

Sur la signification évolutive de la synthèse de l'urée, de l'acide urique et de la guanine.

E. Schoffeniels

Laboratoire de biochimie générale et comparée
Université de Liège, place Delcour 17, B-4020 Liège, Belgique

Résumé : La synthèse de l'urée est une réponse évolutive au passage de la vie aquatique à la vie aérienne. On peut alors proposer raisonnablement que l'utilisation de l'urée comme effecteur osmotique chez les Elasmobranches est une adaptation secondaire dont la signification au plan énergétique est discutée. La situation est comparée à celle des Arthropodes, et plus particulièrement à celle des Crustacés chez qui les acides aminés sont les effecteurs osmotiques les plus largement répandus. En effet, il faut 4 M d'ATP pour synthétiser 1 M d'urée, alors qu'il faut en moyenne 30 M d'ATP pour synthétiser 1 M d'acide aminé.

Abstract : Urea synthesis is the evolutionary response to the passage of aquatic to terrestrial life. It is therefore reasonable to assume that urea as osmotic effector in Elasmobranch fishes is a secondary adaptation the meaning of which from the standpoint of energy metabolism is discussed. This situation is compared to that of the Arthropods and more specifically to that of Crustacea where amino acids are osmotic effectors quantitatively the most important. Indeed 4M ATP are required to synthesize 1M of urea, while a mean of 30 ATP are necessary for the synthesis of 1M of amino acids.

INTRODUCTION

Cet exposé va me permettre d'insister une fois de plus sur le déterminisme physico-chimique qui gère les systèmes biologiques, et de rappeler de nouveau, que s'il y a finalité, cela ne peut être que celle du deuxième principe de la thermodynamique.

Je voudrais aussi dans le contexte de l'anthropomorphisme, qui sévit avec une désolante et répétitive monotonie, rappeler que le concept de déchet est bien mal à propos lorsqu'il s'agit de parler des produits terminaux du métabolisme de l'azote.

Classiquement, on attribue au rein une "fonction épuratrice" dont le "but" est la "réécupération" de métabolites utiles à l'organisme (par exemple, le glucose et les acides aminés) et "l'élimination" de nombreux produits de déchet dont l'urée serait le plus important. Il s'agit d'une vue anthropomorphe dénuée de tout fondement scientifique et dont le caractère finaliste s'accorde mal avec les apports les plus récents de la biochimie comparée. Remarquons en passant que l'appellation de déchets implique en soi un jugement moral puisqu'elle est associée à une notion de bien et de mal dont la science n'a que faire. Comme je l'ai signalé à maintes reprises, les systèmes vivants sont des systèmes ouverts et leur structuration ne peut être maintenue que grâce à un flux continu de matière et d'énergie qui les traverse. Ce qui sort d'un organisme déterminé est utilisé comme source d'énergie par d'autres organismes appartenant au même écosystème. Ce qui est donc "déchet" pour un organisme est source d'énergie ou de matériau clé pour un autre organisme. Cette notion, bien établie par

l'étude des grands cycles de la biosphère est négligée par la plupart des physiologistes classiques qui ont tendance à isoler un organisme de son contexte écologique pour mieux l'étudier. Le cas des produits terminaux du métabolisme de l'azote est un exemple bien à propos. Avant d'analyser plus en détail la situation, il est certainement utile de rappeler que les principaux produits terminaux du métabolisme de l'azote, sont chez les animaux, l'acide urique, l'allantoïne et l'acide allantoïque qui proviennent des bases puriques, l'urée résultant soit de l'activité du cycle de l'ornithine soit du catabolisme de l'acide urique et enfin, l'ammoniaque qui trouve son origine dans l'urée, la désamidation des amides (glutamine et asparagine) ou dans la déshydratation de la sérine.

Envisageons les différentes hypothèses proposées pour rendre compte de cette situation.

Hypothèse de Needham et Baldwin : corrélation entre nature chimique des produits terminaux du métabolisme de l'azote et écologie.

L'opinion, qui est généralement admise, est celle proposée par Needham et Baldwin, selon qui l'ammoniaque étant毒ique, seules les espèces disposant d'une quantité d'eau suffisante pour l'excréter, conduiront jusqu'à ce niveau le catabolisme des dérivés azotés. L'exemple classiquement choisi est celui des Batraciens anoures qui, au cours de leur développement, excrètent d'abord de l'ammoniaque, lorsqu'ils sont aquatiques (têtards) puis de l'urée lorsqu'ils passent au mode de vie terrestre (voir par exemple Florkin & Schoffeniels, 1969). Depuis les travaux de Needham et de Baldwin, on a tendance à établir une corrélation entre la nature chimique de ces produits terminaux du métabolisme de l'azote, les conditions écologiques et les exigences de l'osmorégulation. Si cette vue, comme le démontrent les travaux de Florkin, est correcte sur le plan général, il faut certainement revoir et modifier les postulats de base sur lesquels elle s'est développée. Deux idées maîtresses sont à l'origine de cette conception :

- la toxicité de l'ammoniaque ;
- la disponibilité en eau.

Hypothèse fondée sur l'économie de l'eau et le rôle de l'urée comme substituant de l'ion Na (Schoffeniels, 1977).

L'urée est un effecteur osmotique chez les Elasmobranches. Il en va de même chez les Batraciens, les Reptiles et les Mammifères. Plusieurs exemples illustrent cette proposition : la réponse des Mammifères à la déshydratation qu'elle soit primaire ou secondaire où l'urée intervient comme substituant de l'ion de sodium, en est un.

Les Reptiles en hibernation et les Batraciens soumis à un choc osmotique ou à une déshydratation en atmosphère sèche présentent eux aussi un accroissement de la teneur du sang en urée. Dans tous les cas, il s'agit d'un problème d'homéostasie du pH et de conservation de l'eau qui ne peut être résolu par l'utilisation du sodium (Schoffeniels, 1966).

Ainsi donc la nature du produit d'excrétion azoté, s'il est bien en rapport avec l'économie de l'eau, l'est dans un sens un peu différent de celui proposé par Baldwin et Needham puisque :

- a) l'excrétion de NH_4^+ par les animaux aquatiques est en rapport avec l'ionorégulation, notamment dans le cadre des échanges $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ (Maetz & Romeu, 1964) ;

b) la synthèse d'urée est en rapport avec la réabsorption d'eau au niveau du rein, notamment en cas de déficit ou d'excès de Na^+ . En outre, l'urée est un effecteur osmotique chez tous les Vertébrés ;

c) la synthèse d'acide urique chez les Insectes, les Reptiles et les Oiseaux, s'accorde bien, à première vue, avec l'idée d'un régime pauvre en eau. Mais alors, comment expliquer la présence d'urée chez *X. laevis*, une espèce aquatique et l'excrétion de NH_4^+ chez *R. temporaria* et *R. esculenta*, deux espèces semi-terrestres ? (Dejours *et al.*, 1989 b).

La réponse doit être cherchée dans l'ensemble complexe des adaptations en rapport avec l'homéostasie du pH, la régulation osmotique des liquides extracellulaires et celle du volume cellulaire. Il s'agit :

- a) d'un problème d'ionorégulation faisant intervenir des structures spécialisées comme la glande à sel des oiseaux ;
- b) d'un problème de réabsorption d'eau au niveau du rein ;
- c) d'un contrôle de la concentration des effecteurs osmotiques de nature organique (acides aminés et urée notamment) ;
- d) du maintien de l'équilibre acide/base.

En outre, la structure anatomique des organes excréteurs est un paramètre à ne pas négliger.

Ainsi donc, selon les exigences du milieu, l'adaptation ou l'évolution, c'est selon, portera sur un développement plus ou moins poussé de l'une ou l'autre branche des voies du métabolisme de l'azote. Le ou les produits obtenus seront alors non seulement caractéristiques de l'espèce ou du groupe, mais aussi définiront le type de relation établi avec l'environnement.

Dans la mesure où la synthèse d'un produit azoté, l'urée par exemple, est une caractéristique biochimique d'un type particulier de différentiation cellulaire, en l'occurrence l'hépatocyte ou certaines cellules de l'épithélium rénal (Schoffeniels, 1966 ; Saha & Ratha, 1987, 1989 ; Levillain *et al.*, 1989), nous avons ici l'illustration d'un principe fondamental de l'évolution biochimique, à savoir l'extension latérale ou terminale d'un voie métabolique existente avec insertion du produit dans un système complexe de régulation, actif à un niveau d'organisation supramoléculaire.

3) L'hypothèse de l'homéostasie du pH et de la pompe à protons (Atkinson & Camien, 1982).

Le catabolisme des protéines libère l'anion HCO_3^- dont l'élimination via les poumons, les reins ou le tube digestif n'est pas suffisante pour compenser sa production. Chez les animaux à respiration aérienne, le problème de l'alcalose se pose. Il est rencontré par l'existence de voies biosynthétiques qui utilisent l'acide faible qu'est NH_4^+ . L'utilisation de NH_3 dans ces séquences libère le proton H^+ qui peut alors réagir avec HCO_3^- .

Selon l'espèce, la voie biosynthétique varie. Chez les mammifères c'est l'uréogenèse qui est en jeu et le contrôle de cette voie en réponse à des variations de pH est un aspect important des interactions entre les systèmes de régulation qui concourent à l'homéostasie du pH chez les mammifères.

L'oxydation complète des lipides et des glucides fournit H_2O et CO_2 . Par contre, les substrats contenant un ion carboxylate produisent une quantité de HCO_3^- équimolaire à celle de l'ion carboxylate.

Chez les carnivores et les omnivores, l'ion carboxylate provient des acides aminés, eux-mêmes dérivés des protéines.

L'hydrolyse des protéines fournit des acides aminés dipolaires sans production ou fixation nettes de protons, donc sans effet sur le pouvoir tampon. L'oxydation de l'AA par contre aboutit à l'utilisation d'un proton ce qui amène une production stoechiométrique de HCO_3^- . Ainsi, la production nette de CO_2 est en rapport avec le nombre des autres C de l'AA.

Les mêmes quantités de NH_4^+ et de HCO_3^- sont produites si l'AA est transformé en lipides ou en glucides. Dans le cas des acides aminés soufrés (Cys, Met), le soufre est transformé en H_2SO_4 mais en quantité telle que les protons libérés ne pourraient titrer qu'environ 7 % du total de HCO_3^- . Il est donc évident que le catabolisme des protéines libère d'importantes quantités nettes de HCO_3^- avec pour conséquence un problème d'alcalose. Il faut donc éliminer CO_2 , NH_4^+ et HCO_3^- : c'est un problème commun à tous les hétérotrophes.

Dans le cas d'un animal aquatique, l'excration se fait au niveau de la branchie.

Chez les animaux à respiration aérienne, le problème est tout différent.

CO_2 peut être éliminé au niveau du poumon, mais les ions ne le peuvent. Il faut donc un système permettant d'éliminer HCO_3^- d'une façon contrôlée pour stabiliser le pH : c'est une des contraintes évolutives des animaux à respiration aérienne.

Une partie de HCO_3^- peut être éliminée dans les fèces et dans l'urine, mais c'est une quantité bien faible.

La seule possibilité est donc la protonation avec élimination de CO_2 ou la conversion en un composé non chargé. Il n'y a pas d'acide suffisamment fort et en quantité appréciable dans la cellule que pour protoner HCO_3^- .

NH_4^+ possède un proton dissociable et est produit à la même vitesse que HCO_3^- . C'est la seule source de protons envisageable pour se débarrasser de HCO_3^- . Seulement NH_4^+ est un acide trop faible ($pK = 9.25$) par un facteur de 1000 pour pouvoir protoner HCO_3^- ($pK = 6.1$).

Ainsi l'adaptation à la respiration aérienne implique la conversion de NH_4^+ en un composé dont la fonction azotée est fortement acide et peut alors fournir un proton au système tampon. C'est là la signification évolutive de la synthèse de l'urée, de l'acide urique et de la guanine.

En conclusion, la synthèse de l'urée a pour conséquence d'éliminer :

a) NH_4^+ qui, en équilibre avec NH_3 , pourrait s'accumuler à un niveau toxique (par exemple en dépolarisant les membranes cellulaires puisque NH_4^+ est un bon substituant de K^+), ou encore par la toxicité propre de NH_3 (Dejours, 1989 a).

b) HCO_3^- sous forme de CO_2 puisque le proton de NH_4^+ est amené à un niveau énergétique compatible avec la titration de HCO_3^- . Le cycle de l'urée est donc une pompe à pro-

tons dont l'énergie est fournie par l'ATP. Le même raisonnement s'applique à la synthèse de l'acide urique et de la guanine.

CONCLUSIONS

Le métabolisme des protéines libère plus de HCO_3^- que la somme de tous les acides métaboliques disponibles.

HCO_3^- ne peut être éliminé comme tel quantitativement via les poumons, les reins et l'intestin.

La respiration aérienne n'est donc possible qu'en présence d'un système qui, utilisant de l'énergie, incorpore l'ion NH_4^+ dans un composé dont chaque fonction azotée peut libérer un proton à un potentiel énergétique adéquat pour titrer HCO_3^- .

La voie adoptée est en rapport avec l'écologie et l'éthologie de l'animal.

On peut donc exposer la situation en résumant de façon critique et contradictoire les principaux points de l'argumentation :

1) L'opinion selon laquelle les protéines fournissent des métabolites acides repose sur l'observation d'une production de H_2SO_4 à partir d'acides aminés soufrés. Mais comme indiqué plus haut cette quantité d'acide ne peut titrer que quelques pour cent de HCO_3^- produit.

La considération des équations concernant l'oxydation d'un acide aminé montre qu'il y a une production importante de HCO_3^- donc d'un facteur d'alcalose.

2) Quant au rôle de NH_4^+ urinaire comme méthode d'excrétion d'un proton, cette vue est en rapport avec le fait que NH_4^+ est l'acide conjugué du système $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$. Ce serait correct si NH_3 était injecté dans le système. Mais comme NH_4^+ provient du catabolisme des acides aminés dipolaires issus de l'hydrolyse des protéines sans consommation ou production nette de protons, il s'ensuit que l'azote est déjà protoné.

Du point de vue chimique, l'acide aminé peut être considéré comme un ion ammonium substitué par un alkyl. Le proton est retenu au moment de l'hydrolyse de la liaison peptidique C-N. En conséquence N_2 des protéines est libéré sous forme de NH_4^+ et s'il apparaît dans l'urine, il ne peut avoir accepté un autre H^+ , donc ne peut contrôler le bilan acido-basique. Le catabolisme des protéines ne correspond donc pas à une fourniture nette de protons qui devraient être excrétés pour maintenir l'homéostasie du pH. Et comme l'excrétion de NH_4^+ ne représente pas une excréption de protons, le rôle du rein dans l'équilibre acide-base est impossible.

3) Le contrôle de l'utilisation de HCO_3^- par le foie est en rapport avec l'élimination de CO_2 par le poumon. La réponse de ces mécanismes à une variation de pH se fait via une compensation métabolique, c'est-à-dire un ajustement de la concentration de HCO_3^- par rapport à la concentration normale s'il y a un écart de la valeur de CO_2 à partir de sa concentration normale qui est 1.2 mM et via une compensation respiratoire, c'est-à-dire un ajustement de la concentration en CO_2 si la concentration normale en HCO_3^- s'écarte de la valeur normale soit 24 mM.

4) On considère généralement que l'uréogenèse est le moyen d'éliminer NH_4^+ . Certes, l'urée déplace NH_4^+ . Il faut toutefois remarquer que l'excrétion de 1 M de HCO_3^- dans l'urine par 24 h est impossible. Cette limite n'existe pas dans le cas de NH_4^+ . A un pH urinaire de 4.4 la concentration de NH_4^+ dans l'urine serait 1 000 fois supérieure à celle du sang à l'équilibre. Si 1 M de NH_4^+ était excrétée par jour dans 1 L d'urine, la concentration de NH_4^+ dans le sang serait de 1 mM. Donc un gradient de concentration relativement faible pourrait être maintenu par un phénomène de transport actif maintenant ainsi la concentration sanguine à une concentration tolérable. Il semble donc en conclusion que le besoin d'éliminer NH_4^+ ne représente pas la pression évolutive ayant engendré la synthèse de l'urée.

En conclusion, on doit remplacer les vues classiques énumérées de 1 à 4 ci-dessus par les propositions suivantes :

- a) le catabolisme des protéines ne produit pas un acide,
- b) la synthèse de l'urée consomme HCO_3^- ,
- c) l'excrétion de NH_4^+ n'est pas une excréition d'acide,
- d) NH_4^+ n'est pas l'équivalent d'un acide fort.

En conséquence, on peut dire que la vitesse de synthèse de l'urée est principalement une réponse à la nécessité d'éliminer HCO_3^- . Il y a une analogie entre ce type de contrôle et celui de la respiration. La ventilation a pour résultat d'éliminer du CO_2 et d'absorber O_2 . C'est la concentration en CO_2 qui contrôle la fréquence, ce qui est tout à fait logique puisqu'une petite variation de CO_2 affecterait le pH avec des conséquences plus importantes qu'une petite variation de la concentration en O_2 . De même de petits changements en HCO_3^- seraient plus toxiques que de petits changements en NH_4^+ .

Dans la mesure où l'homéostasie du pH représente une nécessité absolue pour le maintien d'une activité optimum du système biologique, cette nécessité devient une contrainte évolutive aboutissant, chez les animaux à respiration aérienne, à un contrôle strict des concentrations en CO_2 et en HCO_3^- par des mécanismes eux-mêmes contrôlés par le pH. Ces mécanismes ont comme corollaire l'oxygénéation du sang et l'élimination de NH_4^+ . Mais ces dernières semblent intervenir en second lieu dans cette hiérarchie où en dernière analyse, c'est l'homéostasie du pH qui est prioritaire.

Le cas des Elasmobranches.

Chez les Elasmobranches, l'urée est un effecteur osmotique qui intervient pour environ 50 pour cent de la pression osmotique totale. En terme de coût de la synthèse de cette molécule, il est clair qu'elle est relativement bon marché puisqu'elle nécessite 4 ATP seulement. En outre, l'urée doit également intervenir comme substituant des ions de sodium et gère ainsi l'économie de l'eau d'une façon vraisemblablement proche de celle rencontrée chez les Mammifères en déshydratation. Les aspects énergétiques de la synthèse de l'urée expliquent peut-être l'utilisation de cette molécule comme effecteur osmotique.

Le cas des Arthropodes.

Car chez les Arthropodes, ce sont les acides aminés qui sont les effecteurs osmotiques les plus largement représentés. Or le "prix" en ATP de la synthèse des acides aminés est

élevé puisque, il varie de 12 à 78 moles d'ATP par mole d'acide aminé (12 ATP pour Gly, 30 pour Glu, 20 pour Ala etc.). Ce sont donc des effecteurs osmotiques particulièrement chers, du point de vue du métabolisme énergétique de la cellule. Toutefois, si on prend en considération le fait que chez les Arthropodes l'acide a-cétoglutarique remplace l'oxygène comme accepteur d'équivalents de réduction, en milieu concentré (Schoffeniels, 1976), et que par ailleurs l'énergie mise en réserve sous forme d'acides aminés et notamment de Pro est restituée lors du passage en milieu dilué la signification évolutive de la situation semble s'éclairer : l'oxydation de la proline fournit en effet 39 ATP et lors du passage en milieu dilué, les acides aminés interviennent dans la synthèse de l'hémocyanine (Boone & Schoffeniels, 1979). Or, en milieu dilué le métabolisme de l'animal est orienté dans le sens de l'aérobiose avec production accrue d'ATP nécessaire aux transports ioniques particulièrement exigeants en milieu dilué. L'accroissement de la synthèse d'hémocyanine, le porteur d'oxygène caractéristique de ce groupe est donc favorable au caractère aérobiose du métabolisme. Ainsi donc la valeur de survie de l'utilisation soit de l'urée, soit des acides aminés paraît s'éclairer : d'un côté, synthèse d'un effecteur nécessitant peu d'ATP, d'autre part substitution de l'oxygène par un acide a-cétone et mise en réserve de l'énergie sous forme d'acides aminés, réserve qui sera mise à profit lors du passage en milieu dilué. En outre, la synthèse des acides aminés utilise NH_3 de NH_4^+ via la déshydrogénase du glutamate. Donc un proton est libéré qui peut alors intervenir dans l'homéostasie du pH. La question est maintenant de savoir si la contrainte dominante est celle de l'homéostasie du pH ou si au contraire, c'est l'acide cétonique, en tant que substituant de O_2 qui est primordiale.

Enfin, on peut se poser la question de savoir quelle est l'importance relative de l'urée et des acides aminés dans la structuration de l'eau et dans le maintien d'un milieu favorable à l'expression des propriétés des protéines.

Ainsi donc, il apparaît que la synthèse de l'urée est une réponse évolutive du passage de la vie aquatique à la vie aérienne, permettant de contrôler l'alcalose qui découle nécessairement du catabolisme des protéines. L'utilisation de l'urée comme effecteur osmotique semble être une adaptation secondaire à l'apparition de sa synthèse.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ATKINSON, D.E. & M.N. CARMEN, 1982. The role of urea synthesis in the removal of metabolic bicarbonate and the regulation of blood pH. *Current Topics in Cell. Regul.* 21 : 261-302.
- BOONE, W.R. & E. SCHOFFENIELS, 1979. Hemocyanin synthesis during hypoosmotic stress in the shore crab *Carcinus moenas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 63 B : 207-214.
- DEJOURS, P., J. ARMAND & H. BEEKENKAMP, 1989 a. Produits terminaux du catabolisme des corps organiques azotés chez deux amphibiens *Xenopus laevis* et *Pleurodeles waltli* placés dans l'eau ou dans l'air. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 308 : 15-20.
- DEJOURS, P., J. ARMAND & H. BEEKENKAMP, 1989 b. C.R. Uréogenèse chez deux amphibiens, la salamandre *Pleurodeles waltli* et l'anoure *Xenopus laevis* vivant dans une eau contenant du chlorure d'ammonium. *Acad. Sci. Paris*, 308 : 245-250.
- FLORKIN, M. & E. SCHOFFENIELS, 1969. Molecular Approaches to Ecology. Academic Press, New York.

- LEVILLAIN, O., A. HUS-CITHAREL, F. MOREL & L. BANKIR, 1989. Production of urea from arginine in pars recta and collecting duct of the rat kidney. *In Renal Physiol. Biochem.*, 12 : 302-312.
- MAETZ, J. & G.F. ROMEU, 1964. The mechanism of sodium and chloride uptake by the gills of fresh-water fish, *Carassius auratus*. II. Evidence for NH_4^+ / Na^+ and HCO_3^- / Cl^- exchanges. *J. Gen. Physiol.*, 47 : 1209-1227.
- MEIJER, A.J. 1979. Regulation of carbomoyl - phosphate synthase (ammonia in liver in relation to urea cycle activity). *T.I.B.S.*, 4 : 83-86.
- SAHA, N. & B.K. RATHA, 1987. Active ureogenesis in a freshwater air-breathing teleost *Heteropneustes fossilis*. *J. Exp. Zool.*, 241 : 137-141.
- SAHA, N. & B.K. RATHA, 1989. Comparative study of ureogenesis in freshwater, air-breathing teleost. *J. Exp.* 252 : 1-8.
- SCHOFFENIELS, E. & R.R. TERCAFS, 1966. L'osmorégulation chez les batraciens. *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 96 : 23-39.
- SCHOFFENIELS, E. 1977. *Physiologie des Régulations*. Masson, Paris.