bicouches lipidiques, les molécules de H₂S peuvent subir une déprotonation et reformer par la suite des ions hydrosulfures (figure 2). Ainsi le transport de H₂S dépend fortement du pH des compartiments de part et d'autre des membranes biologiques (Mathai et al., 2009).

2. H₂S molécule toxique

2.1 Toxicité de H₂S

2.1.1. Exposition au H₂S

L'exposition au H₂S est dans la plupart des cas, une exposition professionnelle dans les industries (industrie de vulcanisation, industrie pétrolière) et dans les milieux agricoles. Les ouvriers travaillant dans les usines de traitement des eaux, dans les égouts ou dans les laboratoires chimiques peuvent être également exposés au H₂S dans leur milieu de travail.

Par ailleurs, une exposition peut survenir dans des conditions de pollution de l'air en milieu urbain (ATSDR, 1999).

2.1.2. Toxicocinétique

Le H₂S est rapidement absorbé par l'organisme. L'absorption de H₂S se fait presque exclusivement par inhalation. Néanmoins, une absorption de H₂S via la peau peut également se faire grâce aux propriétés lipophiles de H₂S. Aucune étude toxicologique n'a cependant, déterminé les valeurs quantitatives d'absorption de H₂S chez l'Homme ou chez l'animal.

Une fois absorbé, le H₂S est distribué dans différents organes. Les études réalisées chez l'animal ont rapporté une distribution du H₂S dans le poumon, le cerveau, le système digestif (foie, pancréas, intestin grêle), le rein mais encore dans l'os et dans la rate. Dans le plasma sanguin, le H₂S absorbé se trouve lié principalement à l'albumine et peut interagir avec l'hémoglobine et former la sulfhémoglobine de couleur verte. La formation de sulfhémoglobine figure parmi les signes cliniques d'intoxications au H₂S. Cependant, la sulfhémoglobine formée principalement *in vitro* n'est observée que dans des cas d'exposition à une concentration trop élevée de H₂S. Par ailleurs, le H₂S peut réagir avec d'autres protéines comme la cytochrome C oxydase ou des métalloprotéines ou encore des protéines contenant des groupements disulfures comme la glutathion oxydase (Beauchamp et al., 1984). Dans certains cas, la réaction de H₂S avec des protéines peut être considérée comme une voie métabolique de stockage de H₂S et de lutte contre sa toxicité (Shibuya et al., 2009b). Elle peut également constituer une voie par laquelle le H₂S exerce son effet toxique au niveau cellulaire. En plus de la réaction avec des protéines, le H₂S peut être métabolisé dans les tissus selon deux voies métaboliques distinctes : l'oxydation en sulfate et la méthylation (Beauchamp et al., 1984). Ces deux voies sont considérées comme des voies de détoxification de H₂S car elles génèrent des produits moins toxiques que le produit initial. Les voies de détoxification de H₂S seront traitées en détail dans le chapitre III.

2.1.3. Données toxicologiques

Chez l'Homme, le H₂S est la deuxième cause de décès liée à une intoxication gazeuse en milieu professionnel après le CO. Les données de toxicité de H₂S disponibles montrent que les mécanismes d'action chez l'Homme sont identiques à ceux observés chez l'animal ; ce qui facilite l'extrapolation des données de l'animal à l'Homme. Les effets de H₂S chez l'Homme sont résumés dans le tableau 1. Les différentes études réalisées dans ce domaine, bien qu'elles ne permettent pas de distinguer les effets des sulfures solubles de ceux du H₂S en matière d'effets toxiques, soulignent néanmoins deux effets critiques non létaux du H₂S

chez l'Homme et chez les animaux : un effet d'irritation locale des voies aériennes supérieures et profondes, et un effet de toxicité systémique. Les principaux organes cibles lors de la toxicité systémique par inhalation de H₂S sont le cerveau et l'appareil respiratoire. Des perturbations neurologiques /psychologiques ont été également rapportées lors de l'inhalation de H₂S (Reiffenstein et al., 1992).

2.2 Mécanismes cellulaires et moléculaires

2.2.1 Cytotoxicité de H₂S

Les données de la littérature montrent que le H₂S, pouvait être à l'origine d'effets toxiques au niveau cellulaire (figure 3) avec des altérations fonctionnelles des cellules (Cooper and Brown, 2008). Un effet de diminution de densité cellulaire dépendant de la dose a été observé suite à une exposition chronique au H₂S. Cet effet pourrait être attribué selon les auteurs, à des perturbations du cycle cellulaire, à un ralentissement de la prolifération ou encore à des effets cytotoxiques induits par le H₂S (Attene-Ramos et al., 2006). De plus, Attene-Ramos et al. (2006), ont rapporté une réduction de 50% de la densité cellulaire des cellules CHO (*chinese hamster ovary*) mises en culture pendant 72 heures en présence de 368,6µmol/l de Na₂S utilisé comme donneur de H₂S (figure 4). D'autres données bibliographiques rapportent un effet de H₂S en tant que perturbateur de l'équilibre entre prolifération et apoptose cellulaire de façon dépendante de la dose, de la durée d'exposition et du modèle cellulaire étudié (Christl et al., 1996; Deplancke and Gaskins, 2003; Ramasamy et al., 2006; Reiffenstein et al., 1992). Cet aspect sera détaillé dans les paragraphes suivants.

Parallèlement sur le plan moléculaire, les effets toxiques de H₂S sont liés à l'inactivation de différentes enzymes par rupture des ponts disulfures ou par liaison aux co-facteurs métalliques comme le Fe²⁺, le Mg²⁺ et le Cu²⁺. Ainsi, la cytochrome c oxydase principalement mais aussi d'autres enzymes clés telles la phosphatase alcaline et l'anhydrase carbonique seraient des protéines cibles de l'effet toxique de H₂S. Ces enzymes peuvent subir une dénaturation irréversible par effet de H₂S.

Inhibition de la cytochrome c oxydase

Le H₂S a la capacité de se lier et d'inhiber la cytochrome c oxydase, l'enzyme terminale de la chaîne de transfert des électrons dans la mitochondrie (voir chapitre II). L'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase constitue le mécanisme primaire de toxicité de H₂S dans les cellules (Dorman et al., 2002; Nicholls, 1975). Elle est également considérée comme un biomarqueur sensible de l'exposition au H₂S et ceci même en absence

de toute augmentation de la concentration de H₂S dans un tissu donné *in vitro* ou *in vivo* (Dorman et al., 2002). L'inhibition de la cytochrome c oxydase entraîne une inhibition du métabolisme aérobie, une déplétion des niveaux d'ATP intracellulaire et une augmentation de la production d'acide lactique dans les cellules (Beauchamp et al., 1984; Leschelle et al., 2005). Les tissus ayant des besoins élevés en oxygène (e.g. cerveau et cœur) sont donc particulièrement sensibles aux effets toxiques de H₂S. Les effets de H₂S sur l'inhibition de la cytochrome c oxydase au niveau cellulaire seront détaillés dans le chapitre II.

Les données de la littérature comparent le mécanisme de toxicité de H₂S à celui du cyanure (qui est également un inhibiteur de la cytochrome c oxydase). La méthémoglobine, une forme d'hémoglobine ne pouvant transporter l'oxygène aux tissus et dans laquelle le fer ferreux (Fe²⁺) a été oxydé en fer ferrique (Fe³⁺), est utilisée dans le traitement des intoxications dues au cyanure. L'utilisation de la méthémoglobine semble inefficace lors des intoxications liées au H₂S bien que le H₂S soit efficacement piégé par le groupement ferrique de l'hème de la méthémoglobine (Reiffenstein et al., 1992). Ceci suggère l'implication d'autres mécanismes moléculaires en plus de l'inhibition de la cytochrome c oxydase, dans la cytotoxicité induite par le H₂S (Thompson et al., 2003).

Production des espèces réactives de l'oxygène et des espèces réactives du soufre

Les études portant sur les mécanismes responsables de la toxicité du H₂S placent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou *reactive oxygen species* (ROS) (O₂[·], OH[·], H₂O₂ etc.) comme acteurs impliqués dans la cytotoxicité de ce composé (Eghbal et al., 2004). L'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase dans la mitochondrie par le H₂S peut générer des ROS. En effet, la réduction incomplète de l'oxygène en eau au niveau de la chaîne respiratoire produit le radical superoxyde (O₂[·]) (Eghbal et al., 2004; Truong et al., 2006) qui peut subir une dismutation spontanée ou être catalysé par la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD) (K_{cat}=10⁶/sec) pour former le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Loschen et al., 1974; Raha and Robinson, 2001). Le peroxyde d'hydrogène peut à son tour, être réduit en H₂O (K_{cat}=10⁷/sec) par la catalase et la glutathion peroxydase ou réduit par le fer ferreux au cours de la réaction de Fenton pour former un radical hydroxyle (OH[·]). Les radicaux hydroxyles sont considérés comme des oxydants puissants et constituent les espèces radicalaires parmi les plus délétères en raison de leur extrême réactivité. Ils interagissent avec les macromolécules biologiques et causent des altérations aux niveaux de l'ADN, des lipides membranaires et des protéines.

Le cytochrome P450 constitue également une importante source endogène des ROS dans les hépatocytes (Siraki et al., 2002). En utilisant le sel sodique du sulfure d'hydrogène (NaHS) comme donneur de H₂S, l'étude d'Eghbal et al. (2004) a rapporté une implication des ROS, produits au cours de l'oxydation de 500µM de NaHS par le cytochrome P450, dans les effets toxiques de H₂S. De façon intéressante, l'utilisation d'inhibiteurs de l'activité du cytochrome P450 (cimetidine et benzylimidazole) dans cette étude a permis de prévenir la cytotoxicité induite par le H₂S (Eghbal et al., 2004). De plus, l'utilisation de molécules pouvant piéger les ROS semble également prévenir la cytotoxicité liée au H₂S.

En plus de l'implication des ROS dans la cytotoxicité induite par le H₂S, l'équipe de Truong a suggéré que les effets toxiques du H₂S étaient également médiés par des espèces réactives du soufre (RSS) qui seraient produites dans les cellules de façon similaire à la production endogène des ROS, au cours de l'activation métabolique de H₂S par le cytochrome P450 (Truong et al., 2006). Les ROS et les RSS entraînent une déplétion des niveaux intracellulaires du glutathion réduit (GSH) dans des hépatocytes de rats isolés et incubés en présence de 300 ou de 500µM de NaHS (Truong et al., 2006) (figure 5). De plus, les auteurs ont observé une atténuation de l'effet du H₂S sur la déplétion des niveaux intracellulaires de GSH, dans les hépatocytes de rats exposés au NaHS en présence de deferoxamine, un chélateur de fer ferrique, ou en présence de chélateurs des ROS ou encore en présence d'enzymes antioxydants (SOD, catalase). Ces résultats ont conduit les auteurs à avancer l'hypothèse selon laquelle la toxicité de H₂S serait attribuée à la réduction de la fraction intracellulaire liée d'ions ferriques et à la formation d'ions ferreux activés. De plus, les travaux de ces mêmes auteurs ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes d'implication du fer dans les effets cytotoxiques du H₂S médiés par les ROS. Il est connu que le H₂S induit un état de stress réducteur dans la cellule qui est dû d'une part à son propre pouvoir réducteur, et d'autre part, à l'augmentation du rapport NADH/NAD⁺ au niveau de la mitochondrie suite à l'inhibition de la cytochrome c oxydase et par conséquent l'inhibition de la chaîne de phosphorylation oxydative (Nicholson et al., 1998). Plusieurs études ont suggéré que dans des situation de stress réducteur, le fer stocké sous forme de Fe³⁺ par liaison à la protéine de stockage ferritine est libéré de son site de stockage dans le cytosol sous forme de Fe²⁺ libre, causant par conséquent une augmentation du fer intracellulaire (Winterbourn et al., 1991). En induisant un stress réducteur, le H₂S augmenterait le fer cytosolique et sa disponibilité pour la réaction de Fenton. Il en résulterait ainsi une production importante de ROS et de RSS.

2.2.2 Génotoxicité de H₂S

Très peu d'études ont été entreprises afin d'examiner le pouvoir mutagène du H₂S (Gocke et al., 1981; Matter et al., 1969). Ces études réalisées sur des cellules procaryotes (*Salmonella typhimurium*) ou eucaryotes telles les cellules de drosophile ou de moelle osseuse de souris, ont abouti à des résultats controversés ; et n'ont pas permis aux auteurs d'établir des conclusions définitives concernant la génotoxicité de H₂S. Récemment, les données d'Attene-Ramos et al. (2006) ont montré qu'à une concentration de 250µmol/l, le H₂S induit un effet génotoxique. Cette concentration relativement faible par rapport aux concentrations induisant une cytotoxicité cellulaire, reste dans la gamme des concentrations du H₂S retrouvées dans l'intestin (chapitre II). A partir de l'analyse de cellules isolées par électrophorèse en gel d'agarose (*modified single cell gel electrophoresis* : SCGE) réalisée en présence d'inhibiteurs de la réparation d'ADN (hydroxyurée et de 1-β-D-arabinofuranosylcytosine), Attene-Ramos et al.(2006, 2010) ont mis en évidence la présence de cassures d'ADN dans des cellules CHO traitées au Na₂S pendant 4 heures, et dans des cellules épithéliales intestinales humaines non transformées FHs74Int traitées pendant 2 heures au Na₂S (figure 6). Les cassures de brins d'ADN étaient détectées à partir de concentrations de Na₂S égales ou supérieures à 250µM (Attene-Ramos et al., 2010; Attene-Ramos et al., 2006). Ces altérations génomiques semblent indépendantes du métabolisme cellulaire, et semblent être médiées par une augmentation de la production de radicaux libres. Des expériences réalisées sur des noyaux isolés en présence d'inhibiteurs de la réparation d'ADN de cellules CHO traités au NaHS 1µmol/l, ont mis en évidence une augmentation du nombre de bases d'ADN oxydées dans ces cellules (Attene-Ramos et al., 2007).

3. H₂S médiateur biologique

Le H₂S a longtemps été considéré comme un composé toxique. La perception exclusivement négative du H₂S a récemment changé ; et ceci depuis la mise en évidence de sa production endogène dans les cellules de mammifères et de son intervention dans plusieurs fonctions physiologiques. L'ensemble des données rapportées dans la littérature atteste du rôle important que joue le H₂S dans l'organisme (Li et al., 2011). Le H₂S est à présent classé parmi les « gazomodulateurs » ou « gazotransmetteurs » au même titre que le monoxyde d'azote (NO) et le monoxyde de carbone (CO) (tableau 2) (Calvert et al., 2010; Pun et al., 2010; Wang, 2002).

Le NO a été le premier « gazotransmetteur » identifié et le plus étudié jusqu'à l'heure. De façon similaire par rapport au NO, le H₂S induit des réponses biologiques variées allant de la cytotoxicité à la cyto-protection des cellules hôtes. L'importance du H₂S pour certains aspects du fonctionnement cellulaire a conduit plusieurs auteurs à traiter des questions fondamentales s'intéressant à la production de ce médiateur dans les cellules, à sa régulation ainsi qu'aux différents rôles biologiques et physiologiques qu'il exerce.

3.1. Production endogène de H₂S

La production biologique de H₂S a été d'abord étudiée chez les bactéries et les algues. Ce n'est qu'en 1989 que sa production endogène chez l'homme et les mammifères a été mise en évidence, en particulier dans les structures cérébrales (Goodwin et al., 1989; Savage and Gould, 1990; Warenycia et al., 1989). La biosynthèse endogène de H₂S dans les tissus de mammifères implique des voies enzymatiques et non enzymatiques. Le H₂S est produit au cours du métabolisme de la L-cystéine (figure 7), par deux enzymes la cystathionine β-synthase (CBS, EC 4.2.1.22) et la cystathionine γ-lyase appelée aussi cystathionase (CSE, EC 4.4.1.1). Ces enzymes dont l'activité catalytique dépend de la présence de pyridoxal 5'-Phosphate (P-5-P) : un métabolite de la vitamine B6, sont principalement localisées dans le cytosol et utilisent, en tant que substrat, la L-cystéine provenant de l'alimentation ou libérée à partir des protéines endogènes pour la synthèse de H₂S (Swaroop et al., 1992). La L-cystéine peut également provenir de la L-méthionine, lors d'une réaction qui fait intervenir des enzymes appartenant à la voie de la trans-sulfuration. La biosynthèse de cystéine implique la condensation de l'homocystéine, produit intermédiaire de déméthylation de la méthionine, par la CBS avec une molécule de sérine pour former la cystathionine. La cystathionine est ensuite converti par la CSE en L-cystéine. Le α-cetobutyrate et l'ammonium sont également libérés au cours de cette réaction. En plus de cette réaction principale, les enzymes CBS et CSE peuvent également catalyser la synthèse de la cystathionine à partir de L-cystéine (à la place de L-sérine) et L-homocystéine. Cette réaction génère du H₂S. La CSE catalyse la réaction de β-élimination et dégrade la L-cystine en pyruvate, ammonium et thiocystéine qui réagit de façon non enzymatique avec la L-cystéine ou autres thiols pour former le H₂S (Kajimura et al., 2010; Szabo, 2007; Tanizawa, 2011). La voie de synthèse du H₂S via les enzymes CBS et CSE constitue la principale voie dans les différents tissus. L'expression de CBS et CSE est spécifique de certains tissus. L'activité de ces deux enzymes semble être contrôlée négativement par le H₂S. L'utilisation d'inhibiteurs de CBS et CSE (de spécificité souvent faible) a permis de déterminer la voie de biosynthèse de H₂S prépondérante dans chaque tissu. La voie de CSE est ainsi

prépondérante dans le système cardiovasculaire, le pancréas et le foie (Yang et al., 2005; Zhao et al., 2001) et la voie de la CBS est plutôt prépondérante dans le cerveau et dans le système nerveux périphérique (Kimura, 2000).

Récemment, une autre voie enzymatique de biosynthèse de H₂S a été décrite par l'équipe de Kimura au niveau du cerveau et de l'endothélium vasculaire de l'aorte thoracique (Shibuya et al., 2009a; Shibuya et al., 2009b). Cette voie, à la fois cytosolique et mitochondriale, implique une transamination, par l'aspartate aminotransférase (AAT), de la L-cystéine en 3-mercaptopyrivate, puis la libération de H₂S, à partir du 3-mercaptopyrivate, par la 3-mercaptopyrivate sulfurtransferase (MPST ou MST) (Kajimura et al., 2010).

La réduction non enzymatique du soufre élémentaire en H₂S participerait également de façon minoritaire à la production de H₂S dans les cellules (Searcy and Lee, 1998).

3.1.1. Production de H₂S dans les différents tissus

La production de H₂S endogène mesurée dans des homogénats de différents tissus de rats varie entre 1 et 10pmoles par seconde par mg de protéines (Doeller et al., 2005). Cependant, chez les mammifères, le H₂S néosynthétisé peut être consommé ou dégradé rapidement par les tissus pour maintenir des concentrations extracellulaires faibles. Le H₂S peut être produit par différents tissus. Cependant, il convient de préciser que les mesures des concentrations circulantes de H₂S par les différents auteurs ont abouti à des valeurs très discordantes (Furne et al., 2008). La discordance des valeurs rapportées pourrait largement être due aux procédures d'extraction du H₂S à partir des tissus mais également aux méthodes chimiques utilisées pour le dosage de H₂S.

3.1.2. Evaluation de la production de H₂S dans les tissus

Initialement, plusieurs méthodes d'analyse ont été développées pour déterminer les sulfures dans l'eau et dans l'environnement. Un procédé classique de dosage est basé sur la libération de H₂S par l'acidification des sulfures puis son absorption dans une solution d'acétate de zinc. D'autres méthodes de dosage existent également. Une méthode faisant appel à la chromatographie en phase gazeuse utilise un détecteur à conductibilité électrolytique permettant de déterminer la présence de différentes espèces de soufre volatiles. Une méthode analytique colorimétrique au bleu de méthylène est également utilisée et semble être relativement satisfaisante.

Cependant, le dosage *in vivo* de H₂S au niveau plasmatique ou tissulaire semble plus difficile. La technique de dosage la plus utilisée pour la mesure de la production tissulaire de H₂S est celle décrite pour la première fois par Stipanuk et Beck (Stipanuk and Beck, 1982).

Cette technique basée sur le principe du piégeage de H₂S par l'acétate de zinc a été utilisée lors de nombreux autres travaux pour mesurer la production de H₂S par différents tissus (foie, rein, tractus gastro-intestinal, cerveau, tissu vasculaire...) (Li et al., 2011). Le point critique de cette méthode de dosage est la nécessité de rajouter du substrat, de la L-cystéine (jusqu'à 10mM), dans le milieu réactionnel afin d'obtenir un niveau détectable de production de H₂S. La raison est qu'une très faible production de H₂S, à la limite de la détection, est détectée en l'absence de cystéine ajoutée. Ainsi, cette technique de dosage est considérée comme une mesure de la capacité d'un tissu à produire du H₂S (Furne et al., 2008).

Bien qu'en l'état actuel des connaissances, les niveaux de production du H₂S endogène par les différents tissus restent encore non déterminés avec précision, des concentrations variant entre des valeurs nanomolaires élevées et des valeurs micromolaires faibles semblent raisonnables (Cooper and Brown, 2008).

3.1.3. Régulation de la production de H₂S par les « gazotransmetteurs »

Le NO et le CO peuvent moduler la production de H₂S dans les cellules. L'inhibition de la NO synthase diminue considérablement l'activité de CSE dans le cortex de cerveau de rat et entraîne une augmentation de l'activité de MST (Sokolowska et al., 1999). Un résultat similaire a été obtenu sur des cellules isolées de muscles lisses de rat; et une augmentation de la production de H₂S par augmentation de l'expression de l'activité de CSE a été observée en présence de donneur de NO (Zhao et al., 2001). Paradoxalement, dans d'autres expériences réalisées sur des enzymes isolées, le NO semble induire une diminution de l'activité de l'enzyme CBS et par conséquent une diminution de la production de H₂S. Les effets observés, parfois opposés, dépendent du modèle cellulaire étudié. Néanmoins, ces données confirment bien l'inter-relation entre les niveaux intracellulaires de NO et le métabolisme du soufre. Le CO peut également lier l'enzyme CBS avec une affinité plus forte que celle du NO (Taoka and Banerjee, 2001) et moduler sa production. D'autres exemples d'interaction entre « gazotransmetteurs » seront donnés dans les prochains paragraphes.

3.2. Effets physiologiques de H₂S

L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse de H₂S tels l'O-(carboxyméthyl)hydroxylamine hemihydrochloride (CHH) qui est un inhibiteur de la CBS ou le DL-propargylglycine (DL-PAG) qui est un inhibiteur de la CSE ou encore l'utilisation de précurseurs ou de donneurs de H₂S ont permis d'attribuer de nombreux effets biologiques

cellulaires et tissulaires au H₂S. Ces effets ont été surtout étudiés dans les systèmes nerveux et cardiovasculaire (Linden et al., 2010).

Il est important de souligner que les données de la littérature s'intéressant aux effets de H₂S ne rapportent aucune toxicité ou inhibition de la respiration cellulaire liée au H₂S endogène *in vivo*.

3.2.1. Réponses liées au H₂S dans les différents tissus

Système cardio-vasculaire

Des études réalisées sur des animaux, des tissus ou des systèmes cellulaires ont permis de mettre en évidence le rôle de H₂S au niveau vasculaire. Le H₂S endogène, à des concentrations considérées comme physiologiques (c'est-à-dire semblables à celles mesurées dans le système cardio-vasculaire) induit une vaso-relaxation qui nécessite la présence de l'endothélium. Ces résultats suggèrent un effet stimulant de H₂S sur la libération de facteurs à effet vaso-relaxant par l'endothélium (Zhao et al., 2001). Des souris KnockOut CSE^{-/-} sont caractérisées par une réduction de la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. De plus, ces souris sont hypertendues et ont des niveaux sériques de H₂S réduits ainsi qu'une production faible de H₂S aux niveaux aortique et cardiaque. De plus, le H₂S endogène exerce un effet protecteur contre les lésions du myocarde. Expérimentalement, une administration aiguë de H₂S avant l'ischémie (pré conditionnement), ou au moment de la reperfusion, atténue significativement *in vitro* ou *in vivo* les lésions liées à l'ischémie-reperfusion du myocarde. L'effet protecteur du H₂S semble être optimal aux concentrations considérées comme physiologiques. Cet effet semble être médié par un effet protecteur du H₂S sur la fonction mitochondriale (Calvert et al., 2010; Elrod et al., 2007). Par ailleurs, l'administration de H₂S exogène diminue la nécrose et l'apoptose cellulaire induites par l'ischémie-reperfusion.

Système nerveux

Le rôle physiologique de H₂S dans le cerveau a été démontré pour la première fois en 1996 (Abe and Kimura, 1996). Dans le système nerveux central, le H₂S est synthétisé principalement par la CBS (Eto et al., 2002b) dont l'activité enzymatique est 30 fois plus élevée que celle de la CSE. Ces deux enzymes ont été retrouvées dans le cerveau au niveau de l'hippocampe, du cerebellum, du cortex cérébral et au niveau du tronc cérébral.

Le H₂S endogène exerce un rôle dans la régulation de certaines fonctions neuronales clés. Il inhibe en effet, via un mécanisme encore non élucidé, la libération de l'hormone CRH (*corticotropin releasing hormone*) par l'hypothalamus *in vitro* sur explants hypothalamiques

mais aussi *in vivo* chez le rat (Dello Russo et al., 2000; Navarra et al., 2000). Le H₂S joue également un rôle de neuromodulateur dans les processus d'apprentissage et de mémorisation en agissant de façon spécifique sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) pour induire une potentialisation à long terme au niveau de l'hippocampe (Abe and Kimura, 1996; Kimura, 2000). Une diminution de la concentration de H₂S dans le cerveau due à la diminution des niveaux de l'activateur physiologique de la CBS, la S-adénosyl-méthionine ou SAM, a été observée chez les sujets atteints de la maladie d'Alzheimer. Aucune relation de cause à effet n'a cependant, été établie entre la baisse de l'activité enzymatique de la CBS et l'étiologie de la maladie. En revanche, la réduction de H₂S et de l'activité de la CBS pourrait être impliquée dans certains aspects de la perte cognitive associée à la maladie d'Alzheimer (Eto et al., 2002a).

Système gastro-intestinal

Il n'existe que peu d'études s'intéressant aux effets de H₂S au niveau du système gastro-intestinal. Il apparaît clairement que le H₂S affecte différents aspects de la fonction digestive. Certains effets de H₂S dans le système gastro-intestinal seront détaillés dans le chapitre (II).

3.2.2. Mécanismes moléculaires impliqués

Les mécanismes moléculaires par lesquels le H₂S induirait ou modulerait des réponses biologiques dans la cellule ne sont pas précisément connus. Plusieurs études récentes ont permis néanmoins la compréhension de certains des mécanismes impliqués. Le rôle de molécules cibles impliquant des protéines intracellulaires, des enzymes, des facteurs de transcription ainsi que des canaux ioniques membranaires a été mis en évidence dans les différents effets liés au H₂S (Figure 8).

Canaux ioniques

En plus de la cytochrome c oxydase, une importante molécule cible de l'action du H₂S est le canal K_{ATP} dépendant (Zhao et al., 2001). Le H₂S est un activateur des canaux K_{ATP} et la plupart des effets biologiques du H₂S rapportés dans la littérature semblent être médiés totalement ou en partie par l'activation de ces canaux ioniques. En effet, des réponses biologiques liées à la présence de H₂S dans les vaisseaux sanguins, dans le cœur et dans d'autres tissus et organes passent par l'ouverture des canaux ioniques K_{ATP} dépendants (Li et al., 2011). L'ouverture de ces canaux intervient dans la vasodilatation en réponse à une stimulation par le H₂S au niveau des muscles vasculaires lisses (Cheng et al., 2004; Hosoki et al., 1997; Zhao et al., 2001) et au niveau des myocytes auriculaires et ventriculaires de rat

(Zhong et al., 2010). Les effets du H₂S sur la réduction de la pression sanguine au niveau intrahypothalamique (Dawe et al., 2008) ou sur la modulation des altérations liées à l'ischémie/reperfusion font intervenir également les canaux K_{ATP} dépendants (Fiorucci et al., 2005; Zhang et al., 2007). Dans le côlon, les canaux K_{ATP} dépendants interviennent dans la vasodilatation des muscles lisses induite par le H₂S et dans la modulation de la nociception dans les distorsions colorectales (Distrutti et al., 2006). Les mécanismes par lesquels le H₂S active les canaux K_{ATP} dépendants ne sont pas précisément connus. Il semblerait que le H₂S interagisse avec les résidus cystéines extracellulaires pour activer les canaux rvKir6.1/rvSUR1 (Jiang et al., 2010). Selon Cooper et Brown (2008), l'activation des canaux K_{ATP} pourrait être médiée par l'inhibition de la cytochrome c oxydase qui en entraînant une diminution de l'ATP intracellulaire induit une ouverture de ces canaux (Cooper and Brown, 2008).

Le H₂S peut interagir également avec d'autres types de canaux ioniques tel les canaux BKCa (Big K⁺ conductance Ca²⁺ sensitive), les canaux calciques de type L et les canaux chlore intracellulaires (Li et al., 2011). Les interprétations biologiques de ces interactions souvent observées lors d'études *ex vivo* restent encore très mal comprises.

Facteurs de transcription

L'étude des interactions de H₂S avec les facteurs de transcription a une importance cruciale dans l'amélioration de la compréhension du rôle de H₂S dans la modulation de l'inflammation et des altérations associées à l'ischémie/reperfusion.

Des données disponibles dans la littérature suggèrent que le H₂S réduit/inhibe l'activation de la voie impliquant le facteur de transcription NF-κB. En effet, un prétraitement des macrophages RAW246.7 pendant 12 heures au NaHS à la concentration de 200μM inhibe la dégradation et la phosphorylation du facteur IκBα et prévient ainsi l'activation du facteur NF-κB en réponse aux lipopolysaccharides bactériens (LPS) (Oh et al., 2006). Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs sur d'autres modèles cellulaires ou *in vivo* sur modèles animaux. En effet, le NaHS inhibe la dégradation du facteur IκB-α et la translocation nucléaire du NF-κB dans des cellules endothéliales humaines en présence de TNFα (*tumor necrosis factor α*) et au niveau rénal dans des situations d'ischémie/reperfusion chez le rat (Li et al., 2011). Les connaissances actuelles ne permettent pas d'expliquer les mécanismes d'action impliqués. Il serait intéressant de savoir si l'effet du H₂S fait intervenir une diminution de l'activité de la protéine IKK, une kinase qui active par phosphorylation la protéolyse du facteur IκB (Li et al., 2011). La conséquence fonctionnelle de la réduction de l'activation de NF-κB dans les cellules inflammatoires est la diminution de l'expression des gènes pro inflammatoires impliquant principalement les gènes

codant pour la iNOS (*inducible nitric oxidase synthase*) et la COX-2 (*cyclooxygenase-2*) ; mais également les gènes de l'expression des cytokines/chémokines de l'inflammation et les gènes d'expression des molécules d'adhésion (Li et al., 2011).

De façon contradictoire à cet effet anti inflammatoire du H₂S, un effet pro inflammatoire a été rapporté dans certaines études avec une augmentation (et non pas une inhibition) de la dégradation du facteur IκB-α et de l'activation de NF-κB (Zhang et al., 2006; Zhi et al., 2007). L'étude de Zhi et ses collaborateurs a rapporté une activation de la voie NF-κB dans des cellules de la lignée de monocytes humains U937, traitées au NaHS aux concentrations de 0,01, 0,1 et 1mM pendant 10 à 120min. En effet, il est important de noter que le type de modèle cellulaire ainsi que les conditions de culture et les concentrations de H₂S utilisées sont des paramètres qui déterminent la manière dont le système NF-κB répond aux H₂S (Li et al., 2011). De plus, l'activation de la voie NF-κB pendant les premières phases de l'inflammation est pro inflammatoire. Son activation pendant la phase de résolution est couplée à l'expression de facteurs anti inflammatoires comme le TGF-β (*transforming growth factor β*). Par conséquent, le H₂S peut soit inhiber soit activer la voie NF-κB de façon très dépendante du stade précis de la réaction inflammatoire (Li et al., 2011).

Mis à part le facteur NF-κB, les facteurs de transcription : STAT 3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) et le facteur Nrf-2 (*NF-E2-related factor 2*) interviennent dans la transduction des signaux en réponse au H₂S. En effet, le H₂S augmente l'accumulation nucléaire des facteurs STAT3 et Nrf-2 dans les cellules. L'activation du facteur STAT3 permet d'augmenter l'expression des gènes de survie cellulaire (e.g. *survivin*), de prolifération (e.g. *c-fos*), et de l'angiogénèse (tel le facteur VEGF *vascular endothelial growth factor*). La translocation nucléaire du facteur de transcription Nrf-2 permet quant à elle le contrôle de l'expression génique de certaines enzymes dites protectrices et connues pour limiter les lésions cardiaques liées à l'ischémie tel l'hémeoxygénase-1 (HO-1) et la thioredoxine-1 (Trx-1).

Kinases

De façon générale, le H₂S joue aussi bien des rôles d'activateur que d'inhibiteur des kinases de signalisation cellulaire. Les effets contradictoires rapportés dans la littérature semblent là encore dépendre des modèles de cellules et des concentrations en H₂S utilisées. Nombreuses sont les études qui se sont intéressées aux effets de H₂S sur les MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). Dans une étude réalisée sur des cultures de cellules de muscles lisses de vaisseaux aortiques de rat, le NaHS exerce un effet inhibiteur dose dépendant sur l'augmentation de la prolifération via la voie de P38 MAPK provoquée par

l'endothéline. L'effet le plus marqué de NaHS dans cette étude a été observé à une concentration de 0,5mM (Du et al., 2004). Une étude plus récente rapporte au contraire une augmentation de cette activité de p38 MAPK dans des cellules endothéliales humaines en culture en présence de 60µM de NaHS (Papapetropoulos et al., 2009). Par ailleurs, d'autres kinases sont également des molécules cibles pour le H₂S. En effet, le H₂S généré suite à une augmentation de l'expression de la CSE induit une nette augmentation de l'activation/phosphorylation des protéines ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*) dans les cellules HEK-293 et dans des cellules musculaires lisses de vaisseaux de rats (Jeong et al., 2006; Yang et al., 2004). Un effet similaire a été observé dans cellules cancéreuses coliques humaines HCT-116 et SW480 (Cai et al., 2010). Le H₂S peut également être à l'origine d'une activation/phosphorylation de la protéine Akt dans des cellules endothéliales en culture (Wang et al., 2010).

« S-sulfhydration » des protéines

De façon analogue au NO qui induit une S-nitrosylation des protéines, le H₂S induit des modifications de type « S-sulfhydration » de nombreuses protéines (Mustafa et al., 2009). La réaction de « S-sulfhydration » a longtemps été considérée comme un mécanisme lié exclusivement à l'altération des fonctions protéiques et enzymatiques cellulaires. Il est à présent clair qu'il s'agit d'une modification post-traductionnelle importante et commune à de nombreuses protéines dans les cellules. Mustafa et al. (2009) soulignent qu'environ 10 à 25% des protéines de foie de souris sont sous leurs formes S-sulfhydratées (Mustafa et al., 2009). Dans la réaction de « S-sulfhydration », un soufre qui dérive de H₂S est ajouté au groupement thiol des résidus cystéine pour générer un groupement hydropersulfide (-SSH). Les cystéines des protéines portant un groupement -SSH voient leur réactivité chimique augmentée en comparaison aux cystéines basiques contenant des soufre sous forme de thiols. L'augmentation de la réactivité chimique par modification des groupements cystéine peut être associée à une augmentation de l'activité biologique des protéines dont certaines cystéines ont été modifiées. De plus, une activité enzymatique de la forme S-sulfhydratée de la GAPDH plus importante que celle de GAPDH non modifiée a été observée, offrant ainsi un argument en faveur du rôle important que peut jouer la réaction de « S-sulfhydration » des enzymes au niveau métabolique. Cependant, des réticences persistent au sein de la communauté scientifique quant au fait de considérer cette forme de modification comme pouvant constituer une nouvelle forme de signalisation cellulaire. Des études complémentaires s'imposent pour répondre à ces différents questionnements et pour

caractériser l'implication potentielle de cette forme de modifications post traductionnelle dans la physiologie et la physiopathologie cellulaire (Li et al., 2011).

Par ailleurs, des modifications protéiques outre la réaction de « S-sulfhydrylation » peuvent également résulter de l'interaction du H₂S avec les protéines. Les protéines modifiées peuvent être considérées comme des sites de stockage intracellulaire de H₂S (figure 9) (Kajimura et al., 2010).

3.2.3. Autres effets de H₂S

A la base d'études *in vitro* ou *in vivo*, les données bibliographiques rapportent en plus des effets pro et anti inflammatoires des effets pro et anti apoptotiques de H₂S mais également des effets de H₂S en tant que substrat énergétique (Li et al., 2011; Szabo, 2007). Certains de ces effets seront détaillés dans le chapitre II. Il est intéressant de souligner également que des études très récentes considère le H₂S comme une molécule avec un potentiel thérapeutique pour le traitement des inflammations. De nouvelles générations de composés libérant du H₂S ont été développés (Szabo, 2007).

Pour récapituler :

Bien qu'aucune inhibition de la respiration cellulaire n'ait été rapportée pour le H₂S endogène, les données de la littérature nous laissent considérer le H₂S à la fois comme un toxique et comme un médiateur biologique (physiologique) dans l'organisme (Li et al., 2011). Le H₂S est considéré comme un médiateur unique. En effet, il peut agir directement sur les molécules cibles dans les cellules par exemple via l'ouverture des canaux K⁺_{ATP} dépendants ou via la translocation du facteur de transcription NF-κB mais il peut également agir indirectement en modulant par exemple les réponses induites par le NO. De plus, les effets opposés rapportés pour le H₂S dépendent des conditions expérimentales *in vitro* à savoir la concentration de H₂S, le mode d'exposition et les modèles animaux, tissulaires ou cellulaires utilisés. Cependant, l'attribution d'un effet biologique à une concentration précise de H₂S semble difficile à l'heure actuelle du fait de la disparité des résultats rapportés dans la littérature pour des concentrations de H₂S similaires. Cette variabilité est due en partie à l'absence d'une standardisation des méthodes de dosage de H₂S. De plus, d'une manière générale, les concentrations responsables des effets attribués au H₂S semblent être trop élevées par rapport aux concentrations physiologiques (Furne et al., 2008).

Il nous paraît ainsi primordial pour prédire les effets de H₂S de tenir compte de deux éléments importants encore mal exploités dans la littérature : d'une part la présence très

probable de seuil en dessous ou au dessus duquel un des deux évènements l'effet biologique (utilisation comme substrat énergétique et/ou comme molécule signal) ou l'effet toxique (inhibition de la respiration cellulaire), domine ; et d'autre part, la tolérance des cellules vis-à-vis de H₂S. Dans l'état actuel des connaissances, la tolérance des cellules vis-à-vis de H₂S est évaluée par mesure de l'inhibition de la cytochrome c oxydase. Ce critère semble à lui seul insuffisant pour déterminer la résistance des cellules au H₂S et prédire ses effets biologiques ou toxiques

II. Le sulfure d'hydrogène dans le côlon

1. Le gros intestin

1.1. Organisation du gros intestin

1.1.1. Architecture macroscopique

Le gros intestin constitue la partie terminale du tube digestif, il mesure chez l'homme adulte environ 1,5m de long et 6,5cm de diamètre. S'étendant de la valvule iléo caecale à l'anus (figure 10), il est attaché à la paroi abdominale postérieure par le mésocôlon. Sur le plan anatomique, on distingue 4 principaux segments : le caecum, le côlon, le rectum et le canal anal. Le canal anal ne sera pas décrit dans les paragraphes suivants.

Le caecum est une petite poche d'environ 6 cm de long suspendue sous la valve iléocaecale. Un repli de muqueuse qui protège l'ouverture par laquelle l'iléum communique avec le gros intestin et qui permet au contenu de l'intestin grêle de passer dans le gros intestin.

Le caecum s'ouvre sur **le côlon** qui est disposé en cadre dans l'abdomen, et qui se divise en quatre parties : ascendante (droite), transverse, descendante (gauche) et sigmoïde. Le côlon droit ou ascendant représente la portion la plus large (6 à 8cm de diamètre). Il monte le long du côté droit de la cavité abdominale jusqu'à la hauteur du rein droit. Il fait ensuite un angle droit (angle colique droit) pour former le côlon transverse. Le côlon transverse, dont le diamètre est plus faible, traverse l'abdomen horizontalement. Juste devant la rate, il tourne ensuite brusquement (angle colique gauche). Cette partie du côlon est dénommée côlon descendant ou gauche. Le côlon descendant descend du côté gauche le long de la paroi abdominale postérieure et se termine par la portion sigmoïde sous forme de S plus fine. Les segments ascendants et descendants sont rétropéritonéaux ; les segments transverse et sigmoïde sont intrapéritonéaux. Les mouvements péristaltiques du côlon permettent le déplacement des matières fécales vers le rectum qui sert de réservoir avant l'évacuation.

Le rectum constitue le segment terminal du tube digestif. Il mesure 20 cm et est situé devant le sacrum et le coccyx. Le rectum présente trois courbures latérales qui constituent intérieurement 3 replis appelés plis transverses du rectum. Ces plis séparent les fèces des flatulences, c'est-à-dire qu'ils empêchent les fèces de passer avec les gaz intestinaux.

1.1.2. Architecture microscopique

La paroi du gros intestin possède les quatre couches de tissu communes à la plupart des sections du tube digestif qui sont de la superficie (face à « la lumière ») à la profondeur : la *muqueuse*, la *sous-muqueuse*, la *musculeuse* et la *séreuse*.

La muqueuse colique (figure 11) est la couche la plus superficielle du tube digestif. La muqueuse sépare le gros intestin du milieu extérieur (lumière intestinale). Elle est composée d'un épithélium simple prismatique, d'un chorion (tissus conjonctif aléatoire ou *lamina propria*) et d'une *muscularis mucosae* (muscle lisse). L'épithélium de revêtement est constitué d'une monocouche cellulaire comportant un mélange de différentes cellules épithéliales, des cellules absorbantes et des cellules sécrétrices comme les cellules entéro-endocrines (moins abondantes qu'au niveau de l'épithélium de l'intestin grêle) ou les cellules caliciformes (ou cellules en gobelet). Les cellules absorbantes (ou colonocytes) ont pour fonction première l'absorption de l'eau et les mouvements d'électrolytes ; les cellules caliciformes sécrètent le mucus lubrifiant qui facilite le passage des matières dans le côlon et assure une fonction de protection de l'épithélium contre les agressions extérieures physiques et chimiques. L'épithélium de plateau s'invagine pour former les cryptes dans le chorion. **Le chorion** de la muqueuse (ou la *lamina propria*) est un tissu de soutien renfermant des follicules lymphatiques mais également un riche réseau vasculaire et nerveux. **La muscularis mucosae** (musculaire muqueuse) est une fine couche de muscles lisses longitudinaux générant les mouvements locaux et le repli de la muqueuse. La surface de la muqueuse colique et du gros intestin est beaucoup plus faible que celle de l'intestin grêle puisqu'il n'y a pas de villosités et peu de microvillosités.

La sous-muqueuse est faite de tissus conjonctifs aléatoires. Elle contient des fibres nerveuses et des vaisseaux sanguins pour le transport des nutriments.

La musculeuse est constituée de deux couches de fibres musculaires lisses : une couche externe longitudinale et une couche interne circulaire. Les couches longitudinales de la musculeuse s'épaississent pour former trois bandes bien visibles de muscle lisse appelées bandelettes du côlon, qui parcourent le gros intestin sur presque toute sa longueur à l'exception de sa portion terminale. Le rectum de part son rôle dans la défécation et ses contractions fortes se caractérise par une musculeuse qui est dotée de couche de muscles complètes et bien développées.

La séreuse est une fine membrane qui fait partie du péritoine viscéral. Il s'agit d'une couche externe du tissu conjonctif dont le rôle est essentiellement un rôle de soutien.

1.1.3. De l'aspect microscopique à l'aspect fonctionnel du côlon

Le côlon ne possède pas de villosités mais un épithélium de revêtement (ou épithélium de plateau) où aboutissent les cryptes. L'architecture en crypte se trouve presque tout au long du côlon. Les cryptes sont caractérisées par une structure histologique complexe dominée par les phénomènes de renouvellement dans des structures hautement spécialisées et par la perte cellulaire par anoïkis (appelé également apoptose induite par le détachement). Le renouvellement de la muqueuse colique s'effectue tous les 3 à 8 jours chez l'Homme. La moitié inférieure des cryptes constitue une zone de prolifération (figure 12) pour les précurseurs épithéliaux. Les cellules souches pluripotentes se trouvant au fond des cryptes se divisent par mitose asymétrique et donnent naissance à des cellules de transit qui migrent le long de l'axe de la crypte vers la surface en acquérant une différenciation croissante. Les cellules acquièrent leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles en 24 à 48 heures. Les cellules ayant achevé leur maturité subissent l'apoptose et s'exfolient dans la lumière colique. Ainsi, les cellules de l'épithélium de revêtement sont définitivement différenciées, elles ne se divisent plus. En raison de son renouvellement rapide et de ses fonctions d'absorption, l'épithélium colique est caractérisé par des besoins énergétiques élevés (Ardawi and Newsholme, 1985).

1.2. Principales fonctions du côlon

La réabsorption de l'eau, des électrolytes et de certains métabolites bactériens est la principale fonction du côlon. Ainsi, le côlon est un organe important dans le maintien de l'équilibre hydrique de l'organisme. Les cellules absorbantes, qui présentent une bordure en brosse apicale, sont responsables de l'absorption d'eau et des mouvements d'électrolytes. L'irrigation mésentérique du côlon permet le transport de tous les éléments absorbés vers le foie via la veine porte. De plus, le côlon assure également d'autres fonctions comme la production de certaines vitamines, la formation des fèces et leur expulsion hors du corps. Comme évoqué plus haut, le côlon a aussi pour rôle de récupérer une partie de l'énergie à partir des composés non digérés/non absorbés de la lumière colique. Un exemple de récupération de l'énergie par les colonocytes est la métabolisation des acides gras à courte chaîne (AGCC) produit dans la lumière colique par le microbiote intestinal. Il est également important de souligner que le côlon est décrit dans la littérature comme le deuxième organe de détoxification derrière le foie. Le côlon a la capacité de détoxifier les métabolites toxiques en provenance de la lumière colique dans le but de conserver l'intégrité de l'épithélium colique ainsi que son fonctionnement. Cet aspect qui nous intéresse tout particulièrement sera traité dans les prochains paragraphes.

1.3. Métabolites du côlon

Le gros intestin constitue un écosystème extrêmement complexe de part le nombre important d'espèces de bactéries qu'il abrite. On dénombre dans le côlon 400 espèces différentes de bactéries, en partie des bactéries anaérobies strictes (Finegold et al., 1983). Les enzymes d'origine bactérienne complètent la digestion pancréatique et intestinale en agissant sur les polysaccharides indigestibles, les protéines endogènes notamment membranaires provenant de la desquamation des entérocytes et des colonocytes et les protéines qui échappent à la digestion dans l'intestin grêle. En effet, environ 6 à 18 gr de protéines par jour passent la jonction iléo caecale et arrivent sous forme non digérée au niveau colique (Gibson et al., 1976; Smiddy et al., 1960). La fermentation par les bactéries saccharolytiques est prédominante dans le côlon proximal alors que la fermentation protéolytique se produit surtout dans le côlon distal. Des métabolites potentiellement toxiques tels l'ammoniac, les composés soufrés principalement le H₂S, les indoles et les phénols ; mais également des acides organiques tels les AGCC et l'acide lactique sont formés (Hamer et al., 2008).

1.3.1. Acides gras à chaînes courtes

Les AGCC représentent la majorité des anions organiques présents dans le côlon. Les principaux AGCC formés sont l'acétate, le propionate et le butyrate. Les AGCC sont générés par la fermentation bactérienne de fibres alimentaires solubles non digestibles (amidon résistant et des polyosides végétaux) et de façon moindre à partir des protéines alimentaires et endogènes dans la lumière colique (Hamer et al., 2008). Les concentrations d'AGCC générés dépendent du site de fermentation, du régime alimentaire et de la composition de la flore bactérienne (Fredstrom et al., 1994). Cependant, les productions totales *in situ* dans le côlon sont difficiles à déterminer dues au fait que 95% des AGCC sont rapidement absorbés et métabolisés par les cellules épithéliales coliques et/ou en périphérie (Topping and Clifton, 2001). Les études visant à estimer les concentrations coliques en AGCC sont établies sur l'analyse des contenus intestinaux issus de colostomies ou obtenues à partir d'autopsies. Les concentrations totales d'AGCC élevées dans le caecum et le côlon droit diminuent tout au long du côlon. Elles varient de 137 et 197 mmol/kg de chyme dans le caecum à 86 ou 97 mmol/kg dans le côlon descendant (Cummings et al., 1987; Macfarlane et al., 1992). Le gradient de production et de disponibilité des AGCC le long du côlon est inversement relié au valeurs de pH qui augmentent du caecum au côlon descendant (Cummings et al., 1987). Les proportions de production des principaux AGCC sont respectivement de 60%, 20% et 20% pour l'acétate, le propionate et le butyrate (Weaver et al., 1997). Les taux relatifs de

production de ces AGCC chez l'Homme, dans le contenu colique et dans les fèces sont résumés dans le tableau 3. Les AGCC agissent sur la motricité du côlon ; l'absorption hydroélectrolytique, le trophisme colique et le métabolisme énergétique des colonocytes ainsi que sur la sécrétion de mucus par les cellules en gobelet. En effet, et en plus de l'oxydation des nutriments d'origine plasmatique tels que le glucose et la glutamine, les AGCC représente des substrats oxydatifs majeurs des colonocyte (Hamer et al., 2008).

1.3.2. Transport des acides gras à chaînes courtes

Les AGCC sous leur forme non dissociée lipophile, traversent les membranes apicales des colonocytes par simple diffusion (Velazquez et al., 1997). Les AGCC sont des acides faibles et sont présents sous forme anionique et dissociée dans la lumière colique. Des mécanismes de transport autres que la diffusion, ont été décrits pour les formes dissociées d'AGCC à travers la membrane apicale des colonocytes (figure 13). Un transport via un échangeur antiport des AGCC avec les ions bicarbonates ($\text{AGCC}^-/\text{HCO}_3^-$) a été proposé (Kawamata et al., 2007). Ce transport semble impliquer la protéine membranaire SLC4A2. En effet, des expériences sur des membranes coliques isolées ont mis en évidence un mode de transport permettant un échange entre l'entrée de butyrate et l'excrétion d'ions HCO_3^- , stimulé par un gradient de pH (Reynolds et al., 1993; Tyagi et al., 2002). De plus, un co-transport avec des ions sodium ou hydrogènes impliquant des protéines de la famille SLC16A a été également décrit dans la littérature. Les transporteurs d'acides monocarboxyliques MCT1 (monocarboxylate transporter isoform 1) et MCT4 (monocarboxylate transporter isoform 4), qui correspondent respectivement aux protéines SLC16A1 et SLC16A3, permettent le co-transport d'un AGCC sous sa forme acide AGCC^- avec un ion H^+ ou Na^+ de la lumière vers la cellule colique de façon stœchiométrique, ne générant aucun gradient électrochimique (Halestrap and Price, 1999). Ainsi, les transports des AGCC via un antiport des AGCC avec les ions bicarbonates ou un co-transport avec des ions sodium ou hydrogènes sont électriquement neutres.

Les mécanismes de transport des AGCC générant un gradient électrochimique concernent les protéines SLC5A8 et SLC5A12 qui pour assurer le transport des AGCC et des acides mono carboxyliques en général dépendent des ions Na^+ . De par cette particularité ils sont également appelés respectivement SMCT1 et SMCT2 pour sodium-coupled monocarboxylate transporter (Srinivas et al., 2005). Ces transporteurs assurent donc le co-transport des AGCC avec des ions Na^+ mais dans des conditions stœchiométriques d'1 AGCC pour 4 ions Na^+ créant ainsi un gradient électrochimique à travers la lumière intestinale et les cellules coliques. SLC5A8 est exprimé au niveau de la membrane apicale des colonocytes

et a une meilleure affinité pour les AGCC que SLC5A12 qui lui est exprimé dans l'intestin grêle et pas dans le côlon. Dans des conditions physiologiques seul le transporteur SLC5A8 participera au transport des AGCC dans les cellules coliques. Le transport des AGCC au niveau basal reste encore mal connu.

1.3.3. Butyrate

La concentration de butyrate dans les fèces humains varie entre 1 et 25mM (Hallert et al., 2003; Weaver et al., 1997). Cet acide gras à 4 carbones représente le principal substrat énergétique de l'épithélium colique, son métabolisme, privilégié par rapport aux autres AGCC, rend compte de 70 à 80% de la consommation d'oxygène totale des colonocytes. Ainsi, le butyrate reste le substrat oxydable préférentiel pour les colonocytes bien que les autres nutriments (glucose et glutamine) présents dans la circulation sanguine représentent aussi des substrats énergétiques oxydables pour les colonocytes (Ardawi and Newsholme, 1985; Roediger, 1982). La présence de butyrate dans le milieu d'incubation diminue l'utilisation du glucose et de glutamine respectivement dans la voie de la glycolyse et dans le cycle de Krebs dans les colonocytes isolés de porc et d'homme. Une bonne partie du butyrate étant absorbée est métabolisée par les cellules épithéliales coliques, les concentrations restent faibles au niveau de la veine porte variant entre 14 et 64µM chez l'Homme (Cummings et al., 1987).

- **Effets du butyrate**

En plus d'être un substrat énergétique, le butyrate est un régulateur de nombreuses fonctions cellulaires. Nous allons détailler certains effets du butyrate qui sont en lien étroit avec notre problématique de recherche donc essentiels pour la compréhension de notre exposé.

Effet sur l'expression génique : Le butyrate est décrit comme une molécule capable de ralentir la synthèse de l'ADN, d'inhiber la prolifération cellulaire et de moduler l'expression de plusieurs gènes (Prasad and Sinha, 1976). De plus, un rôle prodifférenciant du butyrate sur une variété de lignées de cellules coliques humaines d'origine adénocarcinomateuse a été également rapportée (Bordonaro et al., 2008; Pajak and Orzechowski, 2007). Sur le plan moléculaire, l'effet du butyrate sur l'expression des gènes est médié par une augmentation de l'acétylation des histones qui est due soit à une augmentation de l'activité des histones acétyltransférases (HAT) soit au contraire à une inhibition des histones déacétylases (HDAC). L'acétylation des histones en diminuant les liaisons électrostatiques responsables des interactions ADN-histones permet un relâchement

de la structure chromatinienne et facilite ainsi l'interaction des facteurs de transcription avec leurs éléments de réponse respectifs (Luger et al., 1997).

L'effet du butyrate sur la prolifération cellulaire varie en termes d'augmentation de la prolifération des cellules ou au contraire en termes d'induction de l'apoptose. L'effet du butyrate dans un sens ou dans l'autre dépend des conditions expérimentales *in vitro*. Ainsi, selon que les cellules sont des cellules saines (colonocytes sains) ou au contraire des lignées cellulaires issues d'adénocarcinome humains ; et en fonction des concentrations de butyrate utilisées dans le milieu d'incubation, les effets du butyrate en termes d'effets sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose peuvent être très différents.

Effet anti proliférant : Les effets du butyrate sur la prolifération peuvent s'expliquer de différentes façons. Tout d'abord, le butyrate est capable de moduler l'expression de gènes impliqués dans l'évolution du cycle cellulaire et notamment celui de la protéine p21^{Waf1/Cip1} qui, en inhibant certaines kinases dépendantes des cyclines, conduit à un blocage des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire (Archer et al., 1998; Leschelle et al., 2000). Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant un inhibiteur de l'histone déacétylase i.e. la trichostatine A (TSA), ce qui laisse suggérer que le butyrate favoriserait l'expression du gène p21 en provoquant une hyperacétylation des histones générant ainsi un environnement propice à la fixation des facteurs de transcription sur les éléments cis du promoteur du gène p21. Des facteurs de transcription semblent être impliqués dans la régulation de l'expression de p21. Le rôle du facteur de transcription Sp3 décrit comme médiateur prépondérant de l'effet du butyrate sur la transcription du gène p21 a été rapporté (Sowa et al., 1999). De plus, la protéine ZBP-89 semble également être impliquée dans la régulation de l'expression de p21 par le butyrate (Bai and Merchant, 2000).

Effet prodifférenciant : Le butyrate est également capable de moduler la prolifération des cellules cancéreuses en induisant leur différenciation. La différenciation des cellules coliques est évaluée par l'augmentation de l'expression de glycoprotéines caractéristiques de la bordure en brosse des cellules coliques, de la phosphatase alcaline et de l'antigène carcinoembryonnaire. Dans ce contexte, l'étude de Leschelle et al. (2005) a rapporté une augmentation de l'activité de la protéine dipeptidyl peptidase IV (DPPIV), un autre indicateur de différenciation cellulaire dans des cellules HT-29 Glc^{-/+} traitées au butyrate (Leschelle et al., 2005). L'effet prodifférenciant du butyrate sur les cellules HT-29 Glc^{-/+} sera traité dans les paragraphes suivants.

Effet proapoptotique : L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui peut être induit par deux grandes voies de signalisation, une voie intrinsèque induite par

des signaux intracellulaires et faisant intervenir la mitochondrie et une voie extrinsèque induites par des signaux extracellulaires. Brièvement, dans la voie intrinsèque, la mitochondrie est directement impliquée de par sa capacité à libérer dans le cytosol des molécules proapoptotiques telles que le cytochrome-c ou le facteur AIF (Green and Reed, 1998). Dans le cytosol, ces facteurs vont interagir avec d'autres protéines pour former un complexe protéique appelé apoptosome, permettant l'activation des caspases, les protéines effectrices de l'apoptose (Li et al., 1997). Le relargage mitochondrial de ces facteurs est régulé par des protéines pro ou antiapoptotiques de la famille Bcl-2 ou IAP. Dans des cellules d'adénocarcinome colique, le butyrate permet simultanément d'inhiber l'expression de protéines antiapoptotiques comme Bcl-XL et d'augmenter l'expression de bak, une protéine proapoptotique conduisant ainsi à une activation des caspases et à l'apoptose (Ruemmele et al., 2003). En ce qui concerne la voie extrinsèque de l'apoptose, elle est médiée par des récepteurs membranaires spécifiques qui assurent le recrutement de la protéine adaptatrice FADD qui, avec la procaspase 8, forme le complexe d'induction de la mort cellulaire, DISC (Papenfuss et al., 2008). La protéine cFLIP est un analogue structural de la caspase 8 mais ne possède pas son activité protéolytique et est impliquée dans des phénomènes de résistance à l'apoptose de certains cancers (Thome et al., 1997). Le butyrate entraîne une diminution de l'expression de cFLIP potentialisant ainsi les effets de différents ligands proapoptotiques tels que TNF α ou TRAIL (Tumor Necrosis Factor α , Tumor Related Apoptosis-Inducing Ligand) (Hernandez et al., 2001; Inoue et al., 2002). TRAIL peut induire la mort cellulaire par apoptose dans une grande variété de cellules cancéreuses, et notamment des cellules cancéreuses coliques, tout en préservant les cellules normales (Sheridan et al., 1997). Une étude récente sur des cellules RKO, met en évidence l'implication de la voie de signalisation JNK MAPK dont le rôle a été rapporté dans l'induction de l'apoptose en réponse aux stimuli extérieurs (médicaments cytotoxique par exemple) ou lors d'un stress mitochondrial. Une augmentation de Bcl2 et une diminution de Bax ont été également rapportées dans ces cellules (Zhang et al., 2010).

Effet anti inflammatoire : Des effets anti inflammatoires ont été décrits pour le butyrate. L'étude de Segain et al.(2000) a rapporté *in vitro* un effet du butyrate sur la réduction de l'inflammation par inhibition du facteur de transcription NF- κ B (Segain et al., 2000). Cette même étude a permis de démontrer sur des biopsies issues de patients atteints de rectocolite hémorragique, que le butyrate diminuait l'expression de cytokines proinflammatoires via l'inhibition de NF- κ B dans les cellules de la *lamina propria*. De plus, l'étude d'Inan et al. a rapporté un effet du butyrate sur l'inhibition du facteur de transcription

NF- κ B dans la lignée de cellules coliques humaines HT-29 (Inan et al., 2000). Le butyrate semble également agir via d'autres facteurs de transcription (PPAR γ par exemple).

Par ailleurs, des travaux *in vivo* ont rapporté une amélioration des paramètres cliniques et inflammatoires de patients atteints de rectocolite hémorragique par l'administration intra rectale de butyrate ou de mixture d'AGCC (Luhrs et al., 2002; Scheppach et al., 1992). Ce résultat semble tout à fait concordant avec les résultats de l'étude de Roediger. (1980) montrant une diminution de l'oxydation du n-butyrate dans des colonocytes isolés chez des malades atteints de RCH par rapport aux sujets sains (Roediger, 1980). Il convient néanmoins de préciser que les effets anti inflammatoire du butyrate *in vivo* n'ont pas été confirmés dans des études plus récentes.

Effet antioxydant: Plusieurs études réalisées sur des colonocytes isolés chez le rat (Abrahamse et al., 1999), mais également chez l'homme (Rosignoli et al., 2001), ont démontré la capacité du butyrate à moduler le stress oxydant. Le butyrate ne possède pas de propriétés antioxydantes de par sa nature chimique, mais son action bénéfique sur le stress oxydant peut s'exercer sur des cibles secondaires comme les systèmes de réparation de l'ADN ou les niveaux d'expression des différentes enzymes antioxydantes. Ainsi dans la lignée de cellules cancéreuses coliques HT-29, le butyrate exerce un effet positif sur l'expression de la glutathion-S-transférase (Ebert et al., 2003). De plus, dans une étude récente effectuée chez des patients sains, l'administration intrarectale quotidienne de butyrate a mis en évidence le rôle bénéfique du butyrate sur le stress oxydant (Hamer et al., 2009) .

Les données de la littérature associent le butyrate à d'autres effets au niveau du gros intestin. Des études *in vitro* sur l'effet du butyrate sur les lignées cellulaires issues d'adénocarcinome colique suggèrent un rôle protecteur du butyrate contre le cancer de côlon. L'effet protecteur du butyrate serait dû à l'augmentation de la différenciation des cellules cancéreuses ou à une action cytotoxique de cet AGCC qui induirait l'apoptose des cellules tumorales (Leschelle et al., 2000; Zhang et al., 2010). D'autres études aussi bien *in vivo* que *in vitro* ont permis de démontrer des effets de butyrate sur la satiété, le maintien de l'homéostasie des cellules coliques et sur la perméabilité de la barrière intestinale. Le butyrate a été également impliqué dans les mécanismes de défense en partie en stimulant la sécrétion du mucus mais également en agissant sur l'expression des mucines (Hamer et al., 2008). Enfin, le butyrate a été impliqué dans la modulation du péristaltisme (Cherbut et al., 1998).

- **Métabolisme du butyrate dans les cellules coliques**

Le métabolisme du butyrate se déroule en partie au niveau mitochondrial dans les colonocytes. Les carbones du butyrate sont majoritairement retrouvés sous forme de CO₂, mais également sous forme de corps cétoniques, l'acétoacétate et le β-hydroxybutyrate (Roediger, 1982). Le butyrate représente ainsi le principal précurseur de la céto-genèse dans les colonocytes. Les voies impliquées dans l'utilisation du butyrate par les colonocytes sont résumées dans la figure 14. L'activation mitochondriale du butyrate génère du butyryl-CoA qui rejoint les dernières étapes de la voie de la β-oxydation. L'acétyl-CoA produit peut être utilisé dans le cycle de Krebs ou dans la voie de la céto-génèse. La voie métabolique responsable de la production des corps cétoniques est la même que dans le foie, elle implique l'intervention de l'enzyme la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA (HMG-CoA) synthase mitochondriale.

1.3.4. Autres AGCC

Alors que la fermentation de l'amidon par exemple donne des niveaux élevés de butyrate, la fermentation de substrats plus oxydés comme la pectine génère plus d'acétate (Scheppach et al., 1988). L'acétate est un AGCC à deux carbones. De façon moindre que le butyrate, l'acétate peut être également métabolisé par les colonocytes (Roediger, 1982). Cependant, cet AGCC ne possède pas de fonction d'inhibition des HDACs et donc ne peut avoir une quelconque régulation de l'expression des gènes (Hinnebusch et al., 2002). Le propionate enfin est également produit par le microbiote intestinal à partir des polysaccharides indigestibles et de certains acides aminés (Cummings, 1981) .

1.4. Méthodes d'exploration et d'étude du côlon

1.4.1. Coloscopie

La coloscopie est un examen de routine indiqué dans les cas de suspicion des maladies inflammatoires du côlon, de présence de polypes ou encore dans des cas d'antécédents de pathologies du côlon. Cet examen sert à explorer tout le côlon (gros intestin) et peut être aussi indiqué pour retirer des polypes et éviter leur évolution en cancer.

1.4.2. Biopsies coliques humaines

Un moyen d'étudier le côlon humain est de travailler directement sur des biopsies coliques prélevées au cours des examens de coloscopie de routine. Le consentement éclairé des malades chez lesquels les prélèvements sont réalisés est indispensable pour la réalisation du protocole expérimental. Les biopsies coliques humaines sont le plus souvent utilisées pour

des analyses histochimiques ou des mesures d'expression génique. Les biopsies coliques ne peuvent pas être mises en culture mais peuvent cependant être maintenues vivantes quelques heures. Dans le travail de Christl et al. (1996), des biopsies de muqueuses coliques de sigmoïde ont été prélevées puis mises en culture dans un milieu BME basale dans un incubateur à 37°C en présence de 95% d'oxygène et 5 % de CO₂ pendant une durée de 4 heures. L'objectif de ces auteurs était d'étudier la prolifération des cellules par des méthodes immunohistochimiques (Christl et al., 1996).

Récemment, de nombreuses lignées cellulaires ont été utilisées dans les laboratoires pour des études expérimentales. Chaque lignée cellulaire a ses propres caractéristiques morphologiques et fonctionnelles de différenciation, qui doivent être analysées et prises en compte en fonction des questions posées et lors de l'interprétation des résultats expérimentaux.

1.4.3. Lignées de cellules cancéreuses coliques humaines

Les lignées des cellules cancéreuses coliques les plus utilisées sont les HT-29, les Caco-2 et les T84. Nous nous sommes intéressés ici uniquement aux cellules HT-29. Ces cellules ont été utilisées en tant que modèle de cellules épithéliales coliques humaines dans mon travail de thèse.

- **Lignée HT-29**

Les cellules HT-29 ont été isolées à partir d'un adénocarcinome colique humain. De nombreuses lignées cellulaires issues des cellules parentales HT-29 ont été développées par la suite. Récemment, et grâce à ses propriétés fonctionnelles et de différenciation intéressantes, les cellules HT-29 ont été utilisées dans des études s'intéressant aux fonctions des cellules coliques (Zweibaum et al., 1985). Dans notre laboratoire, nous utilisons les cellules HT-29 Glc^{-/+} comme modèle d'étude des cellules coliques humaines saines notamment parce que ces cellules ont conservé des caractéristiques métaboliques de colonocytes sains (Andriamihaja et al., 2009; Leschelle et al., 2000). Ces cellules ont été obtenues par mise en culture des cellules parentales HT-29 dans un milieu sans glucose pendant plusieurs passages puis dans un milieu riche en glucose (25mM). Ces cellules HT-29 Glc^{-/+} se différencient après confluence en cellules absorbantes avec des caractéristiques à la fois de phénotype entérocytaire et colonocytaire. En effet, les cellules différenciées sont polarisées et expriment à leurs surfaces (pôle apical) des bordures en brosses et des enzymes caractérisant les entérocytes comme la sucrase, isomaltase, aminopeptidase N et la DPPIV. Par ailleurs, les cellules HT-29 Glc^{-/+} ont la capacité d'oxyder le butyrate, ce qui

représente une caractéristique métabolique des cellules de phénotype colonocytaire (Leschelle et al., 2000).

- **Métabolisme énergétique des cellules HT-29 Glc^{-/+}**

Les cellules HT-29 Glc^{-/+} oxydent de façon importante le butyrate ainsi que la glutamine mais très peu le D-glucose (Leschelle et al., 2000). L'oxydation intramitochondriale du butyrate par les cellules permet de contrôler sa concentration cytosolique et probablement sa concentration intranucléaire. L'étude d'Andriamihaja et al. (2009) rapporte qu'environ 94% du ¹⁴C butyrate utilisé à la concentration de 2mM est converti après métabolisation, en ¹⁴CO₂. Une faible fraction (5%) de ¹⁴C radioactif est retrouvée au niveau des histones et environ 1% se trouve dans les lipides cellulaires. Ainsi, le butyrate semble agir comme principal précurseur cytosolique de l'acétylation des histones en formant l'acétyl-CoA (figure 15). Ce produit intermédiaire (acétyl-CoA) est par la suite utilisé pour l'acétylation des histones ; mais également dans la lipogénèse (Leschelle et al., 2000; Roediger et al., 1992).

Comme cité précédemment, le butyrate induit un effet antiproliférant/prodifférenciant sur les cellules HT-29 Glc^{-/+}. L'effet du butyrate semble imputable en partie à l'hyperacétylation des histones. En effet le butyrate a une action directe sur l'activité des enzymes HDACs (Waldecker et al., 2008). L'étude d'Andriamihaja et al. (2009) démontre clairement que le niveau d'acétylCoA généré au départ du butyrate ne représente pas un facteur limitant pour le niveau d'acétylation des histones nucléaires. C'est donc très probablement l'effet inhibiteur du butyrate sur les histones déacétylases qui représente un des mécanismes majeurs à l'origine des effets inhibiteurs du butyrate sur les cellules tumorales coliques. De manière intéressante et confirmatoire, l'acétate ne pouvant inhiber les HDACs n'induit aucun effet antiproliférant/prodifférenciant sur les cellules HT-29 Glc^{-/+} (Andriamihaja et al., 2009).

2. Le sulfure d'hydrogène dans le côlon

2.1. Production de H₂S dans le côlon

2.1.1. H₂S dans la lumière colique

Dans la lumière colique, le H₂S constitue en plus du méthane (CH₄) et du diméthylsulfure (DMS) un des gaz prédominant des flatulences humaines (Suarez et al., 1998b). Des concentrations variées de H₂S luminal ont été mesurées dans les différentes études réalisées chez l'Homme ou chez l'animal (tableau 4). Chez l'Homme, une

concentration de l'ordre de 1,0 à 2,4mmol/L a été rapportée par Macfarlane et al. (1992) (Macfarlane et al., 1992). Des concentrations de l'ordre de 0,22 à 3,38 mmol/kg (en fonction du niveau d'ingestion de viandes) ont été mesurées dans les fèces humaines dans l'étude de Magee et al. (2000) (Magee et al., 2000). De plus, des niveaux similaires de H₂S colique ont été rapportés par Jorgensen et Mortensen (2001) avec des valeurs estimées à 0,74mmol/L (Jorgensen and Mortensen, 2001). Par ailleurs, des concentrations plus faibles de l'ordre de 0,17mmol/kg de matières fécales, ont été mesurées dans les fèces humaines dans l'étude de Florin (1991) (Florin, 1991). Le H₂S a été également mesuré chez les animaux utilisés comme modèles expérimentaux à l'occasion de nombreuses études précédentes. Le H₂S total a été mesuré dans le contenu caecal de rat dans l'étude de Levitt et al.(2002). Estimées à 1,5 mmol/kg de contenu caecal, les concentrations de H₂S mesurées dans le caecum de rat ne sont pas très différentes de celles mesurées chez l'Homme (Levitt et al., 2002). Chez la souris, les concentrations de H₂S rapportées par Deplancke et al.(2003) variaient entre 0,2 et 1,1mmol/ kg.

- **Production par les bactéries sulfato réductrices**

Dans la lumière colique, le H₂S est produit notamment par les bactéries sulfato réductrices (BSR) du côlon à partir des acides aminés soufrés, des sulfates alimentaires et des additifs sulfités (Beerens and Romond, 1977; Gibson et al., 1993).

Les bactéries sulfatoréductrices du côlon

Les BSR sont des bactéries anaérobies strictes. Ces bactéries ont été très peu étudiées dans l'écosystème digestif et dans le côlon et aucune taxonomie spécifique n'a été décrite pour cette population (Blachier et al., 2010). Cependant, des techniques de culture ont permis de conclure de la prédominance du genre *Desulfovibrio* dans le côlon humain (Willis et al., 1997).

Les BSR du côlon produisent du H₂S au cours de leur métabolisme, dans un processus appelé *dissimulatory sulfate reduction*. Dans ce processus, les composés contenant du soufre sont utilisés comme accepteurs finaux des électrons chez ces bactéries, remplaçant l'oxygène dans le système de respiration aérobie, pour produire de l'énergie. Ce phénomène est couplé à l'oxydation de l'hydrogène ou de substrats organiques qui servent de donneurs d'électrons pour ces bactéries (Rabus et al., 2006). Le type de composés soufrés utilisés comme accepteur alternatif d'électrons par les BSR, diffère selon les espèces. De nombreuses espèces bactériennes utilisent du sulfite ou du thiosulfate. Cependant, la

cystéine ou le glutathion peuvent être également utilisés par d'autres bactéries (Rabus et al., 2006).

Plusieurs voies métaboliques sont utilisées par les BSR, pour la production de H₂S dans le gros intestin (revoir l'article de Blachier (Blachier et al., 2010)). Brièvement, la réaction de desulfhydratation est utilisée par certaines bactéries anaérobies telles *Escherichia coli* pour produire du H₂S (Awano et al., 2005). De plus, des réactions de réduction du sulfite par la sulfite réductase peuvent également générer du H₂S. La formation de cystéine à partir de la O-acetyl-serine par l'enzyme Cysteine synthase (CSase) est également une voie qui génère du H₂S et l'acide acétique par des bactéries telles *E. Coli* (Tai et al., 2001).

- **H₂S fécal**

La capacité des fèces ou des cellules coliques à produire du H₂S a été mesurée *in vitro* dans un milieu réactionnel contenant du pyridoxal-5'-phosphate (P-5-P) (2mM) et en tant que substrat : la L-cystéine (10mM). L'étude récente de Flannigan et al. (2011) a montré que la concentration du H₂S fécal mesuré *in vitro* était la résultante d'une production bactérienne de H₂S par les BSR mais aussi d'une production dite eucaryote (production par l'hôte) qui résulte en partie par les cellules épithéliales coliques. Dans cette étude, il a été observé que la libération de H₂S par les matières fécales récupérées chez des souris axéniques n'était réduite que de moitié par rapport au H₂S produit par les échantillons de fèces de souris conventionnelles.

- **Facteurs déterminants les concentrations de H₂S dans la lumière colique**

- Régime alimentaire***

La concentration de H₂S dans la lumière colique dépend fortement de la composition du régime alimentaire. Une corrélation entre les niveaux de protéine ingérés et les niveaux d'excrétion fécale de H₂S, a été rapportée dans des études précédentes (Blachier et al., 2010). L'étude de Suarez et al. (1998) a montré qu'une complémentation du régime alimentaire par des carraghénanes, une forme non absorbée de sulfate organique retrouvé dans les algues, augmentait de 6 fois la libération de H₂S caecal chez le rat (Suarez et al., 1998a). Par ailleurs, la production de H₂S luminal semble être réduite avec le jeûne. En effet, le volume de H₂S produit dans le caecum est significativement réduit chez des rats privés de nourriture pendant 36 heures (figure 16) (Suarez et al., 1998a).

- Liaison à des composés fécaux***

Au regard des données rapportées par la bibliographie chez l'animal et chez l'Homme, il apparaît que le H₂S est présent dans la lumière du gros intestin à des concentrations milli

molaires. De nombreux auteurs suggèrent qu'une grande partie de H₂S luminal est liée à des composés fécaux. Ce qui diminueraient les concentrations de H₂S libres qui seraient ainsi dans la gamme des concentrations micro molaires (Blachier et al., 2010; Levine et al., 1998). Dans ce contexte, l'expérience de Jorgensen et Mortensen. (2001) réalisée sur des matières fécales récupérées chez des volontaires sains, rapporte qu'environ 8% du H₂S total dans la lumière colique se trouvent sous forme libre (Jorgensen and Mortensen, 2001). La concentration de H₂S colique libre est ainsi estimée à 60µmol/L dans le côlon humain (Blachier et al., 2010). L'étude de Levitt et al. (2002) a rapportée de plus qu'environ 1% du H₂S total dans les fèces se trouve sous forme non liée, ce qui équivaut à une concentration de 2,7µmol/kg, (Levitt et al., 2002).

Bien que la capacité des composés fécaux à lier le H₂S soit évoquée et argumentée lors de nombreuses études, la nature de ces composés reste encore mal connue. Les cations divalents tels le zinc et le fer, et le bismuth formant des sels insolubles avec le sulfure apparaissent comme des candidats pertinents dans la modulation de la concentration de H₂S libre dans la lumière colique. L'équipe de Suarez a montré que chez des rats soumis à un régime alimentaire riche en carraghénane, l'addition de zinc acétate au régime réduisait la production de H₂S dans le caecum (figure 16) (Suarez et al., 1998a).

Elimination de H₂S

La quantité de H₂S présente sous forme libre dans la lumière colique est la résultante de la différence entre le taux de production de H₂S par les matières fécales et son taux d'élimination via l'absorption, le métabolisme ou l'excrétion par voie rectale dans les flatulences (Suarez et al., 1998a). Le H₂S est absorbé par les membranes apicales, il est susceptible d'être métabolisé par les colonocytes ce qui permet de diminuer ses concentration intracellulaires et de prévenir sa toxicité (Gouvern et al., 2007; Levitt et al., 2002). Les données partielles concernant les mécanismes de métabolisation et de détoxification de H₂S seront détaillés dans les paragraphes suivants.

2.1.2. Production endogène de H₂S

Le côlon de façon similaire aux autres organes et tissus, libère du H₂S (Deplancke et al., 2003; Linden et al., 2008). Des études précédentes ont caractérisé la production endogène de H₂S dans le côlon et tout au long du tube digestif. Martin et al. (2010) ont rapporté une production endogène de H₂S chez le rat, moindre dans le côlon que dans l'estomac ou dans l'intestin grêle (Martin et al., 2010). Dans le côlon, les enzymes CBS et CSE sont exprimées de façon constitutive chez le rat, la souris et chez l'homme. Cependant,

l'utilisation de substances pharmacologiques a permis de rapporter une expression plus abondante de la CSE dans le côlon de souris mais également dans la lignée de cellules cancéreuse coliques humaines, WiDr (figure 17) (Cao et al., 2010). L'équipe de Martin et al.(2010) a suggéré au contraire une production colique endogène de H₂S prédominante par la CBS chez le rat et chez la souris (figure 18). En effet, l'addition d'hydroxylamine hemihydrochloride (CHH), un inhibiteur de la CBS, à des homogénats de tissu en présence de L-cystéine et de P-5-P, induit une diminution significative de la production colique de H₂S. Par ailleurs, ces mêmes auteurs ont décrit des localisations différentes dans le côlon de ces deux enzymes CBS et CSE par l'utilisation de techniques immunohistochimiques. Il apparaît ainsi que chez le rat, la CBS est présente au niveau de la *muscularis mucosae*, de la sous-muqueuse et de la *lamina propria*. Cette protéine semble par contre absente dans les cellules épithéliales et dans les cryptes. La localisation de la CSE quant à elle semble plus diffuse ; ce qui, selon les auteurs, pourrait être associée à une localisation de la protéine au niveau des vaisseaux sanguins (Martin et al., 2010). Au vue des données bibliographiques rapportées sur les enzymes de production de H₂S, il semblerait qu'il existe une différence d'expression de ces enzymes en fonction des espèces étudiées. Les deux enzymes de production de H₂S sont encore mal connues dans les cellules coliques humaines (Linden et al., 2008). D'autres études sont nécessaires afin de progresser dans ce domaine.

La production endogène colique de H₂S est dépendante de la vitamine B. Une alimentation dépourvue de vitamine B (B6, B12 et B9) et contenant du sulfathiozole un inhibiteur de la formation de folates par la flore bactérienne, abolie complètement la production de H₂S par les cellules du côlon chez des rats après 6 semaines de régime (Flannigan et al., 2011).

Par ailleurs, il a été suggéré que les BSR de la lumière colique pourraient contribuer à la production de H₂S mesuré *in vitro* dans des échantillons de tissu colique (Linden et al., 2010). Ceci est attribué au fait que le H₂S libre peut diffuser au travers de la membrane apicale des colonocytes. Cette hypothèse a été contestée par le travail de Flannigan et al. (2011) qui a développé des arguments en faveur de l'absence de contribution du H₂S bactérien au H₂S mesuré dans des échantillons de côlon *in vitro*. En effet, les auteurs n'ont observé aucune différence significative de synthèse du H₂S colique entre des souris axéniques dépourvues de microbiote intestinal et des souris conventionnelles. De plus, la production de H₂S par le tissu du côlon enflammé augmente proportionnellement avec la sévérité de l'inflammation alors que le H₂S fécal reste inchangé.

3. Effets de H₂S dans le côlon

Une importante littérature s'est concentrée sur l'étude de l'effet du H₂S dans le côlon.

3.1. Effets de H₂S sur les mitochondries

3.1.1. Mitochondrie

Les mitochondries sont des organites de taille de l'ordre du micron, présents dans toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes. Ces organites sont caractérisés par une structure protéique très complexe. Ils ont leur propre génome qui ne code qu'une fraction minime des protéines mitochondriales telles que certaines parties des complexes de la chaîne respiratoire et des enzymes du cycle de Krebs. La mitochondrie possède deux membranes délimitant un espace inter membranaire qui a une composition proche de celle du cytoplasme et un espace matriciel. La membrane externe est constituée de 50% de lipides polaires et 50% de protéines, et est perméable aux ions et à de nombreuses petites molécules. La membrane interne, repliée en crêtes est imperméable à la majorité des ions H⁺. Les seules espèces qui traversent cette membrane le font via des transporteurs. La composition de la membrane interne mitochondriale diffère des autres membranes biologiques avec seulement 20% de lipides et 80% de protéines.

La fonction la plus connue des mitochondries est la fourniture d'énergie à la cellule via la synthèse d'ATP. Un individu ayant une ration journalière de 3000 kcal synthétise l'équivalent de son poids en ATP chaque jour. Outre la synthèse d'ATP, d'autres réactions fondamentales s'y déroulent telles que le cycle de Krebs ou la β-oxydation. La mitochondrie est impliquée dans d'autres fonctions cellulaires telle la production des ROS et l'apoptose, la thermogenèse, l'homéostasie du calcium, et dans de nombreuses voies anaboliques comme la synthèse de l'hème et des stéroïdes. Nous ne traiterons dans ce chapitre que le rôle des mitochondries dans la respiration.

- **Phosphorylation oxydative**

La respiration se fait au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elle constitue l'étape finale de la dégradation des substances alimentaires qui aboutit à la réduction de l'oxygène en eau grâce aux électrons donnés par les coenzymes réduits lors des réactions cataboliques couplées à la synthèse d'ATP.

Le catabolisme des glucides, acides aminés et acides gras va permettre la réduction de coenzymes (NAD⁺ et FAD). Ces équivalents réduits sous forme de NADH⁺H⁺ et FADH₂ sont les intermédiaires centraux du métabolisme mitochondrial. Leur oxydation permet

d'alimenter la chaîne respiratoire en électrons et en protons ; leur réduction est nécessaire au fonctionnement de nombreuses enzymes. Ils se comportent comme une source d'électrons rapidement transférables dans les cellules. Les électrons passent à travers une série de transporteurs membranaires avec un système enzymatique complexe.

La chaîne respiratoire (figure 19) est composée de complexes protéiques localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle catalyse une succession de réactions d'oxydoréduction. Les électrons vont transiter du composé ayant le plus faible potentiel redox (NAD^+) vers des molécules à plus fort potentiel pour arriver jusqu'à l'oxygène ayant le potentiel le plus élevé. Les électrons proviennent soit de l'oxydation du NADH au niveau de la NADH-ubiquinone oxydoréductase (Complexe I), soit de l'oxydation du succinate au niveau de la succinate-ubiquinone oxydoréductase (Complexe II). Ils sont ensuite transférés à l'ubiquinone qui sert de transporteur mobile d'électrons et de H^+ . Le Coenzyme Q va ensuite céder les électrons aux cyt b-c1 (ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase) (Complexe III) qui va les transférer à un autre transporteur mobile le cytochrome c. La cytochrome c oxydase (Complexe IV) permet finalement le transfert des électrons du cytochrome c réduit à l'oxygène moléculaire (O_2), dernier accepteur d'électrons de la chaîne respiratoire. Parallèlement, le flux d'électrons à travers les complexes I, III, IV est accompagné d'un flux de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Pour chaque paire d'électrons transférés à l' O_2 4 protons sont pompés au niveau du Complexe I, 4 protons au niveau du complexe III et 2 au niveau du Complexe IV. L'énergie du transfert des électrons est conservée dans le gradient de protons et est à l'origine d'un potentiel d'énergie chimique due à la différence de concentration de H^+ (la matrice devient plus basique) et d'un potentiel d'énergie électrique dû à la séparation de charge (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement). Une partie de l'énergie libre du transfert des électrons est utilisée pour pomper les H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'ATP synthase utilise également cette force protonmotrice pour produire de l'ATP à partir de l'ADP et du P_i . Ce couplage entre l'oxydation des substrats et la synthèse d'ATP par la force protonmotrice est appelée phosphorylation oxydative et est à la base de la théorie chimio-osmotique émise par Mitchell dès 1961.

- **Complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire**

- ***Complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase***

Le complexe I est le plus gros composant protéique de la membrane interne de la mitochondrie (Schagger and von Jagow, 1991). Il possède 46 sous-unités dont 7 sont codées par l'ADN mitochondrial et 39 par l'ADN nucléaire (DiMauro and Schon, 2003). L'assemblage

de ces sous-unités constitue deux domaines majeurs. Le domaine hydrophile codé par le génome nucléaire contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide et huit ou neuf centres fer/soufre constituant le centre catalytique de l'enzyme. Le domaine hydrophobe est constitué des sept sous-unités NADH déshydrogénase (ND) codées par le génome mitochondrial et contient le site de réduction des quinones et la machinerie de pompage des protons. Ce complexe catalyse le transfert des électrons (2 électrons) issus de l'oxydation du coenzyme NADH, H⁺ qui a lieu sur la face matricielle de la membrane par la NADH-déshydrogénase vers l'ubiquinone. L'inhibiteur du complexe I classiquement utilisé est la roténone. Elle agit au niveau du domaine hydrophobe du complexe, vraisemblablement au niveau du site de fixation de l'ubiquinone (Degli Esposti, 1998).

Complexe II : Succinate-déshydrogénase ou succinate-ubiquinone Oxydoreductase

Le complexe II est composé de 4 sous-unités codées par le génome nucléaire. Les sous-unités SDH (succinate déshydrogénase) A et B constituent le domaine hydrophile localisé dans la matrice mitochondriale tandis que les sous-unités SDH C et D permettent d'ancrer le complexe à la membrane interne. Le complexe II catalyse la ré-oxydation du succinate en fumarate qui, par l'intermédiaire de l'oxydation de FADH₂ et de la réduction de l'ubiquinone, permet de transférer 2 électrons au complexe III (complexe b-c1). Ce transfert d'électrons est le seul à ne pas être couplé à un efflux de protons. Le complexe II est inhibé par le malonate et le thénylthiofluoroacétone. Le malonate empêche l'utilisation du succinate et le thénylthiofluoroacétone inhibe le transfert d'électron des centres fer/soufre vers l'ubiquinone (Hatefi, 1985).

Complexe III : Complexe b-c1 (ubiquinone-cytochrome c oxydoreductase).

Il est constitué de 11 sous-unités dont trois portent les quatre groupements prosthétiques. Ainsi, les 2 cytochromes b (bL et bH) sont associés à la sous-unité 3, le cytochrome c1 appartient à la sous-unité 4 et le centre fer/soufre est contenu dans la sous-unité 5. Seule la sous-unité 3 comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial. Le pool des quinones permet un transfert d'électrons à un deuxième transporteur mobile situé dans l'espace intermembranaire, le cytochrome c qui relie le complexe III au complexe IV. Ce transfert d'électrons est également associé à un efflux de protons. Le complexe III est inhibé par l'antimycine ou le myxothiazol.

Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Ce complexe contient 13 sous unités, les cytochromes a et a3 ainsi que deux atomes de cuivre CuA et CuB. Les sous unités cytochrome c oxydase I, cytochrome c oxydase II et cytochrome c oxydase III sont codées par le génome mitochondrial et forment le site actif du complexe ou centre binucléaire composé d'un noyau hème (cytochrome a3) associé à un atome de cuivre (CuB). Le complexe IV catalyse la dernière réaction d'oxydoréduction entre le cytochrome c et l'O₂ qui est réduit en H₂O par 4 électrons. Ce transfert d'électrons est irréversible, contrairement à celui qui a lieu dans les complexes I, II et III mais est aussi associé à un efflux de protons faisant de ce complexe le dernier site de couplage de la mitochondrie. Après réduction totale du complexe (4 électrons), l'oxygène se lie au niveau du site actif et est réduit en eau. La réduction du dioxygène en eau consomme 4 protons et l'énergie cédée par les électrons permet de transloquer 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'activité de ce complexe est inhibée par le cyanure de potassium (KCN) ou l'azide de sodium (NaN₃).

ATP synthase

L'ATP synthase est parfois considérée comme le 5^{ème} complexe de la chaîne respiratoire. Il est composé de deux sous complexes F₀ et F₁ et est également appelé F₁-F₀ ATPase. La partie F₀ est ancrée dans la membrane interne mitochondriale et forme un canal qui permet le passage des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice (Fillingame and Divall, 1999). Cette partie est composée de cinq sous-unités. Le domaine catalytique F₁ se trouve dans la matrice mitochondriale au contact de la membrane interne. Il utilise le gradient de protons pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. Ce domaine est composé de cinq types de sous-unités. L'ajout d'oligomycine permet d'augmenter le potentiel de membrane et de mesurer une respiration en condition non phosphorylante qui n'est pas couplée à la synthèse d'ATP.

L'ATP est synthétisé dans la matrice et est exporté dans le cytoplasme où il sera consommé. Deux transporteurs sont impliqués : le transporteur de phosphate inorganique et l'antiport ATP/ADP. En présence d'ADP (état 3), l'ATP produit par la mitochondrie est utilisé dans différents mécanismes cellulaires tels que la synthèse de protéines, le fonctionnement des pompes Na⁺/K⁺-ATPase et Ca²⁺-ATPase, lors de la néoglucogenèse ou pour la contraction musculaire avec l'actinomyosine-ATPase (Rolfe and Brown, 1997).

- **Rendement de la phosphorylation oxydative**

Le rendement de la phosphorylation oxydative, qui peut être mesuré par le rapport entre les flux d'ATP et d'oxygène (JATP/JO) est plus faible avec FADH₂ qu'avec NADH,H⁺. L'oxydation phosphorylante est contrôlée par la concentration en ADP extramitochondriale, ce qui révèle un rôle régulateur de l'adénine nucléotide translocase qui permet la sortie de l'ATP et l'entrée de l'ADP dans la mitochondrie. Toutefois, l'ADP extramitochondriale n'est pas le seul paramètre contrôlant la phosphorylation oxydante. D'autres facteurs jouent des rôles déterminants tel est le cas de la concentration extra-mitochondriale en phosphate inorganique (Pi) et l'approvisionnement en H⁺, fourni par les différents substrats et l'activité de la cytochrome c oxydase (Tager et al., 1983).

- **Fuite des protons**

La vitesse de la respiration dépend donc de la vitesse de phosphorylation, les deux mécanismes étant couplés. Cependant, la synthèse d'ATP n'est pas parfaitement couplée à la consommation d'oxygène dans les mitochondries. En effet, la membrane interne mitochondriale n'est pas totalement imperméable, permettant une fuite de protons (figure 19 et 20). Les fuites membranaires diminuent la force protomotrice et induisent une baisse de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante. Elle rend compte d'une oxydation sans contrepartie énergétique. Cette dernière a été observée dans tous les tissus étudiés et serait responsable de 20% de la consommation d'oxygène. Cette conductance aux protons est maximale quand la mitochondrie ne synthétise pas d'ATP, c'est-à-dire quand le gradient électrochimique est élevé. Comme la vitesse de respiration mitochondriale est régulée par la valeur du gradient électrochimique de protons, on parle de contrôle respiratoire, ainsi, quand le gradient de protons est élevé, le pompage des protons et donc l'oxydation des substrats devient plus difficile ; la respiration est alors ralentie (Brand, 2000; Murphy, 1989; Rolfe and Brand, 1996). Cet état, nommé 4, est obtenu en inhibant l'ATP synthase (avec l'oligomycine) ou en absence d'ADP ou de phosphate inorganique. Par contre, la fuite de protons est minimale lorsque la synthèse d'ATP a lieu (état 3).

3.1.2. Effets de H₂S

- **H₂S : substrat et inhibiteur de la cytochrome c oxydase**

H₂S constitue à la fois un substrat et un inhibiteur de la cytochrome c oxydase (Nicholls and Kim, 1981; Nicholls and Kim, 1982). La cinétique d'inhibition de cette enzyme par effet de H₂S est très complexe. Trois molécules de H₂S sont requises pour inhiber une molécule de la cytochrome c oxydase (Nicholls and Kim, 1982). La forme inhibée de la

cytochrome c oxydase est liée à 2 molécules de H₂S au niveau de son centre binucléaire hème a₃/Cu_B. Une molécule de H₂S est liée à la forme réduite de Cu_B et l'autre à la forme oxydée de l'hème a₃ (Hill et al., 1984). L'interaction de H₂S avec la cytochrome c oxydase (figure 21) permet également l'oxydation de H₂S en soufre élémentaire (Petersen, 1977). L'inhibition de la cytochrome c oxydase se produit immédiatement après addition de H₂S. Elle est non compétitive avec l'oxygène et est observée à des concentrations faibles de l'ordre du nanomolaire. La cytochrome c oxydase isolée est inhibée de façon réversible avec une constante *K_i* de 0,2μM similaire à celle rapportée pour le cyanure (HCN) (Petersen, 1977). Une concentration inférieure à 1μM de H₂S inhibe l'activité de la cytochrome c oxydase purifiée (Nicholls and Kim, 1981). Les résultats de Leschelle et al. (2005) ont rapporté une diminution de 50% de l'activité de cette enzyme mitochondriale dans des homogénats de cellules coliques humaines et des colonocytes de rats perméabilisés en présence de 0,3μM de NaHS (figure 22). Une exposition chronique de l'enzyme au H₂S aux concentrations variant entre 0.1 et 0.5mM induit une inhibition irréversible de son activité causée par une déstabilisation structurale de la protéine ce qui accélérerait la dégradation des sous unités (Di Meo, 2011).

- **Effets sur la respiration mitochondriale**

Comme cité précédemment, le H₂S est connu pour affecter l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le H₂S à la concentration de 10μM induit une inhibition de 50% de la respiration de mitochondries isolées de foie de poulet (Yong and Searcy, 2001). Par ailleurs, la concentration de 50μM de NaHS inhibe complètement la consommation d'oxygène de mitochondries isolées de cerveau, de foie, de cœur et de rein de rat, en présence de succinate comme substrat (Hildebrandt, 2011). L'effet de H₂S dans les mitochondries est très complexe et ceci du fait qu'à de faibles concentrations, il stimule la consommation d'oxygène des cellules et augmente le potentiel de membranes (Cooper and Brown, 2008). Il est considéré comme le premier substrat minéral métabolisable identifié pour les cellules de mammifères (Gouvern et al., 2007). En effet, dans l'étude de Gouvern et al. (2007), une infusion de NaHS sur des cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} perméabilisées entraîne une augmentation de la consommation d'oxygène des cellules (2,14±0,30 nmol O₂/minute/10⁶ cellules). Cette augmentation est tout à fait comparable à la consommation d'oxygène mesurée en présence de substrats endogènes tels le succinate (3,48±0,21nmol O₂/minute/10⁶ cellules) ou le L-alpha-glycerophosphate (2,37±0,10 nmol O₂/minute/10⁶ cellules). Il est intéressant de souligner également que cet effet était observé dans les cellules coliques humaines CaCo2 et dans des colonocytes isolés de rat. Aucune stimulation

n'a cependant été notée dans les entérocytes de rat ou dans les cellules CHO (Gouvern et al., 2007).

- **Autres effets**

Le H₂S peut induire une importante production des ROS dans les mitochondries des cellules pouvant être à l'origine d'une cytotoxicité mitochondriale (chapitre I). Cependant, cette production de ROS par effet de H₂S n'a pas été observée pour tous les types cellulaires. Aucune production nette des ROS n'a été observée dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} suite à un traitement des cellules pendant 24 h en présence de NaHS 1mM (Leschelle et al., 2005). Par ailleurs, une étude de Thompson et al a rapporté de plus, un effet de NaHS (1,1 mM) sur le pore de transition mitochondrial (*mitochondrial permeability transition pore* MPTP) dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat pouvant également médier un effet toxique de H₂S sur les mitochondries (Thompson et al., 2003). L'effet de H₂S sur la production des ROS et sur le MPTP semble contribuer à l'induction de l'apoptose rapportée pour H₂S pour dans certaines cellules.

3.2. Effets sur les cellules épithéliales coliques

Les effets les plus marqués sur les cellules épithéliales coliques sont les effets sur le métabolisme oxydatif et sur la prolifération cellulaire (Leschelle et al., 2005).

3.2.1. Effets sur le métabolisme oxydatif

Roediger. (1980) a décrit un effet du H₂S sur l'inhibition de l'oxydation des AGCC dans des cellules épithéliales coliques humaines (Roediger, 1980). Des années plus tard, l'équipe de Roediger a décrit un effet de NaHS à une concentration similaire à celle retrouvées chez l'Homme (1 à 2mM) sur la diminution de la β-oxydation des acides gras dans des colonocytes isolés de rat et des colonocytes humains (Babidge et al., 1998; Jorgensen and Mortensen, 2001; Roediger et al., 1993a). Cette inhibition a été observée dans un autre travail à une concentration de 100μmol/L de NaHS dans des colonocytes de rats (Roediger et al., 1993b). Le travail de Leschelle et al. (2005) a montré de plus, une inhibition de l'oxydation du n-butyrate mais aussi de celle de L-gultamine et de l'acétate dans des cellules HT-29 Glc^{-/+} exposées pendant 1,5 heure au NaHS (1mM) (figure 23) (Leschelle et al., 2005). Le H₂S agit sur l'oxydation du butyrate via la butyryl CoA deshydrogenase, une flavoprotéine de transfert des électrons, importante pour la β-oxydation (Moore et al., 1997; Roediger, 1982; Shaw and Engel, 1987). Cependant, l'inhibition de cette enzyme n'est pas la seule cible, il apparaît que le H₂S inhibe également l'acyl-CoA deshydrogénase (Babidge et al., 1998). De plus, l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase semble contribuer

aussi à l'effet de H₂S sur l'oxydation du butyrate (Leschelle et al., 2005). L'inhibition du métabolisme oxydatif des AGCC induirait un déficit énergétique (baisse de la concentration intracellulaire en ATP) puis la mort des cellules par nécrose. La libération des composés intracellulaires participerait au déclenchement de l'inflammation associée à la RCH. Ainsi, l'hypothèse de «déficience énergétique» avancée par Roediger. (1980) a tenté d'établir un lien entre les effets du H₂S sur le métabolisme des cellules épithéliales et l'étiologie des RCH.

3.2.2. Effets sur la prolifération

Des données de la littérature ont associé le H₂S à un effet hyperproliférant (hyperplasique) sur les cellules coliques. L'étude de Christl et al. (1996) réalisée *ex vivo* sur des biopsies coliques humaines prélevées à partir du côlon rectosigmoïde chez des sujets sains, a permis de mettre en évidence l'effet hyper proliférant de H₂S (figure 24). Dans ce travail, les auteurs ont utilisé un marquage à la bromodesoxyuridine (un analogue des bases de l'ADN) en immunohistochimie afin de visualiser les cellules proliférantes marquées par rapport aux cellules totales tout au long des cryptes. Les cryptes ont été sectionnées en 5 compartiments longitudinaux allant du compartiment 1 situé à la base de la crypte jusqu'au compartiment 5 qui constitue la surface de la crypte. L'incubation des biopsies coliques pendant 4 heures en présence de NaHS à la concentration de 1mmol/l, induit une hyper prolifération des cellules de cryptes (une augmentation d'à peu près 54% des cellules proliférantes) et une expansion de la zone proliférante au niveau de la base des cryptes (Christl et al., 1996). L'expansion de la prolifération à la base des cryptes est considérée par certains auteurs comme un bio marqueur de modifications préneoplasiques (Lipkin, 1991).

Récemment, l'étude de Deplancke et Gaskins (2003) a montré que dans des cellules IEC-18 (une lignée de cellules intestinales non transformées originaire de crypte de rat), une exposition au NaHS (0,2 à 5mM) pendant 4 heures augmente la fraction des cellules proliférantes caractérisées par cytométrie de flux. L'augmentation des cellules en prolifération semble être médiée par l'activation de la voie de signalisation des MAPK qui active l'expression du facteur de transcription *c-Jun*. Selon ces auteurs, il semblerait que le H₂S en inhibant/réduisant la respiration mitochondriale induirait un état « d'hypoxie » qui serait à l'origine de l'activation de cette voie de signalisation. Ces observations ont conduit les auteurs à suggérer que le H₂S pourrait être à l'origine d'une dérégulation de la prolifération de l'épithélium et pourrait ainsi contribuer aux maladies du côlon (RCH et CCR). Cependant, une activation similaire de l'expression de *c-Jun* a été rapportée dans des cellules pendant les phases précoces de l'apoptose. Il est alors possible que les cellules considérées comme proliférantes dans ce travail soient des cellules entrant en phases précoce d'apoptose

d'autant plus que l'apoptose dans ce travail a été observée pour des doses de NaHS supérieures à 5mM (Deplancke and Gaskins, 2003).

En outre, l'étude de Leschelle et al. (2005) a montré une diminution de l'activité proliférante des cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} traitées aux concentrations de 0,3 ou 1mM de NaHS (figure 25) (Leschelle et al., 2005). Dans cette étude, ces résultats ont été interprétés en termes d'épargne d'ATP par ralentissement de la division cellulaire (et donc des voies de l'anabolisme consommatrices d'ATP) de manière à empêcher une chute du contenu intracellulaire d'ATP, chute à l'origine des phénomènes de nécrose cellulaire.

Il paraît important de souligner que les effets rapportés de H₂S sur la prolifération cellulaire, l'hyper prolifération mais également l'apoptose sont hétérogènes et pourraient dépendre du modèle cellulaire, des doses de H₂S utilisées et de la durée du traitement.

3.3. Effets au niveau du côlon

3.3.1. Effets sur la physiologie

Le H₂S exerce des effets dans le côlon. Les publications nombreuses sur le sujet, ont abouti à des conclusions parfois contradictoires. Le H₂S joue un rôle dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse colique. Des effets sur le flux sanguin et sur la sensibilité viscérale ont été décrits pour le H₂S (Revoir la revue de Li. (Li et al., 2011)). Une étude récente a montré qu'un traitement au H₂S atténue la nociception et la perception de douleurs chez des rats soumis à des distensions colorectales (DCR). Un effet qui semble être médié par les canaux K_{ATP} dépendants et par le monoxyde d'azote (Distrutti et al., 2006).

3.3.2. Implication dans les maladies du côlon

- **H₂S et RCH**

La RCH est une maladie multifactorielle dont les causes restent inconnues. Cependant, les progrès des connaissances dans ce domaine permettent de s'orienter vers une association entre des facteurs environnementaux (alimentation, infections, microbiote) et une prédisposition génétique pouvant entraîner une cascade de réactions aboutissant à l'apparition de la maladie (Podolsky, 2002). Comme cité précédemment, l'hypothèse de déficit énergétique avancée par Roediger et. (1980) a permis de proposer un lien possible entre le H₂S et RCH. D'autres résultats expérimentaux et observations cliniques, décrits dans la littérature ont incriminé le H₂S dans le risque de développement ou de récurrences des RCH. La présence de BSR dans les fèces d'une plus grande proportion de sujets atteints de RCH par rapport à la population générale a été considéré par Gibson et al.(1990) comme un

argument pour associer le H₂S à la maladie de RCH (Gibson et al., 1990). A cette argumentation s'ajoute la présence de H₂S à des concentrations plus importantes dans les fèces de sujets atteints de RCH par rapport aux sujets sains. De plus, une maladie similaire à la RCH a été induite expérimentalement chez des animaux de laboratoire nourris avec des polysaccharides sulfatés comme le S carraghénanes et le sodium dextran sulfate (Kitano et al., 1986; Watt and Marcus, 1970). Par ailleurs, des recherches cliniques récentes ont montré que chez des patients atteints de rectocolite hémorragique en rémission, une alimentation riche en protéines ou en sulfates pourrait via une augmentation du H₂S luminal favoriser les risques de rechute (Jowett et al., 2004). En effet, le risque relatif de récurrence est de 3 fois plus élevé chez des patients consommant des régimes riches en protéines par rapport à ceux recevant un apport modéré en protéines et en sulfates. Cependant, un éventuel consensus sur les effets pro inflammatoire du H₂S sur la muqueuse colique est loin d'avoir été fait.

De fait, des travaux récents rapportent un effet protecteur de H₂S contre l'inflammation. Dans un modèle expérimental d'inflammation chez le rat, la synthèse de H₂S augmente jusqu'à 100 fois avec la survenue de l'inflammation puis décline après rémission. L'inhibition de la synthèse de H₂S exacerbe la maladie alors que l'administration d'agents libérant du H₂S favorise la rémission et accélère le processus de réparation et de guérison. Ceci s'explique sans doute par l'effet suppresseur de H₂S sur l'expression des médiateurs pro inflammatoires tel le TNF α (Fiorucci et al., 2007; Wallace et al., 2009). De plus, un effet de donneurs de H₂S sur l'inhibition de l'adhésion leucocytes-endothélium et sur la réduction de la formation d'œdème a été observé (Szabo, 2007; Zanardo et al., 2006). Là encore, l'hétérogénéité des résultats provient probablement en grande partie des différents modèles expérimentaux utilisés dans les études, des différentes formes de « donneurs de H₂S » utilisés et des doses employées.

- **H₂S et cancer colorectal**

Les résultats des travaux d'Attene-Ramos et al.(2006, 2007, 2010) suggèrent un rôle génotoxique du H₂S. Le H₂S pourrait ainsi être associé à une instabilité génomique et à une accumulation de mutations génétiques dans les cellules (Attene-Ramos et al., 2007). A l'heure actuelle des connaissances, aucun lien direct n'est établi entre le H₂S et le développement du cancer colorectal (Attene-Ramos et al., 2007).

4. Détoxification de H₂S dans le côlon

La muqueuse intestinale (colique) peut servir de barrière efficace et empêcher (ou réduire) la pénétration du H₂S exogène susceptible de passer dans la veine porte à destination du foie. La couche de mucus ainsi que la sécrétion de bicarbonates réduiraient significativement l'exposition des cellules au H₂S (Roediger et al., 1984). De plus, l'adhérence des cellules épithéliales à la membrane basale ainsi que la présence de jonctions entre les cellules, peuvent également constituer un autre système de défense contre le H₂S luminal.

Par ailleurs et comme cité précédemment, le H₂S peut être métabolisé dans les tissus (figure 26). Il peut être en effet, oxydé par la mitochondrie ou méthylé dans le cytosol. Ces deux voies sont considérées comme des voies de détoxification de H₂S car elles génèrent des produits moins toxiques que le produit initial. De plus, la liaison de H₂S à la méthémoglobine pour former la sulfhémoglobine (ou sa liaison à la myoglobine pour former la sulfmyoglobine) constitue également, une troisième voie de métabolisme du H₂S (Beauchamp et al., 1984; Kajimura et al., 2010; Li and Moore, 2007; Pietri et al., 2011; Szabo, 2007).

De nombreuses études réalisées sur des cellules ou sur des modèles animaux rapportées dans la littérature attestent du rôle des cellules coliques dans la détoxification active de H₂S. En effet, il a été déterminé qu'environ 300µM de H₂S sont détoxiqués quotidiennement chez le rat par la muqueuse colique (Jorgensen and Mortensen, 2001).

4.1 Méthylation de H₂S

La méthylation de H₂S est catalysée par l'enzyme Thiol S-méthyltransférase et nécessite la présence du cofacteur S-adenosyl méthionine (Roediger et al., 1997; Weisiger et al., 1980). La méthylation permet la conversion de H₂S en méthane-thiol (CH₃SH) puis ce dernier est converti en diméthylsulfure (CH₃SCH₃) (Furne et al., 2001; Weisiger et al., 1980). Les données concernant la méthylation de H₂S par la muqueuse colique rapporte une activité estimée à 10⁻¹³ mol/min par milligramme de protéines (Weisiger et al., 1980). Cette activité est faible comparée à l'activité de métabolisation de H₂S en thiosulfates dans le caecum de rat rapportée par Suarez et al. (1998) qui est estimée à 10⁻⁷ mol/min (Suarez et al., 1998a). Ainsi, la réaction de méthylation est loin d'être la voie principale de métabolisation/détoxification de H₂S dans la muqueuse colique. D'autres arguments en faveur de cette considération, ont été proposés par Suarez et al. (1998) (figure 27).

4.2. Oxydation en thiosulfate

Les premières indications de la labilité métabolique de H₂S proviennent de l'étude de Bartholomew et al.(1980). Une oxydation de H₂S a été mise en évidence *ex vivo* dans des organes isolés en utilisant du sulfure de sodium marqué (Na₂³⁵S). Selon ces mêmes auteurs, l'oxydation générant du sulfate et du thiosulfate très efficace dans le foie de rat, l'est moins dans le rein ou le poumon où il existe très peu d'oxydation (Bartholomew et al., 1980).

L'oxydation du H₂S en thiosulfate semble être la principale voie de détoxication de H₂S dans les cellules épithéliales coliques (Beauchamp et al., 1984; Blachier et al., 2010; Furne et al., 2001; Levitt et al., 1999; Wilson et al., 2008). En effet, l'instillation intra caecale de H₂³⁵S chez le rat par l'équipe de Levitt. (1999) a révélé que virtuellement, tout le H₂S absorbé était oxydé en thiosulfate. Le thiosulfate retrouvé au niveau de la veine porte pouvait par la suite être oxydé en sulfate dans le foie (Levitt et al., 1999). Par ailleurs, une étude réalisée sur des volontaires sains exposés à des concentrations différentes de H₂S sous forme de gaz (8, 18 et 30ppm) pendant une période de 30 à 45 minutes a rapporté une augmentation des concentrations de thiosulfate dans les urines chez ces sujets exposés au H₂S (Kangas and Savolainen, 1987). L'oxydation mitochondriale de H₂S en thiosulfate sera traitée en détail dans le chapitre III.

Pour récapituler :

De cette partie de recherche bibliographique, nous pouvons ressortir 3 principaux points :

A. Le côlon représente un environnement complexe renfermant des concentrations considérables de H₂S. Le H₂S est généré à la fois par des réactions biochimiques au cours du métabolisme de la cystéine mais également au cours du métabolisme anaérobie du soufre par les bactéries sulfato réductrices du côlon. La présence d'un système de détoxication de H₂S permet aux colonocytes se trouvant à l'interface entre la lumière colique et le milieu interne, de maintenir les concentrations de H₂S à des niveaux physiologiques. Le comportement de H₂S vis-à-vis des cellules épithéliales coliques, en tant que molécule toxique ou en tant que substrat énergétique dépend de l'équilibre entre la production de H₂S et son oxydation par les enzymes de détoxication du H₂S.

B. La littérature nous présente des données et des résultats qui nous laissent penser que l'effet de H₂S dans la cellule ou dans le côlon dépendrait largement de son effet au niveau de la mitochondrie. En effet, La mitochondrie est l'organite de détoxication de H₂S et

est donc le compartiment où se gèrent la régulation des concentrations intracellulaires de H₂S.

C. Les différents effets biologiques de H₂S dans les cellules épithéliales coliques (ou dans la mitochondrie) que nous venons de détailler, ont principalement été établis *in vitro* dans des cellules coliques ou *ex vivo* sur des muqueuses coliques en exposant ces modèles expérimentaux au H₂S seul (ou à des donneurs de H₂S). Comme cité précédemment, le H₂S inhibe l'oxydation du butyrate. Il semble ainsi primordial de s'intéresser aux effets combinés de H₂S et du butyrate sur les cellules épithéliales coliques. Ces deux métabolites étant présents dans la lumière colique. Le butyrate étant un agent de différenciation vis-à-vis des cellules épithéliales coliques, il semble également important d'évaluer les capacités métaboliques des colonocytes vis-à-vis du H₂S en fonction du degré de différenciation de ces cellules.

III. Oxydation/détoxication mitochondriale de H₂S dans les cellules épithéliales coliques

1. Oxydation/détoxication de H₂S dans les mitochondries

L'oxydation mitochondriale de H₂S a été bien étudiée chez les organismes marins vivants dans des milieux riches en H₂S. Chez ces organismes, les électrons générés par l'oxydation de H₂S rejoignent la chaîne de transport des électrons selon les espèces étudiées au niveau du pool de l'ubiquinone, du complexe III (ubiquinol-cytochrome-c oxydoreductase) ou au niveau du cytochrome c jusqu'à la cytochrome c oxydase avec l'oxygène représentant l'accepteur final d'électrons (Grieshaber and Volkel, 1998; Powell and Somero, 1986; Volkel and Grieshaber, 1996). Il s'en suit ainsi une production d'ATP mais également de thiosulfate (Volkel and Grieshaber, 1996). L'oxydation de H₂S est ainsi couplée à la phosphorylation oxydative de la chaîne de transport des électrons et à la production d'ATP. Il est intéressant cependant de souligner, que ce couplage -autrement dit le transfert des électrons générés par l'oxydation de H₂S vers la chaîne de transport des électrons et le pompage de protons nécessaire à la production d'ATP- ne se fait qu'en présence de faibles concentrations de H₂S ne dépassant pas les 10 ou 20µM selon les espèces étudiées. Ce couplage diminue en présence de fortes concentrations de H₂S jusqu'à l'inhibition complète observée à 50µM (Volkel and Grieshaber, 1996).

Une oxydation mitochondriale similaire de H₂S couplée à la production d'ATP a été mise en évidence dans des études relativement récentes dans le foie de poulet. Ce résultat a laissé les auteurs suggérer que ce phénomène intervenait dans de nombreuses espèces indépendamment de l'adaptation aux environnements riches en H₂S (Yong and Searcy, 2001). De plus, une oxydation mitochondriale de H₂S a été également décrite chez les mammifères, dans des hépatocytes et des colonocytes de rat mais aussi dans des cellules coliques humaines (Furne et al., 2001; Gubern et al., 2007; Hildebrandt and Grieshaber, 2008b).

Les données de la littérature traitant l'oxydation mitochondriale de H₂S permettent de faire ressortir deux composantes importantes de cette fonction commune à de nombreuses espèces vivantes. On a d'une part, la chaîne respiratoire qui a pour rôle de transférer les électrons issus de l'oxydation de H₂S vers les différents accepteurs de la chaîne. Et on a d'autre part, les trois enzymes de détoxication de H₂S qui semble agir en une seule unité fonctionnelle qu'on peut qualifier de « *sulfide oxidation unit* » (ou unité d'oxydation du H₂S) et dont la finalité est la détoxication de H₂S et sa transformation en thiosulfate. Ainsi, les

frontières entre les notions d'oxydation et de détoxication de H₂S restent *a priori* difficiles à définir.

1.1. Implication de la chaîne respiratoire mitochondriale

Chez les mammifères, l'accepteur des électrons issus de l'oxydation de H₂S est le coenzyme Q, l'intermédiaire entre le complexe I et le complexe III. L'oxydation d'une molécule de H₂S libère 2 atomes d'hydrogènes (2 électrons et 2 protons) qui, via la réduction du coenzyme Q va permettre le transfert des 2 électrons jusqu'à l'atome d'oxygène qui est réduit à son tour en H₂O au niveau de la cytochrome c oxydase (figure 28) (Gouvern et al., 2007). Gouvern et al. (2007) ont proposé la présence de deux sites de consommation d'oxygène lors de l'oxydation mitochondriale de H₂S par les colonocytes. D'une part une utilisation de l'oxygène par la chaîne respiratoire pour la production d'eau au niveau de la cytochrome c oxydase (complexe IV), et d'autre part une utilisation de l'oxygène pour la formation des composés soufrés oxygénés par les enzymes de détoxication du H₂S. La stœchiométrie de consommation d'oxygène par la chaîne mitochondriale a une valeur théorique de 0,5 (0,5 atome d'oxygène ou 1/2 O₂ est consommé pour oxyder une molécule de H₂S) (Gouvern et al., 2007)..

1.2. Implication des enzymes de la « *Sulfide oxidation unit* »

L'oxydation mitochondriale se fait en plusieurs réactions. Les réactions permettent la conversion de H₂S en persulfide, sulfite (SO₃²⁻), thiosulfate (S₂O₃²⁻) et sulfate (SO₄²⁻). Le sulfate représente entre 77 et 92% du soufre total dans les urines (Beauchamp et al., 1984).

La première étape de la voie d'oxydation est catalysée par la SQR (*Sulfide quinone oxydoreductase*), une flavoprotéine de la membrane interne mitochondriale qui oxyde H₂S en persulfide liée au résidu cystéine de la protéine (SQR) et transfère les 2 électrons au pool d'ubiquinone (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b; Theissen and Martin, 2008; Vande Weghe and Ow, 1999). La deuxième étape de la voie d'oxydation fait intervenir les enzymes de la matrice mitochondriale : la sulfure dioxygénase (ETHE1) et la thiosulfate sulfure transférase (TST) (une des isoformes de la rhodanese). La ETHE1 nécessite la présence de l'oxygène moléculaire (O₂) et d'une molécule d'eau pour 2 molécules de H₂S. Cette activité catalytique génère à partir des persulfides produits par la SQR des sulfites. Cette réaction constitue le deuxième site d'utilisation de l'oxygène. La TST rajoute un second persulfide au sulfite pour donner le produit final qui est le thiosulfate. Des thiols de faible poids moléculaire tels le glutathion ou le dihydrolipoate peuvent être impliqués dans le transfert du groupement persulfide de la SQR à la sulfure dioxygénase (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b). De plus,

il a été montré *in vitro* que le persulfide glutathion pouvait être un substrat pour la ETHE1 (Tiranti et al., 2009).

La SQR a été récemment caractérisée chez *Arenicola marina* (Theissen and Martin, 2008). Des gènes similaires au gène codant la SQR d'*A. marina* ont été décrits dans le génome de souris et chez l'Homme (Theissen et al., 2003). Cependant, au moment du commencement des travaux de cette thèse, aucune étude n'avait examiné le rôle fonctionnel de la SQR de mammifères ou de la SQR humaine. La SQR de foie de rat a un Km pour le H₂S relativement faible (2,9±0,3µM) (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b) et donc une bonne affinité pour son substrat. Ce qui suggère un catabolisme efficace de ce substrat dans les cellules de mammifères (Kabil and Banerjee, 2010).

La ETHE1 est une protéine de la matrice mitochondriale contenant un groupement fer non héminique. Une mutation au niveau du gène *ethe1* codant pour la sulfure dioxygnase entraîne une encéphalopathie éthylmalonique, une pathologie à transmission autosomique récessive (Tiranti et al., 2004). La perturbation génétique de la ETHE1 entraîne chez la souris une accumulation de H₂S ainsi qu'une réduction du niveau et de l'activité de la cytochrome c oxydase de certains tissus (colonocytes, muscle et cerveau). De plus, l'accumulation de H₂S suite à un déficit en expression de ETHE1 est à l'origine d'une inhibition du métabolisme énergétique aérobie et peut expliquer certaines manifestations cliniques liées à l'encéphalopathie éthylmalonique tel l'acrocyanose et les altérations vasculaires (Tiranti et al., 2009). La ETHE1 purifiée catalyse la consommation d'oxygène dépendante du glutathion persulfide. Elle interagit physiquement avec la rhodanese suggérant que les deux enzymes agissent en un seul complexe pour convertir le persulfide liée à la SQR en thiosulfate (Kabil and Banerjee, 2010). A cette argumentation s'ajoute la présence de fusion entre les gènes codant pour les deux enzymes dans le génome de certaines bactéries (Tiranti et al., 2009).

La TST a été d'abord décrite pour avoir un rôle dans la détoxication du cyanure (Westley et al., 1983). Récemment, le rôle de cette enzyme dans la détoxication de H₂S dans les cellules coliques humaines a été démontré (Picton et al., 2002; Ramasamy et al., 2006; Wilson et al., 2008). Picton et al. (2002) avaient proposé un rôle de la rhodanèse dans la détoxication de H₂S. Selon ces mêmes auteurs, cette enzyme catalyserait la formation de thiocyanate à partir de cyanure et de H₂S (Picton et al., 2002). Il est à présent consensuel de considérer que le rôle de cette enzyme de détoxication de H₂S dans les cellules coliques humaines est indépendant de la présence de cyanure considéré par de nombreux auteurs comme non physiologique (Wilson et al., 2008). Cependant, le travail de Ramasamy et al. (2006) a rapporté que des deux iso enzymes décrites pour la sulfure transférase, à savoir la

thiosulfate sulfure transferase (TST) et la mercaptopyruvate sulfure transferase (MST), seule la TST est impliquée dans la détoxification de H₂S dans les cellules coliques humaines (Ramasamy et al., 2006). D'autres auteurs suggèrent au contraire l'implication de la MST mais aussi de la CAT (une autre enzyme du catabolisme de la cystéine) dans l'oxydation mitochondriale de H₂S. Cependant, l'accepteur naturel du groupement sulfure n'est pas connu avec certitude mais il pourrait s'agir de la thioredoxine dans le cas de la MST (Nandi and Westley, 1998; Westrop et al., 2009).

Le sulfite, produit de la réaction de la sulfure dioxygénase peut être oxydé directement en sulfate par la sulfite oxydase. De façon alternative, le sulfite peut être converti en thiosulfate par la rhodanese, thiosulfate qui pourrait ensuite être métabolisé en sulfate via l'action de la thiosulfate réductase et de la sulfite oxydase (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b; Muller et al., 2004). Une métabolisation du thiosulfate en sulfate a été également rapportée dans les mitochondries de foie de rat (Bartholomew et al., 1980; Cohen et al., 1972).

La sulfite oxydase est une hémoprotéine contenant un groupement molybdoptérim. Un déficit d'expression de la sulfite oxydase entraîne des perturbations neurologiques sévères (Mudd et al., 1967).

2. Mécanismes d'adaptation mitochondriale au H₂S

En présence de fortes concentrations de H₂S, l'effet inhibiteur de H₂S sur la cytochrome c oxydase devient important et entraîne une inhibition complète de la respiration cellulaire. L'inhibition de la cytochrome c oxydase empêche les électrons générés par l'oxydation de H₂S de passer dans la chaîne de transport des électrons : vers le complexe III et la cytochrome c oxydase. Dans ces conditions, des mécanismes alternatifs d'adaptation peuvent intervenir au niveau de la mitochondrie afin de permettre la détoxification de H₂S même quand celui-ci est présent à de fortes concentrations. Dans ce contexte, le ver marin *A. marina* représente un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes d'adaptation au H₂S car il constitue le seul système connu qui ne soit pas inhibé par le H₂S. En effet, l'étude réalisée chez *A. marina* a décrit en présence de concentrations de H₂S supérieures à 10μM et donc inhibitrice de la cytochrome c oxydase chez cet animal, un transfert des électrons libérés de l'oxydation de H₂S vers une oxydase terminale alternative et insensible au H₂S et qui à son tour transfère les électrons directement aux molécules d'oxygène (figure 29). L'oxydase terminale alternative permet de produire de l'eau sans passer par la

phosphorylation oxydative ; et donc sans production concomitante d'ATP (Volkel and Grieshaber, 1996). La nature de cette enzyme n'est pas encore connue.

Par ailleurs, d'autres travaux se sont intéressés aux mécanismes d'adaptation des mitochondries de cellules de mammifères. Aucune oxydase alternative n'a été décrite dans les cellules de mammifères ou les cellules humaines. En revanche, d'autres mécanismes alternatifs ont été proposés.

2.1. Adaptation des cellules coliques humaines au H₂S

Peu d'études ont examiné l'adaptation mitochondriale des cellules coliques humaines au H₂S. Une voie alternative a été proposée par Gubern et al. (2007) dans des cellules HT-29 Glc^{-/+} incubées pendant 12 minutes dans une solution de NaHS infusée à raison de 28nmol HS⁻/minute/5x10⁶ cellules. Les auteurs ont observé une inhibition complète de la respiration mitochondriale de ces cellules associée à une augmentation significative de la concentration intracellulaire en succinate et une diminution de celle du malate dans les cellules incubées en présence de NaHS (figure 30). Ces résultats ont permis aux auteurs de suggérer la mise en place d'un transfert des électrons issus de l'oxydation de H₂S vers le complexe II qui résulterait en une réversion partielle du cycle de Krebs et une réduction du malate en succinate (Gubern et al., 2007). La signification physiologique de cette voie alternative n'est pas encore claire. D'un point de vue théorique, l'envoi des électrons issus de l'oxydation de H₂S vers le complexe II (ou vers une oxydase alternative observée chez *A.marina*) prévient leur accumulation au niveau de la chaîne de transport des électrons (Leschelle et al., 2005; Pun et al., 2010). En outre, la réversion de la réaction au niveau du complexe II pourrait prévenir l'accumulation des substrats destinés à la phosphorylation oxydative et permettre ainsi aux substrats de prendre une autre voie métabolique, la voie de la glycolyse par exemple (Leschelle et al., 2005)). Par ailleurs, une exposition des cellules HT-29 Glc^{-/+} au NaHS (1mM) pendant une durée de 24 heures, considérée par les auteurs comme une exposition à long terme, entraîne la mise en place de réponses métaboliques adaptatives dans les cellules traitées. Ces réponses contribueraient au maintien de la viabilité cellulaire. Les auteurs, Leschelle et al. (2005) ont rapporté une inhibition de l'activité enzymatique de la cytochrome c oxydase et de la respiration cellulaire dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} traitées au NaHS (Leschelle et al., 2005). Cependant, le niveau intracellulaire en ATP et ADP dans ces cellules n'était pas affecté par l'incubation en présence de NaHS. Leschelle et al. (2005) ont rapporté dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} traitées au NaHS, une libération de lactate associée à une augmentation de la glycolyse anaérobie qui pourrait avoir pour objectif la compensation partielle de la baisse de la production d'ATP altérée par effet

de H₂S. De plus, un ralentissement des phases du cycle cellulaire et de la prolifération a été également observé dans les cellules traitées au NaHS. Ce ralentissement pourrait constituer un autre moyen utilisé par les cellules afin de diminuer les dépenses énergétiques en ATP liées à la division cellulaire et aux voies métaboliques de biosynthèse associées permettant ainsi de maintenir un niveau intracellulaire stable d'ATP. De fait, il est bien connu qu'une chute brutale du contenu cellulaire en ATP est susceptible d'entraîner la mort cellulaire par nécrose. Par ailleurs, il a été également observé dans les cellules traitées au NaHS, une augmentation des niveaux d'expression de la protéine de découplage UCP-2 et une diminution de l'expression protéique des sous unités I et II de la cytochrome c oxydase (figure 31) (Leschelle et al., 2005). Le découplage mitochondrial qui en résulte pourrait diminuer la production des ROS (Dawson et al., 1993).

Kimura et al. (2006) ont mis en évidence sur des cellules nerveuses prétraitées au H₂S, une adaptation cellulaire qui rend les cellules plus résistantes au stress oxydant induits par le H₂S. Une augmentation de la synthèse du glutathion suite aux niveaux élevés de ROS dans la cellule semble être à l'origine de cet effet (Kimura et al., 2006). Ces observations n'ont pas été retrouvées dans les cellules coliques humaines (HT-29 Glc^{-/+}) qui, au contraire, semblent plus vulnérables lorsque les cellules sont exposées deux fois au H₂S par rapport à des cellules exposées une seule fois à cet agent (Leschelle et al., 2005). Cet effet semble être dû à la présence d'une capacité de la phosphorylation oxydative dans les cellules qui serait partiellement perdue après une première exposition au H₂S. Les réponses adaptatives semblent donc dépendre des types cellulaires même s'il est nécessaire de préciser que très peu d'études ont abordé ce point.

3. Modulation de la détoxification de H₂S dans les cellules épithéliales coliques

3.1. Modulation par le butyrate

Les travaux de la littérature s'intéressant à la modulation de la fonction de détoxification de H₂S ont été principalement centrés sur les effets du butyrate, composé luminal intervenant dans de nombreuses fonctions intestinales et ayant fait l'objet de nombreuses études. Dans ce contexte, il est intéressant de citer le travail de Christ et al.(1996). Dans cette étude réalisée *ex vivo* sur des biopsies coliques humaines, les auteurs ont mis en évidence un effet antagoniste/protecteur du butyrate contre l'effet hyperproliférant du H₂S dans ce modèle (figure 24). Ainsi, une coincubation des biopsies coliques avec le NaHS (1mmol/l) et le butyrate (10mmol/l) réduit l'effet hyperproliférant rapporté

quand les biopsies son exposées au NaHS seul. Les mécanismes impliqués dans cette modulation de l'effet de H₂S ne sont pas connus.

L'étude de Ramasamy et al. (2006) a rapporté une diminution de la cytotoxicité de NaHS dans des cellules HT-29 prétraitées au butyrate. Une pré incubation des cellules HT-29 parentales pendant 24 heures avec une solution de butyrate (2 mM) suivie d'une incubation avec une solution de NaHS (1mM) pendant 24 heures diminue le nombre de cellules flottantes (mortes) et augmente celui des cellules adhérentes. De plus, une suppression de l'effet de NaHS (0,3 mM) sur la diminution de l'activité de la TST, a été également observée après prétraitement des cellules au butyrate. Il est intéressant de souligner de plus que l'effet de diminution de l'activité de la TST était observé pour des concentrations plus importantes de NaHS dans les cellules prétraitées au butyrate que dans les cellules « contrôle » suggérant ainsi une plus grande résistance des cellules à la toxicité de H₂S. En outre, l'effet du butyrate a été associé également à une augmentation de l'expression de la protéine TST (en western blot) et de son activité enzymatique (figure 32). Ces régulations semblent être médiées par l'action inhibitrice du butyrate sur les enzymes HDAC (Ramasamy et al., 2006).

3.2. Modulation par des facteurs cellulaires

Des facteurs cellulaires pourraient être présents *in vivo* dans la cellule et avoir pour rôle le contrôle de la liaison de H₂S à la cytochrome c oxydase, ce qui modulerait sa toxicité et augmenterait sa détoxification. Dans ce contexte, l'étude très récente d'Hildebrandt. (2011) a suggéré le rôle protecteur de l'acide désoxyascorbique, la forme oxydée de la vitamine C (dehydroascorbic acid :DHA) contre la toxicité de H₂S. Dans cette étude *in vitro*, le NaHS à la concentration de 50µM inhibait complètement, la respiration de mitochondries isolées de foie de rat en présence de succinate utilisée comme substrat. L'addition de DHA (1mM) a permis la réversion de cet effet inhibiteur de NaHS (figure 33). Par conséquent, une respiration mitochondriale a été mesurée en présence de la forme oxydée de la vitamine C même en présence de concentrations élevées de NaHS allant jusqu'à 200 µM. La valeur d'IC50 du NaHS (induisant la diminution de 50% de la respiration) était augmentée de 20 fois en présence de DHA. L'oxydation de H₂S était également augmentée dans ces expériences. L'effet protecteur de DHA semble être en partie dû à des modifications de la fixation du H₂S libre sur la cytochrome c oxydase. De fait, il semblerait qu'une liaison du DHA à la cytochrome c oxydase au niveau de l'interface entre la protéine et les autres protéines des autres complexes de la chaîne mitochondriale, entraînerait des changements conformationnels au niveau de la protéine cytochrome c oxydase; ce qui pourrait être à

l'origine d'une diminution de l'affinité de la cytochrome c oxydase pour le H₂S (Hildebrandt, 2011).

Pour récapituler :

Les études de la littérature confèrent une importance capitale aux mécanismes de détoxication de H₂S. Chez les organismes adaptés aux environnements riches au H₂S, il semble clair que l'oxydation de H₂S soit à la fois un système de détoxication et une voie de production d'énergie. Chez les mammifères et l'homme en particulier, des arguments vont dans ce sens mais des études restent encore à réaliser afin de comprendre le fonctionnement de ce système de détoxication et ses mécanismes de régulation dans le côlon. Par ailleurs, les quelques résultats obtenus à partir de travaux expérimentaux ont conduits plusieurs auteurs à proposer une hypothèse considérant qu'un dysfonctionnement de la détoxication de H₂S pourrait jouer un rôle partiel dans l'étiologie de la rectocolite hémorragique et du cancer colorectal. En effet, une étude a rapporté une réduction de l'expression génique de la TST dans des tissus cancéreux coliques comparée à des tissus sains (Birkenkamp-Demtroder et al., 2002). Une autre étude a mis en évidence la présence d'une corrélation entre les diminutions de l'expression de la TST et les niveaux d'infiltration par les cellules immunitaires dans les RCH. Le système de détoxication de H₂S semble donc être une composante importante de la physiologie et peut être de la physiopathologie du côlon.

Travaux réalisés

JUSTIFICATION DES TRAVAUX EXPERIMENTAUX

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au H₂S en tant que substrat oxydatif mais également au H₂S en tant que molécule susceptible d'exercer un effet inhibiteur sur la respiration dans la mitochondrie. Ce travail avait pour but de développer certains aspects encore peu étudiés dans la littérature.

Notre travail a consisté dans un premier temps à étudier la détoxification mitochondriale de H₂S dans les cellules humaines mais également à étudier les enzymes d'oxydation/détoxification impliquées. Au regard des différentes études réalisées sur des cellules humaines ou animales, la mitochondrie apparaît comme un organe déterminant pour le devenir de H₂S dans la cellule (Gubern et al., 2007; Hildebrandt and Grieshaber, 2008a; Hildebrandt and Grieshaber, 2008b). En effet, c'est en partie au niveau de la mitochondrie que se fait le catabolisme de H₂S mais également sa production via la voie de la MST (Pun et al., 2010). L'oxydation mitochondriale de H₂S entraîne une énergisation mitochondriale et une production d'ATP, et fait intervenir un système de détoxification impliquant la SQR et deux autres enzymes : la ETHE1 et la TST (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b). Bien que ces enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » (ou unité d'oxydation du sulfure d'hydrogène) soient bien décrites chez le ver *A.marina* et chez le rat, elles restent encore méconnues chez l'Homme. Cependant, de nombreuses données expérimentales de la littérature nous ont conduits à supposer la présence d'un système enzymatique fonctionnel similaire chez l'Homme, responsable de l'oxydation/détoxification de H₂S. Cette hypothèse de travail se base principalement sur les résultats des travaux de Gubern et ses collaborateurs montrant la présence d'une oxydation/détoxification de H₂S dans les cellules coliques humaines (Gubern et al., 2007). De plus, la production endogène de H₂S par la plupart des cellules de mammifères, y compris les cellules humaines telle que rapportée dans la littérature, associée au rôle physiologique important de H₂S en tant que molécule de signalisation agissant sur plusieurs tissus de mammifères, pourrait constituer un argument en faveur de la présence d'un système de contrôle des concentrations intracellulaires de H₂S dans de nombreuses cellules. On peut donc envisager la présence d'un système d'oxydation du H₂S dont le rôle serait de contrôler localement les concentrations de H₂S au niveau de ses sites de production mais également au niveau de ses sites d'action. Par ailleurs, les paramètres pouvant orienter les effets de H₂S en terme d'énergisation mitochondriale ou de toxicité ont été également considérés dans ce travail. Ces paramètres concernent d'une part l'existence très probable de concentration « seuil » de H₂S en dessous ou au dessus de

laquelle un des deux phénomènes, l'énergisation ou la toxicité mitochondriale prédomine, et d'autre part la tolérance des cellules vis-à-vis de H₂S.

Dans un deuxième temps, notre travail a été consacré à l'étude de l'expression des enzymes impliquées dans la « *sulfide oxidation unit* » dans les cellules épithéliales coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} et au niveau des différents segments du côlon, ce qui nous permettait en plus d'avoir une approche au niveau de l'unité fonctionnelle que représentent les cryptes et l'épithélium de surface. Les mécanismes de régulation de cette fonction de détoxification de H₂S notamment au cours de la différenciation des cellules épithéliales coliques ont été également abordés. De plus, nous avons porté un intérêt particulier à l'étude de l'adaptation des cellules coliques humaines au H₂S déjà évoquée lors de travaux précédents (Gubern et al., 2007; Leschelle et al., 2005). Les données bibliographiques dans ce contexte, nous ont amené à considérer les enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » au centre des mécanismes d'adaptation des colonocytes vis-à-vis du H₂S.

Enfin, comme le contenu luminal colique représente un environnement complexe contenant différents métabolites bactériens et éléments non digérés et/ou non absorbés en provenance de l'alimentation ; nous avons émis l'hypothèse que des composants de la lumière colique pouvaient moduler, prévenir ou au contraire accentuer la toxicité de H₂S. Nous avons donc examiné le rôle des cations divalents susceptibles de modifier la concentration luminale de H₂S libre sur la détoxification de H₂S dans les cellules coliques humaines. Nous avons de plus testé l'effet d'un prétraitement au NaHS sur l'oxydation de H₂S par les cellules coliques humaines. En effet, un rôle de NaHS (H₂S) dans l'induction de l'enzyme de détoxification TST a été rapporté dans les cellules HT-29 parentales par l'équipe de Ramasamy (Ramasamy et al., 2006). Par ailleurs, au regard du rôle globalement bénéfique du butyrate à doses physiologiques sur les différentes fonctions du côlon (Hamer et al., 2008), mais également du rôle protecteur de cet acide gras à courte chaîne sur la toxicité liée au H₂S (Christl et al., 1996); nous avons émis l'hypothèse d'un rôle protecteur potentiel du butyrate contre la toxicité de H₂S dans les cellules épithéliales coliques.

ELEMENTS DE CHOIX METHODOLOGIQUES

1. Choix des concentrations de NaHS utilisées et du mode d'exposition

Dans ce travail, nous avons examiné la capacité des cellules à oxyder le H₂S en utilisant deux modes d'exposition au NaHS, utilisé comme source soluble de H₂S. Dans notre premier article, les cellules ont été exposées à une infusion continue et contrôlée de solution de NaHS. Le but de l'infusion était d'obtenir un état d'équilibre stable « steady state » entre la délivrance continue de H₂S et son oxydation par les cellules ou par les mitochondries isolées. En utilisant ce mode d'exposition, tout le H₂S délivré peut être immédiatement oxydé par la préparation cellulaire et, de façon intéressante, l'arrêt de l'infusion entraîne un retour immédiat à la valeur de consommation d'oxygène basale. Cependant, la concentration de NaHS appliquée ne peut être déterminée avec précision avec ce mode d'exposition. Par conséquent, pour cette approche nous raisonnons en flux de NaHS utilisé et non en concentration.

Dans les expériences présentées dans notre deuxième article, nous avons utilisé une approche différente de celle utilisée dans l'article 1. Les cellules ont été exposées au NaHS par additions uniques de concentrations de NaHS dans la chambre de l'oxygraphe contenant les cellules. Bien que ce mode d'exposition soit différent de l'infusion, il offre l'avantage de pouvoir déterminer avec plus de précision les concentrations de NaHS auxquelles sont exposées les cellules (au moins en début d'incubation) facilitant ainsi l'attribution d'un effet biologique observé à une concentration initiale donnée de H₂S. Ce mode d'exposition facilite la comparaison des résultats obtenus avec les données rapportées dans la littérature. En effet, les études traitant des effets de H₂S dans la bibliographie, utilisent surtout des expositions à des concentrations précises de H₂S qui mimeraient l'exposition au H₂S dans les conditions physiologiques. Il est important de souligner également que pour certaines expériences dans l'article 1 et notamment pour la détermination des concentrations toxiques de H₂S, les cellules (cellules CHO transfectées ou cellules Jeg3) ont été exposées à des concentrations uniques de NaHS.

2. Choix des modèles cellulaires utilisés

Dans notre travail expérimental, nous avons utilisé des lignées de différents phénotypes cellulaires (CHO, HT-29 Glc^{-/+}, THP1...). Les lignées cellulaires offrent l'avantage

d'être faciles à maintenir en culture et à manipuler. Nous avons également utilisé des mitochondries isolées à partir de tissus sains de souris pour confirmer les résultats obtenus avec les lignées cellulaires. Notre objectif était d'être certain d'attribuer les effets observés aux phénotypes cellulaires utilisés, et non pas aux modifications/anomalies qualitatives du métabolisme cellulaire provoquées par l'immortalisation des cellules des lignées cellulaires, ni aux conditions de leur culture. Par ailleurs, concernant nos expériences de mesure d'oxydation de H₂S réalisées sur des cellules, nous avons jugé judicieux d'utiliser des cellules intactes qui, contrairement aux cellules perméabilisées (utilisées précédemment par notre équipe dans l'étude de Gubern et al. (2007)), nous permettaient de nous rapprocher davantage des conditions physiologiques. De plus, nous avons consacré une bonne partie de notre travail à l'étude de l'oxydation de H₂S dans les cellules épithéliales coliques humaines. Nous avons en particulier choisi d'utiliser les cellules HT-29 Glc^{-/+} comme modèle. Cette lignée cellulaire très utilisée dans notre laboratoire est, compte tenu de ses caractéristiques métaboliques proches de celles des colonocytes sains, appropriée pour l'étude et la mise en évidence des phénomènes métaboliques caractérisant les cellules coliques humaines saines (Leschelle et al., 2005).

3. Evaluation de la capacité des cellules à oxyder le H₂S

Notre méthode d'évaluation de la capacité des cellules à oxyder le H₂S a consisté en la mesure de la consommation d'oxygène par polarographie concomitante à l'injection à débit constant de NaHS ou survenant après addition unique d'une concentration de NaHS. Notre démarche expérimentale a été élaborée suite aux observations faites au cours des études précédentes réalisées par notre équipe. En effet, une variation (stimulation ou inhibition) quantifiable de la consommation d'oxygène due à l'oxydation de H₂S ou à l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase a été observée par polarographie dans des cellules coliques humaines en présence de NaHS. La stimulation de la consommation d'oxygène lors de l'oxydation de H₂S serait directement liée à l'activité de la « *sulfide oxidation unit* » via une consommation d'oxygène au niveau de l'enzyme ETHE1 d'une part et à l'activité de la chaîne respiratoire via une consommation d'oxygène au niveau de la cytochrome c oxydase d'autre part. Cette méthode de mesure de consommation d'oxygène permet ainsi d'apprécier globalement le fonctionnement des enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » mais aussi le fonctionnement des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale en utilisant des inhibiteurs spécifiques dans la chambre de l'oxygraphe.

ARTICLE 1

Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes.

Article paru dans *Biochimica et Biophysica Acta*.

Vol 1797 n°8. Pb 1500-1511. (2010)

Emilie Lagoutte, **Sabria Mimoun**, Mireille Andriamihaja, Catherine Chaumontet, François Blachier et Frédéric Bouillaud

1. Contexte et objectifs

L'oxydation de H₂S est effective chez les organismes adaptés aux environnements riches en soufre. Chez les mammifères, l'oxydation du sulfure d'hydrogène implique la coopération entre la SQR, la ETHE1 et la TST en une entité d'oxydation de H₂S « *sulfide oxidation unit* ». L'oxydation de H₂S consomme de l'oxygène. Elle est associée chez le rat à la phosphorylation oxydative avec l'entrée des électrons du H₂S au niveau du pool d'ubiquinone et à une production d'ATP et du thiosulfate. Les données expérimentales obtenues chez le ver *A. marina* et chez le rat ont permis de proposer un schéma théorique selon lequel 1,5 moles de O₂ sont consommées pour oxyder 2 moles de H₂S. Alors que 1/2 de O₂ est utilisé au niveau de la cytochrome c oxydase pour réduire l'oxygène en H₂O, le double c'est-à-dire 1 O₂ est utilisé au niveau de la ETHE1/TST pour donner une mole de thiosulfate H₂S₂O₃. La valeur théorique de stœchiométrie est estimée à 1.5 divisé par 2 soit 0,75 (Grieshaber and Volkel, 1998; Hildebrandt and Grieshaber, 2008b). La première étape d'oxydation est catalysée par la SQR qui est liée à la membrane interne et transfère les électrons au pool d'ubiquinone. L'étude de Hildebrandt et al. (2008) a rapporté une inhibition complète de l'oxydation de H₂S par le myxothiazole un inhibiteur du complexe III de la chaîne de transport des électrons, démontrant ainsi que l'oxydation de H₂S se fait exclusivement via la chaîne respiratoire en aval du complexe III dans des mitochondries de foie de rat (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b). En s'appuyant sur ces résultats et ceux obtenus par notre équipe montrant une oxydation de H₂S dans les cellules coliques humaines, il paraissait possible de présumer la présence d'une SQR fonctionnelle dans les cellules humaines. De plus, un gène homologue présentant une similitude de séquence avec

le gène codant la SQR chez les bactéries et dont la fonction n'était pas connue chez l'homme avait été détecté dans le génome de mammifères (Theissen et al., 2003). Aucune étude dans la littérature n'avait examinée le rôle de ce gène au début de ma thèse. L'objectif de notre travail était donc dans un premier temps de déterminer la fonction du gène présumé codant la SQR humaine. Pour ce faire un vecteur exprimant *SQRDL*, le gène candidat déterminé *in silico* à partir des bases de données, a été introduit dans une lignée de cellules de mammifère CHO. Dans un deuxième temps, notre objectif était d'examiner l'oxydation de H₂S en mesurant la consommation d'oxygène en présence de NaHS des cellules CHO transfectées ou non avec le gène de la SQR humaine. Nous avons également mesuré les capacités à oxyder le H₂S des cellules d'autres phénotypes (HT-29 Glc^{-/+}, THP1...) ainsi que des mitochondries isolées à partir de différents tissus de souris.

2. Matériels et méthodes

Dans ce travail, des cellules CHO ont été transfectées avec un vecteur d'expression pcDNA3 dans lequel la séquence du gène candidat *SQRDL* a été insérée afin d'obtenir une lignée cellulaire CHO stable exprimant le gène de la SQR humaine. L'expression du gène a été vérifiée par qPCR. Dans le but d'examiner la fonction présumée de ce gène, nous avons mesuré la consommation d'oxygène des cellules CHO transfectées à l'aide d'un oxygraphe orobros à 37°C en présence d'une solution de NaHS infusé à raison de 10 à 80 nl/sec pendant une période de 2 à 5 min. La consommation d'oxygène de cellules d'autres phénotypes cellulaires a été également mesurée. La capacité des cellules à oxyder le H₂S a été déterminée dans différentes conditions : dans les conditions basales (sans aucun agent exogène), mais également en présence de roténone (5µM) un inhibiteur du complexe I de la chaîne mitochondriale permettant d'inhiber la consommation d'oxygène due à l'oxydation des substrats organiques, ou encore en présence d'oligomycine (0,5µg/ml) un inhibiteur du complexe FoF1 ATP synthase mitochondriale. Les valeurs de consommation d'oxygène (JO₂) étaient données directement par le logiciel Datlab 4 software. L'augmentation de consommation d'oxygène concomitante de l'infusion de NaHS (Δ (JO₂)) a été calculée et exprimée en pmol/(s.ml). Nous avons également mesuré la capacité d'oxydation de H₂S dans des mitochondries de souris isolées à partir de différents tissus (foie, cœur, cerveau et rein). Lors d'une dernière étude de ce travail, le NADH réduit a été déterminé par fluorescence (excitation à 340nm et émission à 460nm) à l'aide d'un fluorimètre dans des cellules THP1, une lignée de cellules monocyttaire humaine caractérisée par une forte capacité à oxyder le H₂S.

3. Résultats et discussion

Ce travail démontre clairement que l'insertion du gène *SQRDL* humain homologue de la SQR bactérienne dans les cellules CHO augmente la capacité des cellules à oxyder le H₂S mais aussi leur tolérance à de fortes concentrations de ce métabolite. Ces observations confirment que le *SQRDL* code bien pour la SQR humaine et que la quantité de SQR constitue un facteur limitant pour l'oxydation du H₂S. De plus, nos résultats montrent que chez les mammifères, les mitochondries de différents types cellulaires, outre les colonocytes, sont également capables d'oxyder le H₂S. La capacité à oxyder le H₂S peut donc être maintenue même si les cellules ne sont pas dans un environnement riche en sulfure. Ce résultat est tout à fait en accord avec les données de la littérature (Bartholomew et al., 1980). De plus, la mesure de la consommation d'oxygène en présence de NaHS dans les différentes cellules nous a permis de séparer les cellules de mammifères en deux catégories : des cellules oxydant donc tolérant le H₂S et des cellules ne tolérant pas le H₂S. Il paraît également important de souligner que la plus forte activité d'oxydation de H₂S a été mesurée dans les cellules épithéliales coliques HT-29 Glc^{-/+} et qu'une consommation d'oxygène en présence de NaHS faible ou inexistante a été observée dans des cellules de neuroblastomes et dans des mitochondries de cerveau de souris. Cette dernière observation suggère une forte sensibilité des cellules nerveuses aux effets toxiques de concentrations excessives de H₂S.

Nos observations nous ont également permis de proposer la concentration de 1μM de NaHS comme étant la concentration seuil au dessus de laquelle le H₂S peut être oxydé par la SQR et utilisé comme substrat énergétique dans les cellules humaines. Des concentrations allant de 10 à 40μM peuvent selon les phénotypes cellulaires, induire une inhibition modérée à complète de la respiration cellulaire.

Par ailleurs, nos résultats indiquent également que l'oxydation mitochondriale de H₂S par la SQR humaine exprimée dans les cellules CHO et de façon similaire à celle décrite chez le ver *A.marina* et dans le foie de poulet ou de rat est couplée à la synthèse d'ATP (Hildebrandt and Grieshaber, 2008b; Volkel and Grieshaber, 1996; Yong and Searcy, 2001).

La mesure de l'oxydation du H₂S en présence de substrats carbonés (en absence de roténone) démontre que l'oxydation de H₂S est prioritaire par rapport à l'oxydation des substrats carbonés. Une interaction négative entre l'oxydation de H₂S par la SQR et l'oxydation des substrats carbonés peut être proposée : la SQR injecterait les électrons issus de l'oxydation de H₂S au niveau du coenzyme Q sans tenir compte de l'oxydation des autres substrats, et ceci sans modifier le flux d'électrons atteignant l'oxygène. La compétition entre

le H₂S et les autres donneurs d'électrons : NADH ou FADH₂ venant de l'oxydation des substrats carbonés serait ainsi efficace. Cette compétition a été suggérée d'une part par l'augmentation de la vitesse d'oxydation de H₂S observée en présence de roténone et de concentration saturante de H₂S dans des cellules CHO, et d'autre part, par l'augmentation du rapport NADH/NAD concomitante de l'addition de H₂S dans les cellules THP1. Une augmentation qui serait due à une diminution de l'oxydation de NADH par le complexe I. L'efficacité du H₂S comme substrat pour la phosphorylation oxydative garantirait sa détoxication et éviterait ainsi l'inhibition de la cytochrome c oxydase. Les cellules sont donc capables de gérer un flux continu de H₂S, aussi longtemps que la vitesse maximale d'oxydation du H₂S n'est pas dépassée.

Dans les colonocytes, contrairement aux autres cellules étudiées, la présence de roténone réduit la vitesse maximale d'oxydation du H₂S. La présence d'un complexe I fonctionnel optimiserait donc l'oxydation du H₂S. Ces résultats nous permettent de suggérer que dans les colonocytes, quand l'exposition au H₂S est élevée, le complexe I pourrait opérer dans le sens inverse du sens conventionnel de la chaîne respiratoire et accepterait les électrons venant des quinones qui vont réduire le NAD en NADH. Cette réaction redox défavorable serait balancée par un flux de protons au niveau du complexe I de l'espace intermembranaire vers la matrice. Dans ces conditions, l'oxydation de H₂S peut continuer même dans des situations d'inhibition de la cytochrome c oxydase. Par ailleurs, nos résultats montrent une valeur de stœchiométrie en présence d'oligomycine similaire à la valeur basale dans les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+}. Ce résultat est compatible avec la présence d'un découplage mitochondrial induit par le H₂S dans ces cellules.



Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes

Emilie Lagoutte^a, Sabria Mimoun^b, Mireille Andriamihaja^b, Catherine Chaumontet^b, François Blachier^b, Frédéric Bouillaud^{a,*}

^a CNRS-FRE3210, Université René Descartes, Site Necker 156 rue de Vaugirard, 75730 Paris cedex15, France

^b INRA-CRNH-IdF-AgroParisTech, UMR 914, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2010

Received in revised form 6 April 2010

Accepted 8 April 2010

Available online 14 April 2010

Keywords:

Mitochondria

Sulfide quinone reductase

Mitochondrial complex I

Detoxification

Stoichiometry

ABSTRACT

Sulfide (H_2S) is an inhibitor of mitochondrial cytochrome oxidase comparable to cyanide. In this study, poisoning of cells was observed with sulfide concentrations above $20\ \mu\text{M}$. Sulfide oxidation has been shown to take place in organisms/cells naturally exposed to sulfide. Sulfide is released as a result of metabolism of sulfur containing amino acids. Although in mammals sulfide exposure is not thought to be quantitatively important outside the colonic mucosa, our study shows that a majority of mammalian cells, by means of the mitochondrial sulfide quinone reductase (SQR), avidly consume sulfide as a fuel. The SQR activity was found in mitochondria isolated from mouse kidneys, liver, and heart. We demonstrate the precedence of the SQR over the mitochondrial complex I. This explains why the oxidation of the mineral substrate sulfide takes precedence over the oxidation of other (carbon-based) mitochondrial substrates. Consequently, if sulfide delivery rate remains lower than the SQR activity, cells maintain a non-toxic sulfide concentration ($<1\ \mu\text{M}$) in their external environment. In the colonocyte cell line HT-29, sulfide oxidation provided the first example of reverse electron transfer in living cells, such a transfer increasing sulfide tolerance. However, SQR activity was not detected in brain mitochondria and neuroblastoma cells. Consequently, the neural tissue would be more sensitive to sulfide poisoning. Our data disclose new constraints concerning the emerging signaling role of sulfide.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

1.1. Sulfide and living matter

Sulfide is an inhibitor of cytochrome oxidase activity as potent as cyanide [1]. An aqueous solution of sulfide contains hemisulfide anion (HS^-) sulfide ion S^{2-} and dissolved H_2S gas that accounts for 10–30% of total sulfide at physiological pH [2,3]. H_2S is uncharged and highly soluble in lipids [2], therefore it can cross cellular membranes and reach mitochondria. To defend themselves against excessive sulfide concentrations, cells have no other possibility than destroying or complexing [3] this poison. However, oceanic ridges are places where oxidation of this mineral compound is the primary source of energy [4]. In fact this chemotrophic pathway is thought to be more ancient than photosynthesis. In mammals sulfide is generated either by biochemical reactions within cells [5] or by bacterial anaerobic sulfur metabolism in the gut [6]. Adaptation to a sulfide-rich environment has been well studied in invertebrates: it involves oxidation of sulfide at the mitochondrial level [7,8]. Data have been produced showing that sulfide oxidation can also take place in vertebrates and is coupled

to mitochondrial bioenergetics [9,10]. We have previously studied adaptation of colonocytes to sulfide [11] and shown that they are able to oxidize sulfide [12]. This was the first description of the use of a mineral substrate by mammalian cells. This metabolic capacity was thought to represent an adaptation of colonocytes for the survival of cells in the vicinity of the colonic lumen where sulfate-reducing bacteria continuously produce sulfide. This sulfide oxidation involved a sulfide quinone reductase (SQR) activity. A candidate gene exists for this function in the mammalian genome [13].

1.2. The sulfide oxidation unit as known from invertebrates

Fig. 1 shows the relationships between the sulfide oxidation pathway as described in Ref. [8] and the other “usual” pathways of oxidation in the mitochondrial respiratory chain linked to the use of carbon-based substrates. It emphasizes that cooperation between SQR, dioxygenase and sulfur oxidase is required and this constitutes somehow a “sulfide oxidizing unit.” Several consequences of this scheme are relevant here. (i) The stoichiometry between oxygen (O_2) consumption and sulfide is 0.75 ($1.5\ \text{O}_2$ for 2 molecules of H_2S). While $0.5\ \text{O}_2$ is used at the level of cytochrome oxidase, twice as much ($1\ \text{O}_2$) is consumed by the dioxygenase/sulfur transferase pair. (ii) The capacity for sulfide oxidation of a cell with a given phenotype will depend upon the presence of the sulfide oxidizing unit and

* Corresponding author. Present address: Institut Cochin, 24 rue du Faubourg St Jacques 75014 Paris, France. Tel.: +33 1 40 61 56 71; fax: +33 1 40 61 56 73.

E-mail address: frederic.bouillaud@inserm.fr (F. Bouillaud).

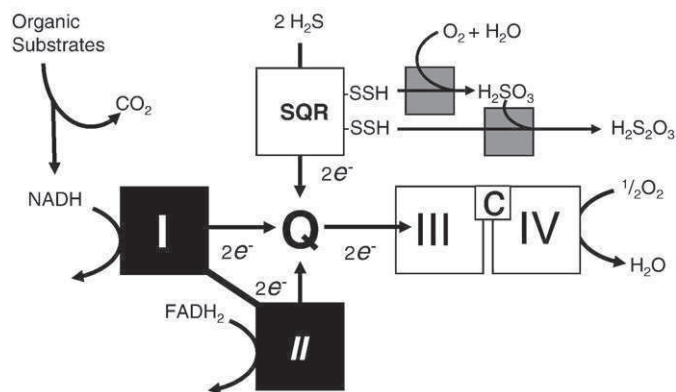


Fig. 1. Carbon and sulfide oxidation in mitochondria. Oxidation of carbon-based substrates leads to the reduction of the NAD or FAD coenzymes. The reduced forms of these coenzymes yield electrons to coenzyme Q of the mitochondrial respiratory chain. NADH is oxidized by mitochondrial complex I. Reduced FAD coenzymes yield electrons through different pathways including for example complex II (succinate dehydrogenase) and others (symbolized here as a second black box (II)). Oxidation of a given organic substrate involves several steps including NAD and FAD using complexes so that these two “black boxes” are functionally linked. Inhibition of complex I by poisoning (or mutation) dramatically reduces overall cellular oxidation (see text and Fig. 2) although the second black box is unaffected directly. The sulfide oxidizing unit acts independently. It is constituted of the sulfide quinone reductase (SQR) and of two other enzymes (greyed boxes): a dioxxygenase (top) and a sulfur transferase ensuring the final oxidation of the two disulfides (-SSH) bound to SQR into oxidized cysteine linked by a disulfide bond. This is the state of SQR able to restart a catalytic cycle.

downstream mitochondrial activities of complex III and complex IV (cytochrome oxidase), both of which pump protons to energize the mitochondrial inner membrane. The subsequent relevant events are those that control proton return (not shown in Fig. 1): these are the phosphorylation rate of ADP into ATP by the mitochondrial complex V and other pathways collectively named “leaks”. (iii) The sulfide oxidizing unit could provide electrons to the respiratory chain in the absence of any carbon related metabolism inside the cell and independently of the activity of mitochondrial complex I. In terms of quantitative bioenergetics, this sulfide oxidation pathway is certainly of marginal importance. However, the severity of the disorders linked to the loss of the mitochondrial sulfur dioxxygenase [14] indicates clearly the paramount importance of the sulfide oxidizing unit.

1.3. Aims and implications of this study

The primary aim of the present study was to introduce an expression vector with the human candidate gene (*SQRDL*) coding sequence into a mammalian cell line in order to check for the function associated with the sulfide quinone reductase activity. Another aim was to study sulfide oxidation in an experimental scheme more relevant to cellular physiology than the permeabilized preparation used before (that is more closely related to isolated mitochondria [12]). Accordingly, living cells with different phenotypes were used. Surprisingly, our study revealed that addition of sulfide to the incubation medium allowed the detection of relatively high SQR activity in many different cell types. This unexpectedly wide scattering of sulfide oxidation has to be considered with relation to the fact that sulfide is now considered as a physiologically relevant molecule with signaling properties comparable to NO [2,15].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

All chemicals, including sulfide, were purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA). Each day of the experiment, a fresh 1 M solution of sodium sulfide was prepared and diluted to prepare

working solutions of 1–5 mM. At this step, the anhydrous molecular weight of sodium sulfide was used as the hydration state of the product was unknown. Separately, the estimation of the real sulfide content was derived from estimation of the sodium content by flame spectrometry. The same batch was used for the entire study and the correction factor was determined to be 0.662.

2.2. Cellular respiration

Cells in suspension were obtained by the action of trypsin 0.25 g/L in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 g/L EDTA. The cells were resuspended in their culture medium. Cellular respiration at 37 °C was monitored with an Oroboros “O2k” (<http://www.oroboros.at/index.php?home>) equipped with the micropumps to inject sulfide solution at rates ranging between 10 and 80 nl/s for periods of 2–5 min. Oxygen consumption rates (JO2) were obtained directly from the Datlab 4 software. The calculations were made using the increase in JO2 (Δ (JO2) in pmol/(s ml) concomitant with sulfide infusion. The rate of oxygen consumption was usually determined at the end of the infusion period when the rate was stabilized at a constant value. When infusion exceeded the maximal sulfide oxidation rate of the cellular preparation, sulfide accumulated in the medium, and because of its toxicity, the respiratory rate went down to the value observed after complete inhibition of mitochondrial respiration within a few minutes/seconds. Consequently, when inhibition took place during infusion, the resulting rates are the mean value of a continuously decreasing rate. These values might be shown for providing evidence of inhibition, but were not used in any calculation, as it would be meaningless. When the concentration dependence was studied single addition of sulfide leading immediately to the expected concentration were used.

2.3. Cloning and expression of the human SQR

Starting from the sequence present in databases (gbAF042284), oligonucleotides were designed to amplify the human SQR coding sequence 5' oligo (gcatgggctcctgaagATGGTGCCACTGGTGCTG) and 3' oligo (ccgcgaattcCTAACTCATACCTAGATGAAACAACCTGC). The SQR coding sequence was inserted in the pcDNA 3 expression vector between the *Bam*H1 and *Eco*RI sites. The resulting expression vector was sequenced and used to obtain stable transformants of the CHO cell line. The expression of the human SQR gene was estimated by Q-PCR.

2.4. Isolated mitochondria

Mitochondria from various mouse tissues were prepared by differential centrifugation in a sucrose preparation medium (Tris 10 mM, EDTA 5 mM, sucrose 250 mM). Mitochondria were resuspended in a sucrose respiration medium (Tris 10 mM EDTA 5 mM sucrose 250 mM; Na Pi 5 mM; BSA 0.1%). Respiration was initiated by glutamate/malate addition and, when a stable respiratory rate was recorded, sulfide infusion was started.

2.5. Fluorimetry

The reduction state of NADH was evaluated by fluorescence (exc. 340 nm, em. 460 nm), using a Hitachi F2500 fluorimeter with #15 × 10e6 cells/ml (THP1 cells) in 2 ml of PBS buffer at 37 °C with constant stirring. The stirring resulted in single aberrant data points with a fluorescence value much higher than that of the immediately preceding and following data points. After importation of the raw data into Microsoft excel, these aberrant data points were replaced by the mean value calculated from the immediately preceding and following data points. This noise reduction procedure was limited so that less than 10% of the data points were replaced by the mean value of their immediate neighbours.

3. Results

3.1. Characteristics of sulfide oxidation in living cells

Fig. 2 shows a typical experiment of sulfide oxidation in which the flux of sulfide is determined and the flux of oxygen is calculated from the decrease in oxygen concentration. The experiments were performed in the “basal state” of living cells (no agent addition to the culture medium) or in the presence of rotenone (an inhibitor of mitochondrial complex I), which reduced oxygen consumption to about 10% of the basal state. The first two infusions of sulfide were accompanied by a concomitant increase in oxygen consumption by the cells. This increase was amplified if rotenone was present in the medium. This provides indirect evidence for the activity of mitochondrial sulfide quinone reductase and is thus in complete agreement with the established scheme (see Introduction) and with our previous publication [12]. However, the cells used here were CHO cells (hamster ovarian epithelial cells) and not colonocytes, demonstrating the presence of a quantitatively significant sulfide quinone reductase activity in these cells unrelated to the digestive tract.

Fig. 2 shows that further increase of the injection rate of sulfide resulted in an increase in oxygen consumption that lasted longer than the injection period. This indicates that sulfide was accumulated in the medium because the infusion rate exceeded the maximal sulfide oxidation rate of the cellular preparation. In these conditions, the oxygen consumption rate was not stable and after an initial increase, it decreased down to a minimal value and increased again until the final drop restoring the oxygen consumption rate in the absence of sulfide. This indicates a partial inhibition of respiration by the sulfide accumulated in the medium. When this inhibition starts it is self-amplified as it decreases the oxidative sulfide disposal rate while infusion continues.

In the same experiment, the same quantity of sulfide was also added as a single shot which resulted in a 26 μM concentration in the incubation medium. In the absence of rotenone, this resulted in an immediate inhibition of cellular oxygen consumption with a decrease down to 25% of the value recorded before this addition. However, cellular sulfide disposal still took place, and after a long period cells recovered a sub-normal respiratory rate. The same single addition of sulfide in the presence of rotenone caused an increase in oxygen consumption, which lasted much less than the inhibition phase in the absence of rotenone. The conclusions are: (i) although a severe poisoning of the cellular respiration occurred, the process of sulfide elimination still took place through an oxygen consuming pathway. (ii) The shorter time needed for sulfide elimination in the presence of rotenone reveals a negative interaction between sulfide oxidation and

mitochondrial complex I activity. However, no such negative interaction could be deduced from the previous infusions of sulfide. The reason for that will be presented below.

3.2. Numerous mammalian cell types oxidize sulfide

The presence of SQR activity was examined in a variety of mammalian cell lines (Fig. 3). As the injection of sulfide caused an increase in cell oxygen consumption in the absence of any other addition (Fig. 2 black line), we decided to evaluate the cellular sulfide oxidation capacity in this basal state of respiration, and not in the presence of rotenone, because in physiological conditions, cells would occasionally have to deal with sulfide while having a normal respiratory activity. To facilitate comparison between cell preparations (Fig. 3), we used the following units: the stimulation of respiration relative to the initial respiratory rate (without sulfide) and a “relative sulfide exposure,” given by the ratio between sulfide infusion rate (pmol/(s ml)) and the initial respiratory rate (same units). Two types of cell lines were easily distinguished: a vast majority (12 cell types out of 16) showed a stimulation of respiration during sulfide addition while others (4 cell types) did not. The distinction could be easily seen at a relative sulfide exposure of 0.5 for which positive cells increased their oxygen consumption by about 25% (Fig. 3 histogram) whereas “negative cells” did not show any significant increase. In fact, with “negative cells,” inhibition of respiration often occurred well below this relative sulfide exposure. As expected, the human colonic carcinoma cell line HT-29 showed the highest SQR activity, but surprisingly the human monocyte (THP1) cell line and a primary culture of human myoblasts showed a high SQR activity, even slightly higher than the other colonic epithelial cell line CaCo2. The two different neuroblastoma cell lines examined proved to be negative. An experiment with two cell lines originating from plants (carrot, tobacco) showed no detectable SQR activity (data not shown).

3.3. Recombinant expression of human SQR in CHO cells

The cDNA for the human *Sqr1* gene homologous to bacterial SQR enzyme [13] was introduced in a mammalian expression vector and the stable transformants of CHO cells obtained were examined for SQR activity (Fig. 4). When the clones expressing the highest level of SQR were compared to control clones, the oxygen consumption increased almost linearly with sulfide injection rate in the SQR transformants, while the control clones could hardly increase their oxidation rate and undergo inhibition of cellular oxidation with the highest sulfide infusion rate (Fig. 4A). This confirms that the *Sqr1*

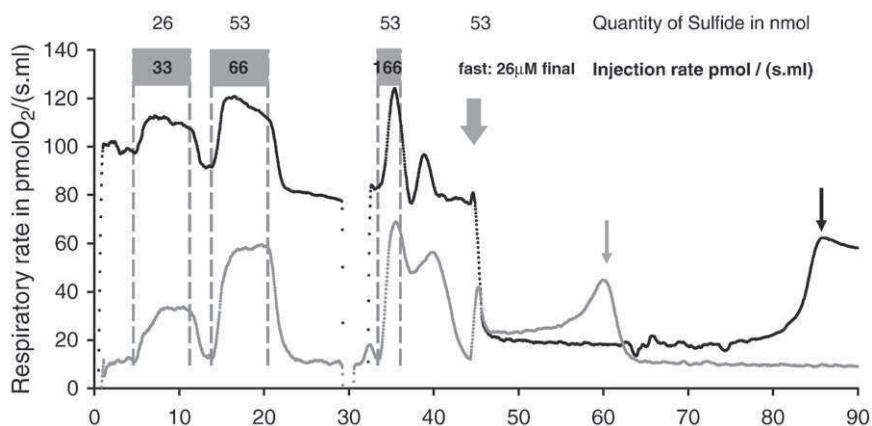
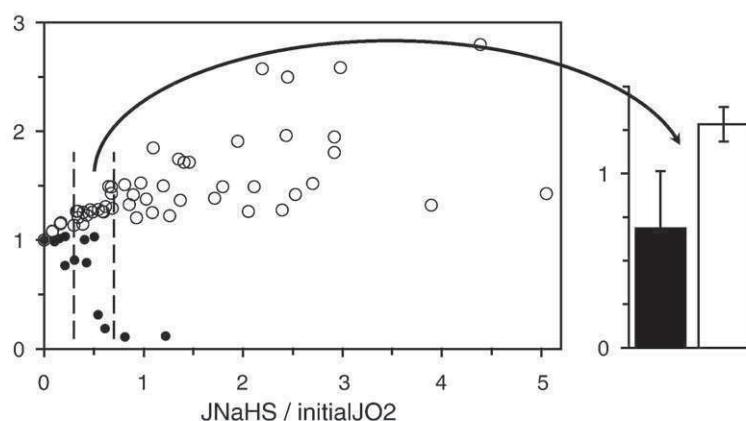


Fig. 2. Cellular respiration in presence of sulfide. CHO cells resuspended in their culture medium. X axis, time in minutes; Y axis, oxygen consumption by the cellular suspension; black, “basal state” (no addition); gray, cells poisoned by 5 μM rotenone (mitochondrial complex I is fully inhibited). The periods of sulfide infusion are shown as grayed bars, the quantity of sulfide added as well as the injection rate are indicated.



Cell type	Cell line	max stim	JNaHS / initJO2
Colonic carcinoma	HT29	2.36	2.8
Monocytes	THP1	2.33	2.7
Myoblasts	p.c.	1.96	2.4
Colonic carcinoma	CaCo 2	1.74	1.4
Mammary carcinoma	ZR75-1	1.50	0.8
Myotubes	p.c.	1.50	1.2
Hepatoma	Hep G2	1.43	0.7
Mouse macrophages	p.c.	1.43	5.0
T cell	i.c.l.	1.38	1.7
Fibroblasts	NIH 3T3	1.31	0.6
Ovarian	Hela	1.28	0.5
Ovarian	CHO	1.20	0.7
Neuroblastoma	SHS-Y5Y	1.03	0.2
Placenta	Jeg3	1.03	0.5
Neuroblastoma	N2A	1.01	0.2
Embryonic Kidney	HEK293	1.00	0.0

Fig. 3. Stimulation of cellular respiration by sulfide in various cell types. Top: the data points obtained with the different cells types (except HT-29). X axis: JNaHS/initial JO2 ratio where JNaHS is the flux of sulfide in pmol/(s ml) and initial JO2 the oxygen consumption of the cellular preparation in the absence of sulfide (same units). This is a dimensionless number that quantifies the relative sulfide exposure independently of the density of the cellular preparation. Y axis: stimulation of respiration (\times initial JO2), white dots cells showing SQR activity, black sulfide intolerant cells showing no detectable SQR activity. Experiments were stopped when inhibition of cellular oxygen consumption was observed. The data points situated between the dotted lines were used to draw the histograms shown on the left. Bottom: The different cell types examined are indicated with the maximal value of stimulation of oxygen consumption (third column) and the relative sulfide exposure at which it occurs (fourth column). The name of established cell lines is indicated, otherwise these cells are coming from primary culture (p.c.) or locally immortalized cell lines (i.c.l.). Inverted characters: cell types considered as sulfide intolerant. HT-29: 5 independent experiments, CHO cells: 3 independent experiments, the others: one experiment (in triplicate). However, Jeg3 cells were used as a negative control in several other experiments and THP1 in other experiments (Figs. 5 and 11).

gene does indeed code for the human SQR and points to SQR abundance as a limiting factor for the sulfide oxidation capacity in the CHO cells. It was duly checked that both with endogenous or recombinant SQR this mitochondrial oxidation of sulfide is coupled to ATP synthesis (Fig. 4B).

3.4. Concentration dependence

The Jeg3 cell line showing no detectable SQR activity was used to define the toxic concentration of sulfide in our experimental conditions. A concentration of 20 μ M sulfide resulted in half inhibition of cellular oxygen consumption of the Jeg3 cells (Fig. 5A). To estimate the concentration of sulfide in the medium triggering the cellular oxidation by SQR, the CHO-J cell line expressing the highest level of human SQR was used. A sublinear increase in cellular oxygen consumption was observed for concentrations of sulfide in the range 2–10 μ M (Fig. 5 bottom). It remains uncertain whether or not stimulation of cellular oxygen consumption (sulfide oxidation) took place when the concentration added was below 2 μ M. In other experiments we could estimate with the human monocyte cell line THP1 that the threshold at which sulfide oxidation starts is between 0.5 and 1 μ M in the external medium (supplementary information 1). For the sake of simplicity, we will refer hereafter to a 1 μ M threshold

for SQR activity. It is important to bear in mind that technical limitations made this estimation the maximal value for this threshold. Although cytochrome oxidase is not expected to be less sensitive to sulfide when cells are equipped with SQR, when 20 μ M sulfide was added to the SQR expressing cells CHO-J, the oxygen consumption was further increased although this parameter was not linear anymore under such an experimental condition (Fig. 5 bottom). Several reasons would explain this result: Firstly, according to the reaction scheme (Fig. 1), sulfide oxidation results in an increase of oxygen consumption, two thirds of which are not due to cytochrome oxidase activity. Secondly, this rate is the mean value of the transient increase recorded after the sulfide addition. Hence, it occurs during a continuous decrease in sulfide concentration from the desired value down to zero (in fact the threshold value). It is therefore impossible without a continuous measurement of actual sulfide concentration in the incubation medium (not presently feasible) to investigate what sulfide oxidation rate would occur if a stable sulfide concentration (for instance 20 μ M) were maintained during the experiment. However, based on our observations, we propose that a range of sulfide concentrations between 10 and 40 μ M represents a reasonable estimation of the range for which a transition between a moderately impaired and a complete inhibition of mitochondrial bioenergetics takes place. Lower sulfide concentration i.e. in the 1–5 μ M range,

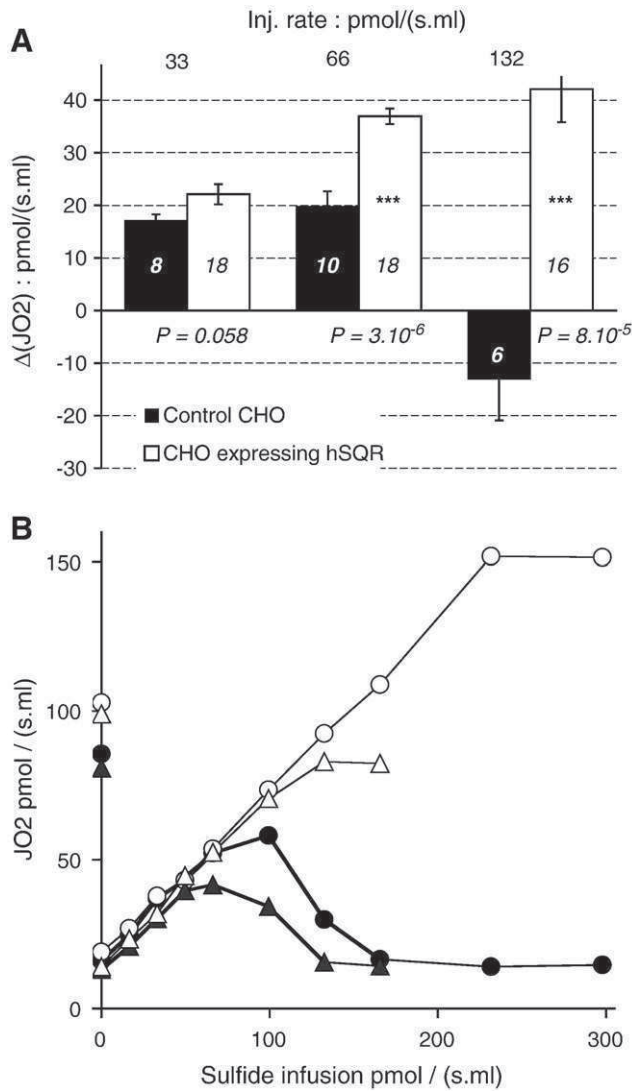


Fig. 4. Recombinant expression of the human SQR in CHO cells. A) Oxidation of and tolerance to sulfide: The graph shows the mean value \pm s.e.m. of absolute increase in respiratory rate Δ (JO₂) in pmol/(s ml) caused by the infusion of sulfide. Filled bars: The stimulation observed with four control CHO cell lines transfected with the empty vector (2 clones) or expressing the UCP2 mitochondrial protein (2 clones), mean cell density 1.39×10^6 /ml, mean oxygen consumption rate 98 pmol/(s ml). Empty bars: The six stable transformants of CHO cells with the highest levels of expression of human SQR, the mean cell density was 1.39×10^6 /ml with a mean oxygen consumption rate in absence of sulfide of 105 pmol/(s ml). Sulfide injection rate is indicated above histogram bars. The measurements at 33 and 66 values of sulfide infusion rates involved all these clones. However only 3 of the four control clones were examined at 132 pmol/(s ml). The *p* values (unpaired *t*-test) are indicated. B) Coupling of sulfide oxidation to phosphorylation: Y axis: oxygen consumption (JO₂) of the cellular preparation, X axis: Sulfide infusion. A clone of CHO cells transfected with the empty vector (black symbols) and the CHO-J cellular clone (white symbols) grown under identical conditions are shown. The basal cellular respiration was recorded and then rotenone (5 μ M) was added to inhibit mitochondrial complex 1 activity. The sulfide was infused at increased rates in absence (circles) or in presence of 0.5 μ g/ml of the mitochondrial FoF₁ ATPsynthase inhibitor oligomycin (triangles). The data shown comes from a single experiment but similar experiments were repeated (but paired \pm rotenone) for the calculation of stoichiometry as shown in Fig. 7.

would represent a “safe range” where SQR operates in the absence of significant cytochrome oxidase inhibition.

3.5. Oxidation of sulfide by mitochondria from mouse organs

To check whether oxidation of sulfide by cultured cells has a counterpart *in vivo*, mitochondria from mouse organs (liver, heart,

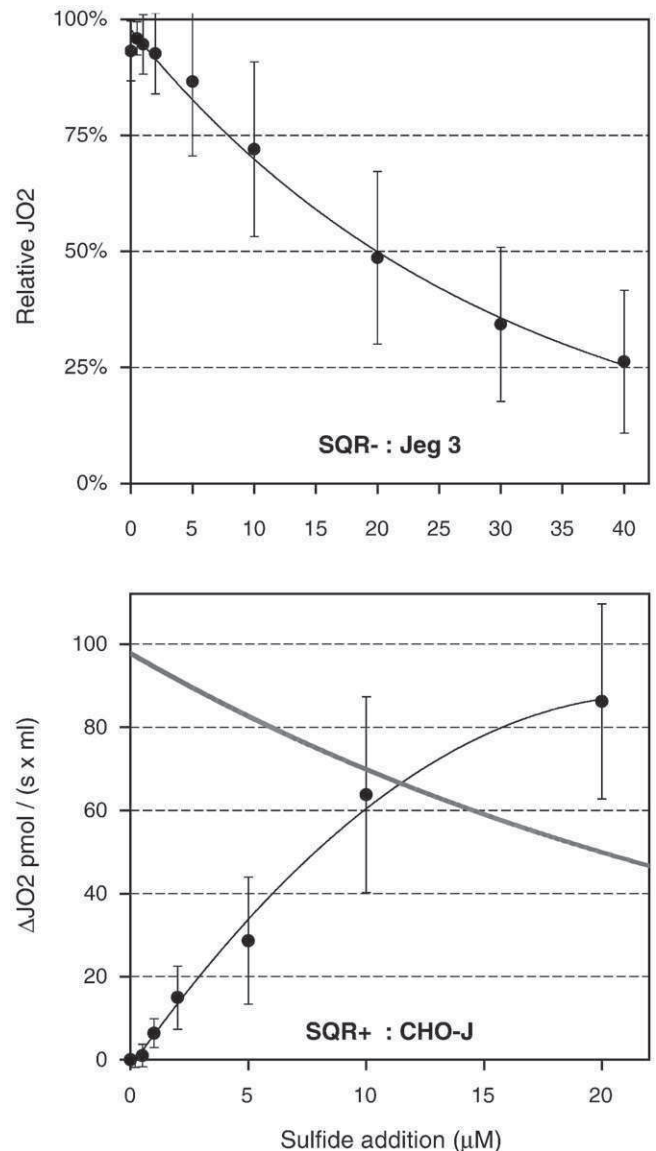


Fig. 5. Inhibition and activation of cellular respiration by sulfide. Top: Inhibition of respiration in Jeg3 cells: Jeg3 cells are unable to oxidize sulfide: in separate experiments, it was shown that there is no detectable oxygen consumption acutely triggered by sulfide addition in presence of rotenone. The oxygen consumption of Jeg3 cells was recorded in presence of increasing concentration of sulfide (acute addition from 0.5 to 40 μ M; X axis) in five experiments (three independent cell preparations). The ratio between oxygen consumption in presence/absence of sulfide is shown as % \pm mean deviation (Y axis). Exponential fitting is shown. Bottom: Concentration dependence of sulfide oxidation in the recombinant CHO-J cell line expressing the highest level of human SQR. Cells were poisoned with rotenone before sulfide addition. The same units as above are used for the X axis (note the different scale), Y axis: increase in Δ (JO₂) in pmol/(s ml) caused by sulfide addition. Data are presented as mean \pm mean deviation of four experiments (two independent cell preparations). The grey line reproduces the exponential fitting of the upper graph for comparison of inhibition range with the activation range.

brain and kidney) were examined. When these mitochondria were challenged with sulfide infusion, sulfide oxidation due to SQR activity could be found in kidney, heart and liver, but appeared to be absent or extremely low in brain (Fig. 6). This agrees with the conclusion that SQR is present in many types of mitochondria as indicated by the studies with cell lines and confirms a defect of sulfide oxidation in neural tissues. This experiment demonstrates that the presence of an active SQR in cell lines does not result from a qualitative modification of cellular metabolism brought on by immortalization or culture conditions. No optimization of the protocol was attempted and

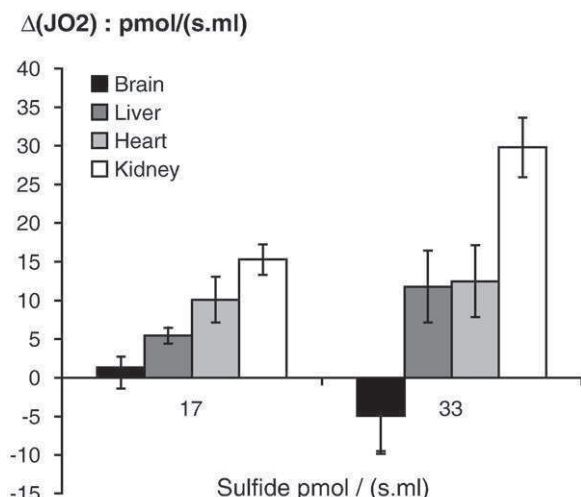


Fig. 6. Oxidation of sulfide by isolated mitochondria. The graph shows the absolute increase in respiratory rate $\Delta(JO_2)$ in pmol/(s ml) observed during sulfide injection at the rate indicated below the X axis (same units): mean values \pm mean deviation obtained with three independent mitochondrial preparations. The mean values of oxygen consumption were respectively 151, 50, 84 and 84 pmol O_2 /(s ml) for the brain, liver, heart and kidney mitochondrial preparations.

although the present study indicates relative differences between organs, their quantitative analysis remains beyond the objective of this study.

3.6. Stoichiometry of oxygen to sulfide

In the experiment shown in Fig. 2, oxygen consumption was measured and the sulfide infusion rate was controlled. The ratio between the increase in oxygen consumption and the sulfide infusion rate allowed calculation of the experimental oxygen to sulfide stoichiometry (Fig. 7). When the cellular preparation has reached its maximal sulfide oxidation rate, a moderate increase in sulfide infusion would decrease the ratio before any detectable inhibition of oxygen consumption occurs. Consequently, the decrease in calculated stoichiometry is an indication of the saturation of the sulfide oxidation pathway by the flux of sulfide imposed to the cells. This is best illustrated by the differences between the control CHO cells and CHO cells expressing human SQR. In the presence of rotenone, the cells with a high sulfide oxidation capacity showed over a wide range of sulfide injection rates a stable stoichiometry value between 0.74 and 0.89, equal to or slightly above the theoretical 0.75 value derived from the reaction scheme (Fig. 1). In the “basal state”, the value ranged from 0.5 to 0.64 and remained constant over a more restricted range of injection rates, confirming the negative interaction between mitochondrial complex I and the sulfide-oxidizing unit.

With CHO and THP1 cells and in the presence of oligomycin, the stoichiometry approached the value in the presence of rotenone and declined at significantly lower rates of sulfide infusion. This earlier decline is evidence for the mitochondrial coupling. In contrast, for the colonic epithelial cell line HT-29, the stoichiometry in the presence of oligomycin remained barely modified in comparison with the “basal state” indicating an uncoupled state of mitochondrial respiration in the presence of sulfide.

3.7. Sulfide oxidation is accompanied by an increase in the NADH/NAD ratio

The effect of rotenone with a saturating amount of sulfide suggested that mitochondrial complex I rendered sulfide oxidation slower (right end of Fig. 2). To check if the inverse is true the reduction state of NAD/NADP coenzymes was evaluated by fluores-

cence (Fig. 8A). First sulfide injections caused no inhibition of oxygen consumption (Fig. 8B) the last one (double dose) caused inhibition. Both doses of sulfide led to an increase in fluorescence indicating further reduction of NAD coenzymes. Inhibition of the mitochondrial respiratory chain results in the increase in the NADH reduction rate (see effect of rotenone in Fig. 8A). In this respect the sole observation of the increase in NADH is not a direct proof of a direct competition between SQR and complex I. However, a kinetic argument could be put forward: upon sulfide addition an immediate increase in fluorescence occurred, this increase appeared to be the same with the low and high sulfide additions. This increase was followed by a decrease in the case of low addition and by a slow increase concomitant with the oxygen consumption decrease in the case of the high addition of sulfide. This slower increase led to fluorescence value close to that obtained with the complete inhibition of mitochondrial complex I with rotenone. It appears therefore likely that the onset of the sulfide oxidation by SQR had the immediate consequence to set the NADH/NAD ratio to a new value at which complex I could still drive electrons in the respiratory chain while SQR operates. Then according to the sulfide concentration present the inhibition of cytochrome oxidase would take place or not.

3.8. Rotenone recouples sulfide oxidation in colonocytes

The comparison of the maximum fluxes of oxygen and sulfide in the HT-29 cells are compared in Fig. 9. In the presence of rotenone (white bars), the addition of oligomycin reduced the amount of oxygen consumed, an effect which was not observed in the absence of rotenone (black bars). Therefore, in the absence of rotenone, mitochondrial respiration was largely uncoupled and addition of rotenone restored the coupling. The changes in stoichiometry caused by rotenone or oligomycin (Fig. 7) could be misleading, and at least complicate the figure with regard to a normal coupled/uncoupled transition where the difference should be seen in the presence of oligomycin (Fig. 9 top right) but not in its absence (Fig. 9 top left). The maximal sulfide consumption rate is not subject to this complication. Consistent with the oxygen data, the decrease induced by oligomycin is greater and becomes statistically significant only in the presence of rotenone (Fig. 9 bottom). Moreover, in the presence of oligomycin, the maximal sulfide oxidation rate is decreased when complex I is inhibited by rotenone (Fig. 9 bottom right). Consequently, in the presence of oligomycin, the presence of a functional complex I increased sulfide oxidation by SQR in HT-29 cells. This contrasts sharply with the other cell types where the use of rotenone revealed that mitochondrial complex I had adverse effects on the SQR activity (Figs. 2, 7).

4. Discussion

4.1. Physiological concentrations of sulfide

The mitochondrial sulfide oxidation takes place within living cells if the concentration of sulfide in the medium is above a threshold estimated in the 0.5–1 μ M range. The cells have therefore a rather high affinity for sulfide. Actually, the affinity of the SQR enzyme is even higher and was estimated to be lower than 0.1 μ M in permeabilized HT29 cells [12]. Although the flux of sulfide oxidation can be high [12], its concentration has to be maintained very low since 0.3 μ M in the vicinity of mitochondrial cytochrome oxidase is sufficient for half inhibition of this enzyme [11]. Therefore, the concentrations evidenced previously with permeabilized cells or enzymatic preparations (<0.3 μ M) differ from those evidenced here 1–10 μ M (Fig. 5) by at least an order of magnitude. In all our experiments, sulfide was given as the sodium salt of the hemisulfide (HS^-) anion that by protonation can generate H_2S . While H_2S is permeant, the plasma membrane and/or its potential (negative inside) is a barrier to anion entry. It is unclear

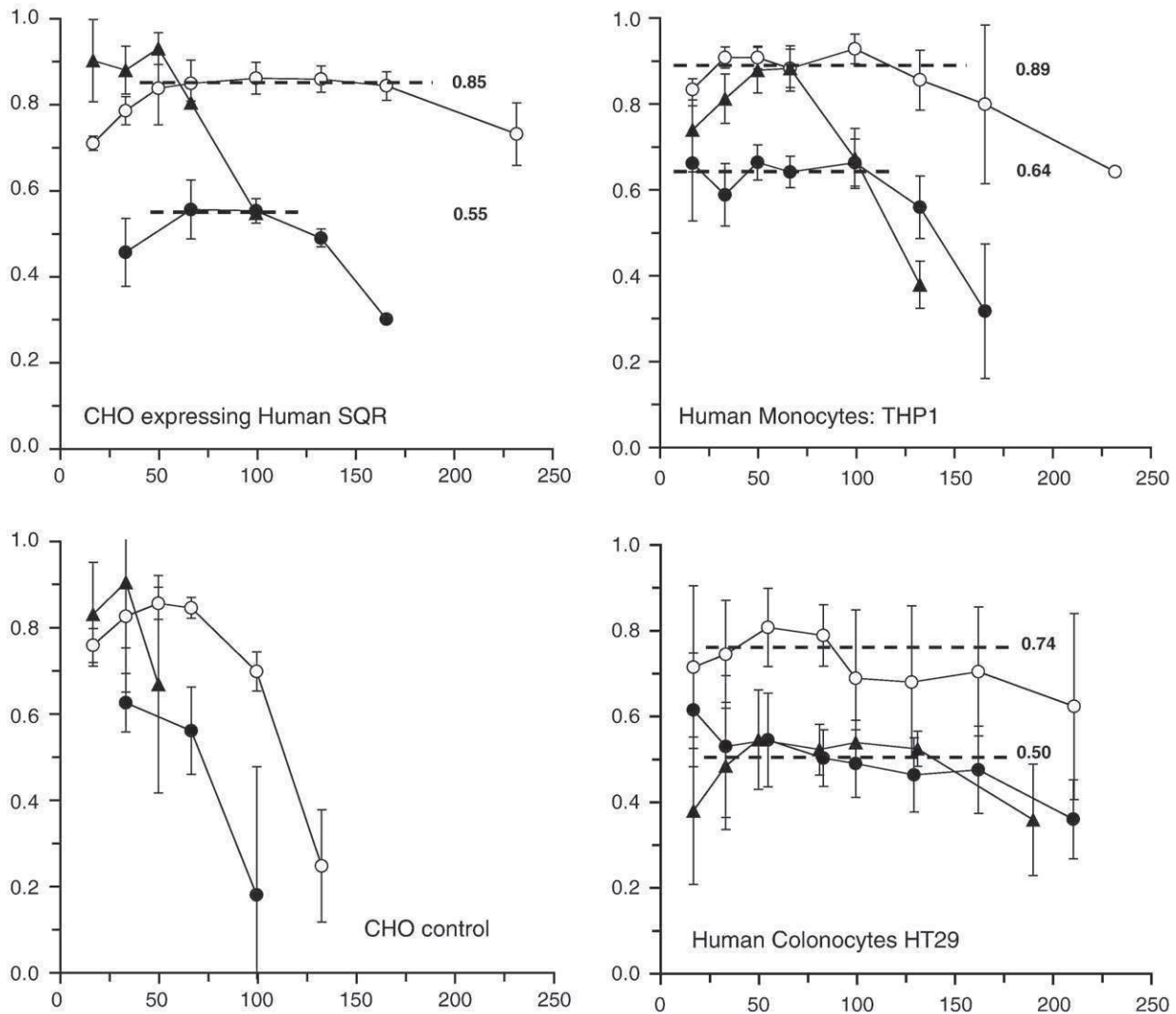


Fig. 7. Stoichiometry of Oxygen to Sulfide consumption. Y axis: the stoichiometry (oxygen to sulfide) is calculated from the ratio between the increase in oxygen consumption associated with sulfide infusion and sulfide infusion at different rates of sulfide injection in pmol/(s ml) (X axis). Mean values \pm mean deviation. $N = 3$ (three independent cellular preparations), except for HT-29: $n = 9$ measurements (with five independent cellular preparations). Empty circles: respiration in presence of rotenone (sulfide only). Black symbols: respiration in absence of rotenone (organic substrates and sulfide), in absence of oligomycin (circles) or in its presence (triangles). The dotted lines underline the data points used for calculation of the stoichiometry (O_2 /Sulfide) in absence or presence of rotenone. These values are shown on the right. Paired experiments were performed in presence/absence of rotenone. The paired *t*-test gave a *p* value equal to 0.001 for the CHO control cell line and lower than 10^{-7} for the others for the difference in stoichiometry in presence/absence of rotenone (white/black circles).

if sulfide oxidation by SQR or inhibition of cytochrome oxidase needs entry into mitochondrial matrix. If so, the high potential of the mitochondrial inner membrane could exclude further sulfide from reaching its target(s). This shielding effect of the cellular membrane is likely to explain the differences in concentrations noticed above (see also [supplementary information 2](#)).

The present study shows that there is within the mammalian body a significant amount of mitochondria in different cell phenotypes which are able to oxidize sulfide in addition to the colonic epithelial cells. This suggests a selective pressure for its maintenance even if the animals/cells have escaped from a sulfide containing external environment. This is likely to be explained by the fact that sulfide, an inhibitor of cytochrome oxidase with the same potency as cyanide, remains a permanent threat to aerobiosis due to the continuous use of sulfur containing molecules by living matter [5,16]. The sulfide production rate has been estimated [17,18]. For instance, in Ref. [18], the sulfide production rates were estimated to be 2 and 5 nmol $g^{-1} \text{ min}^{-1}$ in aorta and heart, respectively. This allows one to presume that sulfide concentration would rise by 2 or 5 μM per minute (assuming

that 1 g corresponds to 1 ml) unless sulfide is consumed. Therefore, if these experimental values reflect physiological reality, within minutes aorta or heart would release enough sulfide to poison themselves. Consequently, detoxification of sulfide is required and mitochondrial oxidation by SQR would do so. The oxygen consumption linked to sulfide oxidation represents 0.75 of the sulfide production rate hence 1.5–4 nmol $O_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for the sulfide production rates indicated above. The oxygen consumption rates of a beating mouse heart are in the 10,000 nmol $O_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ range [19], whereas a value of 180 nmol $O_2 \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ was given for resting myocardial tissue [20]. Therefore, sulfide oxidation appears to constitute a marginal contribution to the cellular oxygen consumption and mitochondrial ATP production. Our experiments could easily detect the increase in oxygen consumption linked to sulfide addition because it was of the same order of magnitude as that of the basal oxidative metabolism of the cells/mitochondria in the absence of sulfide (Figs. 2, 4–6). Hence, the SQR activity present in cells or in mitochondria appears to be in large excess with regard to the expected endogenous sulfide production rates. Hydrogen sulfide is a gas that diffuses freely across

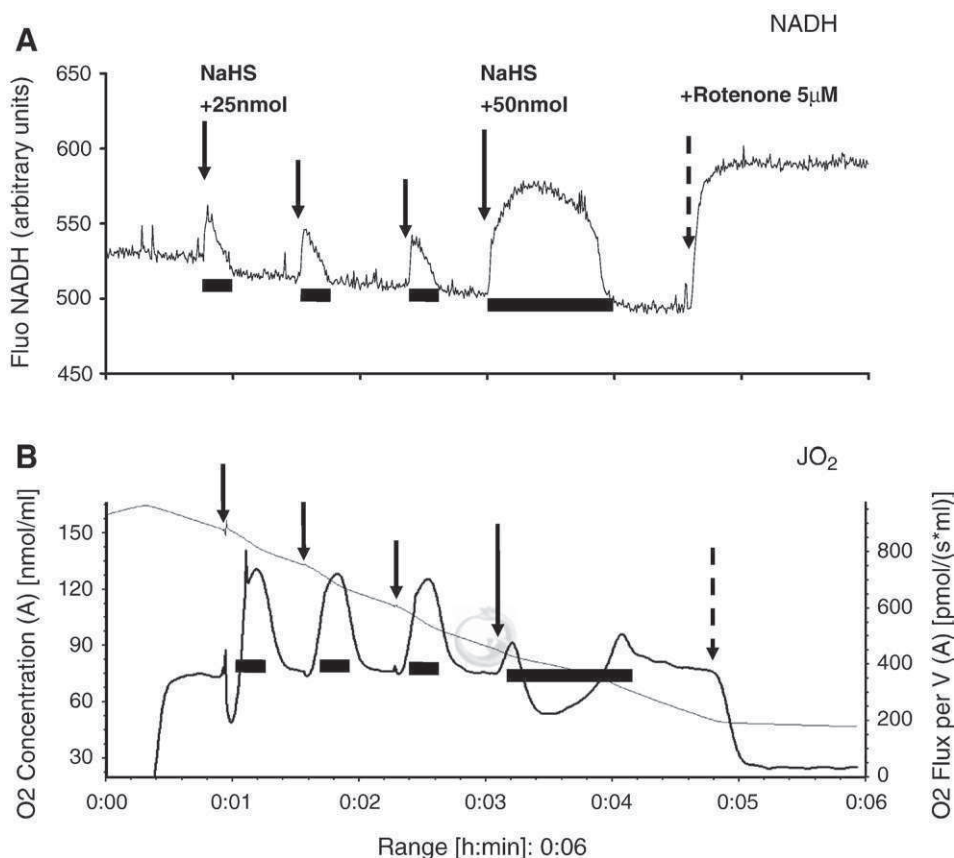


Fig. 8. Sulfide oxidation increases the reduction state of NADH. A) The reduction state of NADH was evaluated by fluorescence. The different additions are indicated. B) Recording of the oxygen consumption of THP1 cells in the same conditions (same cell preparation) and same additions: thin line represents oxygen concentration, thick line represents oxygen consumption (JO_2). This is the unmodified graph from the oxygraph software. Horizontal bars indicate equivalent periods of time in the two graphs.

membranes. Therefore, any sulfide produced in the body is likely to meet a sulfide oxidizing mitochondrion within a short time. Moreover, our study showed that immune cells such as macrophages or monocytes scattered over or circulating within the whole body show a high sulfide oxidation capacity. Accordingly, within a short range around any sulfide producing source, the concentration of sulfide in the extracellular medium would not be higher than the SQR threshold ($\leq 1 \mu\text{M}$). In this respect our data agree with the recent conclusion that the global sulfide concentrations within tissues are considerably lower than previously thought [21]. Another possibility has been put forward to explain why sulfide concentration remains low in the body and would constitute a second line of defence against sulfide toxicity [3]. According to these authors the added free sulfide is converted into a bound form of sulfur stored within cellular components. This bound form can be released by the action of reducing agent or pH changes. This has been well demonstrated using the brain tissue, but the demonstration of the reversibility of binding is missing using liver or heart homogenate, while both showed a considerably faster rate of sulfide disappearance. The comparison with results obtained with isolated mitochondria (this study) leaves open the possibility that in the experiment shown in Ref. [3] with liver and heart homogenates, sulfide was in fact quickly oxidized by the SQR, something not possible with the brain homogenate. Accordingly, although this bound form of sulfur is likely to represent a source of sulfide relevant for cellular signaling, we propose that its formation by combination of free sulfide is a less efficient line of defense against sulfide toxicity in comparison with the fast-acting SQR.

Our study defined three domains for the external concentration of sulfide according to the state of SQR and cytochrome oxidase. At concentrations lower than the threshold ($\leq 1 \mu\text{M}$), external sulfide is

not made available for the intracellular SQR. Between 1 and $10 \mu\text{M}$, sulfide is oxidized as a fuel by cells if SQR is present. When concentrations rise above $10 \mu\text{M}$, inhibiting effects become increasingly relevant and are complete above $40 \mu\text{M}$. Cells therefore have to recruit other mechanisms than aerobic oxidation by the mitochondrial cytochrome oxidase to extract energy from their substrates. Even if complete inhibition of cytochrome oxidase is taking place, sulfide disposal still occurs but at a considerably reduced rate.

4.2. Sulfide oxidation and the physiological roles of sulfide

Concerning the physiological roles of sulfide, bibliographic data indicate a signaling role similar to NO [2], an antioxidant role [22], a role in the induction of a suspended animation state in rodents [23] and finally a role in oxygen sensing [24]. All these observations raised interest and the therapeutic use of sulfide has been envisaged [15].

Sulfide signaling requires a source of sulfide and a cellular target. Our experiments showed two issues depending on the relative importance of sulfide delivery with respect to sulfide oxidation: (i) If sulfide production is to be maintained below the cellular oxidative capacity, sulfide concentration should be in the low micromolar range (see above). (ii) If sulfide production saturates the oxidation pathway, sulfide accumulates, and inhibition of mitochondrial respiration occurs when the external concentration rises above a critical concentration ($>40 \mu\text{M}$). However, mechanisms which metabolize sulfide still take place and cessation of sulfide delivery allow detoxifying mechanisms (or diffusion) to lower sulfide concentration and thus respiration to resume. Consequently, if the SQR is the sole/major pathway for sulfide disposal, any external concentration below the threshold value ($\leq 1 \mu\text{M}$) can be maintained. The affinity of SQR

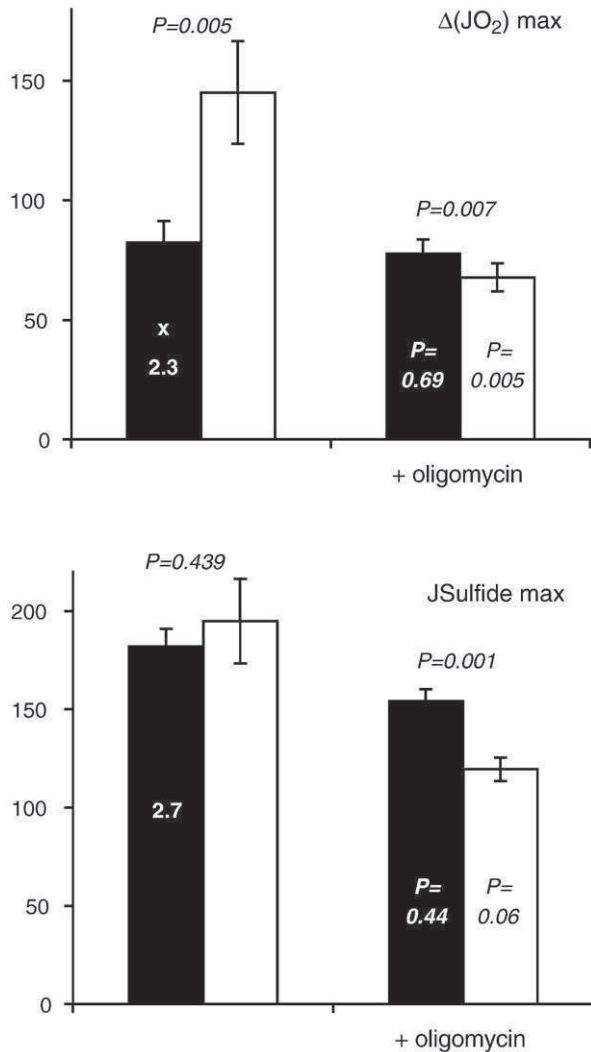


Fig. 9. Maximal oxygen and sulfide fluxes in HT-29 cells. Top: maximal increase in oxygen consumption $\Delta(JO_2)$ caused by sulfide oxidation in the absence (black) or presence (white) of the complex I inhibitor rotenone and in the absence or presence of the FoF1 ATPsynthase inhibitor oligomycin. These are the mean values \pm SEM of nine measurements made during five independent experiments. Bottom: Maximal flux of sulfide oxidized by the same cells: same units and same legend. The italicized characters above histograms indicate the *p* values of the paired *t*-test between values in the presence/absence of rotenone. The italicized characters on the right of the histogram are the *p* values of the unpaired *t*-test between values in the presence/absence of oligomycin. Numbers in white on the left of the histograms are the stimulation factor for respiration (top) and the relative sulfide exposure (bottom) for their comparison with the prediction of the model (Fig. 10).

and its excess with regard to estimated endogenous sulfide production rates (see above) make the SQR a major opponent to any process susceptible to increase sulfide concentration above this threshold value. However, if by any chance sulfide concentration would rise above $40 \mu\text{M}$, the inhibition of mitochondrial oxidative metabolism would make SQR considerably less efficient; and maintenance of this high concentration of sulfide would be associated with much lower rates of sulfide delivery. In the hypothesis of a single sulfide addition, there would be a critical zone ($10\text{--}40 \mu\text{M}$) in which the time needed for sulfide disposal increases abruptly in a non-linear way (see, for example, Figs. 2 and 8). These considerations have important consequences with regard to the physiological properties of sulfide presented so far which are related to a signaling role for this compound and to its capacity to induce a suspended animation state [15,23].

Following the description of NO as a gaseous signaling molecule [25] and after pioneering work indicating the relevance of sulfide in

the learning process and in vasorelaxation [26,27], sulfide has gained credit as a meaningful gaseous messenger during the past decade [17,18,28]. A recent review on these gaseous messengers and their relationship with amino acid metabolism is found in Ref. [29]. The “signaling concentrations” that were used are reviewed in Ref. [15]. In the cellular models, the concentrations are in the $10 \mu\text{M}$ to 3mM range. The lowest concentrations are therefore overlapping with the critical concentration range as indicated above while the highest concentrations would impair severely and immediately mitochondrial bioenergetics. This would have immediate consequences on muscular tone and/or K^+ -ATP channels. The coincidence of the inhibiting effect of sulfide on respiration with its protecting role on mitochondrial function during ischemia reperfusion has been noticed [30], pointing to a possible overlap/confusion between signaling and inhibition of oxidative metabolism. Therefore in quite a few cases, the sulfide administration would have the same bioenergetical consequences than a period of ischemia, with the difference that the mitochondrial bioenergetics would be gradually restored following the decrease in sulfide concentration with time. This decrease could be due to SQR activity, binding to cellular components, and to chemical instability of sulfide solution. A non-lethal period of ischemia triggers cellular responses (preconditioning) aiming at increasing resistance to the deleterious consequences of ischemic shock. These deleterious consequences include oxidative stress. In this respect it is worth noticing that exposure of neurons to sulfide protects them against the oxidative stress caused by external glutamate [22]. The mechanisms include an increase in cellular glutathione, which outperforms the direct antioxidant property of sulfide itself [22], and appeared to be mediated by the K^+ -ATP channels [31].

The SQR activity is likely to be present in many cell phenotypes and this activity would cause a decrease of sulfide external concentration down to the $1 \mu\text{M}$ limit i.e. at a pace heavily influenced by the sulfide amount to cell ratio. This further complicates the comparison between data obtained using different experimental protocols. While pharmacological use of sulfide does not prove that sulfide has a role in physiology, this role is now supported by the observation that mice where one sulfide producing enzyme has been invalidated show hypertension [18].

The signaling role of sulfide has to be considered in the context of our present results which indicate that monocytes present in blood and a large part of the surrounding tissues (muscle, and conjunctive tissue for example) should be able to maintain a sulfide concentration below $0.5\text{--}1 \mu\text{M}$ in the extracellular medium. Therefore, our data and calculation are in agreement with [21], but are against the estimate of a $40 \mu\text{M}$ free sulfide physiological plasma concentration, since this would severely poison cellular aerobic metabolism. Two possibilities can be envisaged: firstly, sulfide concentrations below the threshold for SQR activity do have signaling properties, or secondly sulfide signaling concentrations are within the range where SQR operates. The first possibility means that signaling would occur with sulfide concentrations below $1 \mu\text{M}$ in the extracellular medium, and ten times less within the cell. Then SQR would simply represent a way to avoid a rise of sulfide to toxic levels. If this is true, so many studies have used sulfide at such concentrations that it creates some confusion regarding the effects of sulfide on cellular bioenergetics and the effects of sulfide in the signaling process. The second possibility is that the concentrations required for a sulfide signaling role overlap with those relevant for SQR and mitochondrial bioenergetics. This opens up the possibility that SQR and mitochondrial bioenergetics participate in this signaling. It is worth noting that the situation is different according to the presence/absence of SQR in the target cell. If present, the SQR activity would ensure extinction of the signal and guarantee its confinement to specific locations close to the sulfide source. In this respect the defect of sulfide oxidation capacity as evidenced in the neural tissue (this study) is of importance because it would correspond to an extension both in time and space of the influence of sulfide

whatever its initial source would be. This higher sensitivity of the brain might be relevant in the induction of the suspended animation state.

4.3. Mammalian mitochondria prefer sulfide “mithridatochondria”

The oxidation of sulfide is achieved by a sulfide oxidizing unit constituted of three enzymes [8]. The entry of sulfide takes place through the sulfide quinone reductase (SQR) and we demonstrate that the human candidate gene indeed codes for a functional SQR. The reaction scheme [8] imposes a stoichiometry of oxygen to sulfide of 0.75. Experimental determination of oxygen to sulfide stoichiometry remained consistent with this value of 0.75 when mitochondrial complex I was poisoned with rotenone (Figs. 1, 2, 7) and consequently sulfide alone was oxidized. The model shown in Fig. 10 explains how stoichiometry in the absence of rotenone (basal state) was lowered to 0.5. This model states that the flux of electrons reaching oxygen in the mitochondrial respiratory chain is unchanged whether sulfide is oxidized or not. Consequently, the injection of electrons by the SQR causes a decrease in the output of electrons from other substrates (mainly complex I). Accordingly mammalian mitochondria showed more affinity for the mineral substrate and also poison sulfide than for their “normal” carbon derived substrates. This may recall the strategy used a long time ago by the king Mithridate VI Eupator (132–63 BCE) who attempted to get protection against poisons by absorbing limited doses of them. Consequently, a redox change/stress results from the SQR activity before the inhibition of the cytochrome pathway (Fig. 8). This precedence of SQR over complex I is not complete and the activity of complex I impedes SQR from reaching its maximal rate. This is deduced (i) from the threshold at which stoichiometry values started to decrease in the absence/presence of rotenone (Fig. 7), (ii) from the time needed to oxidize a large excess of sulfide in the presence/absence of rotenone with CHO cells (Fig. 2) and (iii) from the variation of stoichiometry in the presence of oligomycin, which has driven the stoichiometry to values close to that calculated in the presence of rotenone (Fig. 7 CHO and THP1). Therefore, in the presence of oligomycin, the model shown in Fig. 10 is no longer applicable to CHO or THP1, and complex I keeps on injecting electrons at a rate close to that observed in the absence of sulfide. The explanation for that is likely to be the reduction state of NAD and of complex I: when the NADH/NAD ratio rises; the electrons coming out of complex I becoming competitors against those coming out of SQR. An over-reduced state of complex I is induced by factors that directly (rotenone and sulfide in this study) or indirectly (oligomycin) act downstream of complex I to inhibit electron transport in the mitochondrial respiratory chain. This is likely to explain the large difference in the time needed to oxidize sulfide whether rotenone is present or not and when 53 pmol of sulfide (26 μ M) were added to the cells, leading to a drastic inhibition of cytochrome oxidase (last addition in Fig. 2). However, essentially no difference was observed, when the same amount was infused at the fasted rate (166 pmol/(s ml)), a condition which led only to a very partial inhibition of cytochrome oxidase. Oxidation seems to be faster in absence of rotenone after the 166 pmol/(s ml) infusion. This may however be explained by difficulties in determining the end of sulfide oxidation or by the consequences on the plasma membrane potential of the bioenergetic failure due to the presence of rotenone.

This model predicts the value of the oxygen consumption increase in relation to the relative sulfide exposure (Fig. 10 bottom). These predictions were met throughout the study: a relative sulfide exposure of 0.5 caused a 25% increase of the oxygen consumption (Fig. 3) see also Fig. 9. The upper limit of oxygen consumption in the presence of sulfide represents three times the initial rate. This value was not vastly different when compared to the one obtained in the experiments made with a maximal dilution of THP1 cells which reduces the total amount of sulfide and its metabolite present in the close chamber (Fig. 11).

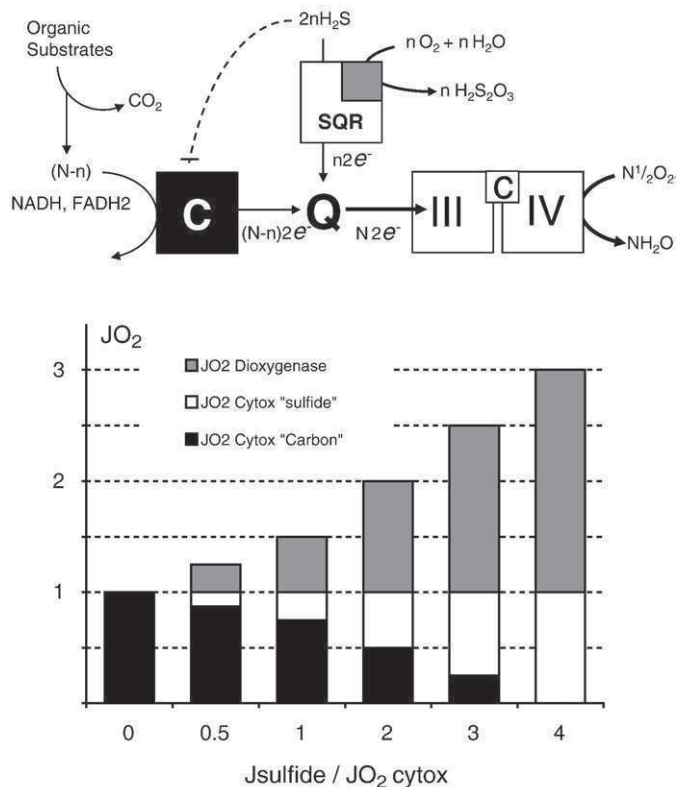


Fig. 10. Model for sulfide and carbon oxidation in mitochondria. Top: a schematic view of the relationships between carbon and sulfide oxidation. Organic substrates' oxidation is schematized as a first step providing NADH and FADH2 to relevant complexes of respiratory chain (black box). Sulfide oxidizing unit with the sulfide quinone reductase (SQR) and associated enzymes (grey box). The output of electrons from the quinone pool (Q) towards complexes III and IV (cytochrome oxidase c = cytochrome c) remains constant. Consequently the entry of electrons coming from sulfide results in a decrease of the flux of electrons coming from carbon oxidation. This inhibition is emphasized by the dotted line. Bottom: quantitative analysis of the components of oxygen consumption at different sulfide oxidation rates expressed relatively to the cytochrome oxidase rate ($J_{\text{sulfide}}/JO_2 \text{ cytox}$). This unit is congruent with the relative sulfide exposure ($J_{\text{NaHS}}/\text{initial } JO_2$).

The oxidation of sulfide consumes a lot of oxygen (Figs. 1 and 11). This together with the relative inhibition of cytochrome oxidase render cell phenotypes generating and oxidizing sulfide more subject to oxygen shortage than others. This latter point is relevant to oxygen sensing [24]. Our model (Fig. 10) predicts that in the basal state, the increase in oxygen consumption reflects only the activity of the dioxygenase. This dioxygenase together with a sulfur transferase restores the SQR into a form able to accept again the two molecules of H_2S used for each catalytic cycle. The dioxygenase produces sulfite to which a second sulfur atom is added by sulfur transferase to generate thiosulfate (Fig. 1). Two reactions by the dioxygenase would also oxidize the SSH groups on the SQR and liberate two sulfite anions instead of thiosulfate. This would cause greater oxygen consumption with a stoichiometry O_2/H_2S of 1.25. Interestingly, the mean values of stoichiometry calculated with CHO or THP1 appeared slightly higher than with the HT-29 colonic epithelial cells. These latter values met the values corresponding to the minimal oxygen consumption for sulfide disposal within the presented models (Figs. 1 and 10).

Our model (Fig. 10) predicts that the supply of a substrate with high affinity to the mitochondrial respiratory chain did not increase the flux of electrons. It just switched the origin of electrons towards the most efficient substrate at the expense of the others. Hence, increased substrate offer does not lead to waste of energy. On one hand, this guarantees energetic efficiency and evidences a tightly coupled state of mitochondria. On the other hand, this limits the detoxifying power of

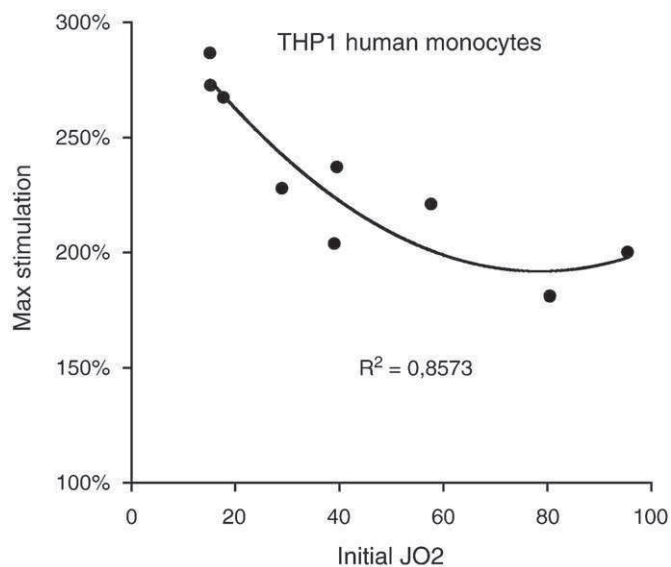


Fig. 11. Maximal stimulation of cellular respiration by sulfide. This figure shows the original data used to calculate the mean values shown in Fig. 3 with the human monocyte cell line THP1. X axis: initial oxidation rate (JO₂) of the cellular preparation before sulfide addition (in pmol/(s ml)) which is directly proportional to the number of cells used. Y axis maximal stimulation obtained with an optimal rate of sulfide injection. There is a tendency for a higher stimulation when the cell number is low. A likely explanation would be a low toxicity of the sulfide oxidation product(s) (presumably thiosulfate + sulfite) that would obviously accumulate more when a larger number of cells are present. Maximal values of stimulation approach the 300% value deduced as the maximal possible stimulation according to the model (Fig. 6).

SQR to a level linked to the ATP turnover of the cell. Our data show that the colonocytes are able to escape this limitation by a remarkable adjustment of their mitochondrial bioenergetics.

4.4. Reversion of mitochondrial complex I in colonocytes increases their tolerance to sulfide

When stoichiometry was examined, the HT-29 cells differed from the other cellular phenotypes in two ways: (i) Oligomycin caused no change in stoichiometry in HT-29 cells (Fig. 7) exactly as if coupling was altered and if complex I in the presence of oligomycin was still unable to compete with SQR. (ii) The stoichiometry in the presence/absence of rotenone did not evidence a competition between complex I and SQR. Furthermore, no competition could be evidenced from the shape of the stoichiometric curve as the decline did not occur earlier in absence of rotenone. Moreover, when the effect of rotenone on stoichiometry was studied in the presence of oligomycin (supplementary information 3), no change was observed with the THP1 cells. This is in contrast with what is observed in HT-29 cells. In these cells, rotenone addition changed the shape of the curve towards a form more similar to that obtained with THP1 cells. Finally, the study of maximal fluxes of oxygen and sulfide observable in HT29 cells led to the conclusion that the activity of complex I is associated with an uncoupled state of mitochondria and an increase in the sulfide oxidation rate.

To propose a mechanism by which complex I would help in sulfide oxidation in HT-29 cells, one should be reminded that complex I is a reversible redox proton pump (supplementary information 4). This reversion would add a second fate for the electrons coming out of SQR, the final acceptors for the electrons of sulfide would then be NAD⁺ and oxygen. The NADH produced by the reversed complex I would then be oxidized by another complex I remote from SQR. In the context of a number of sulfide oxidizing units significantly lower than that of complexes I, III and IV this would increase mitochondrial sulfide oxidation capacity (Fig. 12). Moreover, the re-entry of protons

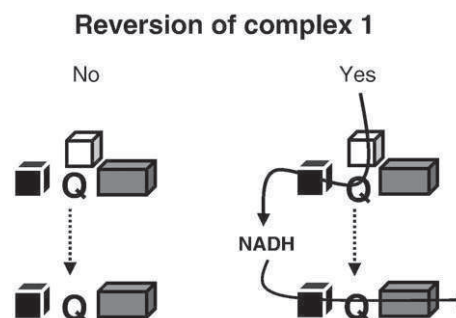


Fig. 12. How reverse electron transfer increases overall sulfide oxidation capacity. A situation is schematized where the number of SQR enzymes (white box) is notably lower than that of the other complexes of the mitochondrial respiratory chain (black: complex I; gray complexes III and IV). Left: in the absence of reversion of complex I, the coenzyme Q reduced by SQR may diffuse to another complex III remote from SQR (dotted arrow). This diffusion is limited because it occurs within the phospholipid bilayer of the inner membrane. Right: when complex I is reversed, it produces NADH which is a hydrophilic molecule that could easily reach another complex I (solid arrows). It may also be oxidized through other pathways not figured in this scheme. This would cause no change in stoichiometry as reverse flux does not consume oxygen and simply adds another source of NADH than the “carbon metabolism” schematized in Figs. 1 and 10.

through the reversed complex I would then be comparable to the activity of an uncoupling protein as it dissipates the proton electrochemical gradient generated by other respiratory complexes working in “usual” mode. Therefore, the proposition of a reversion capacity of complex I in HT-29 cells would explain both the uncoupled state of mitochondria and the maintenance of a high sulfide oxidation capacity in presence of oligomycin.

Consequently, in basal state, HT-29 colonic cells allow the SQR to function at its maximal rate independently of the presence of other substrates and cellular ATP needs. This appears to represent an elegant and efficient adaptive mechanism for a cell living in a sulfide-rich environment and for which detoxification of this metabolite is an absolute priority. To our knowledge, this also provides the first evidence for reverse electron transfer in intact cells. The additional conclusion is that the other cell types examined here were unable to do reverse electron transfer since in these cells complex I remained an opponent to sulfide oxidation regardless of the presence or absence of oligomycin.

5. Conclusion

Our data provide evidence for a unique mitochondrial oxidation pathway linked to cellular bioenergetics, detoxification, cellular signaling and physiology, together with the molecular identification of a key player in these processes whose importance was ignored up to now: the mitochondrial SQR enzyme inherited from pre-photosynthetic times [13].

Acknowledgments

This work was supported by the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and AgroParisTech, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut de la Santé et Recherche Médicale (INSERM). The authors wish to thank Fabrizia Stavru, Gwendoline Soller, Candide Font-Sala, Caroline Aheng, Bénédicte Oules, Richard Bligny and Anne-Marie Boisson for providing access to different cell types, the help of Christine Leroy for NADH fluorimetry and Nachiket Nadkarni for editing the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbabi.2010.04.004.

References

- [1] C.E. Cooper, G.C. Brown, The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance, *J. Bioenerg. Biomembr.* 40 (2008) 533–539.
- [2] R. Wang, Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J.* 16 (2002) 1792–1798.
- [3] M. Ishigami, K. Hiraki, K. Umemura, Y. Ogasawara, K. Ishii, H. Kimura, A source of hydrogen sulfide and a mechanism of its release in the brain, *Antioxid. Redox Signal.* 11 (2009) 205–214.
- [4] F. Gaill, Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents, *FASEB J.* 7 (1993) 558–565.
- [5] M.H. Stipanuk, Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine, *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004) 539–577.
- [6] G.R. Gibson, J.H. Cummings, G.T. Macfarlane, Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine, *J. Appl. Bacteriol.* 65 (1988) 241–247.
- [7] M.K. Grieshaber, S. Volkel, Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide, *Annu. Rev. Physiol.* 60 (1998) 33–53.
- [8] T.M. Hildebrandt, M.K. Grieshaber, Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria, *FEBS J.* 275 (2008) 3352–3361.
- [9] R. Yong, D.G. Searcy, Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 129 (2001) 129–137.
- [10] J. Furne, J. Springfield, T. Koenig, E. DeMaster, M.D. Levitt, Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa, *Biochem. Pharmacol.* 62 (2001) 255–259.
- [11] X. Leschelle, M. Gubern, M. Andriamihaja, H.M. Blottiere, E. Couplan, M.D. Gonzalez-Barroso, C. Petit, A. Pagniez, C. Chaumontet, B. Mignotte, F. Bouillaud, F. Blachier, Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide, *Biochim. Biophys. Acta* 1725 (2005) 201–212.
- [12] M. Gubern, M. Andriamihaja, T. Nubel, F. Blachier, F. Bouillaud, Sulfide, the first inorganic substrate for human cells, *FASEB J.* 21 (2007) 1699–1706.
- [13] U. Theissen, M. Hoffmeister, M. Grieshaber, W. Martin, Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times, *Mol. Biol. Evol.* 20 (2003) 1564–1574.
- [14] V. Tiranti, C. Viscomi, T. Hildebrandt, I. Di Meo, R. Minerì, C. Tiveron, M.D. Levitt, A. Prella, G. Fagiolarì, M. Rimoldi, M. Zeviani, Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy, *Nat. Med.* 15 (2009) 200–205.
- [15] C. Szabo, Hydrogen sulphide and its therapeutic potential, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 917–935.
- [16] D.G. Searcy, S.H. Lee, Sulfur reduction by human erythrocytes, *J. Exp. Zool.* 282 (1998) 310–322.
- [17] W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang, The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener, *EMBO J.* 20 (2001) 6008–6016.
- [18] G. Yang, L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A.K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S.H. Snyder, R. Wang, H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase, *Science* 322 (2008) 587–590.
- [19] J. Hoerter, M.D. Gonzalez-Barroso, E. Couplan, P. Mateo, C. Gelly, A.M. Cassard-Doulier, P. Dirolez, F. Bouillaud, Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage, *Circulation* 110 (2004) 528–533.
- [20] E.K. Walsh, H. Huang, Z. Wang, J. Williams, R. de Crom, R. van Haperen, C.I. Thompson, D.J. Lefer, T.H. Hintze, Control of myocardial oxygen consumption in transgenic mice overexpressing vascular eNOS, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 287 (2004) H2115–2121.
- [21] J. Furne, A. Saeed, M.D. Levitt, Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295 (2008) R1479–R1485.
- [22] Y. Kimura, H. Kimura, Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress, *FASEB J.* 18 (2004) 1165–1167.
- [23] E. Blackstone, M. Morrison, M.B. Roth, H₂S induces a suspended animation-like state in mice, *Science* 308 (2005) 518.
- [24] K.R. Olson, Hydrogen sulfide and oxygen sensing: implications in cardiorespiratory control, *J. Exp. Biol.* 211 (2008) 2727–2734.
- [25] W.A. Pryor, K.N. Houk, C.S. Foote, J.M. Fukuto, L.J. Ignarro, G.L. Squadrito, K.J. Davies, Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 291 (2006) R491–511.
- [26] K. Abe, H. Kimura, The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator, *J. Neurosci.* 16 (1996) 1066–1071.
- [27] R. Hosoki, N. Matsuki, H. Kimura, The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 (1997) 527–531.
- [28] G.A. Benavides, G.L. Squadrito, R.W. Mills, H.D. Patel, T.S. Isbell, R.P. Patel, V.M. Darley-Usmar, J.E. Doeller, D.W. Kraus, Hydrogen sulfide mediates the vasoactivity of garlic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17977–17982.
- [29] X. Li, F.W. Bazer, H. Gao, W. Jobgen, G.A. Johnson, P. Li, J.R. McKnight, M.C. Satterfield, T.E. Spencer, G. Wu, Amino acids and gaseous signaling, *Amino Acids* 37 (2009) 65–78.
- [30] J.W. Elrod, J.W. Calvert, J. Morrison, J.E. Doeller, D.W. Kraus, L. Tao, X. Jiao, R. Scalia, L. Kiss, C. Szabo, H. Kimura, C.W. Chow, D.J. Lefer, Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia–reperfusion injury by preservation of mitochondrial function, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 15560–15565.
- [31] Y. Kimura, R. Dargusch, D. Schubert, H. Kimura, Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (2006) 661–670.

ARTICLE 2

Detoxification of H₂S by differentiated colonocytes: implication of the H₂S oxidizing unit and of the cell respiratory capacity.

Article en révision soumis au journal *Antioxidant and Redox Signaling*. (2011)

Sabria Mimoun, Mireille Andriamihaja, Catherine Chaumontet, Calina Atanasiu, Robert Benamouzig, Jean Marc Blouin, Daniel Tomé, Frédéric Bouillaud et François Blachier

1. Contexte et objectifs

Dans cette partie du travail, nous avons voulu déterminer la concentration « seuil » pour laquelle l'effet de H₂S passe de l'énergisation mitochondriale à la toxicité cellulaire, en mesurant la capacité des cellules coliques humaines à oxyder/détoxiquer le H₂S, dans des conditions plus physiologiques que celles utilisées précédemment au laboratoire. De plus, au regard de nombreuses études ayant démontré un effet des cations divalents sur la concentration luminale de H₂S, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'effet de ces cations divalents sur l'inhibition de la respiration cellulaire par le NaHS.

Par ailleurs, le butyrate est un métabolite bactérien présent dans la lumière colique, et constitue un substrat oxydatif majeur des cellules coliques humaines tout en exerçant un effet pro-différenciant sur ces cellules. De nombreux arguments expérimentaux suggèrent un effet bénéfique du butyrate contre la toxicité de H₂S (Christl et al., 1996; Ramasamy et al., 2006). Il paraissait ainsi intéressant de supposer un rôle éventuel du butyrate sur la modulation de la toxicité de H₂S. Nous avons supposé également, un effet du butyrate sur l'expression et le fonctionnement des enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » et/ou sur le fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative mitochondriale.

Nous avons porté une attention particulière à l'étude de l'expression des gènes codants les trois enzymes impliquées dans la détoxification de H₂S dans les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} en cours de différenciation et dans les biopsies provenant de

différents segments de côlon humain. A notre connaissance, aucune étude n'a été réalisée dans ce domaine.

2. Matériels et méthodes

Nous avons dans un premier temps examiné l'effet de différentes concentrations de NaHS sur la consommation d'oxygène des cellules HT-29 Glc^{-/+} par polarographie. Notre objectif était de définir, dans nos conditions expérimentales, les concentrations de NaHS stimulantes pour lesquelles on observait une augmentation de la consommation d'oxygène due à une oxydation de H₂S par les enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » et par la réduction de l'oxygène en eau au niveau de la cytochrome c oxydase mitochondriale ; mais également les concentrations inhibitrices de la respiration cellulaire par inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase. Nous avons, dans un deuxième temps, évalué l'effet des agents, ZnCl₂, Zn acétate, CaCl₂, FeCl₂, l'acétate de zinc et l'acétate sur la capacité des cellules HT-29 Glc^{-/+} à oxyder le H₂S. Nous avons également mesuré la capacité des cellules à oxyder le H₂S au cours de leur différenciation ou en réponse à un traitement au butyrate (à la concentration de 2mM) ou à d'autres acides gras (acide caprylique, acétate) subissant ou non la beta oxydation. Afin de mesurer la réserve respiratoire de nos cellules, nous avons mesuré leur consommation d'oxygène en présence de FCCP (1.5µg/ml), un agent découplant de la chaîne mitochondriale. Nous avons dans une troisième partie, mesurée par qPCR l'expression des gènes codants les trois enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} à différents stades de différenciation spontanée et après différenciation provoquée par un traitement au butyrate. De plus, nous avons grâce à une collaboration avec le service de Gastroentérologie de l'Hôpital Avicenne de Bobigny, obtenu des biopsies coliques prélevées chez des sujets sains à partir des différents segments du gros intestin ; biopsies utilisées pour l'étude de l'expression des gènes des enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » par qPCR.

3. Résultats et discussion

Nos résultats confirment la présence d'une stimulation de la consommation d'oxygène due à une oxydation de H₂S dans les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+}. Nos résultats montrent également que dans nos conditions expérimentales, la concentration de 20µM de NaHS représente la concentration stimulante permettant une forte activité d'oxydation/détoxication de H₂S dans les cellules HT-29 Glc^{-/+}. L'oxydation de H₂S diminue de façon dose dépendante pour des concentrations supérieures à 50µM conduisant à considérer la concentration de 50µM de NaHS comme une concentration « seuil » faisant passer le H₂S

d'un substrat énergétique à un composé toxique. L'inhibition quasi totale de la respiration cellulaire due à l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase, a été observée dans notre étude en présence de 130 μ M de NaHS. Par ailleurs, notre étude rapporte une réversion de l'inhibition de la respiration cellulaire par le NaHS à la concentration de 130 μ M en présence de Zn. Ce résultat permet en effet, de proposer un rôle protecteur du Zn contre la cytotoxicité de H₂S. Un rôle déjà rapporté précédemment dans la bibliographie dans des hépatocytes en culture et dans des neurones (Eghbal et al., 2004; Frederickson, 1989).

En outre, nos résultats indiquent une activité de détoxification plus importante dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} différenciées que dans les cellules proliférantes. Ce résultat pourrait correspondre au fait que les cellules différenciées de l'épithélium colique sont celles qui font face au H₂S luminal. De plus, ce résultat pourrait révéler la moindre capacité des cellules se trouvant à la base des cryptes à détoxiquer le H₂S. Une augmentation de la détoxification de H₂S a été également observée dans les cellules coliques HT-29 Glc^{-/+} traitées avec le butyrate mais non avec les autres acides gras. Cet effet du butyrate a été attribué à son rôle en tant qu'agent pro différenciant sur les cellules tumorales HT-29 Glc^{-/+} (Hamer et al., 2008; Leschelle et al., 2000). Par ailleurs et de manière non attendue, nos résultats ont montré que l'importante activité de détoxification de H₂S dans les cellules coliques différenciées spontanément ou par effet du butyrate, était due à l'augmentation de la réserve respiratoire mitochondriale induite par la différenciation, et non pas à l'augmentation de l'expression des enzymes de détoxification de H₂S. Ce résultat nous conduit à conclure de l'importance des capacités de la chaîne respiratoire mitochondriale, comme composante importante de la fonction de détoxification de H₂S, en aval des enzymes de la « *sulfide oxidation unit* ».

Enfin, nos résultats mettent en évidence pour la première fois l'expression des gènes codant les trois enzymes de détoxification de H₂S i.e. la SQR, la ETHE1 et la TST dans le côlon humain. Une expression significativement faible a été observée pour la TST dans le rectum par rapport aux autres segments du tube digestif. Ce résultat tout à fait original ouvre des perspectives intéressantes en situation de déficit d'expression des enzymes de détoxification de H₂S dans le contexte des maladies inflammatoires intestinales coliques chez l'Homme.

Original Research Communication

Detoxification of H₂S by differentiated colonocytes: implication of the sulfide oxidizing unit and of the cell respiratory capacity

Sabria Mimoun ¹, Mireille Andriamihaja ¹, Catherine Chaumontet ¹, Calina Atanasiu ², Robert Benamouzig ^{1,2}, Jean Marc Blouin ¹ Daniel Tomé ¹, Frédéric Bouillaud ³, and François Blachier ^{1*}

¹INRA-CRNH-IdF-AgroParisTech, UMR 914 Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France

² Department of Gastroenterology, Hôpital Avicenne, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

³ Institut Cochin, EMC, Paris, France

*Corresponding author:

François Blachier, UMR 914, Nutrition Physiology and Ingestive Behavior, INRA/AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, F-75005 Paris, France

Phone: 33 (1) 44088675

Fax: 33 (1) 44081825

Email: francois.blachier@agroparistech.fr

Running head: Sulfide oxidation by colonocytes

3908 words, 36 references.

Abstract

Aims. Sulfide is released in the large intestine lumen by the microbiota and is an inhibitor of mitochondrial respiration and a genotoxic agent in colonocytes when present in excess. Deciphering how colonocytes detoxicate sulfide is an important issue. **Results.** In this study, using the human colonic epithelial HT-29 Glc^{-/+} cells, we found that 50 μ M sodium hydrogen sulfide represents the threshold of concentration above which respiration is decreased. The capacity of HT-29 Glc^{-/+} cells to oxidize lower concentration of sulfide was associated with the expression of transcripts corresponding to the enzymes of the sulfide oxidizing unit (SOU) i.e. sulfide quinone reductase (SQR), dioxygenase ethylmalonic encephalopathy (ETHE1) and thiosulfate sulfur transferase (TST). Inhibition of cell O₂ consumption by sulfide was reverted by zinc suggesting that zinc can bind sulfide. When the cells undergo either spontaneous or butyrate-induced differentiation, their capacity to oxidize sulfide was significantly increased. The expression of the genes corresponding to the enzymes of the SOU were not increased whereas increased cellular maximal respiratory capacity was measured. In human biopsies recovered from various parts of the large intestine, the three enzymes of the SOU were expressed. **Innovation.** Our data raise the view that the steps between SQR and cytochrome oxidase are crucial for sulfide detoxification in colonocytes. **Conclusion.** Sulfide oxidative capacity in the colonic mucosa is higher in differentiated than in proliferative epithelial cells. The cell respiratory capacity appears to represent a major determinant allowing sulfide detoxification in colonic epithelial cells downstream from SQR activity.

Introduction

Hydrogen sulfide (H₂S) appears to be involved in numerous physiological and pathological phenomena (33). H₂S can markedly inhibit colonic epithelial cell respiration (21) and provokes genomic DNA damage (3, 4). H₂S is present in the luminal content of the human large intestine at millimolar concentrations (26). However from the measurement of unbound H₂S concentrations in human faeces i.e. 60 μM (17), it is presumed that H₂S in its free form is present in the human colonic lumen at micromolar concentrations. Luminal H₂S can be produced partly by the microbiota from S-containing substrates from both alimentary and endogenous origins (6, 8, 9, 11). Although there is a large capacity of colonic luminal content to bind H₂S, the compounds responsible for this binding remain largely unknown.

Because of its lipophilic property, H₂S penetrates biological membranes (31) and inhibits mitochondrial cytochrome c oxidase activity with a binding constant similar to the one measured with cyanide (16). Cytochrome oxidase is the terminal oxidase of the mitochondrial electron transport chain which catalyses the reduction of dioxygen (O₂) to water (35). In contrast, if sulfide is infused to permeabilized colonocytes, a mitochondrial sulfide oxidation is observed which can be maintained as long as the sulfide flux did not exceed the oxidation capacity of the cellular preparation leading us to propose hydrogen sulfide as the first mineral fuel for human colonocytes (12). The mitochondrial sulfide oxidative unit (SOU) is presumably made of the sulfide quinone reductase (SQR) which oxidizes sulfide and donates electrons to the coenzyme Q in the respiratory chain, and of two other enzymes i.e. the dioxygenase (ETHE1) and the thiosulfate sulfur transferase (TST, also known as one isoenzyme of the rhodanese) which allow the production of thiosulfate (7, 15, 30, 34). Accordingly, we have recently shown that the transfection of CHO cells with a mammalian expression vector containing the cDNA for the human *SQRDL* gene homologous to bacterial enzyme led to an increased capacity for sulfide oxidation (20).

In that context, this study was undertaken to determine the concentration of the sodium salt of H₂S which represents the breaking point between stimulation and inhibition of O₂ consumption in intact human colonic HT-29 Glc^{-/+} epithelial cells. HT-29 Glc^{-/+} cells, which originate from a colon carcinoma, have retained numerous metabolic similarities with normal colonocytes (1, 21).

Furthermore, we tested if cellular differentiation is associated with an increased capacity of colonocytes to oxidize sulfide. We also examined which “block” i.e. SOU and/or respiratory chain is modified when H₂S detoxification capacity is increased. For this aim, we measured the expression of genes corresponding to the enzymes of the SOU and the respiratory capacity

of HT-29 Glc^{-/+} cells. Lastly, biopsies from human large intestine were recovered for the measurement of the expression of genes corresponding to the SOU enzymes in the colonic mucosa according to the different anatomical parts in order to determine if the three enzymes constituting this unit are homogeneously or heterogeneously expressed in the human large intestine mucosa.

Results

Effects of sulfide on HT-29 Glc^{-/+} cell oxygen consumption

As shown in (Fig.1A) NaHS, added as a single shot at 20 μM concentration, was able to markedly increase the O_2 consumption of HT-29 Glc^{-/+} cells. A higher NaHS concentration i.e. 40 μM failed to significantly affect the basal O_2 consumption. Using NaHS at 65 or 130 μM led to a marked inhibition of cellular O_2 consumption. After allowing the HT-29 Glc^{-/+} cells to metabolize the sulfide present in the incubation medium, the reversion rate of oxygen consumption reached almost the control value when using the 20 μM concentration. In the presence of higher concentration of sulfide, the progressive inhibition of respiration was concomitant with the decrease of reversion rate (Table 1).

Effects of divalent cations on the inhibiting effect of NaHS on HT-29 Glc^{-/+} oxygen consumption

As indicated on Fig.1B, 800 μM ZnCl_2 was able to largely reverse the inhibiting effect of 130 μM NaHS on HT-29 Glc^{-/+} oxygen consumption. Lower doses of ZnCl_2 were found to be less effective (data not shown). Other salts of divalent cations i.e. CaCl_2 and FeCl_2 were without any detectable effect on such parameter. Zn-acetate was also efficient for reversing the inhibitory effect of NaHS on cell respiration since this compound allowed to recover $77\% \pm 15$ (n=4) of the basal oxygen consumption value (control). This effect was due to the zinc part of the compound since no effect was observed when acetate alone was added (data not shown).

Capacity of HT-29 Glc^{-/+} cells to oxidize sulfide according to their differentiation state

As indicated in Fig.2A, after a period of rapid cell growth, HT-29 Glc^{-/+} cells progressively slowed down up to late confluency at day 13. This was concomitant with an increase of the brush membrane-associated dipeptidylpeptidase IV activity used as an indicator of cell differentiation (Fig.2B). Using HT-29 Glc^{-/+} cells in the early growth phase (day 3), in the preconfluency period (day 6) and at late confluency (day 11), we found, using 20 μM NaHS concentration, that the cell capacity for sulfide oxidation was significantly increased from day 3 to day 11 (Fig.2C). The basal oxygen consumption (measured without any exogenous agent) was similar at day 3, day 6 and day 11 averaging 2.73 ± 0.11 ; 2.64 ± 0.12 and 2.83 ± 0.17 $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$ cells respectively (n=5).

Effect of fatty acid pre-treatment on the capacity of HT-29 Glc^{-/+} cells to oxidize sulfide

As shown in Fig.3A, when HT-29 Glc^{-/+} cells were treated for 4 days (between day 2 and day 6) with 2 mM butyrate, the cell capacity for sulfide oxidation was significantly increased (p=0.0037) when compared with control experiments. The basal oxygen consumption

(without NaHS) was similar in control and butyrate-treated cells (data not shown). When the same experiments were performed using 30 mM acetate or 2 mM caprylic acid (a fatty acid which undergoes beta-oxidation in cells), no significant effect of pre-treatment with these compounds on the NaHS-stimulated oxygen consumption was measured. When butyrate was added for a shorter period of time i.e. 24h between day 10 and day 11, a similar increase of the capacity for sulfide oxidation was recorded at day 11 with again no effect of acetate and caprylic acid (Fig.3A). However, the same 24 h exposure to butyrate has no effect when made from day 2 to day 3 and from day 5 to day 6 (data not shown).

Effects of the cell differentiation state and of treatment with butyrate on the maximal respiratory capacity of HT-29 Glc^{-/+} cells

The maximal respiratory capacity measured in the presence of the uncoupler FCCP was found to increase from day 3 to day 11 averaging 172% ± 12 of the basal oxygen consumption at day 3, 229%± 11 at day 6 (Fig.3B) and 269%±10% at day 11 (Fig.3B). Accordingly, a treatment with butyrate 2mM led to an increase of the uncoupled respiratory rate when cells were treated from day 2 to day 6 and from day 10 to day 11 when compared with the untreated cells (Fig.3B)

Expression of SQR, ETHE1 and TST genes in HT-29 Glc^{-/+} cells undergoing spontaneous and butyrate-induced differentiation

As showed in Figs.4A, 4B and 4C, SQR, ETHE1 and TST transcripts were detected in proliferating and differentiated HT29 Glc^{-/+} cells. *ETHE1* and *TST* expression decreased modestly but significantly according to the state of differentiation (Figs.4B and 4C). Butyrate treatment did not induce any significant change in the gene expression corresponding to the enzymes of the SOU (Fig.4D).

Expression of the sulfide oxidation unit genes in human large intestine biopsies

The SQR, ETHE1 and TST genes were found to be expressed in the different anatomical parts of the large intestine (Figs.5A, 5B and 5C). The relative *TST* expression was found to be significantly lower in the rectal biopsies when compared with the others anatomical parts of the large intestine (p=0.01 between rectum and caecum, p=0.016 between rectum and ascending colon and p=0.007 between rectum and transverse colon, Fig.5C). *ETHE1* and *SQR* gene expressions levels were not significantly different along the different anatomical localisation.

Discussion

Our work with the human colonic epithelial HT-29 Glc^{-/+} cells shows that 20 μ M NaHS increases O₂ consumption. In contrast, NaHS used at 65 μ M concentration (and above) was inhibitory towards cell respiration. Fifty μ M sulfide represents the breaking point between concentrations which stimulates O₂ consumption and those which inhibit it. Thus little change in sulfide concentration can shift sulfide from being an agent which stimulates oxygen consumption in colonocytes to an agent which inhibits it. Interestingly, this latter concentration is in the same order of magnitude than the free sulfide concentration measured in human feces i.e. 60 μ M (17). The measurement of the increase of oxygen consumption after sulfide addition represents the sum of the oxygen consumption by the SOU and by the cytochrome oxidase (Fig.6). For the same electron transfer rate in the mitochondrial respiratory chain from complex III to complex IV, the entry of electrons in the SOU would consume 3 fold more oxygen than entry of electrons from complex I or II (20). Thus it is worth to note that an increase in the cellular overall oxygen consumption can be related to a situation where the sulfide concentration is high enough for partial inhibition of cytochrome oxidase (see Fig.6).

Our results demonstrate a dose-dependent effect of NaHS pre-treatment on the inability of HT-29 Glc^{-/+} cells to recover their initial basal rate of oxygen consumption. Although the mechanisms explaining this results remain unclear (and beyond the topic of the present study), they are likely linked to the nature of sulfide binding to the cytochrome c oxidase (22, 29).

Previous data have shown that thiosulfate is the end product of sulfide detoxification in the large intestine mucosa (10, 23) and in the liver (15). This is reflected by the oxygen to sulfide stoichiometry (20). Accordingly, the capacity of HT-29 Glc^{-/+} to oxidize sulfide was associated with the presence of transcripts corresponding to SQR, ETHE1, and TST genes.

We found that zinc was able to almost completely reverse the inhibition of HT-29 Glc^{-/+} cell oxygen consumption caused by sodium hydrogen sulfide. This result is in accordance with results showing that zinc acetate reduced caecal sulfide level by 5 fold (32). Zinc is absorbed in the 20-30% range (13, 19) and relatively high zinc concentrations can be measured in the colonic contents (14). Based on these data, the use of zinc as a dietary supplement may represent a simple means to reduce excessive H₂S concentration in the human colon.

Another important result obtained in our study was the higher capacity of differentiated HT-29 Glc^{-/+} cells to oxidize sulfide when compared with undifferentiated cells. This result is compatible with the view that the mature cells from the surface epithelium are more efficient

for sulfide oxidation/detoxification than the undifferentiated cells from the crypt compartment characterized by mitosis capacity (24). Since hydrogen sulfide is considered as a genotoxic agent due to its capacity to provoke genomic DNA damage in colonic epithelial cells (5), capacity of pluripotent stem cells for sulfide disposal may represent an important parameter for avoiding DNA damage (27). However, the concentration of luminal sulfide in close vicinity with these latter cells in vivo is not known and represents an important parameter although difficult to assess from a technical point of view. From our data, it appears that the increase of sulfide oxidation capacity during spontaneous cell differentiation is not caused by increased mRNA expression of the SOU enzymes.

When HT-29 Glc^{-/+} cells were cultured for day 2 to day 6 in the presence of butyrate which represents a luminal compound with pro-differentiating effect on HT-29 Glc^{-/+} cells (21), the capacity of these cells for sulfide oxidation was again significantly increased when compared with control untreated cells. This observation was not specific for the HT-29 Glc^{-/+} cell line since the same results were obtained with another colonic epithelial cell line i.e. Caco-2 cells (S. Mimoun, M. Andriamihaja and F. Blachier, unpublished data).

This effect was not observed with acetate, a short-chain fatty acid which has no effect on cell proliferation/differentiation (21) and which does not undergo beta oxidation. Since we have previously shown that HT-29 Glc^{-/+} cells metabolize butyrate and acetate in partly common metabolic pathways (i.e. after acetylCoA synthesis in mitochondria); this indicates that butyrate probably acts on the HT-29 Glc^{-/+} capacity to oxidize sulfide as itself (1). The fact that caprylic acid, which (like butyrate) undergoes beta-oxidation in colo-rectal mucosa (18), has no effect on the capacity of HT-29 Glc^{-/+} cells to oxidize sulfide reinforces this view. According to the sulfide oxidation pathway (Fig.6), the rate of sulfide oxidation would be determined by the activity of SOU and/or by the rate of electron transfer in the redox pathway from SQR to cytochrome oxidase. The maximal rate of electron transfer through the mitochondrial respiratory chain is revealed by the maximal oxygen consumption observed in the presence of the respiratory uncoupler FCCP. However, respiratory coupling restricts the cellular respiration to a rate matching the cellular ATP turnover. The term “respiratory reserve” is used to describe this respiratory capacity that is not used in the basal state but is revealed by uncoupling. In the present study, spontaneous and butyrate-induced HT-29 Glc^{-/+} cell differentiation was concomitant with an increase of the sulfide-induced oxygen consumption as well as an increase of the cell uncoupled respiratory rate; suggesting that a part of the cell respiratory reserve was somehow mobilized in order to increase the cellular

sulfide oxidation capacity in differentiated cells while it has no influence on the basal respiratory rate because of respiratory coupling.

These results are compatible with the view that sulfide (although generating ATP through its oxidation (20), is not primarily oxidized in order to increase the cellular level of ATP above a steady state value but rather to allow its detoxification.

Lastly, the analysis of the expression of the genes corresponding to the SOU enzymes in human biopsies revealed that the genes corresponding to the three enzymes of the Sulfide Oxidizing Unit are expressed in all anatomical part of the large intestine. TST gene expression was significantly decreased in the rectum when compared with proximal parts of the human large intestine. The functional consequences of this low expression of TST in the rectum mucosa remain to be determined.

From the data obtained in this study, it appears that the differentiation state of colonocytes, the anatomical parts of the large intestine as well as the concentration of sulfide-binding component in the luminal content are likely important parameters in determining the consequences of increased luminal sulfide concentrations on the large intestine epithelium.

Innovation

Our results represent an important contribution in the field of colonic epithelial cell sulfide metabolism by showing that sulfide oxidizing capacity is increased in differentiated cells. Importantly, our results are compatible with the view that sulfide is not primarily oxidized for increasing the cellular level of ATP but rather for allowing its detoxification. These results must be considered taking into account that luminal sulfide in excess is known to represent a “metabolic troublemaker” and a genotoxic agent against genomic DNA. By using oxygen consumption measurement and gene expression assay, our data indicate that the respiratory capacity of colonic epithelial cells represents an important parameter for sulfide detoxification capacity downstream Sulfide Quinone Reductase activity.

Materials and methods

Chemicals

Reagents for cell treatments were from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Reagents for qPCR were from Invitrogen (Cergy Pontoise, France) and primers from Eurogentec (Seraing, Belgium).

Human colonic biopsies

Colonic biopsies were obtained at the time of routine colonoscopic examination from 12 individuals (5 males, 7 females) examined at Avicenne Hospital (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France). Subjects ranged in age from 26 to 78 years (median age 57 years). They were characterized by normal colonic tissue and were free of polyps, colon cancer, and other colonic lesions at the time of examination. Furthermore, they had no known family history of colon cancer. Informed consent was obtained for all subjects participating in these studies. For each individual, two biopsies were taken from each anatomical parts of colon i.e. caecum, ascending colon, transverse colon, descending colon and rectum. One biopsy was immediately snap-frozen on dry ice in TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) (approximately 1 ml per 50-100 mg of tissue) and stored at -80°C until RNA extraction. The other biopsy was used for histological examination. Only normal biopsies confirmed by the histological analysis were included in our study.

Cell culture

The human colon adenocarcinoma cells HT-29 Glc^{-/+} used in this study were selected by Zweibaum et al. (36) from the parental line. Cells between passage 37 and 74 (one passage every week) were grown in a Dulbecco's Modified Eagle's Medium containing 4 mM L-glutamine and supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum. Culture medium was changed every day. Cells were seeded at a density of $2 \cdot 10^4$ cells/cm² and isolated using phosphate buffered saline containing 0.5 g/L trypsin and 0.2 g/L EDTA.

Oxygen cell consumption

Oxygen consumption was measured by polarography (oxygraph Hansatech Inst. Norfolk, UK) at 37°C using a Clark-type electrode as described (2). Six days after seeding, cells were isolated (approximately $5 \cdot 10^6$ cells) and resuspended in 1.5 ml air saturated incubation mixture (20 mM HEPES buffer containing 200 mM mannitol, 5 mM KH₂PO₄, 2,5 mM MgCl₂ and 0.5 mM EGTA; pH 7.4 enriched with 0.1% of serum albumine bovine). After stabilization of the basal respiratory rate i.e. in the absence of any exogenous agent, NaHS, used as sulfide donor, was added as a single shot at different concentrations. After NaHS addition in the incubation medium, and according to the dose of sodium sulfide used, the

respiratory rate went back to a value close to the basal value or below this basal value (i.e. at a time point when all the added NaHS was metabolized by HT-29 Glc^{-/+} cells). This allowed us to calculate the partial reversion rate of the effect of NaHS on O₂ consumption (22) as a percentage of the basal HT-29 Glc^{-/+} oxygen consumption. The calculation of oxygen consumption rate due to solely NaHS addition (ΔJO_2) was made using the difference between the oxygen consumption rate in the presence of sulfide and the basal rate. Uncoupled respiration rate was measured after addition of the proton ionophore carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP 1.5 μ g/ml). For evaluating the effect of divalent cations on sulfide-induced oxygen consumption inhibition, after addition of NaHS at inhibitory concentration, divalent cations were added and oxygen consumption was recorded continuously.

Cell treatments

HT-29 Glc^{-/+} cells at different differentiation states were incubated without or with butyrate, acetate or caprylic acid. Then, cells were isolated and used immediately for oxygen consumption measurement in the presence of 20 μ M NaHS concentration or in the presence of FCCP.

Dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) activity

DPPIV enzyme activity was measured using the method of Nagatsu (28) in sonicated cells. Briefly, DPPIV activity was determined spectrophotometrically at 405 nm using Gly-Pro-pNA as substrate. The protein contents of cells were determined by the method of Lowry et al. (25) using the Biorad kit.

Gene expression analysis

The expression levels of SQR, ETHE1 and TST genes were analysed by Real-time PCR. Total RNAs were extracted from HT-29 Glc^{-/+} cells, and from colonic biopsies by TRIzol® reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). Cells were lysed and homogenized directly in culture flask. Biopsies were homogenized using a Tissue Lyser (Qiagen, Courtaboeuf, France). RNA concentrations were determined by absorption measurement at 260 nm using a Nanodrop spectrophotometer (Labtek, Paris, France) and the RNA quality was checked by loading aliquotes onto 1% agarose gel. For Real-time PCR analysis, 400 ng of total RNA was first reverse transcribed using the high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Reverse transcribed RNA were amplified on a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the SYBR green fluorescence (PE Applied System) method and specific oligonucleotides designed with Primer Express software. The primers used were as follows: *18S*, forward,

5'-ACGGAAGGGCACCACCAGGAG-3' and reverse, 5'-GCACCACCACCCACGGAAACG-3' *ACTB*, forward, 5'-TCAGGAGGAGCAATGATCTTGA-3' and reverse, 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGATCAC-3'; *SQRDL*, forward, 5'-AGCGCCTT TCCATG T ATCTCA-3' and reverse, 5'-TCCCCAGTAACCCCTTAGCA-3'; *ETHE1*, forward, 5'-GGCTGCTCTATGCTGTGAATACC-3' and reverse, 5'- AGCCCCGAGCCTGTAATG T-3'; TST ,forward, 5'- TGCTGGAGAACCTTGAATCTAAGA -3' and reverse, 5'- GCCC GAGTCCAGTCCTACTG -3'. BLASTN searches were conducted against GenBank to check the total gene specificity of the nucleotide sequences chosen for the primers. The identity of the PCR products was confirmed by melting temperatures and dissociation curves. cDNA of all genes were amplified with same efficiency of PCR (greater than 98%) calculated from the slopes of the standard curves. Thermal cycling conditions comprised an initial denaturation step at 95°C for 10 min and 40 amplification cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. The cycle threshold (C_T) for each sample was determined at a constant fluorescence threshold line. Obtained values for cells and colonic biopsies were normalized against those for 18S and β -actin respectively, these latter remaining almost constant in all samples. Relative gene expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula, where ΔC_t value was determined as the difference between the C_t value for each gene tested and C_t value for reference gene. $\Delta\Delta C_t$ was calculated as the difference of ΔC_t between sample and control groups.

Data analysis

The results are expressed as mean values (\pm S.E.M). Statistical analysis was performed using the mixed models for repeated-measure analysis (version 9.1; SAS Institute, Cary, NC) with the t Student test, one-way or two ways ANOVA and Tukey-Kramer multiple-comparisons post hoc tests when appropriate. Differences with p values <0.05 were considered as statistically significant.

Acknowledgments

The authors thank the medical staff of the Gastroenterology department at Avicenne hospital for their excellent assistance in obtaining the biopsy samples. The financial support of NYCOMED France is gratefully acknowledged.

Authors' Disclosure Statement

No competing financial interest exists.

List of Abbreviations

ETHE1 Ethylmalonic encephalopathy

DPPIV Dipeptidyl peptidase VI

FCCP Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

SQR Sulfide quinone reductase

SOU Sulfide oxidation unit

TST Thiosulfate sulphur transferase

Literature Cited

1. **Andriamihaja M, Chaumontet C, Tome D, and Blachier F.** Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of cellular physiology* 218: 58-65, 2009.
2. **Andriamihaja M, Davila AM, Eklou-Lawson M, Petit N, Delpal S, Allek F, Blais A, Delteil C, Tome D, and Blachier F.** Colon luminal content and epithelial cell morphology are markedly modified in rats fed with a high-protein diet. *American journal of physiology* 299: G1030-1037, 2010.
3. **Attene-Ramos MS, Nava GM, Muellner MG, Wagner ED, Plewa MJ, and Gaskins HR.** DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. *Environmental and molecular mutagenesis* 51: 304-314, 2010.
4. **Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR, and Plewa MJ.** Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res* 5: 455-459, 2007.
5. **Attene-Ramos MS, Wagner ED, Plewa MJ, and Gaskins HR.** Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Mol Cancer Res* 4: 9-14, 2006.
6. **Blachier F, Davila AM, Mimoun S, Benetti PH, Atanasiu C, Andriamihaja M, Benamouzig R, Bouillaud F, and Tome D.** Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino acids* 39: 335-347, 2010.
7. **Bouillaud F, and Blachier F.** Mitochondria and sulfide: A very old story of poisoning, feeding and signaling? *Antioxidants & redox signaling* 2010.
8. **Flannigan KL, McCoy KD, and Wallace JL.** Eukaryotic and Prokaryotic Contributions to Colonic Hydrogen Sulfide Synthesis. *American journal of physiology* 2011.
9. **Florin T, Neale G, Gibson GR, Christl SU, and Cummings JH.** Metabolism of dietary sulphate: absorption and excretion in humans. *Gut* 32: 766-773, 1991.
10. **Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, and Levitt MD.** Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical pharmacology* 62: 255-259, 2001.
11. **Gibson GR, Cummings JH, and Macfarlane GT.** Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and environmental microbiology* 54: 2750-2755, 1988.
12. **Gubern M, Andriamihaja M, Nubel T, Blachier F, and Bouillaud F.** Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *Faseb J* 21: 1699-1706, 2007.
13. **Hambidge KM, Miller LV, Westcott JE, Sheng X, and Krebs NF.** Zinc bioavailability and homeostasis. *The American journal of clinical nutrition* 91: 1478S-1483S, 2010.
14. **Hara H, Konishi A, and Kasai T.** Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats. *The Journal of nutrition* 130: 83-89, 2000.
15. **Hildebrandt TM, and Grieshaber MK.** Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *The FEBS journal* 275: 3352-3361, 2008.
16. **Hill BC, Woon TC, Nicholls P, Peterson J, Greenwood C, and Thomson AJ.** Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. *The Biochemical journal* 224: 591-600, 1984.
17. **Jorgensen J, and Mortensen PB.** Hydrogen sulfide and colonic epithelial metabolism: implications for ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* 46: 1722-1732, 2001.

18. **Jorgensen J, and Mortensen PB.** Substrate utilization by intestinal mucosal tissue strips from patients with inflammatory bowel disease. *American journal of physiology* 281: G405-411, 2001.
19. **Kristensen MB, Hels O, Morberg CM, Marving J, Bugel S, and Tetens I.** Total zinc absorption in young women, but not fractional zinc absorption, differs between vegetarian and meat-based diets with equal phytic acid content. *The British journal of nutrition* 95: 963-967, 2006.
20. **Lagoutte E, Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Blachier F, and Bouillaud F.** Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1797: 1500-1511, 2010.
21. **Leschelle X, Delpal S, Gubern M, Blottiere HM, and Blachier F.** Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 267: 6435-6442, 2000.
22. **Leschelle X, Gubern M, Andriamihaja M, Blottiere HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso MD, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, Mignotte B, Bouillaud F, and Blachier F.** Adaptative metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et biophysica acta* 1725: 201-212, 2005.
23. **Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, and DeMaster E.** Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *The Journal of clinical investigation* 104: 1107-1114, 1999.
24. **Lin H.** Stem cells: to be and not to be. *Nature* 425: 353-355, 2003.
25. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193: 265-275, 1951.
26. **Macfarlane GT, Gibson GR, and Cummings JH.** Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *The Journal of applied bacteriology* 72: 57-64, 1992.
27. **Moore KA, and Lemischka IR.** Stem cells and their niches. *Science (New York, NY)* 311: 1880-1885, 2006.
28. **Nagatsu T, Hino M, Fuyamada H, Hayakawa T, and Sakakibara S.** New chromogenic substrates for X-prolyl dipeptidyl-aminopeptidase. *Analytical biochemistry* 74: 466-476, 1976.
29. **Nicholls P.** Inhibition of cytochrome c oxidase by sulphide. *Biochemical Society transactions* 3: 316-319, 1975.
30. **Ramasamy S, Singh S, Taniere P, Langman MJ, and Eggo MC.** Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *American journal of physiology* 291: G288-296, 2006.
31. **Reiffenstein RJ, Hulbert WC, and Roth SH.** Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology* 32: 109-134, 1992.
32. **Suarez F, Furne J, Springfield J, and Levitt M.** Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon. *The American journal of physiology* 274: G727-733, 1998.
33. **Szabo C.** Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews* 6: 917-935, 2007.
34. **Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prella A, Fagiolari G, Rimoldi M, and Zeviani M.** Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature medicine* 15: 200-205, 2009.
35. **Yoshikawa S.** X-ray structure and reaction mechanism of bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochemical Society transactions* 27: 351-362, 1999.

36. **Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, and Rousset M.** Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of cellular physiology* 122: 21-29, 1985.

Figure legends

Table.1. *Reversion rate of the effects of NaHS on O₂ consumption by HT-29 Glc^{-/+} cells.*

The reversion respiratory rates correspond to the stabilized respiratory rate following the stimulation or inhibition of oxygen consumption induced by addition of NaHS. Reverted oxygen consumption rates of cells were measured for different concentrations of NaHS and expressed as the percentage of basal oxygen consumption (before any NaHS addition). The results (mean ± SEM) represent 5-8 independent experiments. Values were considered significantly different when the p value was less than 0.05.

Fig.1. *Effects of sodium sulfide on HT-29 Glc^{-/+} cells oxygen consumption and effect of divalent cations on the sulfide-induced oxygen consumption inhibition* Six days after seeding; cells were isolated by trypsinization and used for O₂ consumption measurement. **(A)** ΔJO₂ was calculated as the difference between the oxygen consumption rate due to the NaHS and the basal oxygen consumption rate. **(B)** Represents the effect of divalent cations on the inhibitory effect of NaHS on oxygen consumption. NaHS 130 μM was firstly added and caused oxygen consumption inhibition and then cations were added in the incubation medium. Results are expressed as the percentage of the basal oxygen consumption i.e. with no added agent. The results (mean ± SEM) were obtained from at least 4 independently experiments. Values with different letters are significantly different (p<0.05).

Fig.2. *Spontaneous differentiation of HT-29 Glc^{-/+} cells associated with capacity to oxidize sulfide.* **(A)** Cells were isolated after 3 to 13 days of culture and counted. **(B)** DPPIV enzymatic activity was determined at different time after cell seeding **(C)** At days 3, 6 and 11, cells were isolated and used for oxygen consumption measurement. After stabilisation of the basal oxygen consumption (without NaHS), NaHS used at stimulatory dose (20 μM) was added. Results are expressed as the percentage of basal oxygen consumption considered as 100%. The results (mean ± SEM) represent 5-6 independent experiments. Values with different letters are significantly different (p<0.05).

Fig.3. *Effects of fatty acids pre-treatment on HT-29 Glc^{-/+}* HT-29 Glc^{-/+} cells were cultured between day 2 and day 6 or between day 10 and day 11 with 2 mM butyrate, 30 mM acetate or 2 mM caprylic acid. **A.** Cells were isolated for the measurement of the oxygen consumption in the presence of a stimulatory dose of NaHS i.e. 20 μM. Results are expressed as percentage of basal oxygen consumption (without NaHS) considered as the 100 % value of respiratory rate. Letters indicate significant differences between treated cells compared to

their corresponding control. **B.** Cells were isolated for the measurement of the respiratory rates before (basal oxygen consumption) and after addition of FCCP (1.5 $\mu\text{g/ml}$, uncoupled respiratory rate) in oxygraph chamber. Uncoupled respiration rates were expressed as percentage of basal oxygen consumption which is considered as 100%. The results (mean \pm SEM) represent 4-11 independent experiments. Values with different letters are significantly different between butyrate treated cells compared to their corresponding control. ($p < 0.05$).

Fig.4. Expression of *SQR*, *ETHE1* and *TST* genes in differentiated HT-29 *Glc^{-/+}* cells.

Cells were grown up to day 13. mRNA levels of *SQR* (**A**), *ETHE1* (**B**) and *TST* (**C**) were determined by qPCR analysis using specific primers. Relative expression value for each gene was calculated after normalization to RNA of reference gene (18S). Data are indicated as percent of control (day 2) (**D**). Expression of *SQR*, *ETHE1* and *TST* genes in butyrate treated HT-29 *Glc^{-/+}* cells. Cells were treated or not with 2 mM butyrate from day 2 to day 6 or from day 10 to day 11. *SQR*, *ETHE1* and *TST* mRNA levels were determined by qPCR analysis and data are indicated as percent of control (untreated cells). Data (mean \pm SEM) represent mean values of at least 5 independent experiments. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Fig.5. Expression of *SQR*, *ETHE1* and *TST* genes in human colon biopsies. Biopsies originating from different anatomical parts of the human large intestine were recovered from 12 healthy individuals and classified as caecum, ascending (Asc), transverse (Trans), descending (Des) colon and rectum. Total RNA was extracted from each biopsy sample. Using specific primers, *SQR* (**A**), *ETHE1* (**B**) and *TST* (**C**) mRNA levels were studied by qPCR analysis and normalized with beta-actin mRNA. Data are expressed as percent of control (mRNA levels in caecum) and are presented as mean \pm SEM. Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

Fig.6. Schematic view of the mitochondrial respiratory chain and the sulfide oxidation unit (SOU). The five mitochondrial respiratory complexes (including complex 2 indicated as Q) are shown as well as proton pumping by complexes I, III and IV and F₀/F₁ ATP synthase (complex V). The sulfide oxidizing unit consisting of Sulfide Quinone Reductase (*SQR*), dioxygenase (*ETHE1*) and thiosulfate sulfur transferase (*TST*) allows the conversion of H₂S into thiosulfate (H₂S₂O₃). The oxidation of two H₂S molecules results in the consumption of one atom of oxygen at the level of complex IV and one molecule of dioxygen (O₂) at the level of the dioxygenase *ETHE1*. Increased capacity of human colonic epithelial HT-29 *Glc^{-/+}* cells

to oxidize/detoxicate H₂S after differentiation appears to be related to the mobilization of the mitochondrial respiratory reserve but not to increased expression of the gene corresponding to the SOU enzymes.

Table.1. Reversion rate of the effects of NaHS on O_2 consumption by HT-29 $Glc^{-/+}$ cells.

Reversion respiratory rates (% of basal oxygen consumption)	NaHS doses (μM)			
	20	40	65	130
	86.57 \pm 6.65 (NS)	68.59 \pm 7.28 (p<0.05)	51.83 \pm 4.53 (p<0.05)	15.59 \pm 4.65 (p<0.0001)

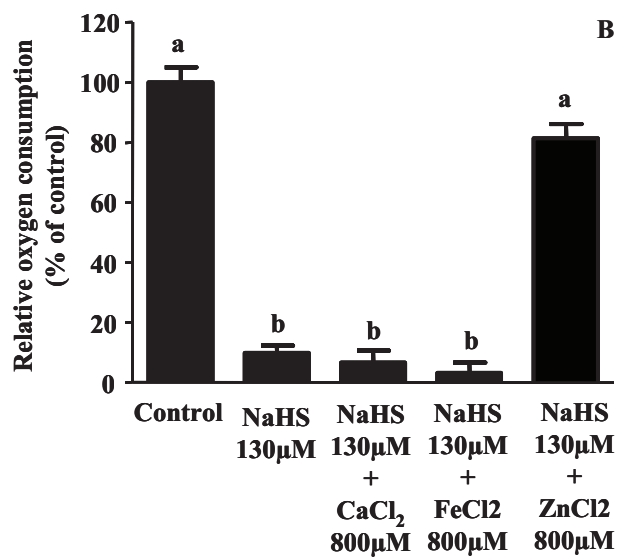
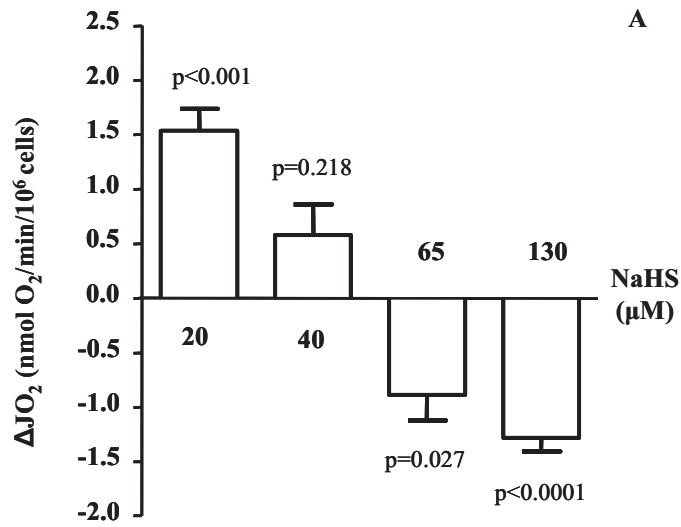


Fig.1. Effects of sodium sulfide on HT-29 $Glc^{+/+}$ cells oxygen consumption and effect of divalent cations on the sulfide-induced oxygen consumption inhibition

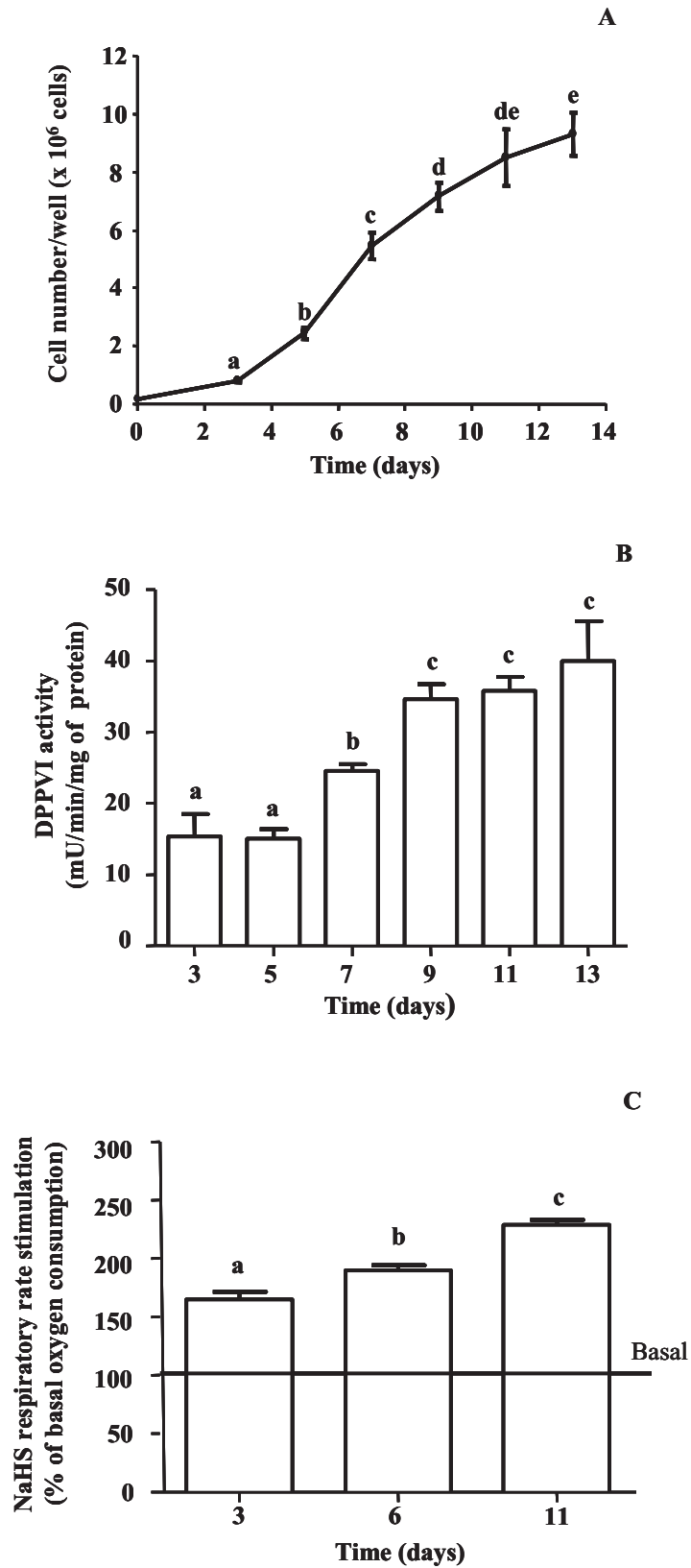


Fig.2. Spontaneous differentiation of HT-29 *Glc^{-/+}* cells associated with capacity to oxidize sulfide

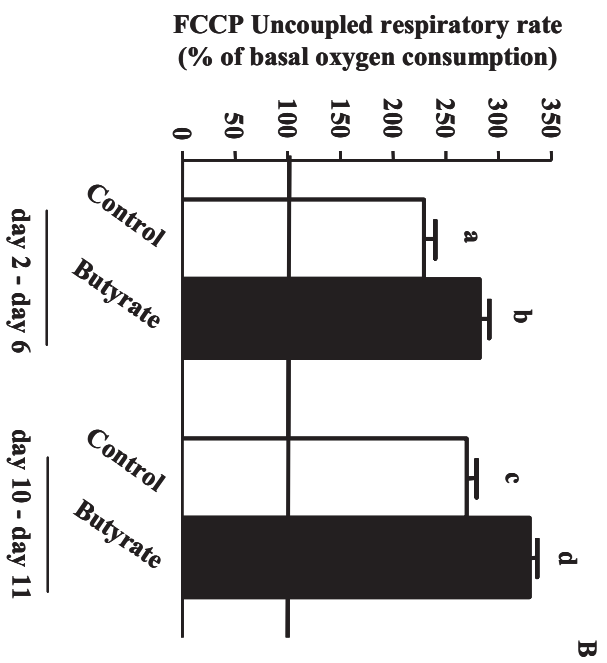
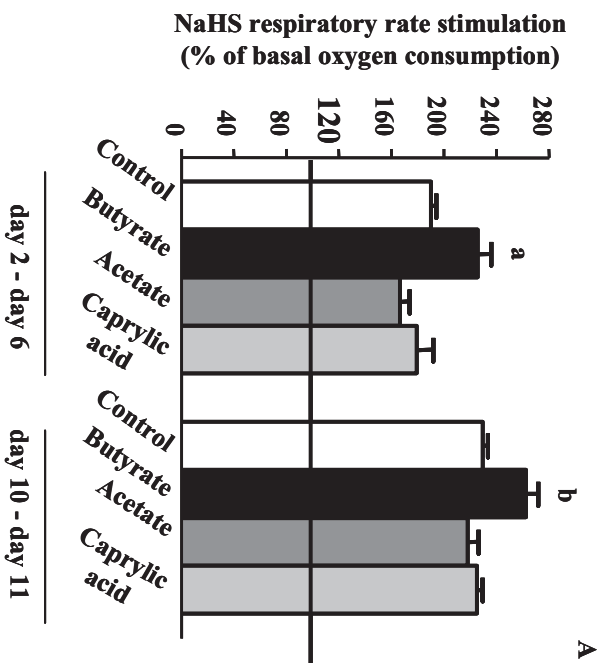


Fig.3. Effects of fatty acids pre-treatment on HT-29 $Gluc^{-/+}$

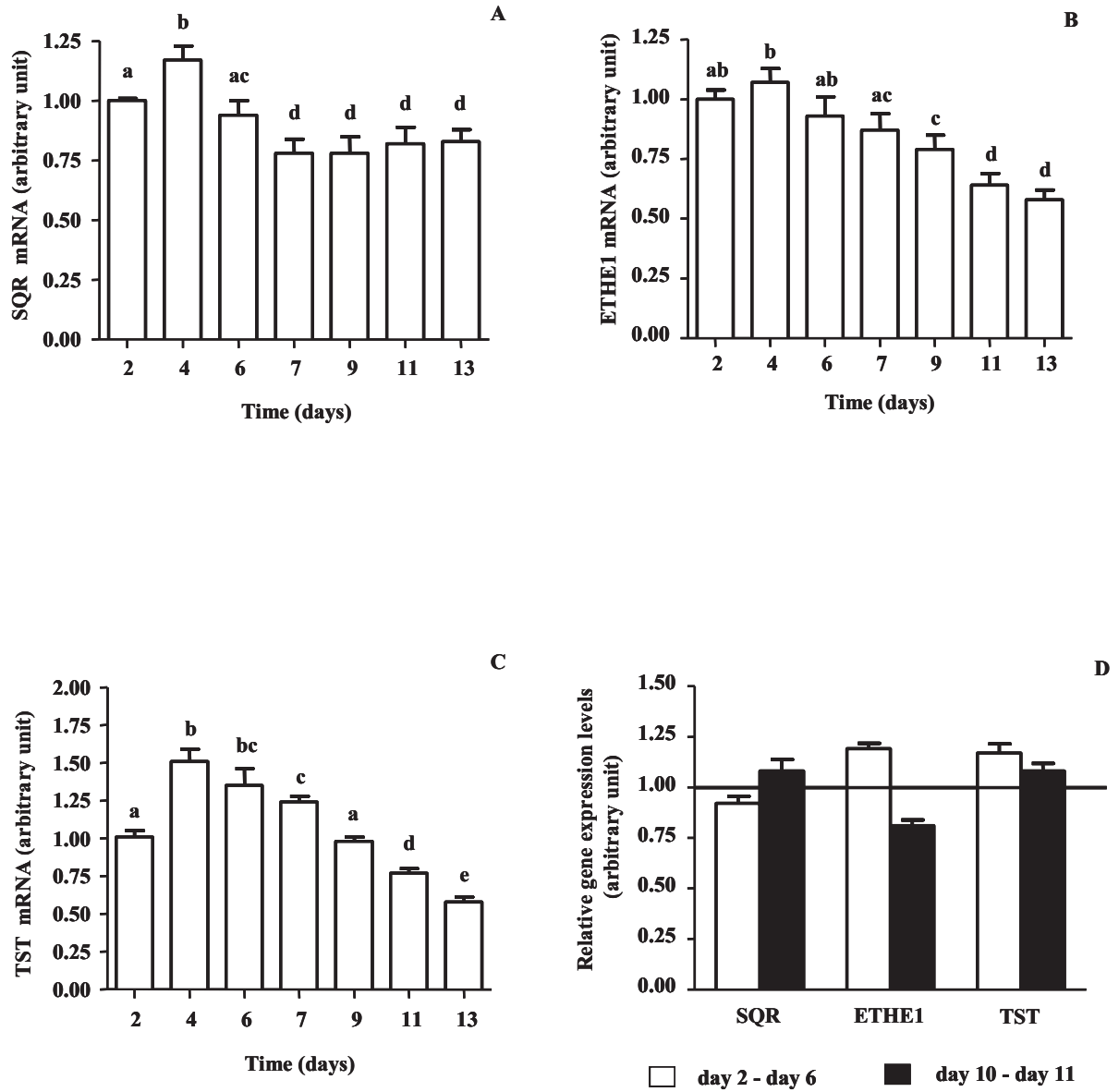


Fig.4. Expression of *SQR*, *ETHE1* and *TST* genes in differentiated *HT-29 Glc^{-/+}* cells.

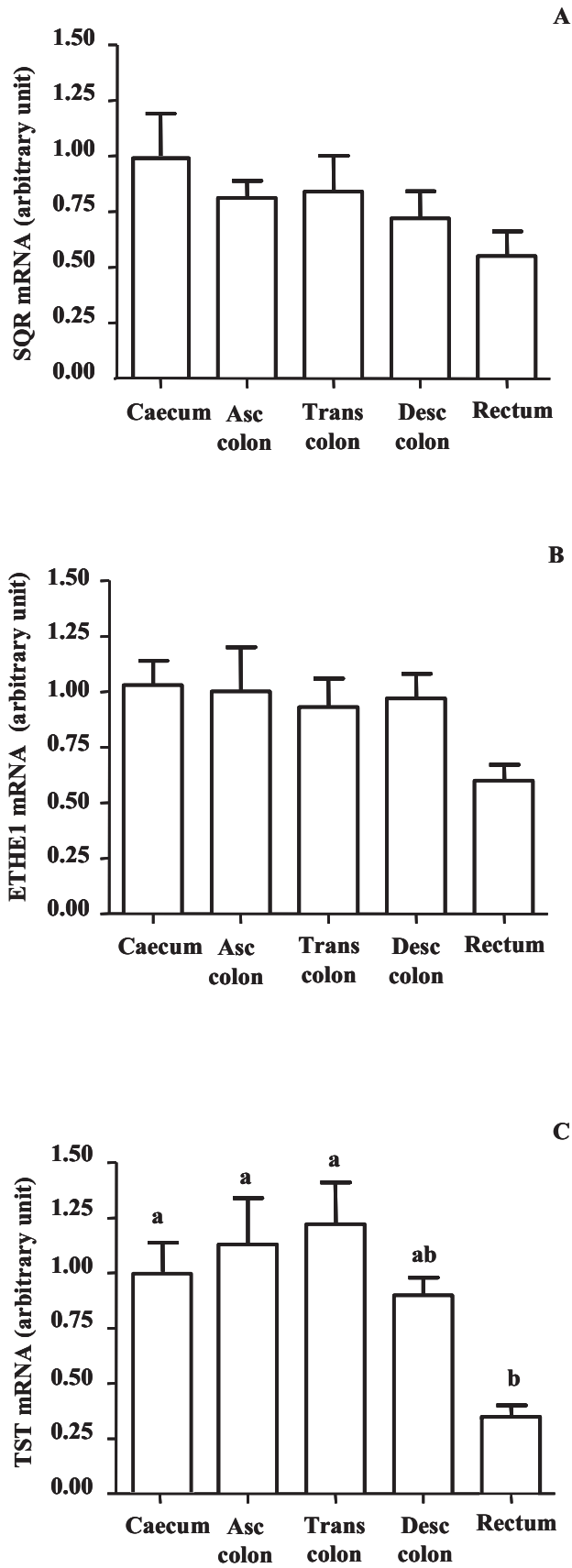


Fig.5. Expression of *SQR*, *ETHE1* and *TST* genes in human colon biopsies.

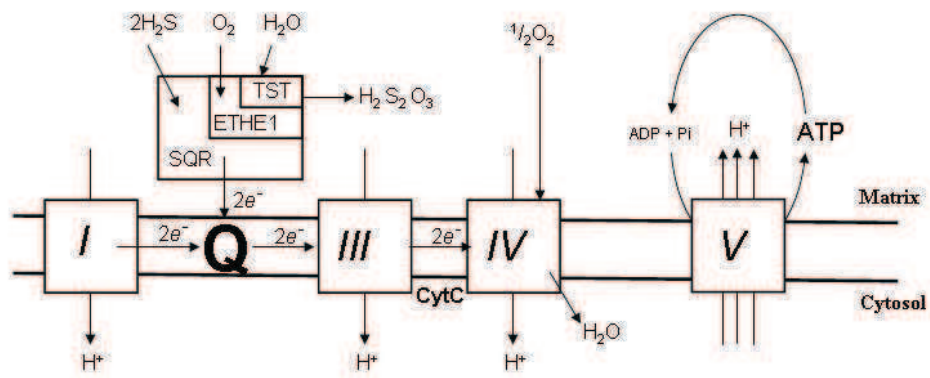


Fig.6. Schematic view of the mitochondrial respiratory chain and the sulfide oxidation unit (SOU).

RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

1. Effet d'un prétraitement des cellules HT-29 Glc^{-/+} au NaHS

Dans cette partie du travail, nous avons exploré l'effet d'un prétraitement au NaHS sur la capacité des cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} à oxyder/détoxifier le H₂S. Des travaux de la littérature nous ont laissé supposer la possibilité d'une modulation de la détoxification de H₂S par un prétraitement des cellules avec ce même métabolite. En effet, une induction de l'expression et de l'activité de l'enzyme de détoxification de H₂S, TST a été rapportée dans les cellules HT-29 parentales traitées au NaHS par l'équipe de Ramasamy (Ramasamy et al., 2006).

Les cellules ont été mises en culture en présence de différentes concentrations de NaHS (200µM, 500µM) pendant différents temps d'incubation (4 heures, 2 heures, 90min, 30 min). La consommation d'oxygène des cellules préincubées ou non au NaHS a été mesurée en présence de la concentration stimulante de NaHS c'est-à-dire 20µM, dans la chambre de l'oxygraphe.

Nos résultats n'ont pas mis en évidence une augmentation mesurable de la capacité des cellules à oxyder le H₂S après une pré-incubation au NaHS. Dans le but d'être plus claire, j'ai représenté les résultats d'une seule condition expérimentale (figure 34), c'est-à-dire l'effet du prétraitement des cellules HT-29 Glc^{-/+} à la concentration de 200µM de NaHS pendant 90min.

***Discussion générale et
perspectives***

1. Rappels des principaux résultats

Les résultats obtenus au cours de cette thèse et présentés dans l'article 1 montrent clairement qu'une augmentation de l'expression de la SQR dans les cellules CHO permet d'accroître l'oxydation/détoxication de H₂S. La présence d'une SQR fonctionnelle dans les cellules serait ainsi un facteur important déterminant la tolérance des cellules vis-à-vis de H₂S. Nos résultats montrent que la majorité des tissus étudiés (cœur, foie, rein) détoxiquent le H₂S, à l'exception notable du tissu nerveux. L'oxydation de H₂S dans les cellules humaines est couplée à la synthèse d'ATP et est particulièrement importante dans les cellules coliques HT-29 Glc^{-/+}. Notre travail souligne de plus, que des concentrations variant entre 10 à 40µM selon les phénotypes cellulaires et les protocoles expérimentaux utilisés constituent les concentrations intermédiaires en termes d'effet de H₂S c'est-à-dire entre l'énergisation et la toxicité mitochondriales. Notre étude est originale dans le sens où elle suggère la présence d'un transfert possible des électrons issus de l'oxydation de H₂S vers le complexe I dans les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} en situation d'inhibition de la cytochrome c oxydase. La réversion du complexe I associée au découplage mitochondrial observé, pourrait expliquer en partie la forte tolérance des cellules HT-29 Glc^{-/+} vis-à-vis de H₂S.

Les résultats présentés dans l'article 2 permettent de considérer la concentration de 50µM de NaHS comme une concentration « seuil » pour l'effet toxique de H₂S. Nos résultats soulignent également un effet protecteur du Zn de part sa capacité à lier le H₂S, et du butyrate de part son rôle pro différenciant, contre la toxicité de H₂S. Par ailleurs, notre étude met en évidence une détoxication de H₂S plus importante dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} différenciées que dans les cellules proliférantes suggérant que les cellules différenciées situées au fond des cryptes seraient plus sensibles à l'effet toxique de H₂S *in vivo*. Par ailleurs, notre étude révèle que l'augmentation de la capacité des cellules coliques HT-29 Glc^{-/+} à oxyder le H₂S semble due en grande partie à l'augmentation de la réserve respiratoire de ces cellules associée à la différenciation spontanée ou induite par le butyrate. Notre deuxième étude est également originale dans le sens où elle met en évidence, pour la première fois, l'expression des gènes codant les enzymes de détoxication de H₂S dans la lignée cellulaire tumorale HT-29 Glc^{-/+} mais également dans des biopsies prélevées dans différents segments du côlon humain sain. Une expression moindre du gène codant la TST a été observée dans le rectum par rapport aux segments coliques.

2. Discussion

A. L'effet de H₂S est régit par un seuil de concentration

Nos résultats ont confirmé les effets opposés en termes d'énergisation et de toxicité par inhibition de la cytochrome c oxydase attribués au H₂S dans la littérature (Gouvern et al., 2007; Li et al., 2011; Linden et al., 2010). Ils rendent compte cependant, de la difficulté à déterminer avec précision les concentrations seuils pour ces effets de H₂S.

Les limites expérimentales dans notre travail ne nous ont pas permis de déterminer avec précision la plus faible concentration de H₂S entraînant une oxydation par la SQR. La valeur théorique de 1µM rapportée dans l'article 1, pourrait bien être ainsi une surestimation de la valeur seuil au dessus de laquelle le H₂S est oxydé par la SQR. Dans notre deuxième article, nous avons utilisé la concentration de 20µM de NaHS comme concentration de référence pour l'oxydation de H₂S par la SQR dans les cellules coliques humaines. En effet, cette concentration représente dans notre travail, la plus faible concentration de NaHS pour laquelle nous observons une stimulation de la consommation d'oxygène concomitante de l'addition de NaHS. Cependant, cette concentration est loin d'être notre valeur seuil. En effet, le manque de sensibilité de notre appareil de mesure ne nous a pas permis de détecter une oxydation mesurable de NaHS pour des concentrations inférieures à 20µM. En effet, à basses concentrations de NaHS, l'oxydation de ce composé par les cellules HT-29 Glc^{-/+} semble se faire de façon très rapide et très efficace.

La toxicité de H₂S est généralement associée dans la littérature au H₂S exogène. En effet, aucun effet toxique n'a été rapporté pour le H₂S endogène. Ceci résulte du fait que les niveaux de production de H₂S endogène dans les différents tissus varient entre des concentrations nanomolaires et des concentrations micromolaires faibles (Cooper and Brown, 2008). Ainsi, ces valeurs sont soit trop faibles et par conséquent en dessous des valeurs de concentrations seuil pour un fonctionnement de la SQR, soit situées dans la gamme des valeurs de concentrations pouvant être gérées et oxydées par la SQR et induire une réponse bioénergétique.

Éléments déterminant la toxicité de H₂S

Notre travail souligne l'importance des conditions expérimentales notamment du mode d'exposition et du modèle cellulaire utilisé dans les effets toxiques liés au H₂S.

Modèle expérimental

L'analyse de l'effet de H₂S sur l'activité de la cytochrome c oxydase et sur la consommation d'oxygène mitochondriale ou cellulaire conduit à des valeurs de concentrations inhibitrices et/ou toxiques différentes. En effet, les concentrations toxiques de H₂S sont différentes selon que les cellules sont vivantes (intactes) ou perméabilisées. Notre travail rapporte une diminution de 50% de l'activité de la cytochrome c oxydase dans des cellules Jeg 3 intactes pour des concentrations de l'ordre de 20µM de NaHS. Des résultats précédents de notre équipe ont en revanche rapporté une diminution de 50 % de l'activité de la cytochrome c oxydase mitochondriale, dans des homogénats de cellules coliques humaines et des colonocytes de rats perméabilisés en présence de 0,3µM de NaHS (Leschelle et al., 2005); c'est-à-dire pour des concentrations qui sont 60 à 100 fois inférieures. Ce résultat suggère un rôle efficace de la membrane plasmique et de l'intégrité de la cellule dans la défense contre le H₂S extracellulaire. Dans toutes nos expériences, le H₂S est donné comme du sel de Na⁺ et HS⁻ qui par protonation peut générer H₂S. Or, seul H₂S est perméant. Il est donc possible que la diffusion de H₂S et de l'anion HS⁻ au travers des membranes cellulaires soit de nature différente selon que les cellules sont intactes ou perméabilisées. En effet, la membrane plasmique ou son potentiel (négatif à l'intérieur) peut constituer une barrière à l'entrée de l'anion et limiter ainsi la quantité de H₂S intracellulaire.

Tolérance des cellules vis-à-vis de H₂S

L'activité de la SQR pourrait être considérée et utilisée comme un critère déterminant la tolérance des cellules vis-à-vis de H₂S. La détermination de la tolérance au H₂S spécifique aux phénotypes cellulaires à la base de l'activité de la SQR pourrait nous permettre de définir des valeurs de toxicité de H₂S dans un tissu donné.

B. Détoxification de H₂S par les cellules de mammifères

Oxydation prioritaire de H₂S

Notre travail suggère une utilisation prioritaire de H₂S par les cellules de mammifères. En effet, une augmentation du rapport NADH/NAD concomitante à l'infusion de NaHS a été observée dans les cellules THP1. Cette augmentation est compatible avec une priorité des électrons issus de l'oxydation de H₂S pour le pool d'ubiquinone aux dépens des autres donneurs d'électrons, essentiellement le NADH, produit par l'oxydation des substrats carbonés. Cette notion de priorité pourrait être interprétée de deux manières. En effet, le H₂S peut être considéré comme un substrat énergétique privilégié pour les cellules de

mammifères mais il peut également être considéré comme un puissant toxique que les cellules doivent impérativement éliminer. La deuxième interprétation semble plus plausible car notre travail ne montre aucune augmentation du flux d'électrons suite à l'oxydation de H₂S ce qui suggère ainsi que l'oxydation de H₂S se fait dans un objectif de détoxication de H₂S et non de production d'énergie.

Stratégies de lutte pour les cellules ne tolérant pas le H₂S

Une production endogène de H₂S dans le cerveau a été rapportée dans la littérature. De plus, un rôle physiologique important lui a été attribué, notamment dans la potentialisation à long terme et la mémorisation via les récepteurs NMDA (Abe and Kimura, 1996; Kimura, 2000). Il apparaît ainsi probable que des mécanismes permettant d'éliminer le H₂S et d'inactiver les signaux enclenchés puissent être présents dans les cellules nerveuses (Linden et al., 2010). Notre travail souligne pourtant l'absence d'augmentation de la consommation d'oxygène en présence de NaHS dans le cerveau. En s'inspirant de l'article de revue de Bouillaud et Blachier, on pourrait proposer la présence d'un mécanisme alternatif de conversion de H₂S en des formes liées permettant aux cellules nerveuses de se protéger contre la toxicité de H₂S (Bouillaud and Blachier, 2011). Néanmoins, l'absence de capacité à oxyder le H₂S dans le cerveau pourrait avoir comme finalité d'empêcher l'oxydation trop rapide de faibles quantités de H₂S afin qu'il puisse exercer son rôle de neuromodulateur. Récemment, il a été suggéré que la neuroglobine, une protéine de la famille des globines retrouvée dans le système nerveux central, pourrait influencer les niveaux de H₂S dans le cerveau et ainsi protéger les cellules contre sa toxicité (Brittain et al., 2008).

La liaison de H₂S à des protéines comme moyen de lutte contre sa toxicité a été évoquée par de nombreux auteurs (Beauchamp et al., 1984; Shibuya et al., 2009b). Cependant, la nature de ces liaisons reste mal décrite dans la bibliographie (Pietri et al., 2011). Les interactions entre protéines et H₂S pourraient prévenir la toxicité de H₂S en le stockant provisoirement quand ce dernier est présent à des concentrations qui dépasseraient les capacités des cellules à l'oxyder localement grâce à la «*sulfide oxidation unit*». Il est également probable, que des protéines liant/interagissant avec le H₂S puissent protéger les tissus exempts de «*sulfide oxidation unit*» fonctionnelle, en le transportant vers des tissus à forte activité de détoxication de H₂S comme le foie par exemple. De plus, nous pouvons supposer que l'inactivation de H₂S par son interaction ou sa liaison à des sites protéiques ou par son oxydation par les enzymes de la «*sulfide oxidation unit*» pourrait avoir comme objectif de limiter la diffusion locale de ce «*gazotransmetteur*» et ainsi limiter les

communications intercellulaires. Des investigations restent encore à mener afin de mieux comprendre les aspects mécanistiques de ces phénomènes.

C. Adaptation des cellules coliques humaines au H₂S

Les colonocytes sont des cellules à l'interface entre le milieu interne et le milieu externe qui est la lumière colique. La présence d'enzymes de détoxification semble primordiale pour ces cellules afin de leur permettre de se protéger contre les toxiques en provenance de la lumière colique. En effet, à titre d'exemple, des enzymes de détoxification comme la superoxyde dismutase, la catalase et la glutathion peroxydase sont plus exprimées dans les colonocytes que dans les cellules de la sous-muqueuse (Roediger and Babidge, 1997). Notre travail a mis en évidence la présence d'une activité importante de détoxification de H₂S dans les cellules coliques humaines due à la présence des enzymes de la «*sulfide oxidation unit*». De plus, notre travail suggère la présence de mécanismes d'adaptation permettant aux colonocytes de résister aux effets de fortes concentrations de H₂S conduisant à des situations d'inhibition importante de la cytochrome c oxydase. Les mécanismes d'adaptation suggérés par notre travail et par les travaux précédents (Gouvern et al., 2007; Leschelle et al., 2005) dans les cellules coliques humaines sont résumés dans la figure 35.

En présence de faibles concentrations de H₂S ou des concentrations inférieures à 50µM, la SQR initialement, puis les autres enzymes de la «*sulfide oxidation unit*», détoxiquent le H₂S. Les électrons libérés sont transférés au pool d'ubiquinone pour rejoindre la chaîne respiratoire. L'oxygène est l'accepteur final de ces électrons. Le H₂S est transformé en produits non ou moins toxiques, thiosulfate par exemple. Pour des concentrations supérieures à notre valeur intermédiaire (50µM) et en dépit de la présence d'une SQR fonctionnelle, l'oxydation de H₂S par les cellules HT-29 Glc^{-/+} semble moins efficace pour contrecarrer l'inhibition de la cytochrome c oxydase induite par le H₂S jusqu'à l'inhibition totale de la respiration cellulaire observée dans notre travail à la concentration de 130µM de NaHS. Dans une situation d'inhibition totale de la cytochrome c oxydase, des mécanismes pourraient être mis en place dans le but d'éliminer le H₂S intra-mitochondrial afin de lever l'inhibition de la cytochrome c oxydase pour que les cellules puissent reprendre une activité bioénergétique normale. Cependant, il apparaît dans notre étude que l'inhibition marquée de la cytochrome c oxydase par le H₂S n'est que partiellement réversible suggérant qu'une inhibition de la respiration cellulaire puisse perdurer suite à une exposition des cellules à de fortes concentrations de H₂S.

En se basant sur des calculs de stœchiométrie c'est-à-dire le rapport entre l'augmentation de la consommation d'oxygène et la vitesse d'infusion de NaHS, notre travail suggère la présence, en situation d'inhibition de la cytochrome c oxydase, d'un transfert des électrons issus de l'oxydation de H₂S par la SQR vers le complexe I. Ce transfert induirait par la suite, une production de NADH à partir du NAD⁺ mais également une injection des protons vers la matrice entraînant un état de découplage mitochondrial donc une perte énergétique. De plus, une réversion du complexe II dans des cellules HT-29 Glc^{-/+} exposées à de fortes concentrations de NaHS a été également rapportée précédemment dans le travail de Gubern et al. (2007). Ainsi, la formation de succinate à partir de malate pourrait servir à la production de NAD⁺ qui jouerait le rôle d'accepteur des électrons au niveau du complexe I. Par ailleurs, une augmentation de la glycolyse ainsi qu'une augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP2 ont été également proposées comme mécanismes d'adaptation par Leschelle et al. (2005) dans les cellules coliques humaines. L'augmentation de la glycolyse permet aux cellules de compenser partiellement leur déplétion énergétique due à l'inhibition de la cytochrome c oxydase. L'augmentation de l'expression d'UCP-2 quant à elle aurait pour objectif d'augmenter le découplage mitochondrial des cellules afin de diminuer une production excessive des ROS (Dawson et al., 1993) et permettre le fonctionnement de la chaîne mitochondriale. Cependant, il faut garder à l'esprit que ces deux mécanismes ont été observés dans des cellules HT-29 Glc^{-/+} traitées au NaHS pendant 24 heures c'est-à-dire dans des conditions d'exposition pouvant être considérées comme chroniques alors que dans notre travail, l'exposition au NaHS a été faite pour de courtes durées.

De plus, une hypothèse toute nouvelle a été proposée par Bouillaud et Blachier afin de documenter la grande adaptation des cellules coliques humaines aux fortes concentrations de H₂S et attribuer une finalité physiologique aux mécanismes alternatifs décrits précédemment. Selon ces auteurs, au sein d'une même cellule le NADH produit par la réversion du complexe I pourrait être oxydé au niveau de certains sites où la SQR serait absente (Bouillaud and Blachier, 2011). Les auteurs ont proposé cette hypothèse en s'appuyant sur des données de la littérature considérant les mitochondries comme organisées en réseaux (Okamoto and Shaw, 2005). Ainsi, au niveau du pôle apical des colonocytes, les mitochondries seraient en contact avec de fortes concentrations de H₂S luminal. Ces mitochondries qui exprimeraient de façon importante la SQR auraient pour rôle de détoxiquer le H₂S. Il en résulterait ainsi, une production élevée de NADH. Les mitochondries situées au niveau du pôle basal qui ne seraient pas en contact avec le H₂S et n'exprimant pas de SQR se chargeraient alors d'oxyder le NADH afin de restaurer le potentiel

membranaire mitochondrial et de produire de l'ATP. Aussi séduisante qu'elle puisse être, cette hypothèse nécessite d'être confirmée expérimentalement.

La réversion du complexe I suggérée dans notre travail pourrait être considérée de manière spéculative comme l'équivalent de l'oxydase alternative terminale décrite par Volkel and Grieshaber. (1996) chez le ver *A.marina* qui permet, dans des conditions d'inhibition de la cytochrome c oxydase en présence de fortes concentrations de H₂S, le transfert des électrons issus de l'oxydation de H₂S vers l'oxygène. Le transfert alternatif des électrons serait probablement une particularité des organismes ou des cellules vivant dans des milieux riches en H₂S, notamment des cellules coliques humaines.

D. Toxicité de H₂S dans la lumière colique

Concentration de H₂S toxique dans le côlon

Nos résultats considèrent que des concentrations dans le milieu extérieur supérieures à 50µM de NaHS sont toxiques pour les cellules coliques humaines. Nos conditions de travail étant proches des conditions physiologiques, elles pourraient nous conduire à suggérer une extrapolation des concentrations toxiques définies dans nos conditions expérimentales à des concentrations toxiques réelles de H₂S dans le côlon humain. Ainsi, notre concentration de 50µM correspondrait à la concentration de H₂S libre disponible pour les colonocytes au dessus de laquelle un effet toxique apparaît. Elle ne représenterait que 8% du H₂S total dans la lumière colique (Jorgensen and Mortensen, 2001). La concentration de H₂S total induisant une toxicité serait ainsi, estimée approximativement à des valeurs supérieures à 0,625mM.

Cette valeur approximative nécessite des ajustements et des réserves. En effet, les calculs ont été faits à partir de concentrations de NaHS et non de H₂S. Un ajustement de ces calculs permettrait d'avoir la vraie concentration de H₂S responsable de l'effet biologique. De plus, nos expériences ont été réalisées sur les cellules tumorales HT-29 Glc^{-/+} et non sur des colonocytes sains, un ajustement sur les valeurs obtenues dans les colonocytes sains permettrait d'optimiser l'évaluation de la concentration toxique de H₂S. Compte tenu des études précédentes de l'équipe réalisées sur HT-29 Glc^{-/+} et colonocytes de rat (Gouvern et al., 2007), on s'attend à ne pas avoir de trop grandes discordances entre les valeurs de toxicité de H₂S des HT-29 Glc^{-/+} et celles des colonocytes. En effet, les cellules HT-29 constituent un bon modèle d'étude des colonocytes sains dans le domaine de l'étude du métabolisme oxydatif. Enfin, il convient de prendre en compte la diffusion du sulfure d'hydrogène de la lumière colique vers les colonocytes via la couche de mucus recouvrant l'épithélium colique. A ma connaissance, ce paramètre n'a pas été mesuré dans la littérature.

Une étude sur animaux permettrait de compléter nos observations. La mise des animaux sous régime normo ou hyperprotéique ou encore l'ingestion d'un régime contenant des protéines riches en acides aminés soufrés (par exemple la lactalbumine) permettrait de modifier physiologiquement les concentrations de H₂S dans la lumière colique. La détermination de la concentration de H₂S libre et liée pour chaque type de régime pourrait nous permettre une comparaison avec notre valeur théorique pour le H₂S (0,625μM). Une mesure de la consommation d'oxygène par polarographie des colonocytes isolés chez les animaux suite à l'ingestion de différents types de régimes permettrait de savoir si les capacités de consommation d'oxygène des colonocytes sont altérées suite à des modifications des concentrations luminales de H₂S.

La détoxification de H₂S dans le côlon

Dans notre travail, nous avons démontré la présence de transcrits des gènes codant les enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} ainsi que dans les différents segments du côlon humain. La présence de ces transcrits dans les cellules HT-29 Glc^{-/+} correspond bien aux capacités de ces cellules à oxyder le H₂S. Nous avons ainsi suggérer la présence de protéines fonctionnelles de la « *sulfide oxidation unit* » dans les cellules HT-29 Glc^{-/+}. De plus, notre travail a montré que l'oxydation de H₂S mesurée dans les cellules tumorales n'était pas due à des modifications qualitatives du métabolisme cellulaire associées à l'immortalisation ou aux conditions de culture, puisque cette même oxydation a été retrouvée dans les mitochondries isolées de tissus (article 1). Ce résultat pourrait en effet laisser suggérer la présence de protéines fonctionnelles de la « *sulfide oxidation unit* » dans le côlon humain. Le développement d'anticorps anti SQR et l'utilisation de ces anticorps en plus des anticorps anti TST et anti ETHE1 disponibles dans le commerce devraient confirmer la présence de ces protéines dans les différents segments du côlon par western blot et permettraient d'étudier leur localisation par immunohistochimie. L'étude de Ramasamy et al. (2006) a rapporté une expression de la protéine TST dans le côlon humain. Cette protéine selon les mêmes auteurs semble plus localisée dans les parties proximales des cryptes et à la surface de l'épithélium colique. Les auteurs ont ainsi établi un lien entre le phénotype différencié et l'augmentation de l'expression de la protéine. Notre travail, suggère au contraire une tendance à la diminution des niveaux d'expression du gène de la TST dans les cellules différenciées. Cette divergence soulève la nécessité de faire des études complémentaires. Nous pouvons envisager de faire des mesures des niveaux d'expression en western blot grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques des enzymes de la « *sulfide oxidation*

unit», sur des cellules isolées dans le côlon à partir des cryptes ou à partir de l'épithélium de revêtement. Ces expériences devraient apporter dans le futur des résultats déterminants.

Dans notre travail, la différenciation des cellules HT-29 Glc^{-/+} augmente leur capacité à oxyder le H₂S. Nous avons suggéré que les cellules de l'épithélium de revêtement seraient plus protégées contre la toxicité de H₂S que les cellules situées au fond des cryptes. Nos résultats révèlent également que dans les cellules différenciées, l'augmentation de la capacité de détoxification de H₂S assurée par les enzymes de la «*sulfide oxidation unit*» et par la chaîne de phosphorylation oxydative dépend principalement de la réserve respiratoire mitochondriale. En effet, la différenciation spontanée ou induite par le butyrate n'entraîne aucune augmentation de l'expression des gènes de la «*sulfide oxidation unit*» des cellules mais stimule significativement leur réserve respiratoire. L'augmentation de la réserve respiratoire dans les cellules différenciées spontanément ou par effet du butyrate, indique que les cellules ont des capacités respiratoires maximales supérieures à celles qu'elles utilisent pour leur respiration en conditions basales. Cette réserve respiratoire pourrait être mobilisée par les cellules vraisemblablement afin de permettre d'augmenter leur propre capacité de détoxification du H₂S.

Modulation de l'oxydation de H₂S dans les cellules coliques humaines

Modulation par le NaHS

Le prétraitement au NaHS des cellules HT-29 Glc^{-/+} dans notre étude n'a pas permis de mettre en évidence une quelconque augmentation de la capacité des cellules à oxyder le H₂S. Des résultats obtenus dans l'article de Ramasamy et al. (2006) ont rapporté un effet inducteur de l'activité et de l'expression protéique de la TST dans des cellules HT-29 parentales, traitées pendant 24 heures au NaHS à la concentration de 0,1mM. Selon ces mêmes auteurs, des concentrations variant entre 0,3 et 3mM sont toxiques pour les cellules coliques humaines. Dans notre travail, nous avons utilisé différentes concentrations de NaHS dont la plus faible était de 200µM. Cette concentration a été déterminée approximativement à partir de la concentration de 20µM qui est stimulante dans notre étude et en tenant compte du nombre de cellules prétraitées. Nos résultats pourraient révéler que nous ne nous sommes pas placés dans les bonnes conditions expérimentales (concentration de NaHS, durée de traitement) nous permettant de détecter une augmentation de la capacité des cellules à oxyder le H₂S. Par ailleurs, il n'est pas à exclure qu'une différence probable de réponse puisse exister entre les cellules HT-29 parentales et les cellules HT-29 Glc^{-/+} en

terme de réponse au H₂S. Il serait ainsi probable que les enzymes de la « *sulfide oxidation unit* » ne soient pas inductibles par le NaHS dans les cellules HT-29 Glc^{-/+}.

Modulation par le zinc

Notre travail a rapporté un effet protecteur du Zn contre la toxicité de H₂S et confirme les résultats de la littérature (Frederickson, 1989). Une réduction de l'effet de NaHS sur la viabilité cellulaire a été rapportée dans la bibliographie en présence de ZnCl₂ à la concentration de 200µM (Eghbal et al., 2004). L'affinité du Zn pour le H₂S a été bien décrite dans la littérature. Nos résultats ne nous permettent pas cependant, de vérifier si l'effet protecteur du Zn est exclusivement dû à l'interaction chimique directe entre les deux composés, ou si cet effet fait intervenir des mécanismes supplémentaires qui empêcheraient la liaison de H₂S ou déplacerait le H₂S lié à la cytochrome c oxydase dans le cas de la réversion de l'inhibition de la respiration cellulaire observée dans notre travail.

Modulation par le butyrate

La stimulation de la détoxification de H₂S dans notre travail par le butyrate, est due à l'augmentation de la réserve respiratoire des cellules probablement via l'inhibition des HDACs, mais non à une induction de l'expression des enzymes de la « *sulfide oxidation unit* ». Ce résultat est en désaccord avec ce qui a été décrit précédemment dans la littérature par d'autres auteurs (Ramasamy et al., 2006). Ces mêmes auteurs ont observé une augmentation de l'expression de la TST des cellules HT-29 parentales traitées au butyrate. Ce résultat pourrait encore laisser suggérer une différence de comportement et de réponse des cellules HT-29 Glc^{-/+} par rapport aux cellules HT-29 parentales. Par ailleurs, il n'est pas à exclure que des mécanismes, autres que l'augmentation de la réserve respiratoire des cellules par effet du butyrate, puissent être impliqués pour augmenter la capacité de nos cellules HT-29 à oxyder le H₂S. Une étude de la littérature a montré une stimulation de la détoxification des xénobiotiques des cellules HT-29 traitées au butyrate, associée à une augmentation de l'expression de la glutathion S-transférase (Pool-Zobel et al., 2005).

Un lien hypothétique a été établi dans la bibliographie entre la diminution de la production des AGCC le long du côlon, couplée à l'augmentation de la production de composés toxiques notamment le H₂S, et l'apparition de pathologies essentiellement dans la partie distale du côlon (Topping and Clifton, 2001). De façon spéculative, il est tentant de relier la capacité du butyrate à augmenter la détoxification de H₂S avec les effets bénéfiques de cet acide gras à chaîne courte sur la muqueuse colique normale et enflammée. Il est

cependant important de souligner, que les effets du butyrate sont différents selon que les cellules sont saines ou tumorales.

Notre travail a rapporté une expression moindre du gène de la TST dans les parties distales du côlon et particulièrement dans le rectum. De manière intéressante, de faibles niveaux d'expression de la TST ont été rapportés par d'autres auteurs dans les cancers colorectaux (Birkenkamp-Demtroder et al., 2002; Ramasamy et al., 2006). Cette observation pose la question d'un lien éventuel entre les faibles niveaux d'expression de la TST, et une prédisposition des parties distales du côlon au développement des lésions néoplasiques/cancéreuses. De plus, ces niveaux faibles d'expression de TST coïncident avec une concentration moindre du butyrate dans les parties distales du côlon dont le rôle pro-différenciant vis-à-vis des cellules épithéliales coliques est bien décrit mais également à une présence importante de H₂S dont le rôle génotoxique a été évoqué lors de nombreux travaux (Attene-Ramos et al., 2010). Nous pouvons également envisager que la combinaison de ces paramètres favoriseraient une détoxification moindre de H₂S dans les parties distales du côlon et dans le rectum.

3. Expériences en cours

Dans le but de déterminer le niveau d'expression par western blot et la localisation protéique de la SQR humaine sur des coupes histologiques de côlon par immunohistochimie, des travaux actuellement en cours au laboratoire portent sur le développement d'anticorps dirigés contre la SQR humaine (figure 36). En effet, dans une première série d'expériences, nous avons tenté malheureusement sans succès de produire des anticorps monoclonaux et polyclonaux dirigés contre la SQR humaine. Des animaux de laboratoire (souris et rats) ont été immunisés contre un peptide de 15 acides aminés hydrophile spécifique de la SQR humaine et couplé à la KLH, une protéine permettant d'augmenter son immunogénicité. Dans une nouvelle tentative, des anticorps seront, avec l'aide d'une société de biotechnologie (Eurogentech), produits par immunisation des animaux contre un nouveau peptide correspondant à la SQR humaine. En outre, les anticorps dirigés contre les enzymes de la «*sulfide oxidation unit*» devraient nous permettre en utilisant des biopsies prélevées chez des patients atteints de RCH ou de cancer colique, de voir s'il existe une altération de l'expression des enzymes de la voie de détoxification de H₂S dans ces pathologies du côlon.

Par ailleurs, dans notre laboratoire, une étude visant à mettre au point le dosage de l'activité de la SQR dans les cellules coliques humaines est également en cours de réalisation. L'objectif de cette étude est d'optimiser la technique de dosage décrite précédemment par

Hildebrandt et al. (2008) dans le foie de rat et l'adapter aux cellules coliques humaines. Un dosage de thiosulfate pourrait également être envisagé comme moyen pour doser l'activité des enzymes de la «*sulfide oxidation unit*» mais il requiert des méthodes d'analyse complexe incluant une étape de séparation par HPLC.

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle l'augmentation de la capacité des cellules à oxyder le H₂S dans les cellules différenciées est exclusivement due à l'augmentation du fonctionnement de la chaîne respiratoire et non à une augmentation du flux de H₂S dans la voie de la «*sulfide oxidation unit*». Afin d'essayer de confirmer cette idée, nous mesurons actuellement dans notre laboratoire par polarographie l'oxydation de H₂S des cellules proliférantes et différenciées spontanément ou par effet du butyrate (2mM) en présence d'oligomycine (0,5µg/ml). Cet agent est un inhibiteur de la F0/F1 ATPase mitochondriale et a pour conséquence de réduire le flux de la cytochrome c oxydase de 80%. Comme la consommation d'oxygène en présence de NaHS rend compte de la consommation au niveau de la «*sulfide oxidation unit*» et de la cytochrome c oxydase, dans ces conditions expérimentales, la consommation d'oxygène mesurée est majoritairement due à la «*sulfide oxidation unit*». Les résultats attendus nous permettraient alors de fournir des arguments supplémentaires en faveur de notre hypothèse.

Conclusion

La modulation de l'effet toxique de H₂S par le zinc semble un résultat particulièrement intéressant dans une perspective de recherche clinique. En effet, une application thérapeutique de médicaments contenant du Zn pourrait être envisagée afin de réduire les concentrations de H₂S excessives dans la lumière colique lesquelles pourraient favoriser des perturbations métaboliques et/ou des effets génotoxiques au niveau des colonocytes.

De plus, les résultats de modulation de l'effet toxique de H₂S par le butyrate révèlent un intérêt non seulement en termes de compréhension des phénomènes physiologiques de la fonction de détoxification mais aussi en termes de nutrition préventive. Le rôle protecteur du butyrate *in vitro* à des doses physiologiques contre la toxicité de H₂S est un résultat prometteur qui nécessiterait d'être confirmé *in vivo*. L'utilisation des fibres alimentaires butyrogènes pourrait être ainsi envisagée comme une véritable stratégie nutritionnelle de prévention et de traitement des désordres métaboliques associés à la toxicité colique du H₂S libre en concentration excessive par rapport aux capacités d'utilisation des colonocytes.

En outre, ce travail révèle que la SQR pourrait s'avérer une cible prometteuse pour des composés pharmacologiques nouveaux dans la perspective de favoriser la signalisation médiée par le H₂S endogène. De plus, l'utilisation de donneurs de H₂S, d'inhibiteurs de la SQR et de composés liant le H₂S comme des stratégies permettrait de contrôler le niveau optimal de H₂S capable d'assurer ses fonctions physiologiques au niveau du gros intestin sans entrer dans la zone de toxicité. Des essais d'intervention sont ainsi nécessaires pour apporter dans le futur des résultats déterminants.

Au terme de ma thèse, il m'apparaît clair que les voies métaboliques d'utilisation du H₂S par les colonocytes (et par d'autres phénotypes cellulaires) assurent une interconnexion entre la bioénergétique cellulaire, la détoxification, la signalisation et la physiologie cellulaire.

Annexes

Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe?

François Blachier · Anne-Marie Davila · Sabria Mimoun · Pierre-Henri Benetti ·
Calina Atanasiu · Mireille Andriamihaja · Robert Benamouzig ·
Frédéric Bouillaud · Daniel Tomé

Received: 20 November 2009 / Accepted: 2 December 2009 / Published online: 18 December 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Hydrogen sulfide (H₂S) is present in the lumen of the human large intestine at millimolar concentrations. However, the concentration of free (unbound) sulfide is in the micromolar range due to a large capacity of fecal components to bind the sulfide. H₂S can be produced by the intestinal microbiota from alimentary and endogenous sulfur-containing compounds including amino acids. At excessive concentration, H₂S is known to severely inhibit cytochrome *c* oxidase, the terminal oxidase of the mitochondrial electron transport chain, and thus mitochondrial oxygen (O₂) consumption. However, the concept that sulfide is simply a metabolic troublemaker toward colonic epithelial cells has been challenged by the discovery that micromolar concentration of H₂S is able to increase the cell respiration and to energize mitochondria allowing these cells to detoxify and to recover energy from luminal sulfide. The main product of H₂S metabolism by the colonic mucosa is thiosulfate. The enzymatic activities involved in sulfide oxidation by the colonic epithelial cells appear to be sulfide quinone oxidoreductase considered as the first and rate-limiting step followed presumably by the action of sulfur dioxygenase and rhodanese. From clinical studies with human volunteers and experimental works with

rodents, it appears that H₂S can exert mostly pro- but also anti-inflammatory effects on the colonic mucosa. From the available data, it is tempting to propose that imbalance between the luminal concentration of free sulfide and the capacity of colonic epithelial cells to metabolize this compound will result in an impairment of the colonic epithelial cell O₂ consumption with consequences on the process of mucosal inflammation. In addition, endogenously produced sulfide is emerging as a prosecretory neuromodulator and as a relaxant agent toward the intestinal contractibility. Lastly, sulfide has been recently described as an agent involved in nociception in the large intestine although, depending on the experimental design, both pro- and anti-nociceptive effects have been reported.

Keywords Sulfide · Large intestine · Colon · Detoxification · Energy metabolism

Introduction

Alimentary and endogenous protein digestion followed by amino acid and oligopeptide absorption in the small intestine is an efficient process. Indeed, the protein digestibility for most proteins is equal or even higher than 90% (Bos et al. 2005; Baglieri et al. 1994; Gausseres et al. 1996; Gaudichon et al. 1999). However, significant amounts of even highly digestible proteins escape digestion and enter the large intestine through the ileocecal junction (Evenepoel et al. 1999; Gaudichon et al. 2002). Indeed, nitrogenous material (mainly in the form of proteins and peptides), which represents between 6 and 18 g per day is transferred from the small intestine to the cecum in humans (Chacko and Cummings 1988; Silvester and Cummings 1995; Smiddy et al. 1960; Kramer 1966; Gibson et al. 1976). The fate of

F. Blachier (✉) · A.-M. Davila · S. Mimoun · P.-H. Benetti ·
M. Andriamihaja · D. Tomé
INRA, AgroParisTech, CRNH IdF, UMR 914 Nutrition
Physiology and Ingestive Behavior, Paris, France
e-mail: Francois.Blachier@agroparistech.fr

C. Atanasiu · R. Benamouzig
Department of Gastroenterology, Hôpital Avicenne,
Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Bobigny, France

F. Bouillaud
CNRS-FRE3210, Université René Descartes,
Site Necker, Paris, France

these compounds is to be degraded through proteolysis in the lumen of the large intestine by the colonic flora followed by the production of numerous metabolites including hydrogen sulfide (Blachier et al. 2007). Hydrogen sulfide (H₂S) has been recognized originally as a toxic gas known to disturb lung and brain functions (Nicholson et al. 1998; Grieshaber and Völkel 1998). In fact, human responses to H₂S are, depending on doses, irritation of the respiratory tract, pulmonary edema, respiratory paralysis, neural paralysis, cardiac arrhythmias, and death (Reiffenstein et al. 1992).

However, beyond this identity of a toxic gas and an environmental hazard, H₂S contained in the large intestine luminal content and produced by the microbiota from alimentary and endogenous sulfur-containing compounds has emerged as a compound with both beneficial and deleterious effects on the large intestine mucosa, depending on the doses tested and on the experimental situation chosen. In addition, H₂S is now considered as an endogenously produced signaling molecule by which its production is associated with important physiological and physiopathological functions including inhibition of insulin secretion, effects on smooth muscle cells and vasoconstrictor response, effects on mononuclear cell infiltration and leucocyte adhesion, and effects on haemodynamic parameters (see the review by Szabo 2007). Recently, several neuro-modulator functions of H₂S on the large intestine have been reported and will be presented in this review.

The main goal of this article is to present an overview of the different parameters which will change H₂S from a friend to a foe toward the large intestine mucosa according to (a) the metabolic capacity of the intestine microbiota for H₂S production, (b) the amounts of alimentary and endogenous substrates used by the microbiota for sulfide production, (c) the effects of luminal sulfide on the large intestine mucosa depending on the capacity of colonocytes to detoxify this compound, and (d) the role of endogenously produced sulfide in neuromodulation and nociception.

Production of sulfide by the large intestine microbiota

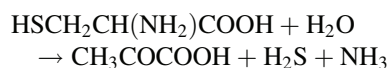
General characteristics of bacterial sulfide production

In prokaryotes, sulfide can be produced from sulfur-containing organic compound degradation and assimilatory or dissimilatory sulfate/sulfur reduction (Rabus et al. 2006). Some bacteria, including anaerobic ones, are then able to derive energy from the carbon chains of peptides and amino acids. Those bacterial sulfur-containing amino-acid-degrading activities produce sulfide (Smith and Macfarlane 1997; Awano et al. 2005). Bacterial assimilatory sulfate reduction generates reduced sulfur for biosynthesis processes (i.e., synthesis of sulfur-containing amino acids) and

does not result in the excretion of sulfide. Therefore, this latter bacterial metabolism cannot be considered significant for sulfide release whatever the ecosystem be. In dissimilatory reduction, sulfur compounds are involved in respiration processes and are used as electron acceptors instead of oxygen for energy conservation during anaerobic growth. This phenomenon is coupled to the oxidation of hydrogen or organic substrates which are acting as electron donors (Rabus et al. 2006; Hedderich et al. 1999). All these metabolic pathways are concomitant with bacterial growth and may contribute to the production of H₂S within the intestinal tract. However, it is worth noting that diet, transit time, and other parameters (e.g., pH, redox potential) are important determinants of bacterial metabolism. Consequently, the major part of the bacterial sulfide production takes place within the large intestine. Proteins and peptides entering the colon are first hydrolyzed to peptides and free amino acids by intestinal bacteria that produce a wide variety of proteolytic and peptidolytic enzymes (Macfarlane and Macfarlane 2003a). Peptides and free amino acids are predominantly incorporated and/or degraded by bacteria since the large intestine lacks significant capacity for their uptake. Peptide and amino acid degradation generate a wide range of gases and metabolites among which sulfide; but also other compounds including hydrogen, carbon dioxide, and short-chain fatty acids (SCFAs). These metabolites also result from carbohydrate fermentation and they can be utilized in dissimilatory sulfate reduction in the colon providing that oxidized sulfur species are present in the luminal content. It is worth noting that the presence of bacteria utilizing H₂S as electron donor (lithotrophic bacteria) has never been reported.

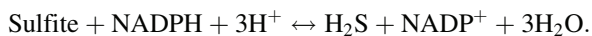
Bacterial metabolic pathways for sulfide production

Bacteria that degrade sulfur-containing amino acids possess specific desulfhydrases. For instance, cysteine desulfhydrase converts cysteine to pyruvate, H₂S, and ammonia according to the following reaction:



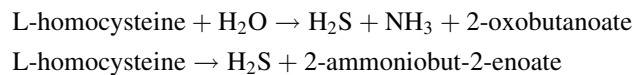
This type of enzymatic activity is exhibited by some anaerobic bacteria like *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Clostridia*, and *Enterobacter aerogenes* that are commonly found in the large intestine (Awano et al. 2005; Kumagai et al. 1975). An in vitro study has shown that slurries of human fecal bacteria ferment cysteine and methionine. In these experiments, the pyruvate formed at the expense of cysteine was fermented or transaminated to yield alanine. Methionine was thought to be converted to α -ketobutyrate, ammonia, and possibly methanethiol (Smith and Macfarlane 1997; Kadota and Ishida 1972).

Bacterial sulfate reducers may utilize hydrogen or a wide variety of simple organic compounds such as carboxylic acids, alcohols, polar aromatic compounds, and amino acids as electron donors. Their oxidation may be either incomplete leading to acetate excretion or complete leading to carbon dioxide production. Many sulfate-reducing bacteria can grow by utilizing sulfite or thiosulfate as alternate electron acceptors. A few of them are able to use cystine or oxidized glutathione as electron acceptors (Rabus et al. 2006; Schauder and Kröger 1993). Another pathway to generate H₂S is metabolism of sulfite by sulfite reductase. This iron flavoprotein is present in a wide variety of microbial genera and species of the γ -subclass of Proteobacteria (like *E. coli*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*), of the Firmicutes (like *Bacillus* and *Staphylococcus*), of the Actinobacteria (like *Corynebacterium* and *Rhodococcus*), and of the Bacteroidetes. This enzyme which was first studied in *E. coli* is able to balance the generation or the consumption of H₂S according to the needs in redox potential (Siegel et al. 1973). The reaction is:

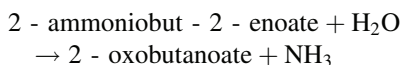


Cysteine synthase (CSase) is the enzyme responsible for the formation of cysteine from *O*-acetyl-serine and H₂S with the concomitant release of acetic acid. In bacteria such as *E. coli*, two forms of that enzyme are known: genes *cysK* and *cysM*. In fact, this activity is widespread among microbial world and is undoubtedly also present within the intestinal microbiota. At least one gene coding one isoform of this enzyme was identified in 908 bacteria and 67 archaea. Not less than 19 structures have been resolved (Tai et al. 2001; Clauss et al. 2005).

All those reversible pathways as well as concentration of H₂S in the luminal content are mostly dependent on the composition and activity of the microbial flora as well as its metabolic requirements. Moreover, minor specific pathways are operative and are very species-specific. For instance, *Proteus morganii*, with its homocystein-desulfurase, is able to catalyse the following reactions (Kallio 1951):



The following reaction is spontaneous:



Taxonomic groups

Bacteria that degrade sulfur-containing amino acids do not belong to a specific taxonomic group. To date, they were surprisingly poorly studied in the digestive ecosystem. These metabolic capacities were considered mainly by

biotechnologists whose aim was to obtain overproduction of sulfur-containing amino acids or by dentists who are concerned by halitosis. Nevertheless, the fermentation of amino acids by the colonic bacteria was investigated and the desulfhydration capability is undoubtedly found within the bacterial group composed of *Enterococci*, *Enterobacteria*, *Clostridia*, and species belonging to the genera *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, and *Eubacterium* (Smith and Marcfarlane 1997).

A wide variety of sulfate-reducing microorganisms have been isolated from diverse ecosystems. The bacteria belong to three main branches: (a) the δ -subclass of Proteobacteria with more than 25 genera, (b) the Gram-positive bacteria with the genera *Desulfotomaculum* and *Desulfosporosinus*, and (c) branches formed by *Thermodesulfobacterium* and *Thermodesulfovibrio*. Archaeal sulfate-reducers have also been isolated. They are strict anaerobes even if a few species tolerate oxygen for limited periods of time. Archaea, *Thermodesulfobacterium* and *Thermodesulfovibrio*, are thermophilic organisms and presumably cannot be found within the large intestine. Other groups include psychrophilic, mesophilic, and thermophilic species and they exhibit a wide morphological diversity (cocci, rods, curved forms, sarcina-like cell aggregates, and multicellular gliding filaments) (Rabus et al. 2006; Schauder and Kröger 1993; Hedderich et al. 1999). Most of the published works dealing with colonic sulfate-reducing bacteria only take into account the enumeration or the quantification of these species with molecular tools. Very few studies have been devoted to the assessment of the diversity of bacterial species. Studies based on cultivation methods concluded to the predominance of the genus *Desulfovibrio*. Despite this apparent lack of diversity, the different strains of *Desulfovibrio* isolated from the colon were metabolically versatile (Willis et al. 1997). A study based on molecular characteristics shows the predominance of *Desulfovibrio piger*, followed by *Desulfovibrio fairfieldensis* and *Desulfovibrio desulfuricans* (Loubinoux et al. 2002). Scanlan et al. (2009) performed a study of the diversity of *Desulfovibrio* sp which confirmed the predominance of *D. piger* in the large intestine of humans, and *Bilophila wadsworthia* was the second most recovered isolate. This latter study highlighted the presence of unknown and uncultured *Desulfovibrio* species.

Carriage and dynamics of sulfide-producing bacterial populations: what consequences on luminal environment?

Little is known about the carriage of bacteria degrading sulfur-containing amino acids. The impact of diets enriched with such amino acids has not been determined despite the fact that they potentially lead to high concentrations of H₂S and mercaptans that are toxic to mammalian cells (Smith

and Macfarlane 1997; Kadota and Ishida 1972). Moreover, longer colonic transit time affect the catabolism of carbohydrates and proteins leading to carbohydrate depletion and synthesis of putrefactive metabolites (Macfarlane and Macfarlane 2003a).

Recently, Stewart et al. (2006) determined the carriage rates of sulfato-reducing bacteria in 12 adults and 40 children. The bacteria were detected in 15% of the children and 58% of the adults. The authors noted that two of the methanogenic adults had, at the same time, high levels of sulfato-reducing-bacteria. Methanogenic archae and sulfato-reducing bacteria compete for hydrogen oxidation in the colon, and thus they are generally described as mutually exclusive populations. Nevertheless, the literature on this topic suggests that the two populations can coexist in the colon of a single host; one of the populations out-competing the other. Sulfate availability is generally cited as the regulator factor of the competitive relationship. Several studies suggest that other modulating factors likely exist (Gibson et al. 1988a, b; Pochart et al. 1992; Christl et al. 1992; Strocchi et al. 1994; Deplancke et al. 2003). Intestinal transit rate together with sulfate intake has been proved to alter sulfate and hydrogen metabolism (Lewis and Cochrane 2007). Dietary sulfate and faster intestinal transit increase fecal sulfate reduction rate and sulfide concentration. To date, the relative contribution of dietary and genetic factors has not been considered. In addition to the potential production of H₂S, inorganic anions like sulfate affect the route of carbohydrate fermentation. They act as electron sinks that divert hydrogen from other intestinal bacteria metabolism. The main consequences are an increased acetate production and a decreased butyrate and lactate formation (Macfarlane and Macfarlane 2003b).

Alimentary and endogenous substrates for sulfide production and binding of luminal sulfide by fecal components

The H₂S concentrations in the luminal content of the human large intestine have been reported to be between 1.0

and 2.4 mmol/L (Macfarlane et al. 1992) (see Table 1). The sulfide concentration in the feces recovered from humans ranged from 0.22 to 3.38 mmol/kg (Magee et al. 2000). Florin (1991) found a somewhat lower H₂S concentration in human feces (i.e., 0.17 mmol/kg feces). Jorgensen and Mortensen (2001) found a concentration of sulfide in human feces in the range of what was measured by Magee et al. (2000) averaging 0.74 mmol/L. Interestingly, there was a correlation between the level of meat intake (and presumably protein in meat) and the level of fecal excretion of sulfide. In the experimental rodent models, the sulfide concentration in the luminal content has also been measured. The total sulfide concentration in the rat cecal content (i.e., 1.5 mmol/kg), as determined by Levitt et al. (2002), was found to be not vastly different when compared with what is found in the human large intestine content. In mice, Deplancke et al. (2003) found that H₂S concentrations in the large intestine luminal content was lower representing between 0.2 and 1.1 mmol/kg.

However, it has to be emphasized that probably a large fraction of sulfide is in bound form in the colonic luminal content. This can be presumed from experiments with feces recovered from human volunteers, which indicates that 8% of total sulfide is in its free (unbound) form (Jorgensen and Mortensen 2001), representing a free concentration equal to 60 μmol/L. In rats, it was determined that approximately 1% of total sulfide in feces is in its free form (Levitt et al. 2002) averaging 2.7 μmol/kg (Table 1). Although it was determined that there is a large capacity of fecal components to bind H₂S (Jorgensen and Mortensen 2001), the compounds responsible for this binding remain largely unknown. In the rat model, it has been determined that zinc acetate reduced cecal H₂S by fivefold indicating potential capacity of this divalent cation for sulfide binding (Suarez et al. 1998). In batch cultures seeded with fecal flora, bismuth, iron, and zinc (but not magnesium) were able to diminish free H₂S concentration (Mitsui et al. 2003).

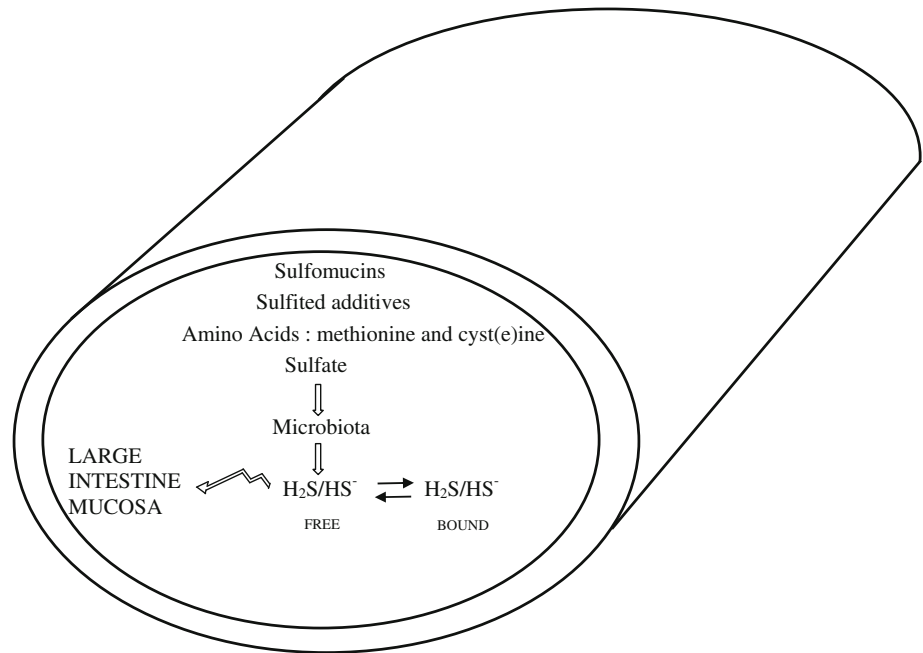
H₂S can be produced by the large intestine microbiota from numerous substrates (see Fig. 1): sulfur-containing amino acids (methionine and cyst(e)ine), inorganic sulfate,

Table 1 Fecal and luminal concentrations of sulfide in the large intestine of human volunteers and experimental animals

Biological material	Total sulfide concentration	Free (unbound) sulfide concentration	References
Human large intestine luminal content	1.0–2.4 mmol/L	ND	Macfarlane et al. (1992)
Human fecal content	0.22–3.38 mmol/kg	ND	Magee et al. (2000)
Human fecal content	0.17 mmol/kg	ND	Florin (1991)
Human fecal content	0.74 mmol/L	60 μmol/L (8% of total concentration)	Jorgensen and Mortensen (2001)
Rat luminal cecal content	1.5 mmol/kg	2.7 μmol/kg (0.2% of total concentration)	Levitt et al. (2002)
Mouse large intestine luminal content	0.2–1.1 mmol/kg	ND	Deplancke et al. (2003)

ND not determined

Fig. 1 Production of sulfide by the intestinal microbiota from the luminal substrates in the lumen of large intestine



and sulfited additives (Florin et al. 1991; Gibson et al. 1988a, b). Inorganic sulfur in the form of sulfite, sulfur dioxide, bisulfate and metabisulfite is currently used for preservation of food and beverage (Wedzicha 1984). Sulfur-containing amino acids, which are fermented by the microbiota, can originate from both alimentary and endogenous proteins which have escaped digestion in the small intestine (Evenepoel et al. 1999; Gaudichon et al. 2002). A western diet contains between 1.5 and 16.0 mmol/day of inorganic sulfate and about 3.8 mmol/day of protein-derived sulfate (Lewis and Cochrane 2007). Drinking water, especially those from private wells, may contain up to 20 mmol/L of sulfate (Deplancke et al. 2003). In addition to these different sources of substrates, sulfated polysaccharides such as sulfomucins are endogenous substrates for H₂S production (Willis et al. 1996). Human colonic mucins are known to be more highly sulfated than small intestine mucins (Liau and Horowitz 1976) and the thickness of both the firm and loosely adherent layers is higher in the large than in the small intestine (Allen and Flemström 2005) raising the view that large intestine mucus can represent a significant precursor for H₂S production. Endogenous secretion of sulfate in the upper gastrointestinal tract has been estimated to be between 1.5 and 2.6 mmol/day (Willis et al. 1996). In contrast to conventional animals, germ-free mice accumulate large amounts of mucins in the gut, in particular, in the vastly distended cecum (Drassar and Hill 1974). Interestingly, it has been shown that in vitro mixed culture of human fecal bacteria grown in a three-stage continuous culture system (that mimics the gastrointestinal tract), when fed with porcine gastric mucins in addition to a mixture of

polysaccharides and proteins, allows extensive mucin degradation. This phenomenon is evidenced by the stimulation of SCFA production and the rise of sulfate reduction and a concomitant complete inhibition of methanogenesis (Gibson et al. 1988a). In vitro experiments in a single-stage chemostat show that the complete degradation of mucins requires consortia of bacteria. In coculture, *Bacteroides fragilis* releases sulfate from mucins in sufficient amount to support the growth of a sulfate-reducing bacteria (Willis et al. 1996).

Although sulfate was first believed to be poorly absorbed by the human gastrointestinal tract (Wilson 1962), it appears that a net absorption of sulfate is measurable and that the amount of dietary sulfate as well as the small intestine absorption capacity are the main factors affecting the amount of sulfate reaching the colon (Florin et al. 1991). The ability of the small intestine to absorb sulfate is about 16 mmol/day in normal subjects but represents not more than 5 mmol/day in the ileostomists (Florin et al. 1991). It is also possible that secretion of sulfate by the colonic mucosa represents a significant contributor for luminal sulfate content. In human volunteers, the ingestion of sulfate supplement was found to increase the fecal sulfide production rate (Lewis and Cochrane 2007). From these data, it appears that current concentrations of sulfate in the large intestine are adequate to support growth of sulfate-reducing bacteria.

From experimental work using the rat model, it has been determined that the H₂S production in the lumen of the large intestine depends on the dietary conditions since fasting is associated with a marked reduction of cecal H₂S concentrations, and since the ingestion of the nonabsorbable sulfur

compound carrageenan results in a sharp increase of the concentration of this compound (Suarez et al. 1998).

Effects of sulfide on large intestine mucosa

Effects of sulfide on colonic epithelial cell oxidative metabolism

Because of its lipid solubility, H₂S penetrates biological membranes (Reiffenstein et al. 1992). In an aqueous solution, H₂S dissociate yielding hydrosulfide anion and sulfide ion with pK_a values being equal to 7.04 and 11.96, respectively. At physiological pH (i.e., pH 7.4), approximately one-third of H₂S remains undissociated (Wang 2002), whereas remaining two-third is hydrosulfide anion (HS⁻) at equilibrium with H₂S. Also, H₂S is known to severely inhibit cytochrome oxidase activity; an effect characterized by a binding constant similar to the one measured with cyanide (i.e., 0.2 μmol/L) using purified cytochrome *c* oxidase (Petersen 1977; Hill et al. 1984). Cytochrome *c* oxidase is the terminal oxidase of the mitochondrial electron transport chain which catalyses the reduction of the dioxygen (O₂) to water and harnesses the free energy of the reaction to phosphorylate ADP to ATP (Yoshikawa 1999). Using homogenate of the colonic epithelial cells HT-29, it was determined that IC₅₀ of the sodium salt of H₂S-NaHS for cytochrome *c* oxidase activity is equal to 0.32 μmol/L (Leschelle et al. 2005). Accordingly, micromolar concentrations of NaHS, in the range of 30–60 μmol/L, are able to severely decrease HT-29 cellular oxygen consumption. However, this inhibitory effect was found to be largely reversible (Leschelle et al. 2005). H₂S has been reported to be able to inhibit butyrate oxidation in isolated human colonocytes (Roediger et al. 1993a). Using millimolar concentrations (1.25 and 2.5 mmol/L) of sulfide, Jorgensen and Mortensen (2001) found marked inhibition of butyrate oxidation by rat colonocytes. In this latter study, and as expected, the authors found that bound sulfide has little effect on butyrate oxidation by colonocytes. In another work, Roediger et al. (1993b) found a weak inhibition of butyrate oxidation in rat colonocytes using 100 μmol/L NaHS; an effect that was hypothesized to be due to the inhibition of butyryl-CoA dehydrogenase which participates in mitochondrial beta-oxidation (Moore et al. 1997; Shaw and Engel 1987; Babidge et al. 1998). However, since NaHS is also able to affect acetate and L-glutamine oxidation which are not related to the beta-oxidation (Leschelle et al. 2005), this indicates that butyryl-CoA dehydrogenase is not the exclusive point of impact of NaHS on colonic epithelial cell oxidative metabolism. It is worth noting that the concentration of free sulfide necessary for inhibition of

butyrate oxidation in isolated rat colonocytes represents at least 30-fold the measured concentration of free sulfide in the large intestine luminal content of the rat; raising the view that in vivo, cytochrome *c* oxidase inhibition is a more likely target of sulfide than enzymes involved in SCFA and other substrate oxidation.

Pre-treatment of the human colonic epithelial cells HT-29 with 1 mmol/L NaHS for 2 h induced neither cell necrosis nor apoptosis, but induced a marked decrease of the cell proliferative capacity (Leschelle et al. 2005). Also, NaHS pre-treatment provoked a more than fourfold increase of the net capacity of HT-29 cells to produce lactate in the glycolytic pathway. Since the adenine nucleotides such as ATP, ADP, and AMP were found unchanged in sulfide-treated cells when compared to untreated cells, despite the inhibitory effect of NaHS on cell oxygen consumption (Leschelle et al. 2005), it was proposed that reduced cell mitosis [thus reduced energy consumption (Buttgereit and Brand 1995)] and increased glycolysis (thus increased anaerobic energy production) represent an adaptation of HT-29 cells toward the effect of sulfide on colonic epithelial cell.

However, the concept that sulfide is simply a metabolic troublemaker toward colonic epithelial cells has been challenged recently (see “[Detoxifying metabolism of sulfide by large intestine epithelial cells](#)”).

Effects of endogenous sulfide as a neuromodulator in the large intestine

Schicho et al. (2006) reported that in humans, more than 90% of submucous and myenteric neurons are colabeled for cystathionine gamma-lyase (CSE) and cystathionine beta-synthase (CBS). These pyridoxal phosphate-dependent enzymatic activities, which are involved in the *trans*-sulfuration of cysteine (Stipanuk 2004), are responsible for the intracellular production of H₂S (Szabo 2007) (see Fig. 2). Furthermore, Schicho et al. (2006) found that the sodium salt of H₂S at millimolar concentrations increased chloride secretion in a colonic submucosa/mucosa preparation. This effect was mimicked by the utilization of cysteine instead of NaHS. Overall, these results suggest that H₂S represent a novel prosecretory neuromodulator in the colonic mucosa.

Interestingly, it was discovered that NaHS at micromolar concentrations is able to exert relaxant effect in a preparation of isolated ileum and to reduce the contractile response of isolated ileum to acetylcholine (Teague et al. 2002) leading the authors to propose that H₂S is involved in controlling the ileum contractility.

Using immunohistochemistry and RT-qPCR, Linden et al. (2008) showed that the mouse colon express the H₂S-forming enzymes CSE and CBS, reinforcing the idea that

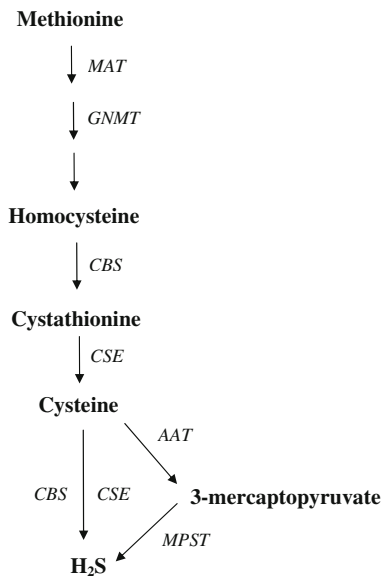


Fig. 2 Endogenous H_2S production. *MAT* methionine adenosyltransferase, *GNMT* glycine *N*-methyltransferase, *CBS* cystathionine beta-synthase, *CSE* cystathionine gamma-lyase, *AAT* aspartate aminotransferase, and *MPST* 3-mercaptopyruvate sulfur transferase

sulfide is an endogenously formed signal molecule in the colon. CSE and CBS are highly expressed in the colonic mucosa, but only CSE appears to be expressed in the external muscle layers including the myenteric plexus.

In isolated segments of mouse colon, sodium H_2S causes an inhibition of spontaneous motor complexes (Gallego et al. 2008). This agent was also able to inhibit the spontaneous motility in strips from human and rat colons. All these effects appear to be critically dependent on the K^+ channels (Gallego et al. 2008).

Sulfide and nociception

Sulfide has recently been implicated in the nociception in the large intestine but controversial results have been obtained in this research area. In 2006, Distrutti et al. (2006b) tested a derivative of mesalamine i.e., 5-amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thioxo-5H-(1,2)dithiol-3yl)-phenyl ester as an H_2S -releasing agent for modulating nociception to colorectal distension in healthy and post-colitic rats. They found that this compound, through a mechanism involving the ATP-dependent K^+ channels inhibits the hypersensitivity induced by colorectal distension in both physiological and pathological situations. In the same model of colorectal distension in rats, Distrutti et al. (2006a) found that intraperitoneal injection of 60 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ NaHS was also efficient for the attenuation of nociception.

These results are in contrast with the one obtained by Matsunami et al. (2009) using the mice model. These authors reported that after intracolonic administration of

0.5–5 nmol/mouse NaHS, visceral pain-like behavior and abdominal hyperalgesia could be recorded. Using the experimental rat model of irritable bowel syndrome in which chronic visceral hyperalgesia is provoked using colonic injection of 0.5% acetic acid, it was found that the expression of CBS in colonic dorsal root ganglion and H_2S signaling is likely to play a role in the development of chronic visceral hyperalgesia (Xu et al. 2009). In fact, CBS immunoreactivity was found in a vast majority of the dorsal root ganglion neurons, and CBS expression was increased after acetic acid treatment. In addition, perfusion of 250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ NaHS in the dorsal root ganglion neurons leads to an increase in the number of action potentials in 68% of the neurons.

The controversial results obtained by these authors can likely be explained by the different experimental protocols used, by the different doses of active agents used as well as the different route of administration (i.e., intraperitoneal and intracolonic). In that regard, intraluminal injection of sulfide in the colon appears to be more related to the physiological effect of this agent. Additional experiments are needed in order to decipher the respective role of endogenously formed and intraluminal H_2S for the effect of this compound on algia originating from the large intestine.

Detoxifying metabolism of sulfide by large intestine epithelial cells

Since sulfide is a potentially deleterious compound for the intestinal epithelial cells when present in excess, the identification of the enzymatic systems responsible for sulfide detoxification is of major interest. Thiol *S*-methyltransferase is found to be present with a relatively high activity in the rat cecal and colonic mucosa (Weisiger et al. 1980). This enzyme catalyses the methylation of H_2S in the presence of *S*-adenosylmethionine. However, conversion of sulfide to thiosulfate appears to represent the main process for sulfide detoxication in colonic epithelial cells. In fact, analysis of cecal venous blood obtained after intracecal instillation of radioactive H_2S in rats reveals that virtually all absorbed H_2S is oxidized to thiosulfate (Levitt et al. 1999). This metabolic capacity appears to be a specialized function of the large intestine mucosa since the other tissues tested were much less efficient for such a process (Furne et al. 2001). Another enzyme, namely rhodanese, which is expressed in the submucosa and crypts of the colon has been proposed to be involved in the process of sulfide detoxication in the large intestine (Picton et al. 2002). This enzyme requires the presence of cyanide for catalytic activity (Picton et al. 2002); and this latter property has raised questions about its physiological

implication in the course of sulfide detoxification. Although it was initially proposed that rhodanese activity catalyses the reaction of sulfide and cyanide to form thiocyanate (Picton et al. 2002), it appears from recent data that rhodanese is not involved in the first step of H₂S metabolism, but most likely in a more distal step of sulfide detoxification (Wilson et al. 2008). From experimental work performed with rat liver, it appears that the membrane-bound mitochondrial enzyme sulfide quinone reductase (SQR) is the mitochondrial enzymatic activity involved in the first step of sulfide detoxification (Hildebrand and Grieshaber 2008) allowing conversion of H₂S to persulfide. Then, a putative sulfur dioxygenase located within the mitochondrial matrix would oxidize persulfide to sulfite with molecular oxygen consumption. Much interestingly, the demonstration that mice invalidated for the mitochondrial dioxygenase ETHE1 dies between the fifth and the sixth week after birth due to sulfide toxicity clearly demonstrates that this enzymatic activity is of paramount importance for sulfide detoxification (Tiranti et al. 2009). The enzyme rhodanese with sulfur transferase activity is likely acting in third position in the liver cell mitochondrial matrix allowing conversion of sulfite to the metabolic end product thiosulfate (Hildebrand and Grieshaber 2008). In the colonic mucosa, Wilson et al. (2008) have proposed that sulfide oxidase, as the first and rate-limiting step, catalyses the conversion of H₂S to thiosulfate; thiosulfate being then converted to thiocyanate by the rhodanese activity. However, from previous *in vivo* work (Levitt et al. 1999), it appears that few thiosulfates are converted into thiocyanate by the large intestine mucosa. A tentative schematic view of the mitochondrial enzymatic system involved in H₂S detoxification in colonic epithelial cells is presented in Fig. 3. According to this scheme, SQR would represent the first enzyme involved in sulfide utilization by colonocytes. These latter enzymes extract electrons from sulfide and forward them to the quinone pool in mitochondria. These electrons are then transferred to the complexes III and IV in the mitochondrial respiratory chain and then to oxygen to form water. In terms of electron transfer, the SQR activity is then similar to that of complex II (i.e., succinate dehydrogenase). If a saturating concentration of succinate (i.e., millimolar) is provided to isolated mitochondria, it leads to fast electron transfer and energization of the mitochondrial inner membrane allowing phosphorylation of ADP into ATP. The use of same

millimolar concentrations of sulfide leads to immediate poisoning of the mitochondrial respiration. However, if low micromolar concentrations of sulfide are provided with an infusion pump to permeabilized colonic epithelial cells, it is possible to match sulfide delivery to sulfide oxidation rate in these cells. Using this latter procedure, it has been shown that sulfide oxidation capacity by colonic epithelial cells is not vastly different when compared with succinate oxidation capacity in these cells (Goubern et al. 2007) and leads to mitochondrial energization. Consequently, if colonocytes are facing a continuous production of luminal sulfide by the microbiota which is lower than their oxidative capacity, they will detoxify sulfide and will use it as a mineral energy substrate. If this oxidation of sulfide takes place near its maximal rate, this will represent the coverage of a significant part of the colonocyte energy needs. In other words, oxidation of sulfide thus represents a likely way for colonic epithelial cells to detoxify and recover energy from a luminal inorganic substrate as long as the cellular metabolic capacity is not defeated. Interestingly, sulfide metabolism represents the primary energetic source in ecosystems where no sunlight is available and can be considered as a prokaryotic metabolism older than photosynthesis. It is therefore tempting to propose that sulfide oxidation in colonocytes represent a very ancestral function. Recent data (Lagoutte, Mimoun, Andriamihaja, Chaumontet, Blachier and Bouillaud; unpublished data 2009) have measured the complex interactions between sulfide and other substrate oxidations. Therefore, these observations are relevant to the trophic interactions between the microbiota and the gut mucosa but require further experimental works. It also raises the view that the balance between the sulfide production by the intestinal microbiota and the colonocyte oxidative capacity would determine the nature of sulfide i.e., a friend or a foe.

Sulfide and large intestine inflammation and cancer

Sulfide and large intestine inflammation

Some clinical and experimental data suggest that sulfide in excess may be implicated in the etiology and/or in the risk of relapse of ulcerative colitis. Ulcerative colitis is a colon-localized inflammatory bowel disease characterized by broad epithelial cell damage, crypt abscesses and

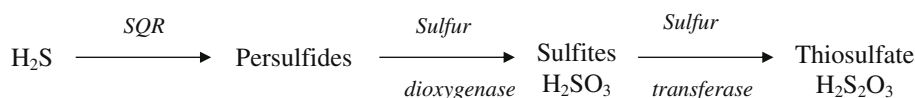


Fig. 3 Tentative schematic view of the mitochondrial enzymatic system involved in H₂S detoxication/utilization in colonic epithelial cells. SQR sulfide quinone oxidoreductase

accumulation of neutrophils but is of still unknown aetiology. Ulcerative colitis depends on complex interactions between genetic and environmental factors in susceptible hosts (Ahmad et al. 2001). The putative role of H_2S in ulcerative colitis is originating from several lines of evidence. First, it has been documented that H_2S in excess has a number of adverse effects that could play a role in the pathogenesis of the disease (reviewed in Pitcher and Pitcher 1996). Second, fecal sulfide concentration and production were found to be elevated in patients with ulcerative colitis (Pitcher et al. 2000; Levine et al. 1998). However, it should be noted that other authors found no difference in fecal sulfide concentration between ulcerative colitis patients and control subjects (Moore et al. 1998). Third, in some experimental colitis animal models, it is possible to induce a pathological state similar to the one observed in ulcerative colitis using undigestible sulfates in the form of dextran sulfate sodium (Gaudio et al. 1999; Tamaru et al. 1993; Leung et al. 2000) and sulfate-containing carrageenan (Watt and Marcus 1973). It has been reported that ulcerative colitis patients who take 5-aminosalicylic acid-containing drugs were characterized by lower fecal sulfide levels than those not taking these drugs (Edmond et al. 2003), which indicates that inhibition of sulfide production may contribute to the therapeutic effect of these agents in ulcerative colitis.

Recently, and in contrast with the putative role of H_2S in ulcerative colitis, Wallace et al. (2009) reported that intracolonic administration of $NaHS$ (30 $\mu\text{mol/kg}$) reduced the severity of colitis induced by intracolonic administration of trinitrobenzene sulfonic acid. In the meantime, they observed a reduction of the expression of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. In addition, inhibition of H_2S synthesis in healthy rats was found to result in colonic inflammation leading the authors to propose that endogenous and exogenous H_2S promote resolution of colitis in rats in this experimental model. However, it is worth noting that the effect of H_2S is probably depending on the experimental model of colitis used. Indeed, using the dextran sulfate-induced colitis in rats, Furne et al. (2000) observed that feeding rats with bismuth subsalicylate, a compound that binds sulfide, reduced the fecal release of H_2S in dextran sulfate-treated rats to values below that of controls without modification of the histological aspect of colitis raising the view that excessive sulfide production does not play a major role in this experimental model of colitis.

A very significant clinical study was performed with ulcerative colitis patients in remission who were followed up for 1 year to determine the effect of habitual diet on the relapse (Jowett et al. 2004). In this study, it was found that high consumption of meat, protein as well as high sulfur or sulfate intakes was associated with an increased likelihood

of relapse for patients. Even if, as noted by the authors, further studies are required to determine if the sulfur compounds within the foods mediate the risk of relapse in patients, the data presented strongly suggest that the bacterial synthesis of sulfide from alimentary substrates in the lumen of the large intestine plays a role in such a relapse process. It is also possible that the capacity of colonic epithelial cells for H_2S detoxification is altered in ulcerative colitis patients, but a role of such a defect remains a working hypothesis that needs to be urgently tested.

Some experimental facts suggest that the capacity of colonocytes to metabolize H_2S is an important feature for their resistance toward an excessive concentration of free luminal sulfide. In the experimental model of dextran sulfate sodium-evoked colitis in mice, Taniguchi et al. (2009) found that rhodanese expression and activity was decreased in the colonic tissues in parallel with the development of colitis. Roediger et al. (1996) reported that *S*-adenosylmethionine (a cosubstrate for the methylation of H_2S) at a concentration of 5 mmol/L is able to reduce the inhibitory effect of sulfide upon butyrate oxidation in human colectomy specimens. Although methylation of sulfide appears to play a minor role for detoxification of excessive luminal sulfide, this metabolic pathway may play a role in limiting sulfide toxicity toward colonocytes. Two other enzymatic activities, i.e., rhodanese and thiol methyltransferase believed to play a role in sulfide detoxication, were measured in rectal mucosa obtained from patients with ulcerative colitis and control individuals (Picton et al. 2007). No difference was found for both enzymatic activities between the two groups of individuals. However, the activity of the first and rate-limiting enzyme for H_2S metabolism, i.e., sulfide quinone oxidoreductase in colonic epithelial cells, was not measured in this study.

Sulfide and large intestine cancer

The data which would allow implying prolonged excessive concentration of sulfide in the luminal content of the large intestine and/or defective expression of detoxifying catalytic activities in large intestine epithelium in the colon carcinogenesis are scarce. Attene-Ramos et al. (2006) reported that Na_2S at a concentration of 500 $\mu\text{mol/L}$ (and above) is able to provoke genomic DNA damage in HT-29-C1.16E colonic cells using an assay in which DNA repair is inhibited. Furthermore, using naked nuclei from Chinese hamster ovary cells (CHO cells) treated with Na_2S , it was found that a concentration as low as 1 $\mu\text{mol/L}$ was able to damage genomic DNA with single and double breaks or lesions that can be converted to strand breaks (Attene-Ramos et al. 2007); such a phenomenon appears to involve free radical production. Although this study was interesting and provocative, it has to be kept in mind that the

experimental design chosen was far away from the physiological conditions which prevails in the large intestine.

Ramasamy et al. (2006) reported that the immunoreactivities of thiosulfate sulfurtransferase (TST) and mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST), two isoenzymes of rhodanese, in the luminal mucosal surface are markedly reduced in advanced colon cancer. Furthermore, they found that TST activity and expression in the human colon adenocarcinoma HT-29 cells can be increased by differentiating agents like butyrate and histone deacetylase inhibitor and increased by sulfide itself. From these results, the authors concluded that dysregulation of TST activity in the colonic mucosa could represent a factor involved in colorectal cancer. New experiments are needed to establish possible causal relationship between TST expression in the colonic mucosa and the colorectal carcinogenesis.

The incubation of mucosal biopsies from the sigmoid rectum obtained from ten patients with normal mucosa, polyps, or inflammatory bowel diseases in the presence of 1 mmol/L NaHS resulted in mucosal hyperproliferation with an expansion of the proliferative zone to the upper crypt (Christl et al. 1996), suggesting that sulfide can affect epithelial cell homeostasis. Accordingly, Deplancke and Gaskins (2003) reported that exposure of nontransformed intestinal epithelial IEC-18 cells with millimolar concentration of NaHS resulted in an inhibition of mitochondrial respiratory activity and an increase of the proliferative cell fraction leading the authors to propose that sulfide may initiate epithelial cell dysregulation and to speculate that these events may contribute to colorectal carcinogenesis.

Lastly, by comparing the fecal amounts of H₂S between volunteers who had previously undergone surgery for sigmoid colon cancer and who later developed new epithelial colon neoplasia and individuals whose large bowel was entirely normal (as verified by total colonoscopy), Kanazawa et al. (1996) found increased fecal excretion of sulfide in the sigmoid cancer group although the possible causal relationship between the two parameters would require new investigations.

Conclusion

From the available data regarding the effects of H₂S on the large intestine mucosa, it appears that there is little doubt that this compound resulting from the microbiota metabolic activity can interfere with the colonic epithelial cell metabolism. Both beneficial and deleterious effects of luminal sulfide are possible toward this intestinal epithelium which represents a frontier between the luminal content and the “milieu intérieur”. Considering sulfide as a friend or a foe depends on numerous parameters including (a) sulfide concentration inside the colonic lumen and thus

substrate availability from exogenous (alimentary) and endogenous origins and metabolic capacity for the microbiota to produce H₂S, (b) percentages of sulfide in free and bound forms, (c) capacities of colonic epithelial cells to detoxicate and to use sulfide as an energy source and availability of anaerobic metabolic pathway (i.e., glycolysis) for energy production when mitochondrial oxygen consumption is impaired, and (d) capacity of colonic epithelial cells to rapidly adapt to an excess in luminal sulfide production. Although there have been an improvement in the recent years in our understanding on how H₂S is metabolized in colonocytes, there is still a need for a consensus regarding the metabolic pathways involved, even if sulfide quinone oxidoreductase, sulfur dioxygenase, and rhodanese are likely to play an important role in the detoxication process when sulfide is present in excess. Also, the intraluminal compounds responsible for sulfide binding need further works for identification and characterization since they are likely to represent one major parameter in determining the free sulfide luminal concentration. From the overall available data, it is tempting to propose, as a working hypothesis, that any imbalance between concentration of free sulfide in the large intestine mucosa and the capacity of epithelial cells to metabolize, it will result in a loss of normal oxidative cell capacity and maybe in the process of normal epithelial cell renewal with possible consequences on the process of mucosal inflammation and/or relapse risk.

Recent works have also raised the idea that endogenously produced H₂S is likely to play a role in the neuro-modulation of chloride secretion, in the control of intestinal contractibility, and on the nociception from the large intestine. About this latter effect, it is not clear from the experimental evidence if H₂S is acting as a pro- or anti-nociceptive agent toward the large intestine.

The capacity of mammalian cells to use a very simple sulfur-containing gas molecule is most probably a reminiscence of a very ancestral function as indicated by metabolic studies with bacteria and marine animals living in a rich sulfur-containing environment (Griesbeck et al. 2002; Grieshaber and Völkel 1998).

References

- Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP (2001) Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 15:731–748
- Allen A, Flemström G (2005) Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am J Physiol* 288:C1–C19
- Attene-Ramos MS, Wagner ED, Plewa MJ, Gaskins HR (2006) Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Mol Cancer Res* 4:9–14

- Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR, Plewa MJ (2007) Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res* 5:455–459
- Awano N, Wada M, Mori H, Nakamori S, Takagi H (2005) Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Appl Environ Microbiol* 71:4149–4152
- Babidge W, Millard S, Roediger W (1998) Sulfides impair short chain fatty acid beta-oxidation at acyl-CoA dehydrogenase level in colonocytes: implications for ulcerative colitis. *Mol Cell Biochem* 181:117–124
- Baglieri A, Mahe S, Zidi S, Huneau JF, Thuiller F, Marteau P, Tome D (1994) Gastro-jejunal digestion of soya-bean-milk protein in humans. *Br J Nutr* 72:519–532
- Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tome D (2007) Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33:547–562
- Bos C, Juillet B, Fouillet H, Turlan L, Dare S, Luengo C, Ntounda R, Benamouzig R, Gausseres N, Tome D, Gaudichon C (2005) Postprandial metabolic utilization of wheat protein in humans. *Am J Clin Nutr* 81:87–94
- Buttgereit F, Brand MD (1995) A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J* 312:163–167
- Chacko A, Cummings JH (1988) Nitrogen losses from the human small bowel: obligatory losses and the effects of physical form of food. *Gut* 29:809–815
- Christl SU, Gibson GR, Cummings JH (1992) Role of dietary sulphate in the regulation of methanogenesis in the human large intestine. *Gut* 33:1234–1238
- Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W (1996) Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 41:2477–2481
- Clauss MT, Zoicher GE, Maier THP, Schulz GE (2005) Structure of the *O*-acetyl-serine sulfurhydrylase, 2 isoenzyme CYSM from *Escherichia coli*. *Biochem* 44:8620–8626
- Deplancke B, Gaskins HR (2003) Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *FASEB J* 17:1310–1312
- Deplancke B, Finster K, Graham WV, Collier CT, Thurmond JE, Gaskins HR (2003) Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice. *Exp Biol Med* 228:424–433
- Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, Roviezzo F, Morelli A, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S (2006a) Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *J Pharmacol Exp Ther* 316:325–335
- Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Russo G, Caliendo G, Santagada V, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S (2006b) 5-Amino-2-hydroxybenzoic acid 4-(5-thio-5H-(1, 2) dithiol-3-yl)-phenyl ester (ATB-429), a hydrogen sulfide-releasing derivative of mesalazine, exerts antinociceptive effects in a model of postinflammatory hypersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther* 319:447–458
- Drassar BS, Hill MJ (1974) *Human Intestinal Flora*. Academic Press, London
- Edmond LM, Hopkins MJ, Magee EA, Cummings JH (2003) The effect of 5-aminosalicylic acid-containing drugs on sulfide production by sulfate-reducing and amino acid-fermenting bacteria. *Inflamm Bowel Dis* 9:10–17
- Evenepoel P, Claus D, Geypens B, Hiele M, Geboes K, Rutgeerts P, Ghos Y (1999) Amount and fate of egg protein escaping assimilation in the small intestine of humans. *Am J Physiol* 277:G935–G943
- Florin T (1991) Hydrogen sulphide and total acid-volatile sulphide in faeces, determined with a direct spectrophotometric method. *Clin Chim Acta* 196:127–134
- Florin T, Neale G, Gibson GR, Christl SU, Cummings JH (1991) Metabolism of dietary sulphate: absorption and excretion in humans. *Gut* 32:766–773
- Furne JK, Suarez FL, Ewing SL, Springfield J, Levitt MD (2000) Binding of hydrogen sulfide by bismuth does not prevent dextran sulfate-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 45:1439–1443
- Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD (2001) Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem Pharmacol* 62:255–259
- Gallego D, Clavé P, Donovan J, Rahmati R, Grundy D, Jimenez M, Beyart MJ (2008) The gaseous mediator, hydrogen sulphide, inhibits in vitro motor patterns in the human, rat and mouse colon and jejunum. *Neurogastroenterol Motil* 20:1306–1316
- Gaudichon C, Mahe S, Benamouzig R, Luengo C, Fouillet H, Dare S, Van Oyccke M, Ferriere F, Rautureau J, Tome D (1999) Net postprandial utilization of (¹⁵N)-labeled milk protein nitrogen is influenced by diet composition in humans. *J Nutr* 129:890–895
- Gaudichon C, Bos C, Morens C, Petzke KJ, Mariotti F, Everwand J, Benamouzig R, Dare S, Tome D, Metges CC (2002) Ileal losses of nitrogen and amino acids in humans and their importance to the assessment of amino acid requirements. *Gastroenterology* 123:50–59
- Gaudio E, Taddei G, Vetuschi A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R (1999) Dextran sulfate sodium colitis in rats: clinical structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 44:1458–1475
- Gausseres N, Mahe S, Benamouzig R, Luengo C, Drouet H, Rautureau J, Tome D (1996) The gastro-ileal digestion of ¹⁵N labelled pea nitrogen in adult humans. *Br J Nutr* 76:75–85
- Gibson JA, Sladem GE, Dawson AM (1976) Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *Br J Nutr* 35:61–65
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1988a) Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *J Appl Bacteriol* 65:241–247
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT (1988b) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Appl Environ Microbiol* 54:2750–2755
- Goubern M, Andriamihaja M, Nübel T, Blachier F, Bouillaud F (2007) Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J* 21:1699–1706
- Griesbeck C, Schütz M, Schödl T, Bathe S, Nausch L, Mederer N, Vielreicher M, Hauska G (2002) Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* 41:11552–11565
- Grieshaber MK, Völkel S (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu Rev Physiol* 60:33–53
- Hedderich R, Klimmek O, Kroëger A, Dirmeier R, Keller M, Stetter KO (1999) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiol Rev* 22:353–381
- Hildebrand TM, Grieshaber MK (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J* 275:3352–3361
- Hill BC, Woon TC, Nicholls P, Peterson J, Greenwood C, Thomson AJ (1984) Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome *c* oxidase. *Biochem J* 224:591–600
- Jorgensen J, Mortensen PB (2001) Hydrogen sulfide and colonic epithelial metabolism: implications for ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 46:1722–1732

- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR (2004) Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 53:1479–1484
- Kadota H, Ishida Y (1972) Production of volatile sulfur compounds by microorganisms. *Ann Rev Microbiol* 26:127–138
- Kallio RE (1951) Function of pyridoxal phosphate in desulfhydrase systems of *Proteus morganii*. *J Biol Chem* 192:371–377
- Kanazawa K, Konishi F, Mitsuoka T, Terada A, Itoh K, Narushima S, Kumemura M, Kimura H (1996) Factors influencing the development of sigmoid colon cancer. Bacteriologic and biochemical studies. *Cancer* 77:1701–1706
- Kramer P (1966) The effect of varying sodium loads on the ileal excreta of human ileostomised subjects. *J Clin Invest* 45:1710–1718
- Kumagai H, Sejima S, Choi Y, Tanaka H, Yamada H (1975) Crystallization and properties of cysteine desulfhydrase from *Aerobacter aerogenes*. *FEBS Lett* 52:304–307
- Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blotti re HM, Couplan E, Gonzales-Barroso M, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, Mignotte B, Bouillaud F, Blachier F (2005) Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochim Biophys Acta* 1725:201–212
- Leung FW, Heng MC, Allen S, Seno K, Leung JWC, Heng MK (2000) Involvement of luminal bacteria, heat shock protein 60, macrophages and gammadelta T cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 45:1472–1479
- Levine J, Ellis CJ, Furne JK, Springfield J, Levitt MD (1998) Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 93:83–87
- Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E (1999) Detoxication of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest* 104:1107–1114
- Levitt MD, Springfield J, Furne J, Koenig T, Suarez FL (2002) Physiology of sulfide in the rat colon: use of bismuth to assess colonic sulfide production. *J Appl Physiol* 92:1655–1660
- Lewis S, Cochrane S (2007) Alteration of sulfate and hydrogen metabolism in the human colon by changing intestinal transit rate. *Am J Gastroenterol* 102:624–633
- Liau YH, Horowitz MI (1976) The importance of PAPS in determining sulphation in gastrointestinal mucosa. *Digestion* 14:372–375
- Linden DR, Sha L, Mazzone A, Stolz GJ, Bernard CE, Furne JK, Levitt MD, Farrugia G, Szurszewski JH (2008) Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. *J Neurochem* 106:1577–1585
- Loubinoux J, Bronowicki JP, Pereira IA, Moug nel JL, Faou AE (2002) Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecol* 40:107–112
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2003a) Food and the large intestine. In: Fuller R, Perdigon G (eds) *Gut flora, nutrition, immunity and health*. Blackwell, Oxford, pp 24–51
- Macfarlane S, Macfarlane GT (2003b) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62:67–72
- Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH (1992) Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *J Appl Bacteriol* 72:57–64
- Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH (2000) Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *Am J Clin Nutr* 72:1488–1494
- Matsunami M, Tarui T, Mitani K, Nagasawa K, Fukushima O, Okubo K, Yoshida S, Takemura M, Kawabata A (2009) Luminal hydrogen sulfide plays a pronociceptive role in mouse colon. *Gut* 58:751–761
- Mitsui T, Edmond LM, Magee EA, Cummings JH (2003) The effects of bismuth, iron, zinc and nitrate on free sulfide in batch cultures seeded with fecal flora. *Clin Chim Acta* 335:131–135
- Moore JW, Babidge W, Millard S, Roediger WEW (1997) Effect of sulphide on short chain acyl-CoA metabolism in rat colonocytes. *Gut* 41:77–81
- Moore J, Babidge W, Millard S, Roediger W (1998) Colonic luminal hydrogen sulfide is not elevated in ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 43:162–165
- Nicholson RA, Roth SH, Zhang A, Zheng J, Brookes J, Skrajny B, Bennington R (1998) Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. *J Toxicol Environ Health* 54:491–507
- Petersen LC (1977) The effects of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome *c* oxidase. *Biochim Biophys Acta* 460:299–307
- Picton R, Eggo MC, Merrill GA, Langman MJS, Singh S (2002) Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* 50:201–205
- Picton R, Eggo MC, Langman MJ, Singh S (2007) Impaired detoxication of hydrogen sulfide in ulcerative colitis? *Dig Dis Sci* 52:373–378
- Pitcher MC, Pitcher JM (1996) Hydrogen sulfide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 39:1–4
- Pitcher MC, Beatty ER, Cummings JH (2000) The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 46:64–72
- Pochart P, Dor  J, L mann F, Goderel I, Rambaud JC (1992) Interrelations between populations of methanogenic archae and sulfate-reducing bacteria in the human colon. *FEMS Microbiol Lett* 77:225–228
- Rabus R, Hansen TH, Widdel F (2006) Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes. A handbook of the biology of bacteria: symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology*, 3rd edn. Springer, New York, 2:659–768
- Ramasamy S, Singh S, Taniere P, Langman MJS, Eggo MC (2006) Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *Am J Physiol* 291:G288–G296
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH (1992) Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:109–134
- Roediger WEW, Duncan A, Kapanaris O, Millard S (1993a) Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104:802–809
- Roediger WEW, Duncan A, Kapanaris O, Millard S (1993b) Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes: a biochemical basis for ulcerative colitis? *Clin Sci* 85:623–627
- Roediger WE, Babidge W, Millard S (1996) Methionine derivatives diminish sulphide damage to colonocytes: implications for ulcerative colitis. *Gut* 39:77–81
- Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR (2009) Culture-independent analysis of *desulfovibrios* in the human distal colon of healthy, colorectal cancer and polypectomized individuals. *FEMS Microbiol Ecol* 69:213–221
- Schauder R, Kr ger A (1993) Bacterial sulphur respiration. *Arch Microbiol* 159:491–497
- Schicho R, Krueger D, Zeller F, Von Weyhern CW, Frieling T, Kimura H, Ishii I, De Giorgio R, Campi B, Schemann M (2006) Hydrogen sulfide is a novel prosecretory neuromodulator in the guinea-pig and human colon. *Gastroenterology* 131:1542–1552
- Shaw L, Engel PC (1987) CoA-persulphide: a possible in vivo inhibitor of mammalian short-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 919:171–174
- Siegel LM, Murphy MJ, Kamin H (1973) Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-sulfite reductase of *Enterobacteria*.

- I. The *Escherichia coli* hemoflavoprotein: molecular parameters and prosthetic groups. *J Biol Chem* 248:251–264
- Silvester KR, Cummings JH (1995) Does digestibility of meat protein help explain large bowel cancer risk? *Nutr Cancer* 24:279–288
- Smiddy FG, Gregory SD, Smith IB, Goligher JC (1960) Fecal loss of fluid, electrolytes and nitrogen in colitis before and after ileostomy. *Lancet* 1:14–19
- Smith EA, Marcfarlane GT (1997) Dissimilatory amino acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* 3:327–337
- Stewart JA, Chadwick VS, Murray A (2006) Carriage, quantification, and predominance of methanogens and sulfate-reducing bacteria in faecal samples. *Lett Appl Microbiol* 43:58–63
- Stipanuk MH (2004) Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu Rev Nutr* 24:539–577
- Stocchi A, Furne J, Ellis C, Levitt MD (1994) Methanogens outcompete sulphate-reducing bacteria for H₂ in the human colon. *Gut* 35:1098–1101
- Suarez F, Furne J, Springfield J, Levitt M (1998) Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon. *Am J Physiol* 274:G727–G733
- Szabo C (2007) Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 6:917–935
- Tai CH, Burkhard P, Gani D, Jenn T, Johnson C, Cook PF (2001) Characterization of the allosteric anion-binding site of *O*-acetylserine sulfhydrylase. *Biochem* 40:7446–7452
- Tamaru T, Kobayashi H, Kishimoto S, Kajiyama G, Shimamoto F, Brown WR (1993) Histochemical study of colonic cancer in experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci* 38:529–537
- Taniguchi E, Matsunami M, Kimura T, Yonezawa D, Ishiki T, Sekiguchi F, Nishikawa H, Maeda Y, Ishikura H, Kawabata A (2009) Rhodanese but not cystathionine-gamma-lyase is associated with dextran sulfate sodium-evoked colitis in mice: a sign of impaired colonic sulfide detoxification? *Toxicology* 264:96–103
- Teague B, Asiedu S, Moore PK (2002) The smooth muscle relaxant effect of hydrogen sulphide in vitro: evidence for a physiological role to control intestinal contractility. *Br J Pharmacol* 137:139–145
- Tiranti V, Viscomi C, Hildebrand T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prella A, Fagioliari G, Rimoldi M, Zeviani M (2009) Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat Med* 15:200–205
- Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR (2009) Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology* 137:569–578
- Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16:1792–1798
- Watt J, Marcus R (1973) Experimental ulcerative diseases of the colon in animals. *Gut* 14:506–510
- Wedzicha BL (1984) Chemistry of sulphur dioxide in foods. Elsevier Applied Science Publishers, London
- Weisiger RA, Pinkus LM, Jakoby WB (1980) Thiol *S*-methyltransferase: suggested role in detoxication of intestinal hydrogen sulfide. *Biochem Pharmacol* 29:2885–2887
- Willis CL, Cummings JH, Neale G, Gibson GR (1996) In vitro effects of mucin fermentation on the growth of human colonic sulphate-reducing bacteria. *Anaerobe* 2:117–122
- Willis CL, Cummings JH, Neale G, Gibson GR (1997) Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Curr microbiol* 35:294–298
- Wilson TH (1962) Intestinal absorption. WB Saunders, Philadelphia, pp 134–137
- Wilson K, Mudra M, Furne J, Levitt M (2008) Differentiation of the roles of sulfide oxidase and rhodanese in the detoxication of sulfide by the colonic mucosa. *Dig Dis Sci* 53:277–283
- Xu GY, Winston JH, Shenoy M, Zhou S, Chen JD, Pasricha PJ (2009) The endogenous hydrogen sulfide producing enzyme cystathionine-beta synthase contributes to visceral hypersensitivity in a rat model of irritable bowel syndrome. *Mol Pain* 5:44
- Yoshikawa S (1999) X-ray structure and reaction mechanism of bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Biochem Soc Trans* 27:351–362

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

PUBLICATIONS

Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Atanasiu C, Benamouzig R, Tomé D, Bouillaud F, Blachier F. *Human colonic epithelial cell capacity to oxidize/detoxicate hydrogen sulfide: effects of spontaneous and butyrate-induced differentiation*. (En révision).

Lagoutte E, **Mimoun S**, Andriamihaja M, Chaumontet C, Blachier F, Bouillaud F. *Oxidation of hydrogen sulfide remains a priority in mammalian cells and causes reverse electron transfer in colonocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 2010 Apr; 1797(8):1500-11.

Blachier F, Davila AM, **Mimoun S**, Benetti PH, Atanasiu C, Andriamihaja M, Benamouzig R, Bouillaud F, Tomé D. *Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe?* *Amino Acids*, 2010 Dec; 39(2):335-47.

Kaddourri H, **Mimoun S**, Mecherfi KEL, Chekroun A, Kheroua O, Saidi D. *Impact of gamma-radiation on antigenic properties of cow's milk beta-lactoglobulin*. *Journal of food protection*, 2008 Jun; 71(6): 1270-1272.

COMMUNICATIONS ORALES OU AFFICHÉES

Atanasiu C, **Mimoun S**, Andriamihaja M, Chaumontet C, Tomé D, Bouillaud F, Bernamouzig R, Blachier F. *Détoxification de l'H₂S luminal par les colonocytes : expression de la Sulfide Quinone Reductase (SQR) dans le côlon humain*. Les Journées Francophone d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive (JFHOD). Paris, France (Résumé : JFHOD 2010)

Mimoun S, Andriamihaja M, Chaumontet C, Benamouzig R, Guillot A, Tomé D, Bouillaud F, Blachier F. *Effets du sulfure d'hydrogène sur la consommation d'oxygène dans les cellules épithéliales coliques*. Club d'Etudes des Cellules Epithéliales Digestives. Strasbourg, France (Résumé : CECED 2009).

Références bibliographiques

- Abe K, Kimura H. 1996. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16(3):1066-1071.
- Abrahamse SL, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G. 1999. Potential of short chain fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* 20(4):629-634.
- Andriamihaja M, Chaumontet C, Tome D, Blachier F. 2009. Butyrate metabolism in human colon carcinoma cells: implications concerning its growth-inhibitory effect. *Journal of cellular physiology* 218(1):58-65.
- Archer SY, Meng S, Shei A, Hodin RA. 1998. p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):6791-6796.
- Ardawi MS, Newsholme EA. 1985. Fuel utilization in colonocytes of the rat. *Biochem J* 231(3):713-719.
- ATSDR. 1999
Toxicological profile for hydrogen sulfide. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, U.S.; Department of Commerce, Spring-field, VA.
- Attene-Ramos MS, Nava GM, Muellner MG, Wagner ED, Plewa MJ, Gaskins HR. 2010. DNA damage and toxicogenomic analyses of hydrogen sulfide in human intestinal epithelial FHs 74 Int cells. *Environmental and molecular mutagenesis* 51(4):304-314.
- Attene-Ramos MS, Wagner ED, Gaskins HR, Plewa MJ. 2007. Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage. *Mol Cancer Res* 5(5):455-459.
- Attene-Ramos MS, Wagner ED, Plewa MJ, Gaskins HR. 2006. Evidence that hydrogen sulfide is a genotoxic agent. *Mol Cancer Res* 4(1):9-14.
- Awano N, Wada M, Mori H, Nakamori S, Takagi H. 2005. Identification and functional analysis of *Escherichia coli* cysteine desulfhydrases. *Applied and environmental microbiology* 71(7):4149-4152.
- Babidge W, Millard S, Roediger W. 1998. Sulfides impair short chain fatty acid beta-oxidation at acyl-CoA dehydrogenase level in colonocytes: implications for ulcerative colitis. *Molecular and cellular biochemistry* 181(1-2):117-124.
- Bai L, Merchant JL. 2000. Transcription factor ZBP-89 cooperates with histone acetyltransferase p300 during butyrate activation of p21waf1 transcription in human cells. *J Biol Chem* 275(39):30725-30733.
- Bartholomew TC, Powell GM, Dodgson KS, Curtis CG. 1980. Oxidation of sodium sulphide by rat liver, lungs and kidney. *Biochemical pharmacology* 29(18):2431-2437.
- Beauchamp RO, Jr., Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA. 1984. A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *Critical reviews in toxicology* 13(1):25-97.
- Beerens H, Romond C. 1977. Sulfate-reducing anaerobic bacteria in human feces. *The American journal of clinical nutrition* 30(11):1770-1776.
- Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, Laurberg S, Sorensen FB, Hagemann R, TF OR. 2002. Gene expression in colorectal cancer. *Cancer research* 62(15):4352-4363.
- Blachier F, Davila AM, Mimoun S, Benetti PH, Atanasiu C, Andriamihaja M, Benamouzig R, Bouillaud F, Tome D. 2010. Luminal sulfide and large intestine mucosa: friend or foe? *Amino acids* 39(2):335-347.

- Blachier F, Mariotti F, Huneau JF, Tome D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino acids* 33(4):547-562.
- Bordonaro M, Lazarova DL, Sartorelli AC. 2008. Butyrate and Wnt signaling: a possible solution to the puzzle of dietary fiber and colon cancer risk? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 7(9):1178-1183.
- Bouillaud F, Blachier F. 2011. Mitochondria and sulfide: a very old story of poisoning, feeding, and signaling? *Antioxidants & redox signaling* 15(2):379-391.
- Brand MD. 2000. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental gerontology* 35(6-7):811-820.
- Brittain T, Yosaatmadja Y, Henty K. 2008. The interaction of human neuroglobin with hydrogen sulphide. *IUBMB life* 60(2):135-138.
- Cai WJ, Wang MJ, Ju LH, Wang C, Zhu YC. 2010. Hydrogen sulfide induces human colon cancer cell proliferation: role of Akt, ERK and p21. *Cell biology international* 34(6):565-572.
- Calvert JW, Coetzee WA, Lefer DJ. 2010. Novel insights into hydrogen sulfide--mediated cytoprotection. *Antioxidants & redox signaling* 12(10):1203-1217.
- Cao Q, Zhang L, Yang G, Xu C, Wang R. 2010. Butyrate-stimulated H₂S production in colon cancer cells. *Antioxidants & redox signaling* 12(9):1101-1109.
- Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(5):H2316-2323.
- Cherbut C, Ferrier L, Roze C, Anini Y, Blottiere H, Lecannu G, Galmiche JP. 1998. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *The American journal of physiology* 275(6 Pt 1):G1415-1422.
- Christl SU, Eisner HD, Dusel G, Kasper H, Scheppach W. 1996. Antagonistic effects of sulfide and butyrate on proliferation of colonic mucosa: a potential role for these agents in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* 41(12):2477-2481.
- Claudian. 1992. L'évolution de l'alimentation humaine? *Alimentation et nutrition humaines*. ESF, Paris, pp 39-65.
- Cohen HJ, Betcher-Lange S, Kessler DL, Rajagopalan KV. 1972. Hepatic sulfite oxidase. Congruency in mitochondria of prosthetic groups and activity. *The Journal of biological chemistry* 247(23):7759-7766.
- Cooper CE, Brown GC. 2008. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 40(5):533-539.
- Cummings JH. 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22(9):763-779.
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CP, Macfarlane GT. 1987. Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28(10):1221-1227.
- Dawe GS, Han SP, Bian JS, Moore PK. 2008. Hydrogen sulphide in the hypothalamus causes an ATP-sensitive K⁺ channel-dependent decrease in blood pressure in freely moving rats. *Neuroscience* 152(1):169-177.

- Dawson TL, Gores GJ, Nieminen AL, Herman B, Lemasters JJ. 1993. Mitochondria as a source of reactive oxygen species during reductive stress in rat hepatocytes. *The American journal of physiology* 264(4 Pt 1):C961-967.
- Degli Esposti M. 1998. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et biophysica acta* 1364(2):222-235.
- Dello Russo C, Tringali G, Ragazzoni E, Maggiano N, Menini E, Vairano M, Preziosi P, Navarra P. 2000. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: in vitro and in vivo studies in the rat. *Journal of neuroendocrinology* 12(3):225-233.
- Deplancke B, Gaskins HR. 2003. Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. *Faseb J* 17(10):1310-1312.
- DiMauro S, Schon EA. 2003. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *The New England journal of medicine* 348(26):2656-2668.
- Distrutti E, Sediari L, Mencarelli A, Renga B, Orlandi S, Antonelli E, Roviezzo F, Morelli A, Cirino G, Wallace JL, Fiorucci S. 2006. Evidence that hydrogen sulfide exerts antinociceptive effects in the gastrointestinal tract by activating KATP channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 316(1):325-335.
- Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP, Lancaster JR, Jr., Darley-Usmar VM, Kraus DW. 2005. Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Analytical biochemistry* 341(1):40-51.
- Dorman DC, Moulin FJ, McManus BE, Mahle KC, James RA, Struve MF. 2002. Cytochrome oxidase inhibition induced by acute hydrogen sulfide inhalation: correlation with tissue sulfide concentrations in the rat brain, liver, lung, and nasal epithelium. *Toxicol Sci* 65(1):18-25.
- Du J, Hui Y, Cheung Y, Bin G, Jiang H, Chen X, Tang C. 2004. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells. *Heart and vessels* 19(2):75-80.
- Ebert MN, Klinder A, Peters WH, Schaferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Pool-Zobel BL. 2003. Expression of glutathione S-transferases (GSTs) in human colon cells and inducibility of GSTM2 by butyrate. *Carcinogenesis* 24(10):1637-1644.
- Eghbal MA, Pennefather PS, O'Brien PJ. 2004. H₂S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. *Toxicology* 203(1-3):69-76.
- Elrod JW, Calvert JW, Morrison J, Doeller JE, Kraus DW, Tao L, Jiao X, Scalia R, Kiss L, Szabo C, Kimura H, Chow CW, Lefer DJ. 2007. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(39):15560-15565.
- Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H. 2002a. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 293(5):1485-1488.
- Eto K, Ogasawara M, Umemura K, Nagai Y, Kimura H. 2002b. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. *J Neurosci* 22(9):3386-3391.
- Fillingame RH, Divall S. 1999. Proton ATPases in bacteria: comparison to *Escherichia coli* F1F0 as the prototype. *Novartis Foundation symposium* 221:218-229; discussion 229-234.

- Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. 1983. Normal indigenous intestinal flora. *In human intestinal Microflora*. in Health and Disease ed. Hentges D.J. pp. 3-13(London: Academic Press).
- Fiorucci S, Antonelli E, Distrutti E, Rizzo G, Mencarelli A, Orlandi S, Zanardo R, Renga B, Di Sante M, Morelli A, Cirino G, Wallace JL. 2005. Inhibition of hydrogen sulfide generation contributes to gastric injury caused by anti-inflammatory nonsteroidal drugs. *Gastroenterology* 129(4):1210-1224.
- Fiorucci S, Orlandi S, Mencarelli A, Caliendo G, Santagada V, Distrutti E, Santucci L, Cirino G, Wallace JL. 2007. Enhanced activity of a hydrogen sulphide-releasing derivative of mesalamine (ATB-429) in a mouse model of colitis. *British journal of pharmacology* 150(8):996-1002.
- Flannigan KL, McCoy KD, Wallace JL. 2011. Eukaryotic and Prokaryotic Contributions to Colonic Hydrogen Sulfide Synthesis. *American journal of physiology*.
- Florin TH. 1991. Hydrogen sulphide and total acid-volatile sulphide in faeces, determined with a direct spectrophotometric method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 196(2-3):127-134.
- Frederickson CJ. 1989. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *International review of neurobiology* 31:145-238.
- Fredstrom SB, Lampe JW, Jung HJ, Slavin JL. 1994. Apparent fiber digestibility and fecal short-chain fatty acid concentrations with ingestion of two types of dietary fiber. *Jpen* 18(1):14-19.
- Furne J, Saeed A, Levitt MD. 2008. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295(5):R1479-1485.
- Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD. 2001. Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochemical pharmacology* 62(2):255-259.
- Gaill F. 1993. Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents. *Faseb J* 7(6):558-565.
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT. 1988. Competition for hydrogen between sulphate-reducing bacteria and methanogenic bacteria from the human large intestine. *The Journal of applied bacteriology* 65(3):241-247.
- Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, Allison C, Segal I, Vorster HH, Walker AR. 1990. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut* 31(6):679-683.
- Gibson GR, Macfarlane GT, Cummings JH. 1993. Sulphate reducing bacteria and hydrogen metabolism in the human large intestine. *Gut* 34(4):437-439.
- Gibson JA, Sladen GE, Dawson AM. 1976. Protein absorption and ammonia production: the effects of dietary protein and removal of the colon. *The British journal of nutrition* 35(1):61-65.
- Gocke E, King MT, Eckhardt K, Wild D. 1981. Mutagenicity of cosmetics ingredients licensed by the European Communities. *Mutation research* 90(2):91-109.
- Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, Taylor JD, Warenycia MW, Reiffenstein RJ, Dowling G. 1989. Determination of sulfide in brain tissue by gas dialysis/ion chromatography: postmortem studies and two case reports. *Journal of analytical toxicology* 13(2):105-109.

- Gouvern M, Andriamihaja M, Nubel T, Blachier F, Bouillaud F. 2007. Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *Faseb J* 21(8):1699-1706.
- Green DR, Reed JC. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381):1309-1312.
- Grieshaber MK, Volkel S. 1998. Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annual review of physiology* 60:33-53.
- Halestrap AP, Price NT. 1999. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J* 343 Pt 2:281-299.
- Hallert C, Bjorck I, Nyman M, Pousette A, Granno C, Svensson H. 2003. Increasing fecal butyrate in ulcerative colitis patients by diet: controlled pilot study. *Inflammatory bowel diseases* 9(2):116-121.
- Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. 2008. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 27(2):104-119.
- Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, Vanhoutvin SA, Fischer MA, Kodde A, Troost FJ, Venema K, Brummer RJ. 2009. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans. *Clin Nutr* 28(1):88-93.
- Hatefi Y. 1985. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual review of biochemistry* 54:1015-1069.
- Hernandez A, Thomas R, Smith F, Sandberg J, Kim S, Chung DH, Evers BM. 2001. Butyrate sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Surgery* 130(2):265-272.
- Hildebrandt TM. 2011. Modulation of sulfide oxidation and toxicity in rat mitochondria by dehydroascorbic acid. *Biochimica et biophysica acta* 1807(9):1206-1213.
- Hildebrandt TM, Grieshaber MK. 2008a. Redox regulation of mitochondrial sulfide oxidation in the lugworm, *Arenicola marina*. *The Journal of experimental biology* 211(Pt 16):2617-2623.
- Hildebrandt TM, Grieshaber MK. 2008b. Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *The FEBS journal* 275(13):3352-3361.
- Hill BC, Woon TC, Nicholls P, Peterson J, Greenwood C, Thomson AJ. 1984. Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome c oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study. *The Biochemical journal* 224(2):591-600.
- Hinnebusch BF, Meng S, Wu JT, Archer SY, Hodin RA. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *The Journal of nutrition* 132(5):1012-1017.
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H. 1997. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochemical and biophysical research communications* 237(3):527-531.
- Inan MS, Rasoulpour RJ, Yin L, Hubbard AK, Rosenberg DW, Giardina C. 2000. The luminal short-chain fatty acid butyrate modulates NF-kappaB activity in a human colonic epithelial cell line. *Gastroenterology* 118(4):724-734.
- Inoue H, Shiraki K, Ohmori S, Sakai T, Deguchi M, Yamanaka T, Okano H, Nakano T. 2002. Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis. *Int J Mol Med* 9(5):521-525.

- Jeong SO, Pae HO, Oh GS, Jeong GS, Lee BS, Lee S, Kim du Y, Rhew HY, Lee KM, Chung HT. 2006. Hydrogen sulfide potentiates interleukin-1beta-induced nitric oxide production via enhancement of extracellular signal-regulated kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 345(3):938-944.
- Jiang B, Tang G, Cao K, Wu L, Wang R. 2010. Molecular mechanism for H₂S-induced activation of K(ATP) channels. *Antioxidants & redox signaling* 12(10):1167-1178.
- Jorgensen J, Mortensen PB. 2001. Hydrogen sulfide and colonic epithelial metabolism: implications for ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* 46(8):1722-1732.
- Jowett SL, Seal CJ, Pearce MS, Phillips E, Gregory W, Barton JR, Welfare MR. 2004. Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. *Gut* 53(10):1479-1484.
- Kabil O, Banerjee R. 2010. Redox biochemistry of hydrogen sulfide. *The Journal of biological chemistry* 285(29):21903-21907.
- Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, Yamamoto T, Suematsu M. 2010. Interactions of multiple gas-transducing systems: hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H₂S gas biology. *Antioxidants & redox signaling* 13(2):157-192.
- Kangas J, Savolainen H. 1987. Urinary thiosulphate as an indicator of exposure to hydrogen sulphide vapour. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 164(1):7-10.
- Kawamata K, Hayashi H, Suzuki Y. 2007. Propionate absorption associated with bicarbonate secretion in vitro in the mouse cecum. *Pflugers Arch* 454(2):253-262.
- Kimura H. 2000. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 267(1):129-133.
- Kimura Y, Dargusch R, Schubert D, Kimura H. 2006. Hydrogen sulfide protects HT22 neuronal cells from oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* 8(3-4):661-670.
- Kitano A, Matsumoto T, Hiki M, Hashimura H, Yoshiyasu K, Okawa K, Kuwajima S, Kobayashi K. 1986. Epithelial dysplasia of the rabbit colon induced by degraded carrageenan. *Cancer research* 46(3):1374-1376.
- Leschelle X, Delpal S, Goubern M, Blottiere HM, Blachier F. 2000. Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *European journal of biochemistry / FEBS* 267(21):6435-6442.
- Leschelle X, Goubern M, Andriamihaja M, Blottiere HM, Couplan E, Gonzalez-Barroso MD, Petit C, Pagniez A, Chaumontet C, Mignotte B, Bouillaud F, Blachier F. 2005. Adaptive metabolic response of human colonic epithelial cells to the adverse effects of the luminal compound sulfide. *Biochimica et biophysica acta* 1725(2):201-212.
- Levine J, Ellis CJ, Furne JK, Springfield J, Levitt MD. 1998. Fecal hydrogen sulfide production in ulcerative colitis. *The American journal of gastroenterology* 93(1):83-87.
- Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E. 1999. Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *The Journal of clinical investigation* 104(8):1107-1114.
- Levitt MD, Springfield J, Furne J, Koenig T, Suarez FL. 2002. Physiology of sulfide in the rat colon: use of bismuth to assess colonic sulfide production. *J Appl Physiol* 92(4):1655-1660.
- Li L, Moore PK. 2007. An overview of the biological significance of endogenous gases: new roles for old molecules. *Biochemical Society transactions* 35(Pt 5):1138-1141.

- Li L, Rose P, Moore PK. 2011. Hydrogen sulfide and cell signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* 51:169-187.
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-489.
- Linden DR, Levitt MD, Farrugia G, Szurszewski JH. 2010. Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract: still in search of a physiologic function. *Antioxidants & redox signaling* 12(9):1135-1146.
- Linden DR, Sha L, Mazzone A, Stoltz GJ, Bernard CE, Furne JK, Levitt MD, Farrugia G, Szurszewski JH. 2008. Production of the gaseous signal molecule hydrogen sulfide in mouse tissues. *Journal of neurochemistry* 106(4):1577-1585.
- Lipkin M. 1991. Application of intermediate biomarkers to studies of cancer prevention in the gastrointestinal tract: introduction and perspective. *The American journal of clinical nutrition* 54(1 Suppl):188S-192S.
- Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohe L. 1974. Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS letters* 42(1):68-72.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389(6648):251-260.
- Luhrs H, Gerke T, Muller JG, Melcher R, Schaubert J, Boxberge F, Scheppach W, Menzel T. 2002. Butyrate inhibits NF- κ B activation in lamina propria macrophages of patients with ulcerative colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 37(4):458-466.
- Macfarlane GT, Gibson GR, Cummings JH. 1992. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon. *The Journal of applied bacteriology* 72(1):57-64.
- Magee EA, Richardson CJ, Hughes R, Cummings JH. 2000. Contribution of dietary protein to sulfide production in the large intestine: an in vitro and a controlled feeding study in humans. *The American journal of clinical nutrition* 72(6):1488-1494.
- Martin GR, McKnight GW, Dickey MS, Coffin CS, Ferraz JG, Wallace JL. 2010. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Dig Liver Dis* 42(2):103-109.
- Mathai JC, Missner A, Kugler P, Saparov SM, Zeidel ML, Lee JK, Pohl P. 2009. No facilitator required for membrane transport of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(39):16633-16638.
- Matter BE, Wurgler FE, Ulrich H. 1969. On the radioprotective effect of hydrogen sulphide in *Drosophila melanogaster*. *International journal of radiation biology and related studies in physics, chemistry, and medicine* 15(6):557-562.
- Moore JW, Babidge W, Millard S, Roediger WE. 1997. Effect of sulphide on short chain acyl-CoA metabolism in rat colonocytes. *Gut* 41(1):77-81.
- Mudd SH, Irreverre F, Laster L. 1967. Sulfite oxidase deficiency in man: demonstration of the enzymatic defect. *Science (New York, NY)* 156(3782):1599-1602.
- Muller FH, Bandejas TM, Urich T, Teixeira M, Gomes CM, Kletzin A. 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Molecular microbiology* 53(4):1147-1160.

- Murphy MP. 1989. Slip and leak in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et biophysica acta* 977(2):123-141.
- Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, Kim S, Mu W, Gazi SK, Barrow RK, Yang G, Wang R, Snyder SH. 2009. H₂S signals through protein S-sulphydration. *Science signaling* 2(96):ra72.
- Nandi DL, Westley J. 1998. Reduced thioredoxin as a sulfur-acceptor substrate for rhodanese. *The international journal of biochemistry & cell biology* 30(9):973-977.
- Navarra P, Dello Russo C, Mancuso C, Preziosi P, Grossman A. 2000. Gaseous neuromodulators in the control of neuroendocrine stress axis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 917:638-646.
- Nicholls P. 1975. Inhibition of cytochrome c oxidase by sulphide. *Biochemical Society transactions* 3(2):316-319.
- Nicholls P, Kim JK. 1981. Oxidation of sulphide by cytochrome aa₃. *Biochimica et biophysica acta* 637(2):312-320.
- Nicholls P, Kim JK. 1982. Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome c oxidase system. *Canadian journal of biochemistry* 60(6):613-623.
- Nicholson RA, Roth SH, Zhang A, Zheng J, Brookes J, Skrajny B, Bennington R. 1998. Inhibition of respiratory and bioenergetic mechanisms by hydrogen sulfide in mammalian brain. *Journal of toxicology and environmental health* 54(6):491-507.
- Oh GS, Pae HO, Lee BS, Kim BN, Kim JM, Kim HR, Jeon SB, Jeon WK, Chae HJ, Chung HT. 2006. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB via heme oxygenase-1 expression in RAW264.7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *Free radical biology & medicine* 41(1):106-119.
- Okamoto K, Shaw JM. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annual review of genetics* 39:503-536.
- Pajak B, Orzechowski A. 2007. Sodium butyrate-dependent sensitization of human colon adenocarcinoma COLO 205 cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *J Physiol Pharmacol* 58 Suppl 3:163-176.
- Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, Yang G, Marazioti A, Zhou Z, Jeschke MG, Branski LK, Herndon DN, Wang R, Szabo C. 2009. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(51):21972-21977.
- Papenfuss K, Cordier SM, Walczak H. 2008. Death receptors as targets for anti-cancer therapy. *J Cell Mol Med* 12(6B):2566-2585.
- Petersen LC. 1977. The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochimica et biophysica acta* 460(2):299-307.
- Picton R, Eggo MC, Merrill GA, Langman MJ, Singh S. 2002. Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* 50(2):201-205.
- Pietri R, Roman-Morales E, Lopez-Garriga J. 2011. Hydrogen sulfide and hemeproteins: knowledge and mysteries. *Antioxidants & redox signaling* 15(2):393-404.
- Podolsky DK. 2002. Inflammatory bowel disease. *The New England journal of medicine* 347(6):417-429.
- Pool-Zobel BL, Selvaraju V, Sauer J, Kautenburger T, Kiefer J, Richter KK, Soom M, Wolf S. 2005. Butyrate may enhance toxicological defence in primary, adenoma and tumor human colon cells by favourably modulating expression of glutathione S-transferases genes, an approach in nutrigenomics. *Carcinogenesis* 26(6):1064-1076.

- Powell MA, Somero GN. 1986. Hydrogen Sulfide Oxidation Is Coupled to Oxidative Phosphorylation in Mitochondria of *Solemya reidi*. *Science (New York, NY)* 233(4763):563-566.
- Prasad KN, Sinha PK. 1976. Effect of sodium butyrate on mammalian cells in culture: a review. *In Vitro* 12(2):125-132.
- Pun PB, Lu J, Kan EM, Moochhala S. 2010. Gases in the mitochondria. *Mitochondrion* 10(2):83-93.
- Rabus R, Hansen TH, Widdel F. 2006. Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. In: Dworkin M (ed) *The prokaryotes. A handbook of the biology of bacteria: symbiotic associations, Biotechnology, . Applied Microbiology*, 3rd edn Springer, New York 2:659–768.
- Raha S, Robinson BH. 2001. Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *American journal of medical genetics* 106(1):62-70.
- Ramasamy S, Singh S, Taniere P, Langman MJ, Eggo MC. 2006. Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *American journal of physiology* 291(2):G288-296.
- Rand WM, Pellett PL, Young VR. 2003. Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American journal of clinical nutrition* 77(1):109-127.
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. 1992. Toxicology of hydrogen sulfide. *Annual review of pharmacology and toxicology* 32:109-134.
- Reynolds DA, Rajendran VM, Binder HJ. 1993. Bicarbonate-stimulated [¹⁴C]butyrate uptake in basolateral membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology* 105(3):725-732.
- Roediger WE. 1980. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease? *Lancet* 2(8197):712-715.
- Roediger WE. 1982. Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83(2):424-429.
- Roediger WE, Babidge W. 1997. Human colonocyte detoxification. *Gut* 41(6):731-734.
- Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S. 1993a. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* 104(3):802-809.
- Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S. 1993b. Sulphide impairment of substrate oxidation in rat colonocytes: a biochemical basis for ulcerative colitis? *Clin Sci (Lond)* 85(5):623-627.
- Roediger WE, Kapaniris O, Millard S. 1992. Lipogenesis from n-butyrate in colonocytes. Action of reducing agent and 5-aminosalicylic acid with relevance to ulcerative colitis. *Molecular and cellular biochemistry* 118(2):113-118.
- Roediger WE, Lawson MJ, Kwok V, Grant AK, Pannall PR. 1984. Colonic bicarbonate output as a test of disease activity in ulcerative colitis. *Journal of clinical pathology* 37(6):704-707.
- Roediger WE, Moore J, Babidge W. 1997. Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Digestive diseases and sciences* 42(8):1571-1579.
- Rolfe DF, Brand MD. 1996. Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate. *The American journal of physiology* 271(4 Pt 1):C1380-1389.

- Rolfe DF, Brown GC. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews* 77(3):731-758.
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA, Morozzi G. 2001. Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 22(10):1675-1680.
- Ruemmele FM, Schwartz S, Seidman EG, Dionne S, Levy E, Lentze MJ. 2003. Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut* 52(1):94-100.
- Savage JC, Gould DH. 1990. Determination of sulfide in brain tissue and rumen fluid by ion-interaction reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 526(2):540-545.
- Schagger H, von Jagow G. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* 199(2):223-231.
- Scheppach W, Fabian C, Sachs M, Kasper H. 1988. The effect of starch malabsorption on fecal short-chain fatty acid excretion in man. *Scandinavian journal of gastroenterology* 23(6):755-759.
- Scheppach W, Sommer H, Kirchner T, Paganelli GM, Bartram P, Christl S, Richter F, Dusel G, Kasper H. 1992. Effect of butyrate enemas on the colonic mucosa in distal ulcerative colitis. *Gastroenterology* 103(1):51-56.
- Searcy DG, Lee SH. 1998. Sulfur reduction by human erythrocytes. *The Journal of experimental zoology* 282(3):310-322.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Bourreille A, Leray V, Gervois N, Rosales C, Ferrier L, Bonnet C, Blottiere HM, Galmiche JP. 2000. Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut* 47(3):397-403.
- Shaw L, Engel PC. 1987. CoA-persulphide: a possible in vivo inhibitor of mammalian short-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochimica et biophysica acta* 919(2):171-174.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277(5327):818-821.
- Shibuya N, Mikami Y, Kimura Y, Nagahara N, Kimura H. 2009a. Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide. *Journal of biochemistry* 146(5):623-626.
- Shibuya N, Tanaka M, Yoshida M, Ogasawara Y, Togawa T, Ishii K, Kimura H. 2009b. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase produces hydrogen sulfide and bound sulfane sulfur in the brain. *Antioxidants & redox signaling* 11(4):703-714.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP, Blottiere HM. 2000. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 46(4):507-514.
- Siraki AG, Pourahmad J, Chan TS, Khan S, O'Brien PJ. 2002. Endogenous and endobiotic induced reactive oxygen species formation by isolated hepatocytes. *Free radical biology & medicine* 32(1):2-10.
- Smiddy FG, Gregory SD, Smith IB, Goligher JC. 1960. Faecal loss of fluid, electrolytes, and nitrogen in colitis before and after ileostomy. *Lancet* 1(7114):14-19.

- Sokolowska M, Wlodek L, Srebro Z, Wrobel M. 1999. The effect of nitrogen oxide level modulation on the content of thiol compounds and anaerobic sulfur metabolism in mice brains. *Neurobiology (Budapest, Hungary)* 7(4):461-477.
- Sowa Y, Orita T, Minamikawa-Hiranabe S, Mizuno T, Nomura H, Sakai T. 1999. Sp3, but not Sp1, mediates the transcriptional activation of the p21/WAF1/Cip1 gene promoter by histone deacetylase inhibitor. *Cancer Res* 59(17):4266-4270.
- Srinivas SR, Gopal E, Zhuang L, Itagaki S, Martin PM, Fei YJ, Ganapathy V, Prasad PD. 2005. Cloning and functional identification of slc5a12 as a sodium-coupled low-affinity transporter for monocarboxylates (SMCT2). *Biochem J* 392(Pt 3):655-664.
- Stipanuk MH, Beck PW. 1982. Characterization of the enzymic capacity for cysteine desulphhydratation in liver and kidney of the rat. *The Biochemical journal* 206(2):267-277.
- Suarez F, Furne J, Springfield J, Levitt M. 1998a. Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon. *The American journal of physiology* 274(4 Pt 1):G727-733.
- Suarez FL, Springfield J, Levitt MD. 1998b. Identification of gases responsible for the odour of human flatus and evaluation of a device purported to reduce this odour. *Gut* 43(1):100-104.
- Swaroop M, Bradley K, Ohura T, Tahara T, Roper MD, Rosenberg LE, Kraus JP. 1992. Rat cystathionine beta-synthase. Gene organization and alternative splicing. *The Journal of biological chemistry* 267(16):11455-11461.
- Szabo C. 2007. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nature reviews* 6(11):917-935.
- Tager JM, Groen AK, Wanders RJ, Duszynski J, Westerhoff HV, Vervoorn RC. 1983. Control of mitochondrial respiration. *Biochemical Society transactions* 11(1):40-43.
- Tai CH, Burkhard P, Gani D, Jenn T, Johnson C, Cook PF. 2001. Characterization of the allosteric anion-binding site of O-acetylserine sulfhydrylase. *Biochemistry* 40(25):7446-7452.
- Tanizawa K. 2011. Production of H₂S by 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. *Journal of biochemistry* 149(4):357-359.
- Taoka S, Banerjee R. 2001. Characterization of NO binding to human cystathionine beta-synthase: possible implications of the effects of CO and NO binding to the human enzyme. *Journal of inorganic biochemistry* 87(4):245-251.
- Theissen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, Martin W. 2003. Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Molecular biology and evolution* 20(9):1564-1574.
- Theissen U, Martin W. 2008. Sulfide : quinone oxidoreductase (SQR) from the lugworm *Arenicola marina* shows cyanide- and thioredoxin-dependent activity. *The FEBS journal* 275(6):1131-1139.
- Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386(6624):517-521.
- Thompson RW, Valentine HL, Valentine WM. 2003. Cytotoxic mechanisms of hydrosulfide anion and cyanide anion in primary rat hepatocyte cultures. *Toxicology* 188(2-3):149-159.

- Tiranti V, D'Adamo P, Briem E, Ferrari G, Mineri R, Lamantea E, Mandel H, Balestri P, Garcia-Silva MT, Vollmer B, Rinaldo P, Hahn SH, Leonard J, Rahman S, Dionisi-Vici C, Garavaglia B, Gasparini P, Zeviani M. 2004. Ethylmalonic encephalopathy is caused by mutations in ETHE1, a gene encoding a mitochondrial matrix protein. *American journal of human genetics* 74(2):239-252.
- Tiranti V, Viscomi C, Hildebrandt T, Di Meo I, Mineri R, Tiveron C, Levitt MD, Prella A, Fagiolari G, Rimoldi M, Zeviani M. 2009. Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nature medicine* 15(2):200-205.
- Topping DL, Clifton PM. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews* 81(3):1031-1064.
- Truong DH, Eghbal MA, Hindmarsh W, Roth SH, O'Brien PJ. 2006. Molecular mechanisms of hydrogen sulfide toxicity. *Drug metabolism reviews* 38(4):733-744.
- Tyagi S, Venugopalakrishnan J, Ramaswamy K, Dudeja PK. 2002. Mechanism of n-butyrate uptake in the human proximal colonic basolateral membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(4):G676-682.
- Vande Weghe JG, Ow DW. 1999. A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *The Journal of biological chemistry* 274(19):13250-13257.
- Velazquez OC, Lederer HM, Rombeau JL. 1997. Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Advances in experimental medicine and biology* 427:123-134.
- Volkel S, Grieshaber MK. 1996. Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*. Evidence for alternative electron pathways. *European journal of biochemistry / FEBS* 235(1-2):231-237.
- Waldecker M, Kautenburger T, Daumann H, Busch C, Schrenk D. 2008. Inhibition of histone-deacetylase activity by short-chain fatty acids and some polyphenol metabolites formed in the colon. *The Journal of nutritional biochemistry* 19(9):587-593.
- Wallace JL, Vong L, McKnight W, Dickey M, Martin GR. 2009. Endogenous and exogenous hydrogen sulfide promotes resolution of colitis in rats. *Gastroenterology* 137(2):569-578, 578 e561.
- Wang MJ, Cai WJ, Li N, Ding YJ, Chen Y, Zhu YC. 2010. The hydrogen sulfide donor NaHS promotes angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Antioxidants & redox signaling* 12(9):1065-1077.
- Wang R. 2002. Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? *FASEB J* 16(13):1792-1798.
- Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, Reiffenstein RJ, Francom DM, Taylor JD, Dieken FP. 1989. Acute hydrogen sulfide poisoning. Demonstration of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. *Biochemical pharmacology* 38(6):973-981.
- Watt J, Marcus R. 1970. Ulceration of the colon in guinea-pigs fed carrageenin. *The Proceedings of the Nutrition Society* 29(1):Suppl:4A.
- Weaver GA, Tangel CT, Krause JA, Parfitt MM, Jenkins PL, Rader JM, Lewis BA, Miller TL, Wolin MJ. 1997. Acarbose enhances human colonic butyrate production. *The Journal of nutrition* 127(5):717-723.

- Weisiger RA, Pinkus LM, Jakoby WB. 1980. Thiol S-methyltransferase: suggested role in detoxication of intestinal hydrogen sulfide. *Biochemical pharmacology* 29(20):2885-2887.
- Westley J, Adler H, Westley L, Nishida C. 1983. The sulfurtransferases. *Fundam Appl Toxicol* 3(5):377-382.
- Westrop GD, Georg I, Coombs GH. 2009. The mercaptopyruvate sulfurtransferase of *Trichomonas vaginalis* links cysteine catabolism to the production of thioredoxin persulfide. *The Journal of biological chemistry* 284(48):33485-33494.
- Willis CL, Cummings JH, Neale G, Gibson GR. 1997. Nutritional aspects of dissimilatory sulfate reduction in the human large intestine. *Current microbiology* 35(5):294-298.
- Wilson K, Mudra M, Furne J, Levitt M. 2008. Differentiation of the roles of sulfide oxidase and rhodanese in the detoxification of sulfide by the colonic mucosa. *Digestive diseases and sciences* 53(1):277-283.
- Winterbourn CC, Vile GF, Monteiro HP. 1991. Ferritin, lipid peroxidation and redox-cycling xenobiotics. *Free radical research communications* 12-13 Pt 1:107-114.
- Yang G, Sun X, Wang R. 2004. Hydrogen sulfide-induced apoptosis of human aorta smooth muscle cells via the activation of mitogen-activated protein kinases and caspase-3. *Faseb J* 18(14):1782-1784.
- Yang W, Yang G, Jia X, Wu L, Wang R. 2005. Activation of KATP channels by H₂S in rat insulin-secreting cells and the underlying mechanisms. *The Journal of physiology* 569(Pt 2):519-531.
- Yong R, Searcy DG. 2001. Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comparative biochemistry and physiology* 129(1):129-137.
- Zanardo RC, Brancaleone V, Distrutti E, Fiorucci S, Cirino G, Wallace JL. 2006. Hydrogen sulfide is an endogenous modulator of leukocyte-mediated inflammation. *Faseb J* 20(12):2118-2120.
- Zhang H, Zhi L, Moore PK, Bhatia M. 2006. Role of hydrogen sulfide in cecal ligation and puncture-induced sepsis in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(6):L1193-1201.
- Zhang Y, Zhou L, Bao YL, Wu Y, Yu CL, Huang YX, Sun Y, Zheng LH, Li YX. 2010. Butyrate induces cell apoptosis through activation of JNK MAP kinase pathway in human colon cancer RKO cells. *Chemico-biological interactions* 185(3):174-181.
- Zhang Z, Huang H, Liu P, Tang C, Wang J. 2007. Hydrogen sulfide contributes to cardioprotection during ischemia-reperfusion injury by opening K ATP channels. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 85(12):1248-1253.
- Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R. 2001. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. *The EMBO journal* 20(21):6008-6016.
- Zhi L, Ang AD, Zhang H, Moore PK, Bhatia M. 2007. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF-kappaB pathway. *Journal of leukocyte biology* 81(5):1322-1332.
- Zhong GZ, Li YB, Liu XL, Guo LS, Chen ML, Yang XC. 2010. Hydrogen sulfide opens the KATP channel on rat atrial and ventricular myocytes. *Cardiology* 115(2):120-126.
- Zweibaum A, Pinto M, Chevalier G, Dussaulx E, Triadou N, Lacroix B, Haffen K, Brun JL, Rousset M. 1985. Enterocytic differentiation of a subpopulation of the human colon tumor cell line HT-29 selected for growth in sugar-free medium and its inhibition by glucose. *Journal of cellular physiology* 122(1):21-29.

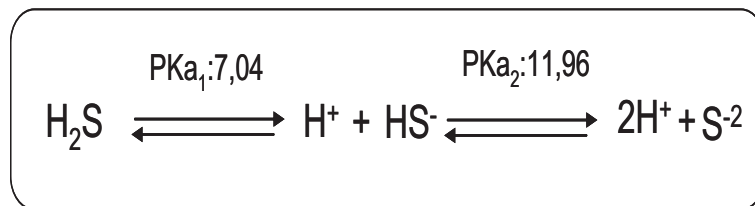


Figure 1 : Réactions de dissociation de H₂S

D'après Wang. 2002

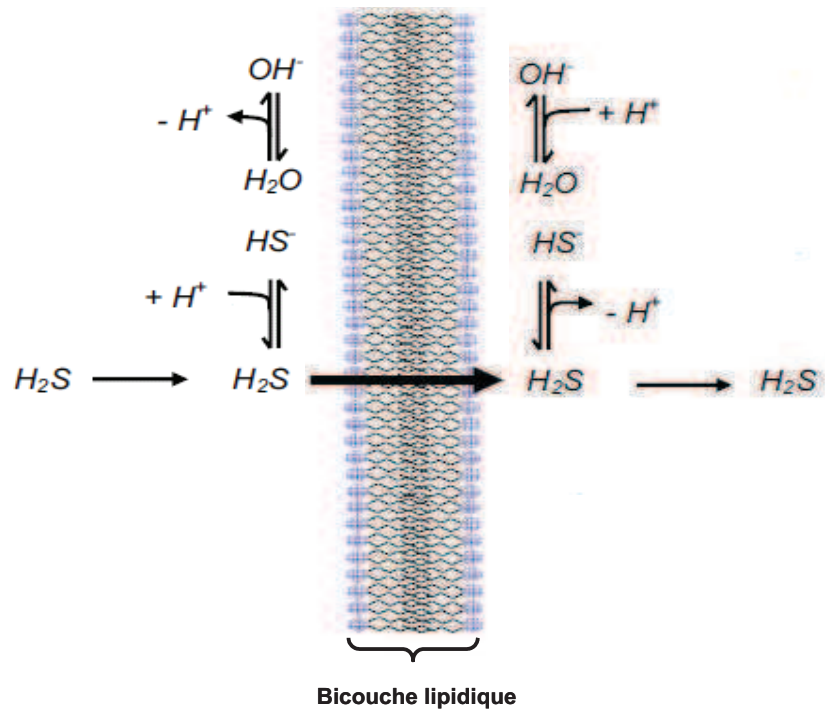


Figure 2 : Transport de H₂S à travers les membranes lipidiques

Le transport du H₂S au travers des membranes lipidiques implique plusieurs étapes : une réaction de protonation permet de transformer les formes ionisées du sulfure d'hydrogène (HS⁻) à la surface membranaire en forme gazeuse diffusible H₂S. Le H₂S sous sa forme non dissociée, traverse les bicouches lipidiques par simple diffusion. Les molécules H₂S après passage au travers des membranes biologiques, peuvent libérer des protons par déprotonation et revenir à la forme d'ion hydrosulfure HS⁻.

D'après Mathai et al. 2009

Tableau 1 : Réponses physiologiques à l'exposition au H₂S chez l'Homme

Concentration de H ₂ S		Réponses physiologiques
ppm	mg.m ⁻³	
0,003 - 0,02	0,0042 - 0,028	Seuil de détection olfactive
3 - 10	4 - 14	Perception d'une odeur désagréable évidente
20 - 30	28 - 42	Forte odeur nauséabonde d'oeuf pourri
30	42	Odeur sucrée écoeurante
50	70	Irritation de la conjonctive
50 - 100	70 - 140	Irritation des muqueuses respiratoires
100 - 200	140 - 280	Perte de l'odorat
150 - 200	210 - 280	Paralysie olfactive
250 - 500	350 - 700	Œdème pulmonaire
500	700	Anxiété, céphalée, ataxie, étourdissements, stimulation de la respiration, amnésie, perte de conscience
500 - 1000	700 - 1400	Paralysie respiratoire entraînant un décès, collapsus immédiat, paralysie neurologique, trouble du rythme cardiaque, décès

D'après Reiffeistein. 1992

1 mg/m³=0,7 ppm, 1ppm=1,4 mg/m³

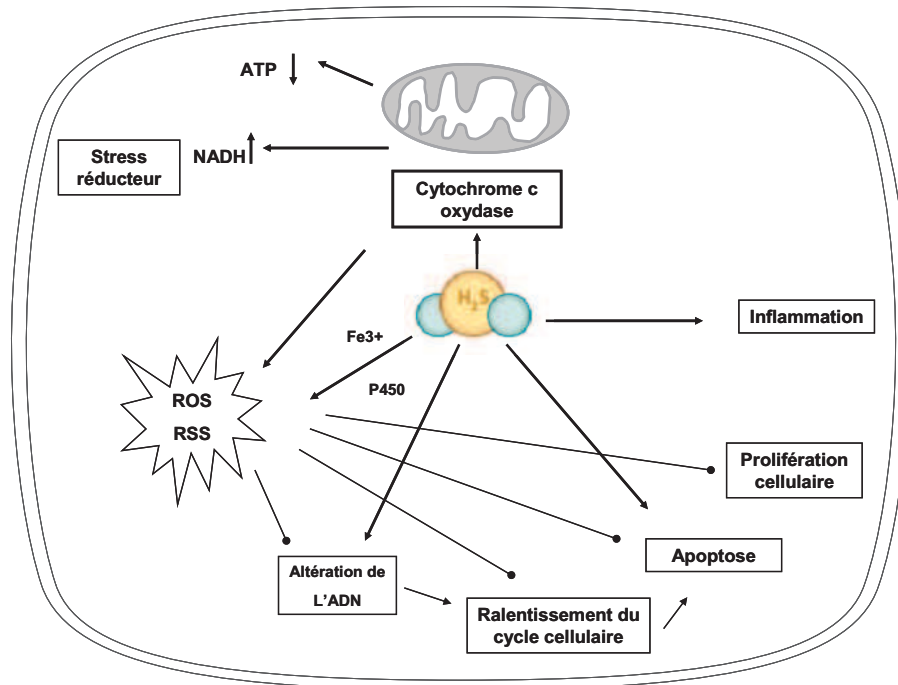


Figure 3 : Effets toxiques de H₂S dans les cellules

Le H₂S inhibe l'activité de la COX ce qui entraîne une diminution des niveaux d'ATP et une augmentation du rapport NADH/NAD⁺ induisant un stress réducteur. Le H₂S peut également être à l'origine d'une perturbation du cycle cellulaire ou d'une réponse inflammatoire dans les cellules ou encore à l'origine d'effets génotoxiques par altération de l'ADN. Les effets toxiques de H₂S peuvent être médiés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et ou par les espèces réactives du soufre (RSS) qui sont produits par la mitochondrie via l'inhibition de la COX ou par le cytochrome P450 via la métabolisation de H₂S.

D'après Attene-Ramos et al. 2010

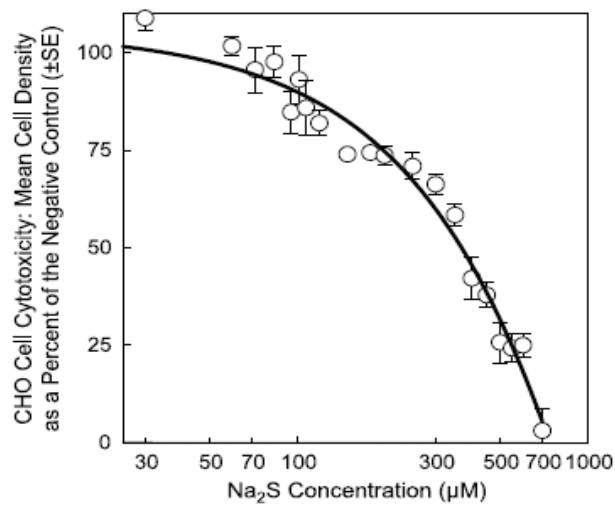


Figure 4 : Cytotoxicité de H₂S dans les cellules CHO

Des cellules CHO (n=8) ont été mises en culture pendant 72 heures en présence de différentes concentrations de Na₂S. Une réduction de 50% de la densité des cellules traitées a été observée en présence de 368,6µmol/l de Na₂S.

D'après Attene-Ramos et al. 2006

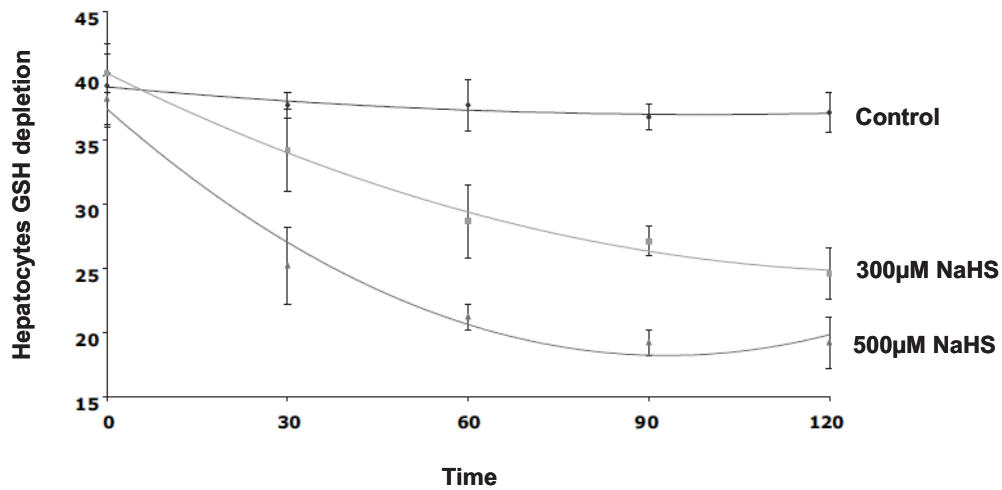


Figure 5 : Déplétion des niveaux de glutathion réduit (GSH) dans des hépatocytes traités au NaHS

Des hépatocytes (n=3) ont été incubés en absence (control) ou en présence de NaHS 300µM ou 500µM pendant différents temps puis isolés. Le NaHS réduit les niveaux de GSH des hépatocytes traités. La déplétion des niveaux de GSH est plus importante dans les cellules traitées à la concentration de 500µM.

D'après Truong et al. 2006

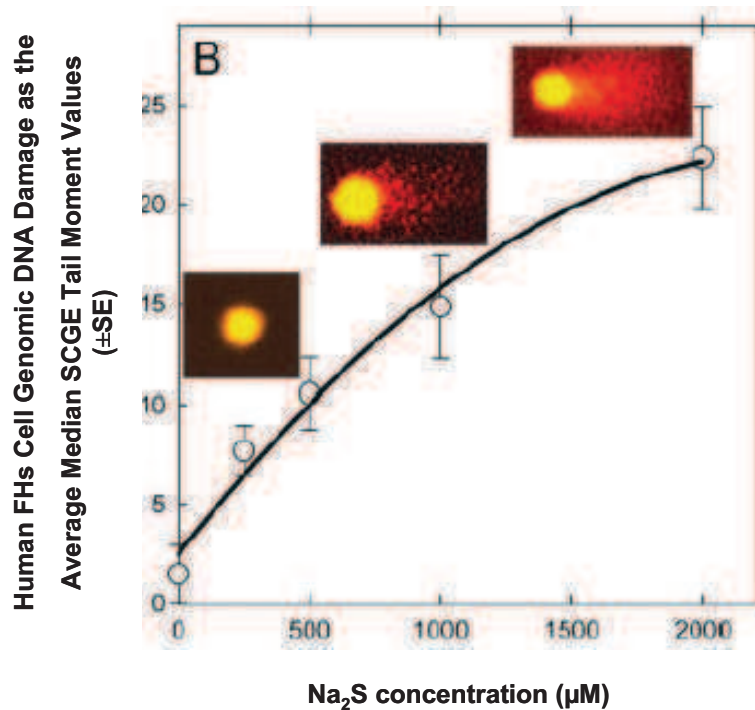


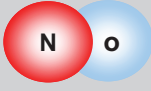
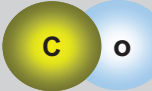
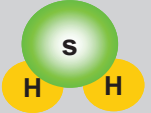
Figure 6 : Mise en évidence de l'effet génotoxique de H₂S par SCGE (ou test des comètes) dans les cellules FHs 74 Int

Les cellules épithéliales intestinales non transformées FHs 74 Int ont été traitées pendant 2 heures au Na₂S puis isolées et analysées par électrophorèse en gel d'agarose (« modified single cell gel electrophoresis »: SCGE) réalisée en présence d'inhibiteurs de la réparation d'ADN. Les trois images représentent des exemples de noyaux de cellules traitées avec le Na₂S aux concentrations respectives de 0 ; 1 et 2 mM. La courbe dose-réponse de l'effet génotoxique de H₂S montre que les valeurs de moments de queue sont significativement différentes dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles ce qui révèle la présence de cassures de l'ADN dans les cellules traitées au Na₂S.

Moment de la queue = longueur de la queue (distance entre le bord du noyau et de l'extrémité de la queue) x % d'ADN

D'après Attene-Ramos et al. 2010

Tableau 2 : Propriétés des trois gazotransmetteurs NO, CO et H₂S

			
Production enzymatique	nNOS iNOS eNOS	HO-1 HO-2 HO-3	CBS CSE 3MST
Principal substrat	L-arginine	Hème	L-cystéine
Concentration dans le sang	nM	nM	μM
Demi-vie (<i>in vivo</i>)	secondes	minutes	secondes
Découverte de son rôle en tant que médiateur physiologique	1987	1991	2002
Second messenger	sGC-cGMP	sGC-cGMP	Canaux K _{ATP} dépendants
Modification chimique	S-nitrosylation	??	S-sulfhydration

Le monoxyde d'azote (NO), le monoxyde de carbone (CO) et le sulfure d'hydrogène (H₂S) sont des gazotransmetteurs produits de façon endogène dans l'organisme. Ces petites molécules de signalisation très labiles et très réactives exercent des rôles physiologiques, activent des voies métaboliques de signalisation et induisent des modifications chimiques aux niveaux de certaines molécules.

CBS : cystathionine β-synthase, CSE : cystathionine γ-lyase, cGMP : cyclic guanosine monophosphate, eNOS : endothelial nitric oxide synthase, HO-1 : heme oxygenase 1, iNOS : inducible nitric synthase, sGC : soluble guanylyl cyclase.

D'après Calvert et al. 2010

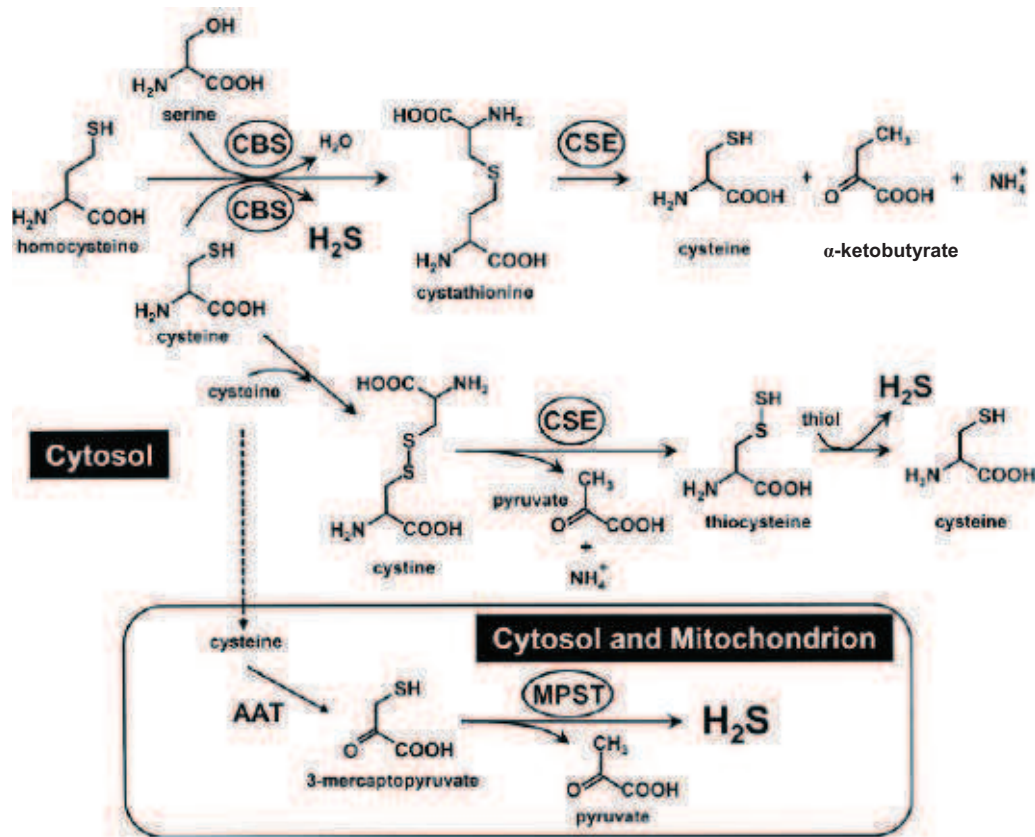


Figure 7 : Voies enzymatiques de production de H₂S

H₂S est synthétisé principalement par les trois enzymes : cystathionine β-synthase (CBS), cystathionine γ-lyase (CSE) et mercaptopyruvate sulfurtransférase (MPST).

D'après Kajimura et al. 2010

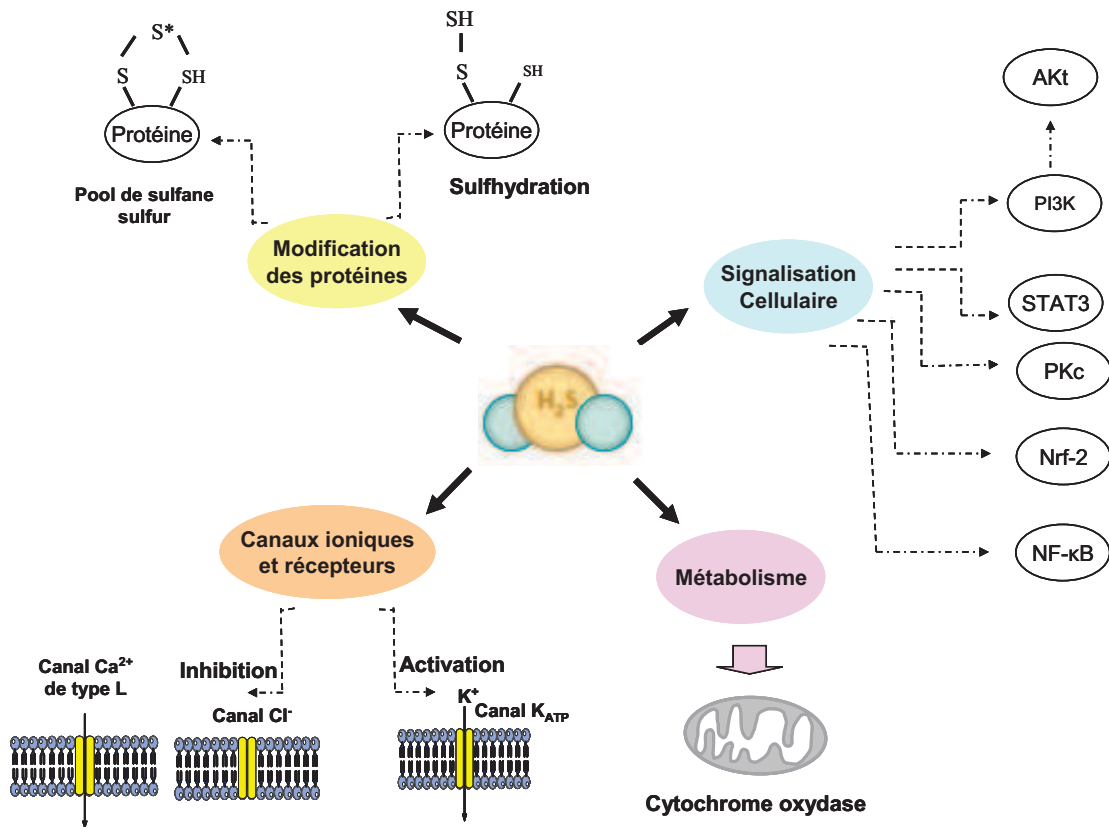


Figure 8 : Sites d'action pour les effets physiologiques de H₂S

Le H₂S agit sur différentes molécules cibles pour induire des réponses biologiques dans les cellules. Ces molécules cibles concernent les protéines de signalisation intracellulaire ou les facteurs de transcription, les canaux ioniques, les protéines via des modifications chimiques et la cyochrome c oxydase qui est la cible d'un effet toxique du H₂S.

NF-κB, nuclear factor κB; Nrf-2, NF-E2-related factor 2; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PKC, protein kinase C; -SH, thiol; -SSH, hydropersulfide; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3.

D'après Li et al. 2011

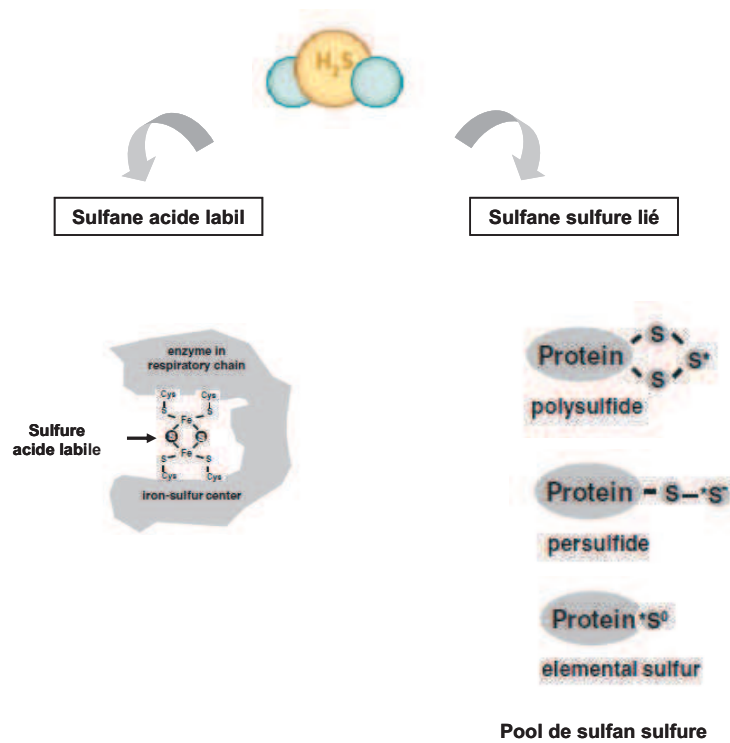


Figure 9 : Les formes liées de H₂S aux protéines

Le H₂S interagit/modifie les protéines. Deux formes de H₂S liées aux protéines ont été décrites. Ces formes peuvent constituer également des sites de stockage pour le H₂S dans les cellules. Le sulfure labile : le H₂S se lie au centre actif des enzymes par interaction avec le fer formant un centre sulfure-fer. Le sulfure acide labile est instable dans des conditions acides et libère du H₂S. Les sulfures sulfanes liés : peuvent être des polysulfures, du sulfure élémentaire ou des persulfides. Ces forment libèrent du H₂S dans des conditions réduites.

D'après Kajimura et al. 2010

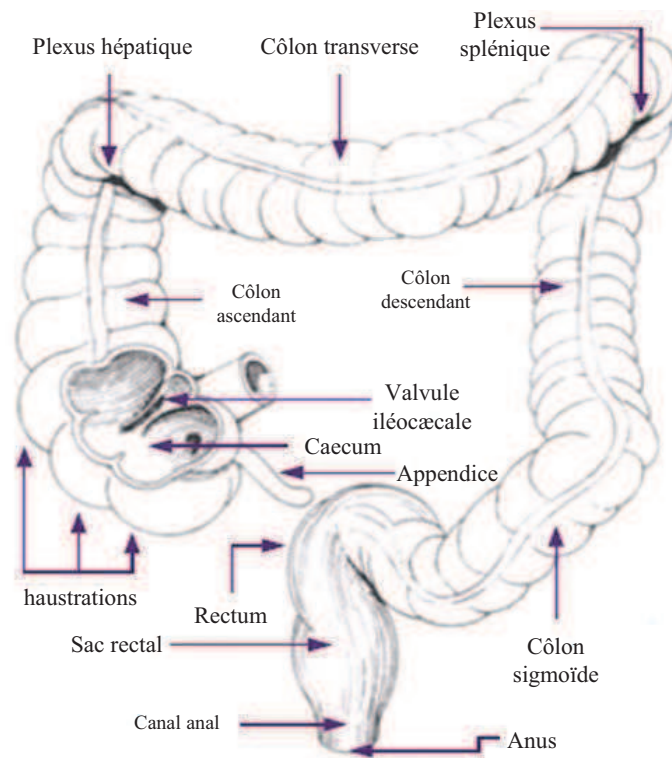


Figure 10 : Les différentes régions du gros intestin

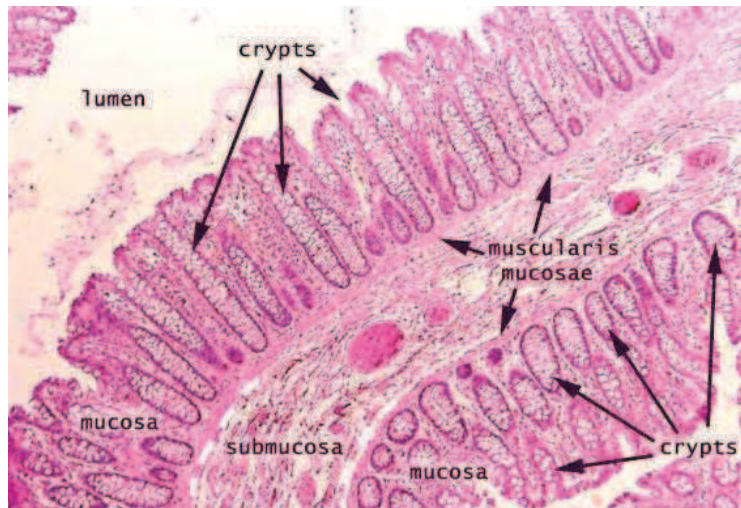


Figure 11 : Muqueuse et sous-muqueuse coliques

D'après www.siumed.edu

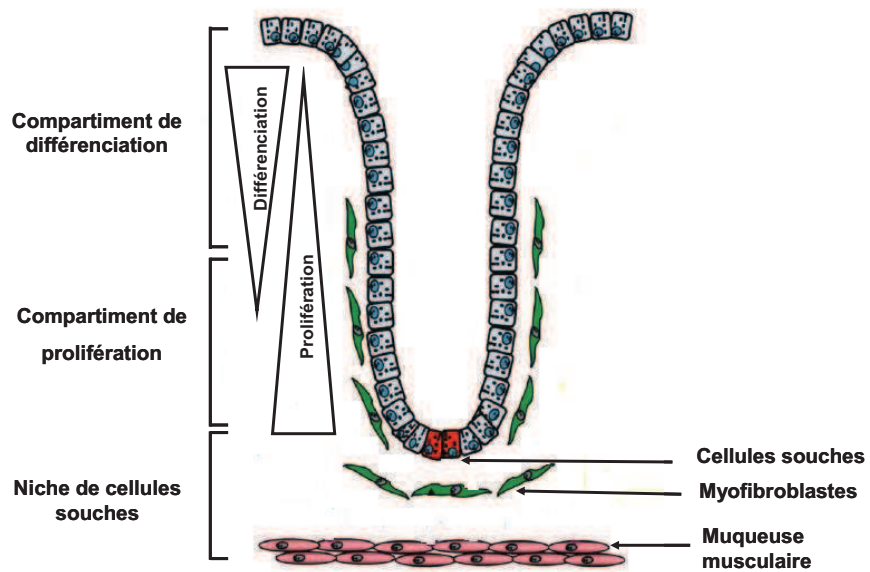


Figure 12 : Présentation schématique du développement des cellules épithéliales du côlon

D'après Kosinski et al. 2007

Tableau 3 : Concentrations des acides gras à courte chaîne (acétate, propionate, butyrate) dans le contenu intestinal chez l'Homme

Site	Concentrations (mmol/kg de contenu)		
	Acétate	Propionate	Butyrate
Caecum	69	25	26
Côlon ascendant	63	27	25
Côlon transverse	58	23	24
Côlon sigmoïde	50	20	18
Fèces	54	20	14

D'après Cummings et Macfarlane. 1991

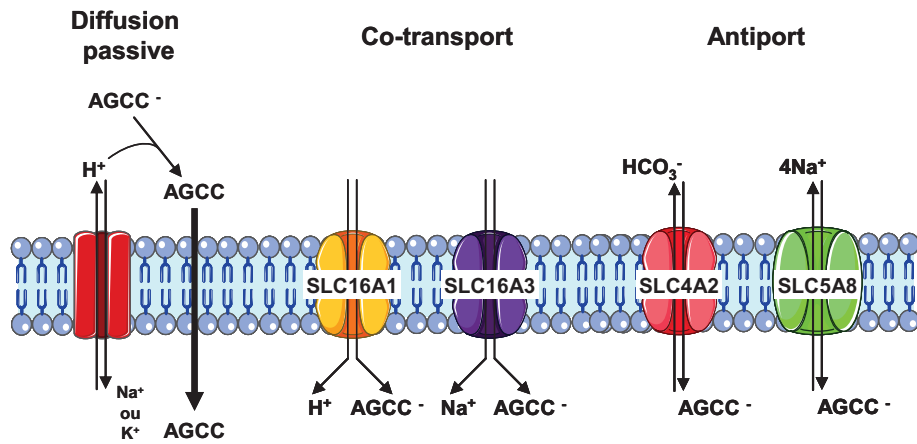


Figure 13 : Absorption des acides gras à chaînes courtes

L'absorption des AGCC se fait par simple diffusion mais également via différents transporteurs se trouvant à la surface des cellules épithéliales coliques.

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

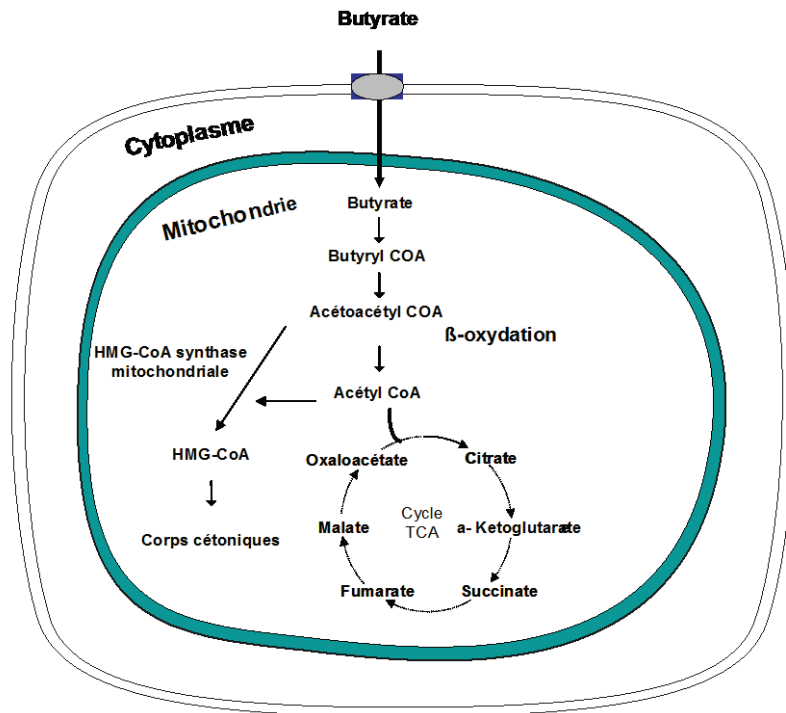


Figure 14 : Voies d'utilisation du butyrate dans les colonocytes

L'activation mitochondriale du butyrate génère du butyryl-CoA qui rejoint la voie de la β -oxydation. L'acétyl-CoA produit peut être utilisé dans le cycle de Krebs ou dans la voie de la cétogénèse.

HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzymeA

D'après Cherbuy et al. 2004

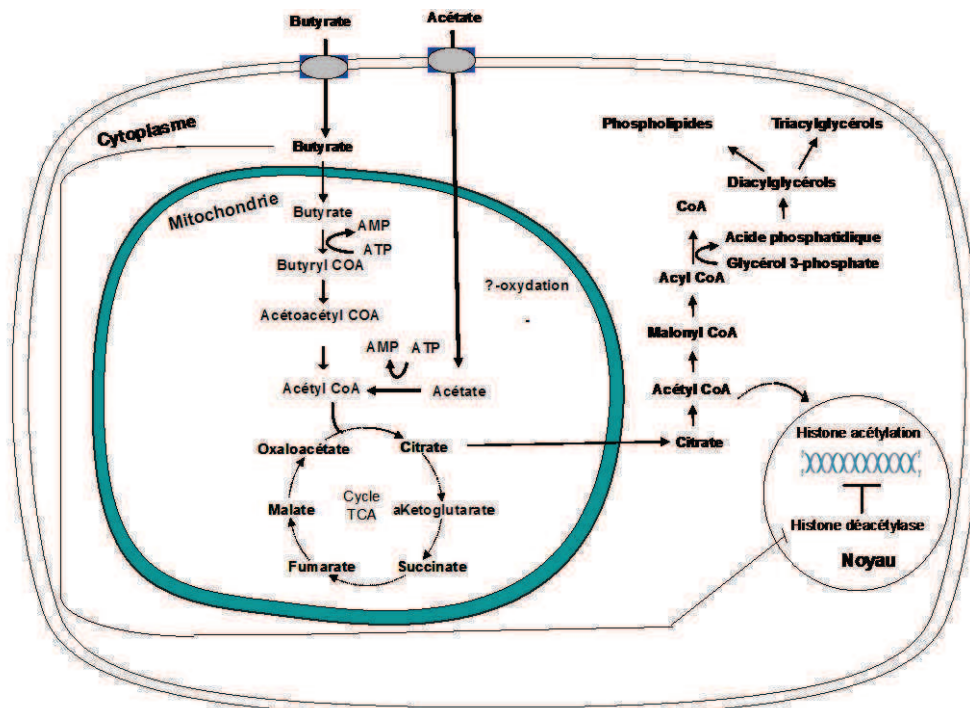


Figure 15 : Métabolisme du butyrate et de l'acétate dans les cellules épithéliales coliques humaines HT-29Glc^{-/+} et effet sur l'acétylation des histones

Le butyrate et l'acétate sont capables d'augmenter le rapport AMP/ADP des cellules. Le butyrate est le principal précurseur cytosolique de l'acétylation des histones en formant l'acétyl-CoA. Le butyrate exerce également un effet inhibiteur sur les histones déacétylases.

D'après Andriamihaja et al. 2009

Tableau 4 : Concentrations fécales et luminales de H₂S chez des sujets volontaires et chez des animaux de laboratoire

Matériel biologique	Concentration de H₂S total	Concentration de H₂S libre (non lié)	Références
Contenu luminal du gros intestin de l'Homme	1,0-2,4 mmol/L	ND	Macfarlane et al. (1992)
Contenu fécal humain	0,22-3,38 mmol/kg	ND	Magee et al. (2000)
Contenu fécal humain	0,17 mmol/kg	ND	Florin (1991)
Contenu fécal humain	0,74 mmol/L	60 µmol/L (8% de concentration totale)	Jorgensen et Mortensen (2001)
Contenu de lumière du caecum de rat	1,5 mmol/kg	2,7 µmol/kg (0,2% de concentration totale)	Levitt et al. (2002)
Contenu de lumière du gros intestin de souris	0,2-1,1 mmol/kg	ND	Deplancke et al. (2003)

ND : non déterminé

D'après Blachier et al. 2010

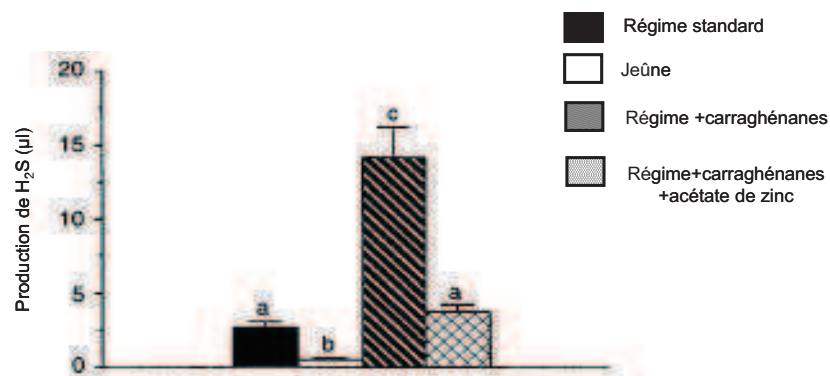


Figure 16 : Influence du jeûne et de la supplémentation en carraghénanes ou en acétate de zinc sur la production de H₂S dans le caecum de rat

La production caecale de H₂S est significativement diminuée chez des rats privés de nourriture pendant 36 heures. Une supplémentation du régime alimentaire en carraghénanes (une forme non absorbée de sulfate) augmente de 6 fois la production de H₂S dans le caecum de rat. Cette augmentation n'est pas observée chez les rats nourris avec un régime supplémentation en carraghénanes et en acétate de zinc.

D'après Suarez e al. 1998

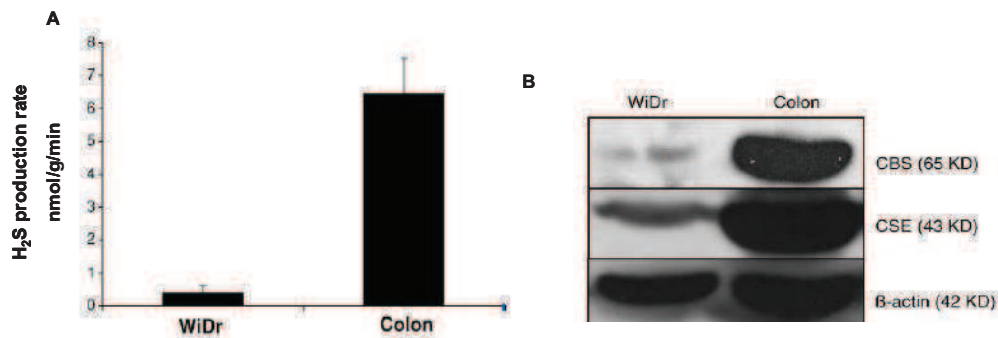


Figure 17 : Production de H₂S et expression des enzymes CBS et CSE dans les cellules coliques humaines WiDr et dans le côlon de souris

La production de H₂S est observée dans des homogénats de côlon de souris mais également par des lysats de cellules cancéreuses coliques humaines WiDr (A). L'analyse de l'expression des enzymes de production de H₂S CBS et CSE par western blot (B) révèle une présence plus abondante de l'enzyme CSE.

D'après Cao e al. 2009

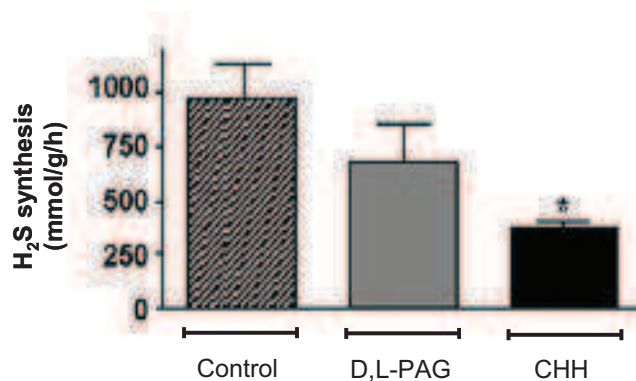


Figure 18 : Production de H₂S dans le côlon de souris et effets des inhibiteurs de la CSE et de la CBS

La synthèse de H₂S par le tissu colique de souris est réduite en présence d'inhibiteur de la CBS. La CBS est l'enzyme prédominante de la synthèse de H₂S dans le côlon de souris.

D,L-PAG :DL-propargylglycine (inhibiteur de la CSE), CHH : O-(carboxyméthyl)hydroxylamine hemihydrochloride (inhibiteur de la CBS)

D'après Martin e al. 2010

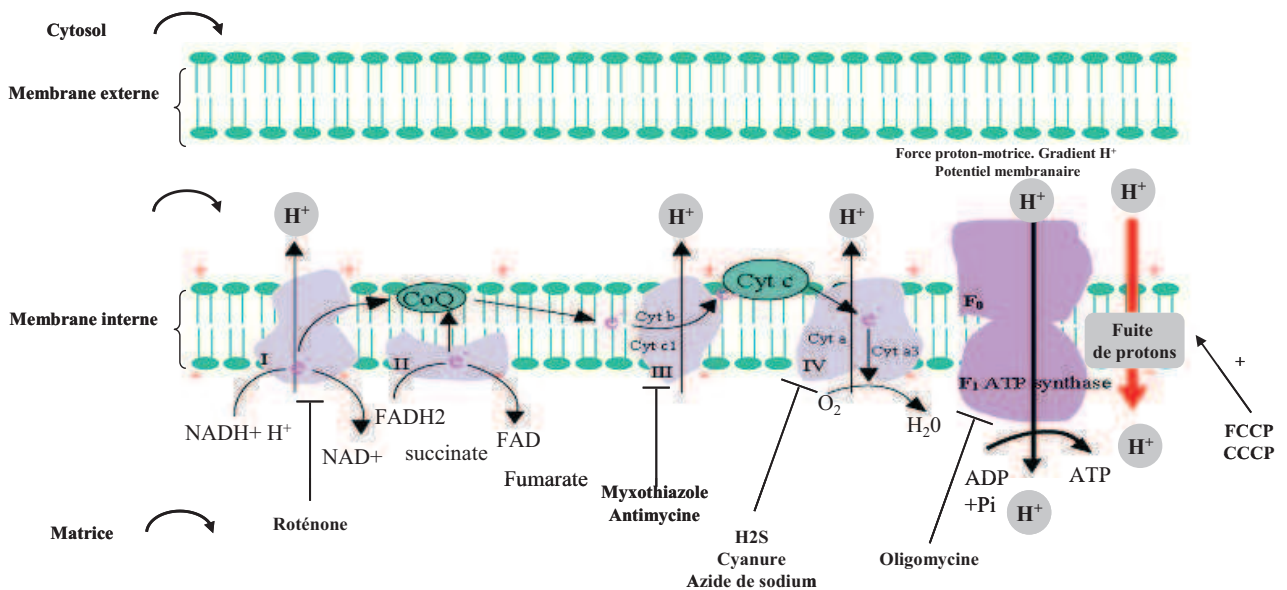


Figure 19 : La chaîne respiratoire mitochondriale et la phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydatives permet la synthèse d'ATP à partir d'électrons libérés de la réoxydation des coenzymes NADH, FADH₂. Les électrons sont transportés par les différents complexes : complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase), complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase), complexe III (ubiquinone-cytochrome c oxydoréductase), complexe IV (cytochrome c oxydase) et par deux transporteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone et le cytochrome jusqu'à l'accepteur final qui est l'oxygène moléculaire (O₂). Le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons vers l'espace inter-membranaire qui engendre un gradient électrochimique de protons. Cette force protomotrice, est utilisée par la F₀-F₁ ATP synthase pour synthétiser de l'ATP à partir de l'ADP et du pi.

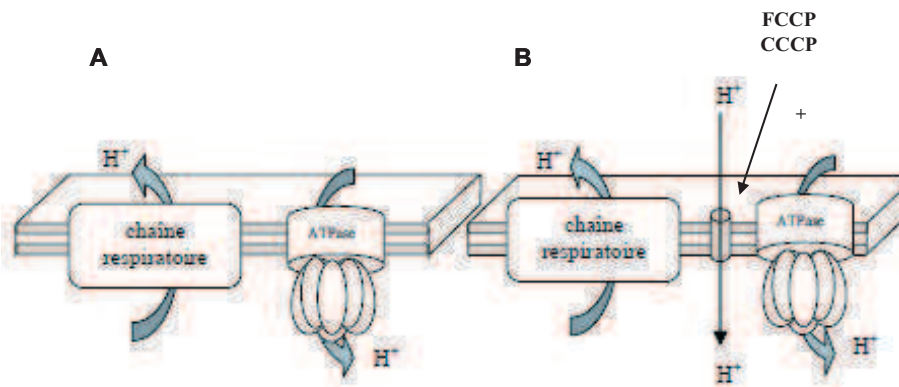


Figure 20 : Phénomène de fuite de protons « proton leak »

Dans une situation idéale, la membrane mitochondriale est totalement imperméable aux protons. Tout proton sortant est utilisé pour effectuer un travail (A). La membrane n'est pas totalement imperméable, il s'opère un retour passif de protons dans la matrice et ceci sans passer par l'ATP synthase donc sans générer d'ATP (B). L'ajout de découplant comme le FCCP (p-trifluorométhoxycarbonylcyanide phénylhydrazone) ou le CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophénylhydrazone) permettent d'effondrer le potentiel de membrane et d'augmenter la fuite de protons.

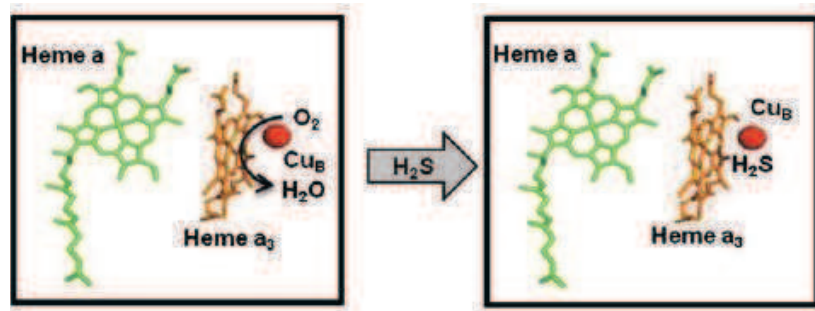


Figure 21 : Structure du centre catalytique de la cytochrome c oxydase et sa réactivité avec le H₂S

La cytochrome c oxydase contient deux hèmes, l'hème *a* et l'hème *a*₃ et deux centres de cuivre Cu_A et Cu_B. Le centre catalytique de la COX comprend l'hème *a*₃ et le centre Cu_B et un résidu tyrosine. La cytochrome c oxydase reçoit les électrons du cytochrome c. Les électrons sont transférés jusqu'au centre hème *a*₃-Cu_B. L'hème *a*₃ ferreux réduit (Fe²⁺) se lie à l'oxygène pour lui transférer les électrons et le réduire en H₂O. H₂S interagit avec le centre binucléaire hème *a*₃/Cu_B ce qui peut modifier l'activité de la cytochrome c oxydase.

D'après Pietri et al. 2011

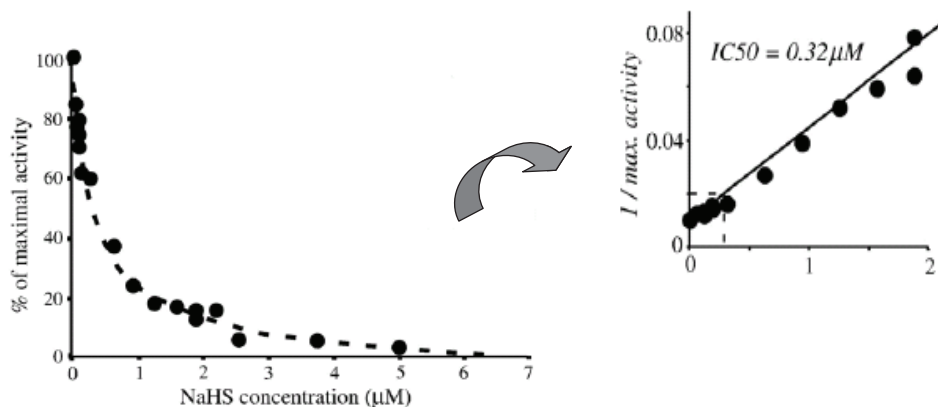


Figure 22 : Inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase par le NaHS

Le NaHS (donneur de H₂S) à des niveaux micro molaires induit une inhibition dose dépendante (IC₅₀=0,32μM) de l'activité de la cytochrome c oxydase dans des homogénats de cellules HT-29 Glc^{-/+}

D'après Leschelle et al. 2005

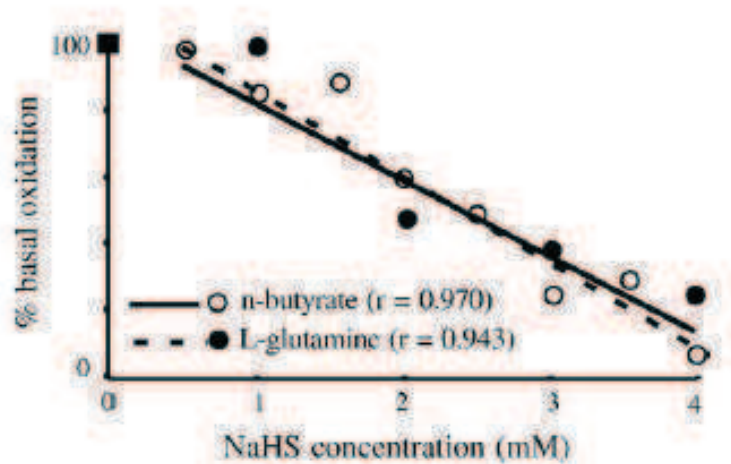


Figure 23 : Effet de NaHS sur les capacités oxydatives des cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+}

Les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} (n=4) ont été incubées pendant 90min en présence de 2mM de n-[1-¹⁴C] butyrate ou 4mM de L-[U¹⁴-C] glutamine en présence ou en absence de concentrations croissantes de NaHS (donneur de H₂S). Les résultats révèlent une inhibition de l'oxydation des substrats n-butyrate et L-glutamine dans les cellules coliques humaines en présence de NaHS.

D'après Leschelle et al. 2005

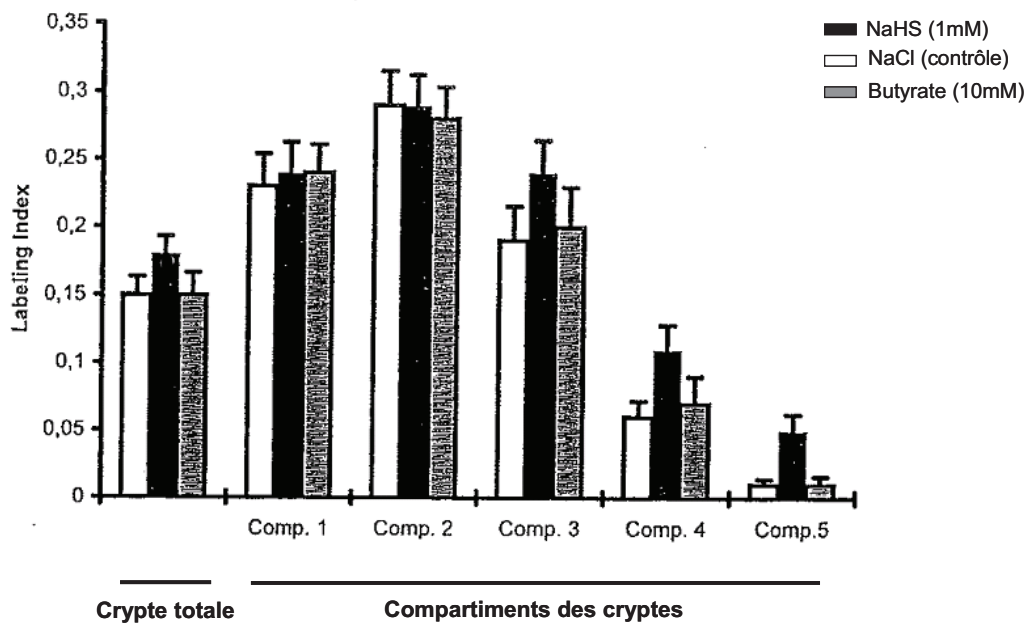


Figure 24 : Mise en évidence de l'effet hyper proliférant de H₂S et sur les cellules coliques humaines

Des biopsies prélevées chez des patients sains à partir du côlon rectosigmoïde ont été soit incubées pendant 4 heures en présence de NaCl (contrôle) ou de NaHS (1mmol/l) soit co-incubées pendant 4 heures en présence de NaHS (1mmol/l) et de butyrate (10mmol/l). Les valeurs (n=10) représentent les moyennes (moyenne ± SEM) des index de marquage à la bromodesoxyuridine (un analogue des bases de l'ADN) en immunohistochimie des cryptes totales et des 5 compartiments de cryptes. Les résultats montrent un effet hyper proliférant de NaHS (1mmol/l) ainsi qu'une expansion de la zone proliférante au niveau de la base des cryptes. Les résultats montrent également un effet protecteur/antagoniste du butyrate contre l'hyper prolifération induite par NaHS.

D'après Christl et al. 1996

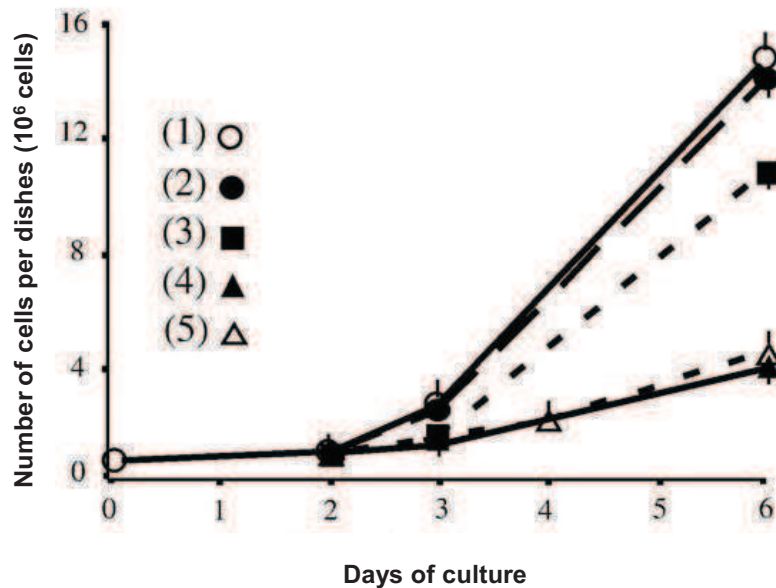


Figure 25 : Effet de NaHS sur la prolifération des cellules coliques humaines

Les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} (n=4) ont été incubées pendant 24 heures en présence ou en absence de NaHS. Les cellules ont été traitées après 2 jours de leur ensemencement aux différentes concentrations de NaHS : 0mM (1), 0,1mM (2), 0,3mM (3), 1,0mM (4). La courbe 5 indique les résultats de deux prétraitements des cellules HT-29 Glc^{-/+} à la concentration de 0,3mM de NaHS respectivement après 2 jours et 3 jours d'ensemencement.

Les résultats montrent une réduction de la prolifération des cellules HT-29 Glc^{-/+} prétraitées aux concentrations de 0,3mM ou 1mM de NaHS. Une inhibition de la prolifération cellulaire est observée après deux traitements successifs des cellules HT-29 Glc^{-/+} à la concentration de 0,3 mM de NaHS.

D'après Leschelle et al. 2005

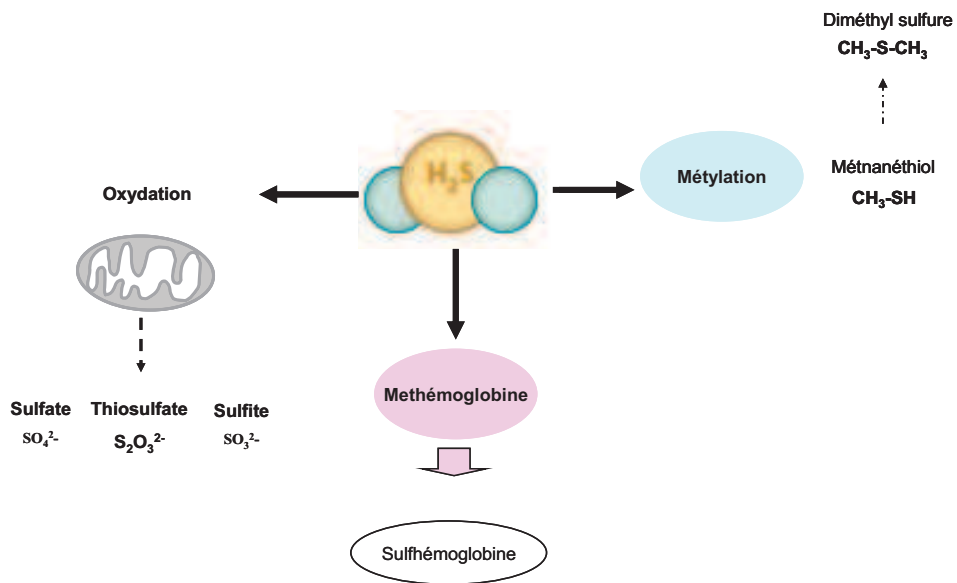


Figure 26 : Métabolisme de H_2S

H_2S peut être métabolisé par oxydation dans la mitochondrie ou par méthylation dans le cytosol. La formation de sulfhémoglobine par interaction de H_2S avec la méthémoglobine constitue également une voie de métabolisation de H_2S .

D'après Li et Moore. 2007

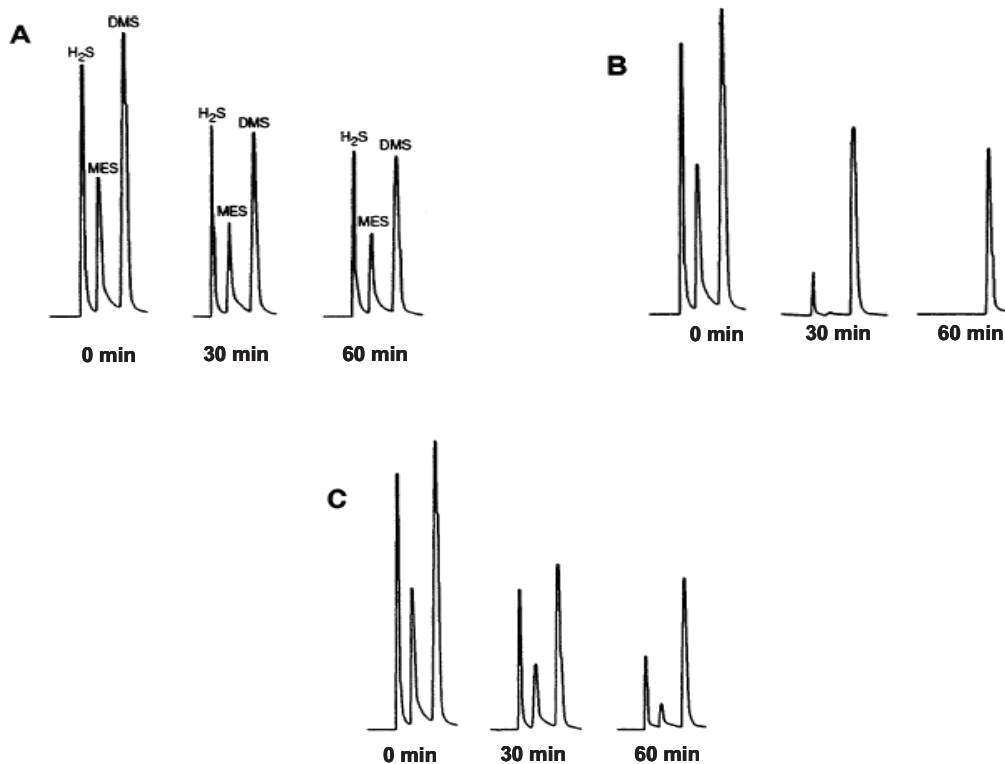


Figure 27 : Métabolisation des gaz sulfurés (H_2S , MES, DMS) par la muqueuse colique et par le foie de rat

La figure représente les profils de chromatographie en phase gazeuse de tampon seul (contrôle négatif) (A), en présence de muqueuse caecale de rat (B) et en présence d'homogénat de foie de rat (C) incubés pendant (0, 30 ou 60 minutes) en présence de H_2S , de MES et de DMS à la concentration de 42 ppm pour chaque gaz. Les résultats montrent que la muqueuse de caecum de rat métabolise de façon très rapide et très efficace le H_2S et le MES comparée au foie de rat. Ces résultats suggèrent que le métabolisme rapide de H_2S et de MES dans la muqueuse caecale n'implique pas la méthylation car aucune augmentation de DMS, le produit final de la thiol S-méthyltransférase n'a été observée.

MES : méthane-thiol (monométhylsulfide), DMS : diméthylsulfide.

D'après Suarez et al. 1998

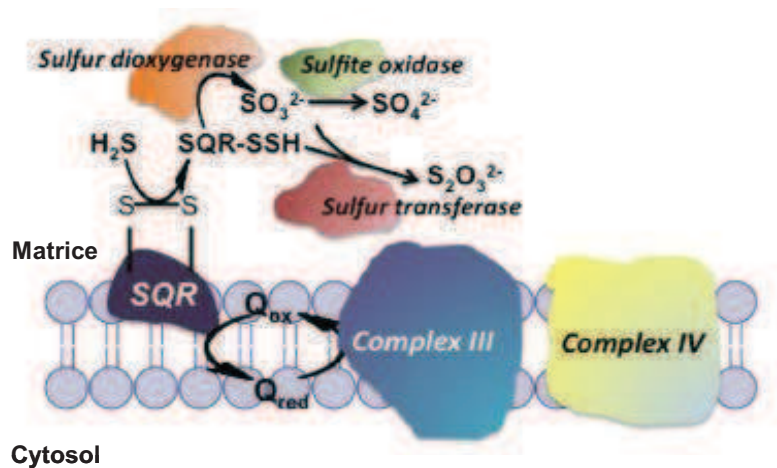


Figure 28 : Oxydation mitochondriale de H₂S

La protéine membranaire SQR (sulfide quinone reductase) oxyde H₂S, un groupement persulfide est formé (SQR-SSH). Les électrons sont transférés à la chaîne respiratoire au niveau de l'ubiquinone qui passe d'un état oxydé à un état réduit (O_{ox}/Q_{red}). Les électrons sont ensuite transférés jusqu'à l'O₂ pour le réduire en H₂O. La sulfure dioxygénase dans la matrice mitochondriale oxyde le persulfide en sulfite (SO₃²⁻) consommant de l'oxygène et de l'eau. La sulfure transférase produit à la fin du thiosulfate (S₂O₃²⁻) en transférant un deuxième persulfide vers le sulfite. Le sulfite peut être transformé directement en sulfate (SO₄²⁻) par la sulfite oxydase.

D'après Hilderbrandt et al. 2008 et Kabil et Banerjee. 2010

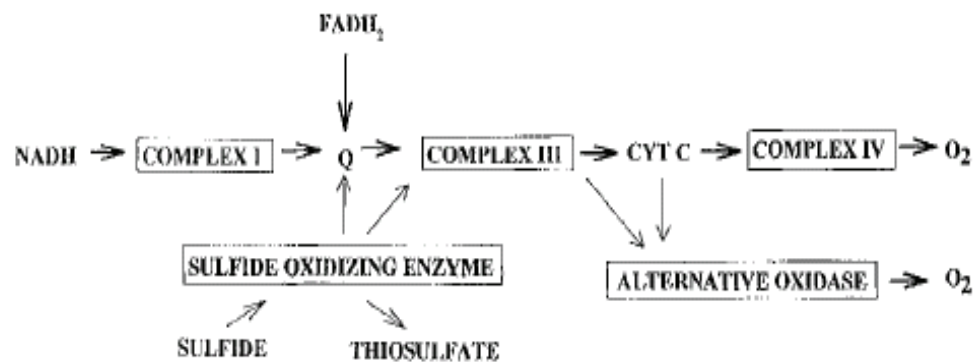


Figure 29 : Transport d'électrons durant l'oxydation mitochondriale de H₂S chez le ver *Arenicola marina*

Les électrons issus de l'oxydation de H₂S rejoignent la chaîne de transport des électrons au niveau de l'ubiquinone ou directement via le complexe III, jusqu'à l'oxygène l'accepteur final des électrons. A fortes concentrations de H₂S et donc dans une situation d'inhibition de la cytochrome oxydase, les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire par une oxydase terminale alternative insensible au H₂S.

D'après Völkel et Grieshaber.1996

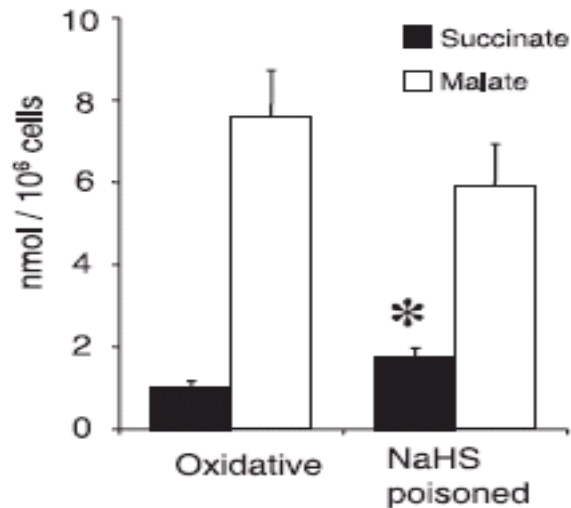


Figure 30 : Effets de la toxicité liée au H₂S sur les intermédiaires du cycle de Krebs

Les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} (n=5) ont été exposées au NaHS (donneur soluble de H₂S). Deux différentes conditions d'exposition (en fonction des taux d'infusion de NaHS) ont été testées. Oxidative : les cellules ont été exposées à des taux d'infusion non toxiques n'induisant pas d'inhibition de la cytochrome c oxydase et permettant aux cellules d'oxyder H₂S. NaHS poisonné : les cellules ont été exposées à des taux d'infusion de NaHS induisant une inhibition totale de la cytochrome c oxydase. Les résultats montrent que l'inhibition de la respiration mitochondriale des cellules par H₂S est associée à une augmentation de succinate et une légère diminution de malate.

D'après Gubern et al. 2007

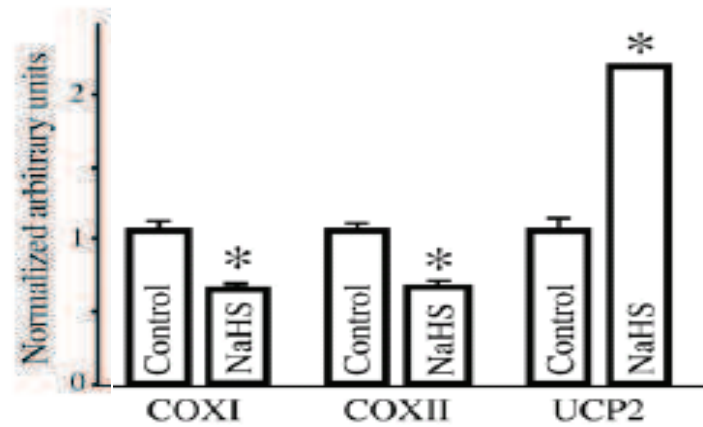


Figure 31 : Effets de H₂S sur l'expression de la protéine UCP2 et des sous unités de la cytochrome c oxydase dans les cellules coliques humaines

Le traitement des cellules HT-29 Glc^{-/+} au NaHS (1mM) pendant 24 heures augmente en western blot l'expression de la protéine de découplage UCP2 et diminue l'expression des sous unités I et II de la COX.

D'après Leschelle et al. 2005

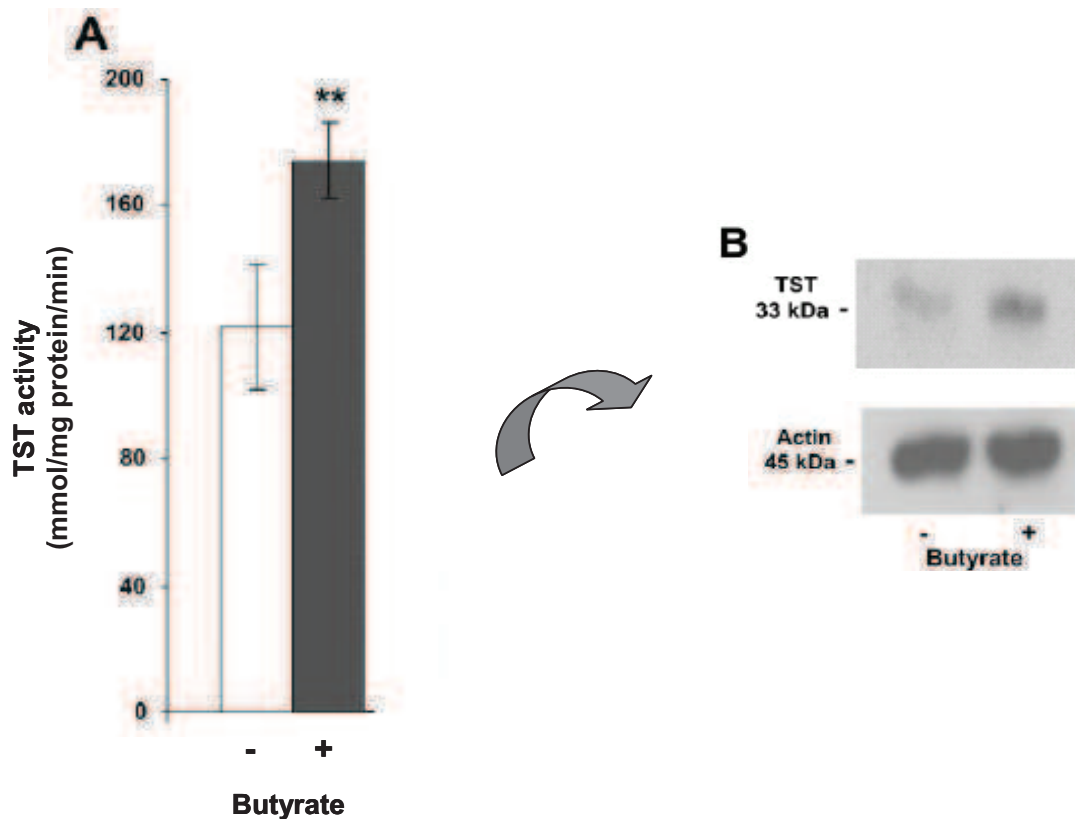


Figure 32 : Effets du butyrate sur l'activité et l'expression de la TST dans les cellules coliques humaines HT-29 parentales

L'activité de la TST a été mesurée dans les cellules HT-29 (n=6) traitées ou non au butyrate (2mM) pendant 24 heures (A). L'expression de la protéine TST dans les cellules traitées et non traitées au butyrate a été analysée par western blot (B). La figure révèle que le butyrate augmente significativement l'activité et l'expression de la protéine TST. L'actine a été utilisée comme témoin négatif. TST thiosulfate sulfurtransferase.

D'après Ramasamy et al. 2006

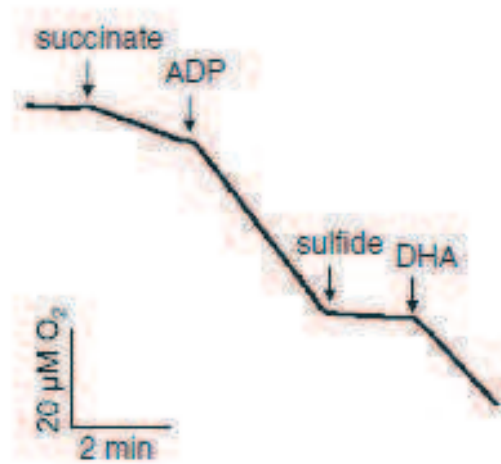


Figure 33 : Effet de l'acide déoxyascorbique (DHA) sur l'inhibition de la respiration mitochondriale induite par le H₂S

La figure montre un tracé de mesure de consommation d'oxygène de mitochondries isolées de foie de rat (0,25 mg/ml de protéines mitochondriales). La mesure a été réalisée par polarographie en présence de succinate comme substrat (4mM) puis après addition successive d'ADP (1mM), de NaHS (50μM) et de DHA (1mM). Le tracé polarographique révèle une diminution de l'effet inhibiteur de H₂S sur la respiration mitochondriale en présence de DHA.

D'après Hildebrandt. 2011

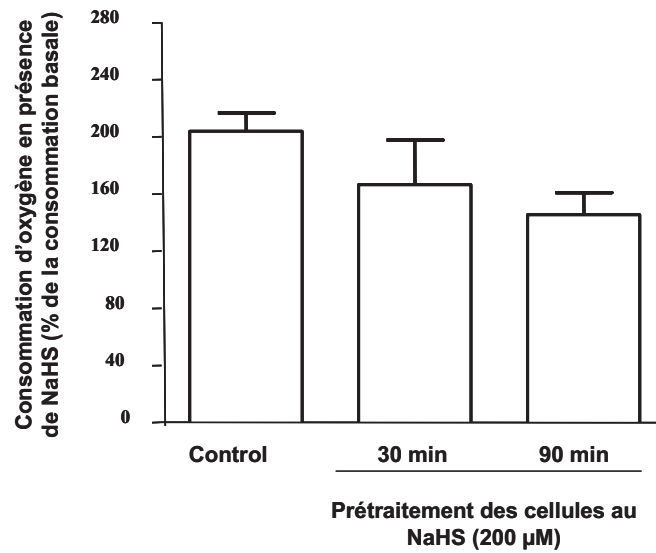


Figure 34 : Effet d'un prétraitement des cellules HT-29 Glc^{-/+} au NaHS

Les cellules (n=) ont été traitées au NaHS à la concentration de 200 μ M pendant 30min ou 90min. La consommation d'oxygène des cellules traitées ou non au NaHS a été mesurée par polarographie en présence de 20 μ M de NaHS dans la chambre de l'oxygraphe (concentration stimulante de NaHS). Le prétraitement au NaHS n'induit pas d'augmentation de la capacité des cellules à oxyder le H₂S

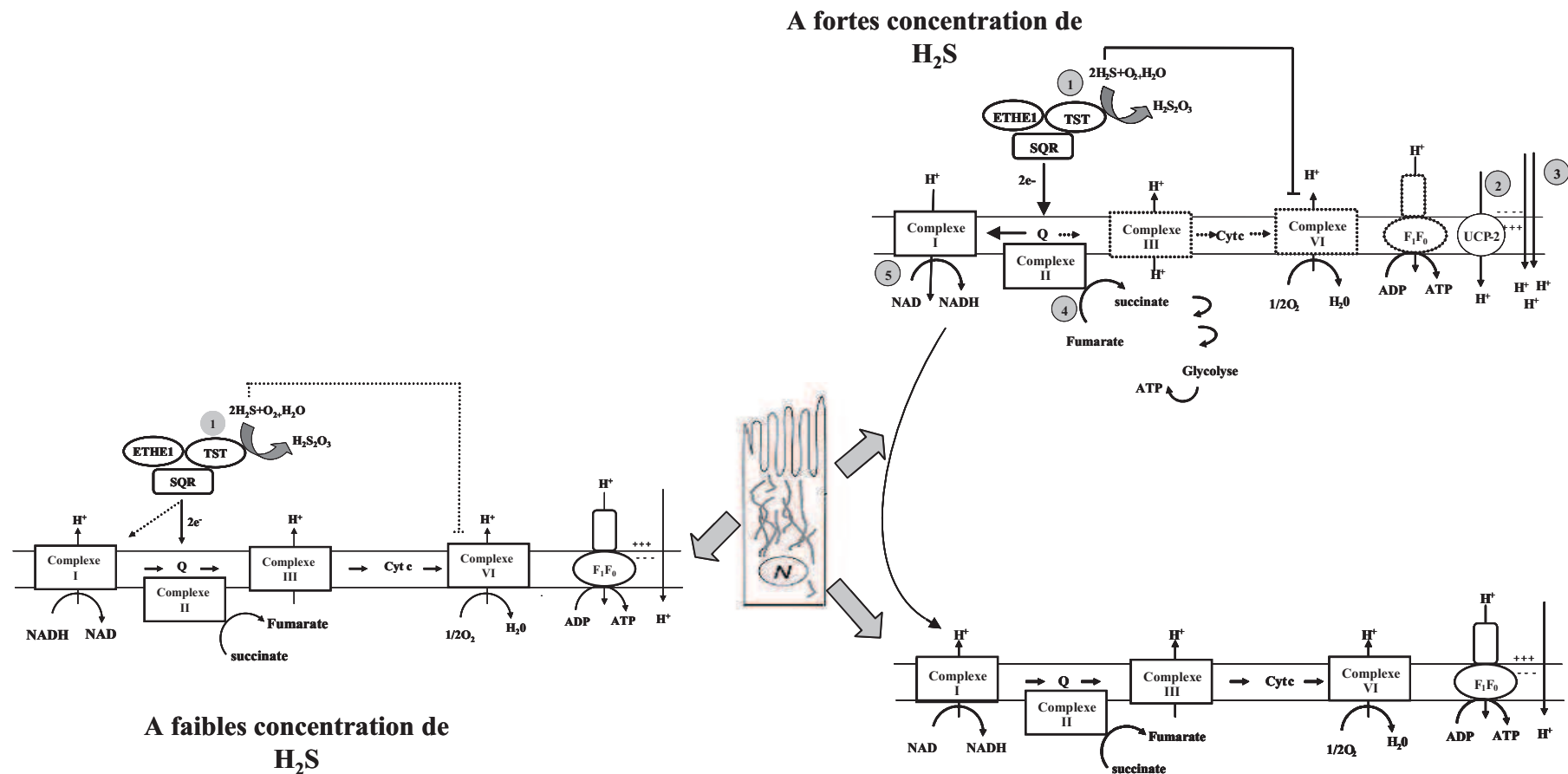


Figure 35 : Schéma récapitulatif de l'oxydation mitochondriale de H₂S (A) et des mécanismes d'adaptation mis en place dans les cellules coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} en présence de fortes concentrations de H₂S (B)

(1) : Oxydation de H₂S par les enzymes de la « sulfide oxidation unit ». (2) : Réduction de NAD⁺ en NaDH et injection des protons après vers la matrice mitochondriale. (3) : Augmentation du découplage mitochondrial. (4) : Réversion du complexe II et formation de succinate à partir de malate. (5) : Augmentation de la glycolyse. (6) : Augmentation de l'expression de la protéine de découplage UCP2.

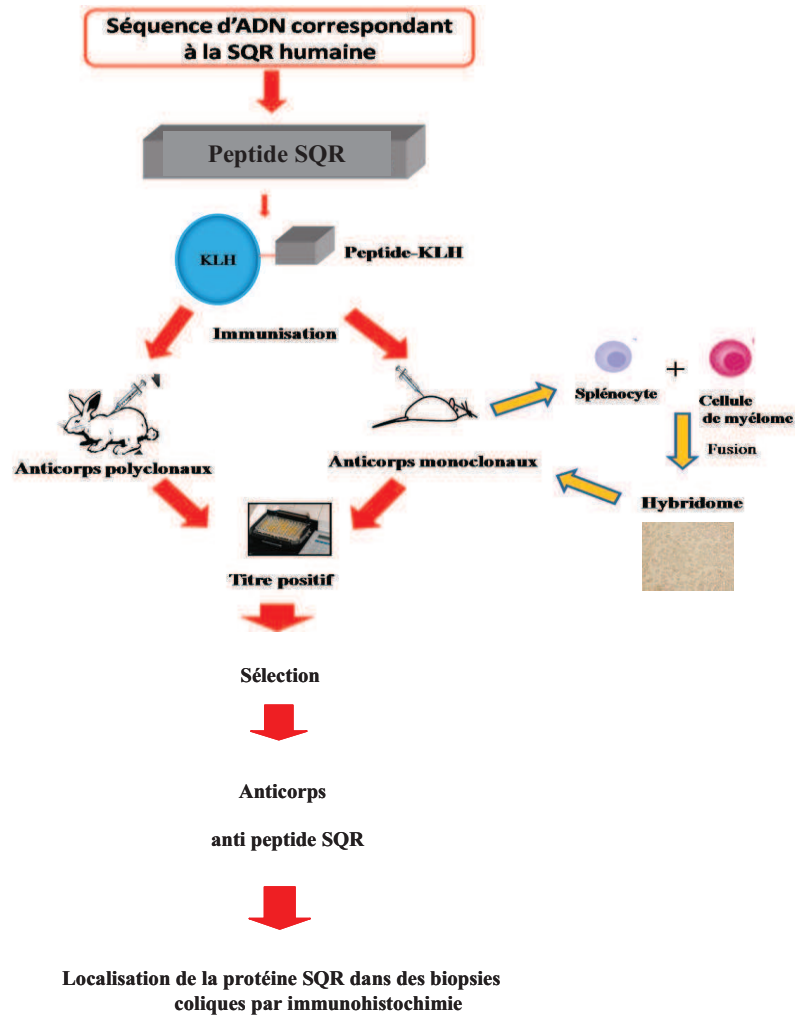


Figure 36 : Schéma récapitulatif des étapes de production des anticorps polyclonaux et monoclonaux anti peptide SQR

RESUME

Le sulfure d'hydrogène (H₂S) est un métabolite bactérien produit notamment par les bactéries sulfato-réductrices du côlon à partir des acides aminés soufrés, des sulfates/sulfites alimentaires et des sulfomucines. A fortes concentrations, le H₂S est un gaz toxique, de par sa capacité à inhiber la cytochrome c oxydase, et par conséquent, la respiration mitochondriale. A l'inverse, notre travail montre qu'à faibles concentrations, le H₂S induit une énergisation mitochondriale des cellules épithéliales coliques humaines HT-29 Glc^{-/+} lui conférant aussi un rôle de substrat minéral énergétique. Dans ce travail, nous avons déterminé les concentrations de H₂S permettant l'oxydation/détoxication de H₂S par les cellules HT-29 Glc^{-/+} et celles provoquant une inhibition de la consommation d'oxygène. L'oxydation de H₂S nécessite la coopération entre la « *sulfide oxidation unit* » et la chaîne respiratoire. La capacité des cellules HT-29 Glc^{-/+} à oxyder le H₂S est associée à la présence des transcrits codant les enzymes constituant la « *sulfide oxidation unit* » : la *Sulfide Quinone Reductase* (SQR), la sulfure dioxygénase ou *Ethylmalonic encephalopathy 1* (ETHE1) et la *thiosulfate sulfur transferase* (TST). Nous avons démontré la priorité de l'oxydation de H₂S sur les substrats carbonés. En effet, nos résultats suggèrent que les électrons venant de la SQR sont transférés au pool d'ubiquinone aux dépens de ceux venant du complexe I. Nos résultats démontrent que la SQR joue un rôle déterminant pour l'oxydation de H₂S. De plus, la détoxication de H₂S par les cellules HT-29 Glc^{-/+} augmente au cours de la différenciation spontanée ou induite par un traitement au butyrate. L'augmentation de la détoxication de H₂S au cours de la différenciation est associée à une augmentation de la réserve respiratoire soulignant l'importance de la chaîne respiratoire comme composante de la fonction de détoxication de H₂S. En situation d'inhibition de la cytochrome c oxydase, la grande capacité des cellules coliques humaines à détoxiquer le H₂S pourrait être en partie due à la présence d'un transfert réverse des électrons issus de l'oxydation de H₂S de la SQR vers le complexe I. Outre le butyrate, le zinc un autre composé de la lumière colique, exerce un effet protecteur contre la toxicité cellulaire de H₂S. Enfin, notre travail a mis en évidence une diminution de l'expression d'un gène codant pour une enzyme de la « *sulfide oxidation unit* » (la TST) dans le rectum comparée à différents segments du côlon, ce qui pourrait correspondre à des capacités de détoxication de H₂S différente en fonctions des segments du gros intestin humain.

Mots clés : H₂S, oxydation, cellules HT-29 Glc^{-/+}, « *sulfide oxidation unit* », mitochondrie