

MÉTABOLISME DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

I. DÉGRADATION DE L'ARGININE CHEZ LES INVERTÉBRÉS MARINS

par

NGUYEN-VAN THOAI, JEAN ROCHE ET YVONNE ROBIN

Laboratoire maritime du Collège de France, Concarneau, Finistère, et Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France)

Les types de dégradation de l'arginine, très divers chez les bactéries—hydrolyse en ornithine et urée¹, en citrulline et ammoniac³, en ornithine et acide carbonique^{10, 14}; décarboxylation en agmatine⁸; oxydation en acide cétonique isologue¹⁷—sont moins nombreux et plus exclusifs chez les animaux. La principale voie qu'emprunte le métabolisme de l'arginine chez la plupart des Vertébrés est l'hydrolyse de celle-ci en ornithine et urée; la formation d'agmatine ne semble pas avoir lieu parallèlement⁴ et l'oxydation de l'acide aminé, manifeste chez les Reptiles²⁰ et les Oiseaux⁵, est faible ou nulle dans les autres classes¹¹. La destinée de l'arginine dans les tissus des Invertébrés a été peu étudiée, l'intérêt des chercheurs s'étant porté vers le rôle de phosphagène qu'y joue la phosphoarginine. Or, chez les animaux non uréotéliques⁶, l'excrétion azotée à forte prédominance ammoniacale va souvent de pair avec l'absence d'arginase, comme l'a vérifié BALDWIN dans diverses espèces marines². Aussi peut-on se demander quelles voies générales empruntent de nombreux Invertébrés pour métaboliser l'arginine. L'agmatine paraissant n'exister que chez un petit nombre de ces animaux⁹, la décarboxylation de l'acide δ -guanido- α -aminovalériannique ne saurait être l'une de celles-ci. Par ailleurs, la biogénèse et la répartition des autres dérivés guanidiques identifiés chez les Invertébrés (arcaïne, astérubine, glycoeyamine, méthylguanidine, octopine) sont encore trop mal connues pour qu'une relation entre leur métabolisme et celui de l'arginine ait pu être mise en évidence.

L'étude de la dégradation de cet acide aminé chez les Invertébrés est susceptible de présenter un double intérêt: caractériser des groupes zoologiques ou des espèces au moyen d'un type métabolique et définir l'origine des dérivés guanidiques accompagnant l'arginine. Le but de ce mémoire est d'exposer les recherches que nous avons poursuivies sur l'hydrolyse et l'oxydation de celle-ci dans diverses classes d'Invertébrés*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. *Hydrolyse et décarboxylation de l'arginine.* L'hydrolyse enzymatique a été suivie par le dosage colorimétrique de l'arginine au moyen de la réaction à l' α -naphtol dite de SAKAGUCHI⁷. Les préparations douées d'activité arginasique ont été obtenues par

* La réaction de transguanidylation conduisant à la synthèse de la glycoeyamine ne paraît pas avoir lieu chez les animaux étudiés (travaux non publiés).

broyage, en présence de deux volumes d'eau glacée, d'hépatopancréas (Mollusques et Crustacés), de muscle ou de tractus digestif (Vers, oursins), ou, exceptionnellement, d'organismes totaux (ophiures); la fraction acellulaire, séparée par centrifugation, a seule été utilisée. Les mélanges réactionnels, de pH = 9.5, présentaient, dans un volume total de 10 ml, la composition suivante: solution enzymatique 1 ml, pyrophosphate de sodium 0.1 M, L-arginine 3.0 mg. Ils ont été placés à 37° pendant 6 heures en même temps qu'un témoin sans arginine. Le dosage de celle-ci a été opéré après arrêt de l'action enzymatique et déprotéinisation par addition d'1.5 ml SO_4H_2 0.6 N et de 1 ml de solution à 10% de tungstate de sodium.

La décarboxylation de l'arginine a été étudiée dans les produits de l'extraction par trois volumes de solution 0.5 M de chlorure de potassium glacé, d'organes (glandes salivaires de seiche; hépatopancréas de seiche, de moule, de crabe; tractus digestif d'oursin, de siponcle) ou d'organismes entiers (ophiures et arénicoles). Les extraits ont été utilisés aussitôt préparés ou après dialyse de 2 heures à +10°, destinée à éliminer, le cas échéant, un excès de dérivés guanidiques naturels. La réaction de décarboxylation a été suivie dans l'appareil de Warburg (0.3 ml de solution neutre d'arginine 0.1 M + 1 ml d'extrait enzymatique + 0.3 ml de solution tampon aux phosphates 0.2 M de pH = 6.2 + eau distillée, q.s.p. 3 ml). Quoique la dissociation du coenzyme soit peu probable dans les conditions de dialyse adoptées¹⁸, il a été ajouté 5 μg de phosphopyridoxine et 24 μg de magnésium (SO_4Mg) dans les essais où l'extrait employé avait été dialysé. On a opéré sous gazéification d'azote, afin d'éviter une interférence avec des processus oxydatifs. Les résultats obtenus ont été rassemblés dans le Tableau I.

TABLEAU I

HYDROLYSE ET DÉCARBOXYLATION DE LA L-ARGININE PAR DES EXTRAITS D'INVERTÉBRÉS MARINS
(μg D'ARGININE DISPARUS, PAR HEURE ET PAR mg N PROTÉIQUE
EN 6 HEURES D'HYDROLYSE ENZYMATIQUE ET μl DE CO_2 DÉGAGÉ EN 30 MINUTES)

Espèces animales	Organe	μg d'arginine hydrolysée	μl de CO_2 dégagé
Echinodermes			
<i>Sphaerechinus granularis</i> L.	tractus digestif	o*	o*
<i>Paracentrotus lividus</i> Lmk.	tractus digestif	o*	o
<i>Ophiothrix fragilis</i> L.	organismes entiers	o*	o
Annélide			
<i>Arenicola marina</i> L.	organismes entiers	8960**	o
Géphyrien			
<i>Sipunculus nudus</i> L.	tractus digestif	900**	—
Crustacés			
<i>Maia squinado</i> Bisso	hépatopancréas	traces	
		o*	o
<i>Cancer pagurus</i> L.	hépatopancréas	25**—o	13.5**—o
Mollusques			
<i>Mytilus edulis</i> L.	hépatopancréas	o*	o*
<i>Sepia officinalis</i> L.	hépatopancréas	450**—o	
	glandes salivaires		43.2**—o
<i>Octopus vulgaris</i> L.	hépatopancréas	400**—18	—

Les signes (*) désignent de nombreux résultats nuls et (**) les chiffres les plus forts obtenus.

Les Echinodermes étudiés ne renferment pas d'enzyme hydrolysant ou décarboxylant l'arginine. Les tissus des Crustacés examinés présentent, de manière quasi

accidentelle, de faibles activités hydrolysante ou décarboxylante et il en est de même chez quelques Mollusques, dont les glandes salivaires paraissent les organes les plus riches en décarboxylase. Toutefois, la répartition de cet enzyme est difficile à préciser en raison de sa faible activité et, semble-t-il, des importantes variations que présente son taux. L'arginase est, par contre, assez abondante dans l'hépatopancréas de la plupart des poulpes et des seiches, mais celui de certains de ces animaux en est pratiquement dépourvu. L'arénicole et divers Annélides sont toujours assez riches en arginase; l'activité arginasique du muscle et du tractus digestif du premier ver est comparable à celle du foie des Mammifères.

La dégradation hydrolytique de l'arginine n'ayant pas lieu chez de nombreux Invertébrés, il convenait de chercher à identifier dans leurs tissus les produits de la dégradation de cet acide aminé, afin d'en étudier le métabolisme. Nous nous y sommes attachés au moyen de l'analyse chromatographique sur papier des guanidines monosubstituées présentes dans les extraits tissulaires de ces animaux et, à titre de comparaison, dans ceux de quelques Vertébrés terrestres ou marins.

II. *Analyse chromatographique sur papier des guanidines monosubstituées présentes dans les tissus de Vertébrés et d'Invertébrés marins.* Les modalités d'analyse chromatographique sur papier des guanidines monosubstituées que nous avons adoptées ont été brièvement décrites dans une précédente publication¹⁰. Elles consistent en l'établissement de chromatogrammes (solvant: 73 p *n*-butanol, 10 p acide acétique, 17 p eau) sur du papier Whatman No. 1, imprégné ou non au préalable de soude 0.2 *N*, la révélation des taches étant opérée par la réaction dite de Sakaguchi, caractéristique des guanidines monosubstituées. Ce procédé s'est révélé, dans ce cas particulier, plus efficace que la chromatographie bidimensionnelle. Il a permis de repérer avec précision des corps non encore identifiés, en dehors de ceux déjà connus en tant que constituants d'Invertébrés (agmatine, arcaïne, arginine, glycocyamine, méthylguanidine, octopine). Nous avons appliqué cette technique à l'étude des extraits tissulaires de nombreux Invertébrés de divers groupes zoologiques et de quelques Vertébrés.

De nombreux contrôles d'extraction ont été opérés, par broyage des tissus à -10° en présence de trois volumes d'alcool à 80° , centrifugation, concentration sous vide à -10° et reprise par l'eau. Les solutions obtenues, pauvres en dérivés guanidiques, se prêtent néanmoins à l'analyse, car la réaction de Sakaguchi permet de révéler 1-2 μ g de ces produits (coloration rose pour la plupart de ceux-ci, violacée pour l'octopine et pour divers autres, non identifiés, dont l'étude est en cours). Dans presque tous les cas, il s'est révélé possible de réaliser correctement l'extraction en opérant sans précaution particulière, par broyage dans 3 parties d'alcool à 70° légèrement acidulé avec HCl. Après plusieurs évaporations au bain-marie et redissolution dans l'eau, les solutions ont été soumises à une première chromatographie, qui ne permet pas en général une caractérisation au moyen des R_F , en raison de la présence de sels. Les dérivés guanidiques repérés sur les chromatogrammes sont alors élués et soumis à de nouvelles chromatographies successives, jusqu'à ce que leur R_F puisse être défini de manière satisfaisante et comparé à celui de corps de référence. Les résultats obtenus ont été résumés dans le Tableau II.

Les extraits alcooliques de tissus de rat ou de cobaye (alcool à -10° , animaux sacrifiés au moment de l'expérience) ne renferment que des traces d'arginine à peine décelables (foie) associées, dans le rein, à des quantités très faibles de glycocyamine. Les divers tissus des poissons marins (Sélaciens et Téléostéens) sont notablement plus

TABLEAU II

R_F de guanidines monosubstituées observés au cours des analyses chromatographiques sur papier (butanol: 73 %, acide acétique: 10 %, eau: 17 %, papier Whatman n° 1) d'extraits tissulaires de Vertébrés (Mammifères, Poissons) et d'Invertébrés marins (Echinodermes, Crustacés, Mollusques, Vers).

Corps a , b , c : produits d'oxydation de l'arginine; a = acide δ -guanido- α -cétovalérianique; b = non identifié, éventuellement aldéhyde γ -guanidobutyrique; c = acide γ -guanidobutyrique.

Corps 1, 2, 3: guanidines non identifiées.

Espèces animales	Tissus	R _F des corps de référence et des guanidines trouvées											
		Octopine	Arginine	Agmatine	a	Glycocy-amine	Arcaine	b	Méthyl-guanidine	c	†	2	3
		0.03	0.07	0.13	0.18	0.21	0.24	0.45	0.50	0.54	0.12	0.21	0.63
Mammifères													
<i>Cavia cobaya</i> Pallas	muscle, foie			trace									
<i>Rattus rattus</i> (alb.)	rein		*			*							
Poissons Téléostéens													
<i>Mullus barbatus</i> L.	muscle		*					*					
Poissons Selaciens													
<i>Carcharias glaucus</i> L.	muscle		*					*					
<i>Leiodon aquila</i> L.	muscle, foie		*					*					
<i>Torpedo marmorata</i> Risso	foie		*					*					
Echinodermés													
<i>Ophiothrix fragilis</i> L.	entier		*		*	*		*		*			
<i>Paracentrotus lividus</i> Lk.	tractus digestif		*		*	*		*		*			
Crustacés													
<i>Cancer pagurus</i> L.	muscle		*	*	*			*		*			
<i>Carcinides moenas</i> Pennant	muscle	*	*	*	*			*		*			
<i>Maia squinado</i> Risso	muscle	*	*		*			*		*			
Mollusques													
<i>Mytilus edulis</i> L.	hépatopancréas		*		*			*		*			
<i>Pecten maximus</i> L.	hépatopancréas	*	*		*			*		*			
<i>Sepia officinalis</i> L.	hépatopancréas	*	*	*	*			*		*			
Vers													
Polychètes sédentaires													
<i>Arenicola marina</i> L.	muscle										*		
	tractus digestif		*								*		
<i>Lanicea conchilega</i> Pallas	entier		*								*	?	
<i>Myxicola infundibulum</i>													
Renier	entier		*								*		
<i>Sabellaria alveolata</i> L.	entier		*								*		
Polychètes errants													
<i>Eulalia viridis</i> Müller	entier		*									*	
<i>Halosydna gelatinosa</i> M. Sars	entier		*									*	
<i>Nereis diversicolor</i> Müller	entier		*									*	
Géphyriens													
<i>Phascolosoma elongatum</i>													
Keferstein	entier		*								*	*	*
<i>Sipunculus nudus</i> L.	entier		*								*	*	*
Némertiens													
<i>Lineus gesserensis</i> Müller	entier		*									*	

é † R_F sur papier imprégné à la soude ou en solvant pyridine-alcool isoamylique-acide acétique-eau, différent de celui de l'agmatine.

riches en arginine libre et on y trouve, en quantités plus grandes chez les premiers, de la méthylguanidine.

Les Echinodermes étudiés (oursins, ophiures) renferment de l'arginine, de la glyco-cyamine¹⁹ et trois corps — que nous désignerons provisoirement par les lettres *a*, *b*, *c*, — dont les R_F ne correspondent à ceux d'aucun des corps de référence déterminés dans les mêmes conditions. Les mêmes produits se retrouvent dans des extraits de Mollusques et de Crustacés, associés à l'arginine et, parfois, à l'octopine (*Pecten*, *Sepia*, *Carcinides*, *Maia*) et à l'agmatine (*Sepia*, *Cancer*, *Carcinides*). Les caractères des extraits de Vers sont tout autres. L'arginine, en général présente, parfois à des taux très faibles, n'y est accompagnée ni des corps *a*, *b*, *c*, ni, semble-t-il, des autres guanidines monosubstituées connues. On trouve, en revanche, chez des Annelides Polychètes sédentaires et chez des Géphyriens inermes, un dérivé guanidique inconnu (corps 1), associé, chez les derniers, à d'autres bases de la même série. L'une de celles-ci (corps 2) a été mise en évidence avec l'arginine chez des Polychètes errants et chez un Némertien (*Lineus gessereensis*).

L'analyse chromatographique a par ailleurs montré la répartition très restreinte de l'agmatine et, par là même, confirmé que la décarboxylation de l'arginine n'est pas un processus métabolique commun à de nombreux Invertébrés. On pouvait penser que diverses guanidines inconnues dériveraient de cet acide aminé par une autre voie que ses dégradations hydrolytiques ou décarboxylante; nous avons entrepris des recherches sur leur origine oxydative.

III. *Oxydation enzymatique de l'arginine*. Les caractères de la L-aminoacideoxydase de nombreux Invertébrés marins ayant été décrits ailleurs¹⁵, nous n'étudierons ici que la cinétique de son action et la nature des produits de celle-ci.

A. Oxydation de l'arginine aux pH = 4.1 et 6.2. — 28 g d'hépatopancréas de moule sont homogénéisés en présence de 50 ml d'eau et dialysés 12 heures à +1° sous agitation. On centrifuge à la fin de cette opération et l'on reprend par 50 ml d'eau la masse solide ainsi séparée, de manière à disposer d'une suspension renfermant l'enzyme. Les mélanges réactionnels sont constitués par: suspension enzymatique, 4 ml; solution de L-arginine à 20 mg par ml (pH = 6.0) 0.5 ml; solution tampon acétoacétique *M* de pH = 4.1 ou solution tampon de phosphates alcalins 0.12 *M* de pH = 6.2, 0.5 ml (pH des mélanges = 4.3 et 6.2). On constitue pour chaque pH une série de 6 tubes, dont le premier est immédiatement déprotéinisé et les 5 autres placés à 37° sous oxygène (incubation 15 min, 30 min, 1 heure, 3 heures et 6 heures). On les porte ensuite 5 minutes au bain-marie bouillant et leur filtrat est soumis à l'analyse chromatographique (butanol acétique). On dépose pour cela une microgoutte de chaque filtrat en bordure d'une feuille de papier Whatman N° 1 et une quantité plus grande du même liquide sur une ligne de plusieurs cm à côté de la première prise d'essai (volumes soigneusement mesurés). Après révélation des taches du chromatogramme de l'échantillon déposé sur la marge de la feuille, les bandes, non révélées, correspondant à chaque tache sont découpées et éluées à l'eau pendant 36 heures. Les éluats, portés à un volume connu, renferment divers dérivés guanidiques monosubstitués que l'on dose colorimétriquement au moyen de la réaction de SAKAGUCHI⁷.

Les bandes marginales des chromatogrammes établis sur la fraction liquide des milieux dont la composition a été indiquée ci-dessus présentent 4 taches de guanidines monosubstituées, dont les R_F respectifs caractérisent l'arginine et les corps *a*, *b* et *c* (Tableau II). L'étude de la formation des trois derniers aux dépens du premier a été

poursuivie grâce à leur dosage, opéré sur les éluats des bandes transversales non colorées dont la position était définie par le R_F de ces corps, repéré grâce au chromatogramme marginal témoin. Les résultats obtenus ont été reportés sur la Fig. 1.

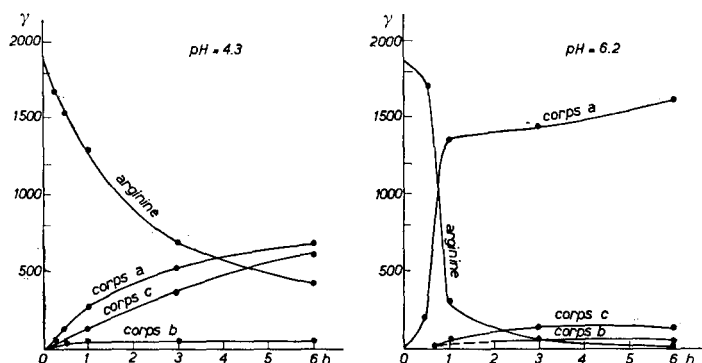


Fig. 1. Oxydation de la L-arginine par la L-aminoacideoxydase de l'hépatopancréas de moule (*Mytilus edulis*, L.) à pH = 4.3 et 6.3 et formation des corps *a*, *b* et *c* au cours de ce processus (A = arginine; *a*, *b*, *c* = corps *a*, *b* et *c*, *a* étant l'acide δ -guanido- α -cétovalérianique, *b*, un corps inconnu (éventuellement l'aldéhyde γ -guanidobutyrique) et *c*, l'acide γ -guanidobutyrique).

Abscisses: temps d'incubation à 37° (heures)

Ordonnées: μ g d'arginine et des corps *a*, *b* et *c* présents (exprimés en arginine).

A pH = 6.2, l'arginine est très rapidement oxydée de manière à peu près quantitative et le corps *a* se forme en même temps en abondance, *b* et *c* n'étant alors présents qu'à de très faibles taux. A pH = 4.3, l'oxydation de l'arginine est plus lente et moins complète, mais les corps *a* et *c* apparaissent en quantité voisine, la formation de *b* étant toujours minime. Le bilan de la réaction de transformation de l'arginine en ses dérivés ne peut être qu'approximatif en raison de la technique adoptée, mais les valeurs obtenues aux divers temps permettent de se faire une représentation assez fidèle de l'évolution de la réaction.

Les préparations enzymatiques oxydant l'arginine présentent une forte activité catalasique à pH = 6.2, diminuant au fur et à mesure que le pH s'abaisse, sans toutefois s'inactiver totalement à pH = 4.2. La présence d'eau oxygénée et sa destruction plus ou moins rapide par la catalase nous ont paru susceptibles d'expliquer les différences observées à ces deux pH et cette hypothèse s'est révélée par la suite plausible, le corps *a* ayant été identifié à l'acide δ -guanido- α -cétovalérianique et le corps *c* à l'acide γ -guanidobutyrique.

B. Identification des acides δ -guanido- α -cétovalérianique et γ -guanidobutyrique.— 50 ml d'homogénéisat d'hépatopancréas de moule (voir p. 407) sont additionnés de 20 ml de solution tampon de phosphates alcalins 0.2 M de pH = 6.8 et de 0.5 g de L-arginine en solution neutre. Le mélange (75 ml) est porté 8 heures à 37° avec gazéification à l'oxygène. Après déprotéinisation par 5 ml d'acide trichloroacétique à 30%, on ajoute au filtrat 280 mg de 2-4-dinitrophénylhydrazine dissous à chaud dans 20 ml HCl N. Après séjour de 12 heures à + 1°, on recueille les cristaux qui se sont formés, on les lave à l'eau puis à l'éther, on les recristallise trois fois dans HCl à 15% et on dessèche dans le vide sur P_2O_5 (rendement 245 mg). L'analyse élémentaire a donné les résultats suivants correspondants à $C_{12}H_{14}N_6O_7Cl$:

C% théorique = 37.10	trouvé = 36.77
N% théorique = 25.29	trouvé = 24.75 (microDumas)
Cl% théorique = 9.16	trouvé = 9.05

Le produit étudié est l'hydrazone de l'acide δ -guanido- α -cétovalérianique. Celui-ci, régénéré à partir de sa combinaison hydrazonique, donne la réaction de Sakaguchi avec une intensité proportionnelle à sa teneur en groupement guanidique et ses caractères chromatographiques sont identiques à ceux du corps *a* (voir Tableau II).

80 g d'hépatopancréas de moule sont traités par ailleurs, comme on l'a indiqué plus haut (§ III, A) en vue de l'obtention d'une préparation douée d'activité L-aminoacido-oxydasique, et le produit de cette opération est mis en suspension dans 100 ml d'eau et additionné d'un mélange tampon de phosphates de pH = 6.2 (concentration finale 0.025 *M*) et de 2 g de L-arginine neutralisée, le volume total étant de 150 ml. Après incubation de 15 heures à 37°, avec gazéification à l'oxygène, on déprotéinise grossièrement par chauffage de 5 minutes au bain-marie bouillant, le pH ayant au préalable été ajusté à 4.0. Le filtrat est traité par 1.5 ml de perhydrol*, abandonné 12 heures et porté à ébullition pendant 5 minutes. On lui ajoute un excès d'acide flavianique, lequel précipite en bloc les guanidines présentes, et l'on décompose les flavianates obtenus, par action du *n*-butanol en milieu sulfurique¹³. Les ions sulfate sont ensuite éliminés à l'état de sel de baryum, on concentre sous vide après filtration et l'on traite par l'acide picrique pour éliminer l'arginine dont le picrate se sépare. On ajoute aux eaux-mères de celui-ci un excès d'acide flavianique, ce qui provoque la formation, en une demi-heure environ, d'un flavianate de l'acide γ -guanidobutyrique. Ce sel une fois décomposé (voir plus haut), l'acide γ -guanidobutyrique est recristallisé 3 fois dans HCl concentré¹². Le rendement est d'environ 30% de la théorie.

L'analyse élémentaire du chlorhydrate obtenu a donné les résultats suivants correspondants à $C_5H_{12}N_3O_2Cl$:

N% théorique = 23.10	trouvé = 22.69
Cl% théorique = 19.5	trouvé = 19.7

L'acide γ -guanidobutyrique ainsi isolé donne la réaction de Sakaguchi avec une intensité proportionnelle à sa teneur en groupements guanidiques et ses caractères chromatographiques sont identiques à ceux du corps *c*, présent dans les extraits tissulaires de nombreux Echinodermes, Mollusques et Crustacés.

Quant au corps *b*, dont le taux a toujours été faible, il paraît être, comme le montre son ordre d'apparition au cours des expériences, un intermédiaire entre les acides δ -guanido- α -cétovalérianique et γ -guanidobutyrique. Traité par le réactif de Nessler sur les chromatogrammes, il se colore en brun comme les dérivés aldéhydiques. Ce corps est par ailleurs instable et il fait parfois défaut. Aussi peut-on se demander s'il ne constitue par l'aldéhyde γ -guanidobutyrique.

DISCUSSION DES RÉSULTATS ET CONCLUSION

Ni les Invertébrés de diverses classes étudiés, ni les Vertébrés, ne métabolisent activement l'arginine par voie décarboxylante. L'agmatine n'est, en effet, décelable que

* L'addition de perhydrol est nécessaire lorsque l'oxydation de l'arginine a été réalisée à pH = 6.2, car la catalase détruit alors une partie d' H_2O_2 , ce qui conduit à la formation d'un excès de l'acide δ -guanido- α -cétovalérianique. Elle est inutile à pH = 4.2, où la catalase est partiellement inhibée.

chez quelques espèces des premiers, où l'enzyme décarboxylant est peu abondant. En revanche, contrairement aux Vertébrés, la plupart des Invertébrés n'hydrolysent pas l'arginine au moyen de l'arginase. Seuls les Vers sont riches en celle-ci, que l'on rencontre également à des taux variables dans l'hépatopancréas des seiches et des poulpes. Toutefois, le métabolisme de l'arginine présente chez les Vers des particularités que nous décrirons prochainement, en sorte que la dégradation arginasique doit être tenue pour assez exceptionnelle chez les Invertébrés marins. On sait, par ailleurs, que l'arginine-dihydrolase^{10,14} et l'argininedésiminase³, toutes deux génératrices d'ammoniac, ne sont présentes que dans des microorganismes.

Chez les Echinodermes, les Crustacés et les Mollusques étudiés, le métabolisme de l'arginine est essentiellement du type oxydatif. L'action de la L-aminoacideoxydase y conduit à la formation des acides δ -guanido- α -cétovallérianique et γ -guanidobutyrique, corps que l'analyse chromatographique a permis de mettre en évidence dans les extraits tissulaires de ces animaux, mais non dans ceux de Mammifères, de Poissons et de Vers, dont les organes renferment une L-aminoacideoxydase très peu active sur l'arginine. Cette dernière n'est par ailleurs présente qu'à l'état de traces dans les tissus des Mammifères et des Téléostéens et elle est absente du muscle d'arénicole.

En définitive, il existe chez les animaux deux modes principaux de dégradation de l'arginine paraissant plus ou moins s'exclure l'un l'autre. Certains animaux, dont les plus typiques sont les Mammifères et les Annélides étudiés, renferment en abondance de l'arginase et leur L-aminoacideoxydase est inactive ou peu active sur l'acide δ -guanido- α -aminovalérianique; leurs tissus sont dépourvus des produits d'oxydation de celui-ci. Les Echinodermes, les Crustacés et les Mollusques étudiés, chez lesquels l'arginase fait plus ou moins défaut, oxydent énergiquement l'acide aminé, lequel est associé dans leurs tissus à ses dérivés métaboliques à groupement guanidique intact et, parfois, à l'agmatine, à l'arcanine ou à l'octopine.

RÉSUMÉ

1. Les extraits tissulaires de divers Echinodermes, Crustacés et Mollusques marins n'hydrolysent ni ne décarboxylent activement et régulièrement la L-arginine. Ils oxydent par contre celle-ci grâce à une L-aminoacideoxydase particulière. De nombreux Annélides sont exempts d'argininedécarboxylase et de L-aminoacideoxydase active sur la L-arginine et leurs tissus sont riches en arginase. Ils se distinguent, à cet égard, des premiers Invertébrés et il est possible que le métabolisme de l'acide aminé y soit, pour une part, analogue chez eux et chez les Vertébrés.

2. La L-aminoacideoxydase de nombreux Echinodermes, Crustacés et Mollusques métabolise la L-arginine en donnant naissance aux acides δ -guanido- α -cétovallérianique et γ -guanidobutyrique et à un produit intermédiaire (corps *b*) dont la nature n'a pas pu être définie. Ces guanidines monosubstituées, dont les deux premières ont été isolées à l'état pur, sont largement réparties dans les tissus des Invertébrés appartenant aux groupes zoologiques désignés plus haut.

3. En dehors des produits d'oxydation de l'arginine identifiés au cours de ce travail, certains Invertébrés renferment d'autres guanidines monosubstituées différentes de toutes celles actuellement connues comme constituants des êtres vivants. Trois de ces corps ont été caractérisés par leurs caractères chromatographiques chez les Vers et paraissent n'être abondants que chez ceux-ci. Les divers groupes d'Invertébrés présentent donc des caractères biochimiques différents en ce qui concerne les dérivés guanidiques qu'ils renferment et le métabolisme de ceux-ci (enzymes et types de dégradation).

SUMMARY

1. The tissue extracts of various Echinodermes, Crustacea and Molluscs do not actively and regularly hydrolyse nor decarboxylise L-arginine. However, they oxidise the latter owing to the presence of a L-amino acid oxidase. Numerous Annelides contain no L-arginine-active arginine-decarboxylase and L-amino acid oxidase, and their tissues are rich in arginase. They are different,

in this respect, from the other Invertebrates studied and it is possible that the metabolism of arginine is analogous in them and in Vertebrates.

2. L-amino acid oxydase of numerous Echinoderms, Crustacea and Molluscs metabolise L-arginine giving rise to δ -guanido- α -ketovalerianic and γ -guanidobutyric acids and to an intermediary product (substance b), the nature of which has not been defined. These mono-substituted guanidines, the first two of which have been isolated in a pure state, are largely distributed in the tissues of Invertebrates belonging to the studied zoological groups.

3. Apart from the oxidation products of arginine identified in the course of this work, certain Invertebrates contain other mono-substituted guanidines different from all those actually known as constituents of living beings. Three of these substances have been demonstrated, by their chromatographic characteristics, in worms and they appear to exist chiefly in the latter. Various groups of Invertebrates show different biochemical characteristics with regard to the nature of the guanidine derivatives that they contain and to the metabolism of these (enzymes and types of degradation).

ZUSAMMENFASSUNG

1. L-Arginin wird nicht aktiv und regelrecht von Gewebeextrakten verschiedener Echinodermen, Crustaceen und Seemollusken hydrolysiert oder decarboxyliert. Die Gewebeextrakte oxydieren dagegen diese Aminosäure, dank einer besonderen L-Aminosäureoxydase. Zahlreiche Anneliden besitzen keine auf L-Arginin wirksame L-Arginindecaboxylase und L-Aminosäureoxydase und ihre Gewebe sind reich an Arginase. Sie unterscheiden sich in dieser Hinsicht von anderen Invertebraten und es ist möglich, dass der Aminosäurestoffwechsel bei ihnen und den Vertebraten teilweise analog ist.

2. Die L-Aminosäureoxydase zahlreicher Echinodermen, Crustaceen und Mollusken verwandelt das L-Arginin und bildet dabei δ -Guanido- α -ketovaleriansäure und γ -Guanidobuttersäure und ein Zwischenprodukt (Substanz b), dessen Natur nicht festgestellt werden konnte. Diese monosubstituierten Guanidine, von denen die beiden ersteren im reinen Zustand isoliert wurden, sind weit verbreitet in den Geweben, der zu den oben bezeichneten zoologischen Gruppen gehörenden Invertebraten.

3. Ausser den im Verlauf dieser Arbeit identifizierten Oxydationsprodukten des Arginins enthalten gewisse Invertebraten andere monosubstituierte Guanidine, die sich von allen bisjetzt als Bestandteile lebender Wesen bekannten Guanidinen unterscheiden. Drei dieser Substanzen, welche bei den Würmern, und vielleicht nur bei ihnen, vorkommen, wurden durch ihre chromatographischen Eigenschaften charakterisiert. Die verschiedenen Gruppen der Invertebraten zeigen also, was die in ihnen enthaltenen Guanidinderivate und ihren Stoffwechsel (die Enzyme und die Art des Abbaus) betrifft, biochemisch verschiedene Eigenschaften.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. ACKERMANN, *Z. physiol. Chem.*, 56 (1908) 305.
- ² E. BALDWIN, *Biol. Rev.*, 11 (1935) 247 et *Biochem. J.*, 29 (1935) 252.
- ³ M. BEHRENS, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 27.
- ⁴ H. BLASHKO, *Advances in Enzymol.*, 5 (1945) 67.
- ⁵ P. BOULANGER ET R. OSTEUX, *Compt. rend.*, 234 (1952) 1409.
- ⁶ A. CLEMENTI, *Atti Acad. Lincei*, 23 (1914) 612 et 27 (1914) 299.
- ⁷ C. DUMAZERT ET R. POGGI, *Bull. soc. chim. biol.*, 21 (1939) 500 et 1381.
- ⁸ E. F. GALE, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 1.
- ⁹ M. GUGGENHEIM, *Die Biogenin Amine*, Basel Verlag von S. Karger, New York (1951) p. 378.
- ¹⁰ G. M. HILLS, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1057.
- ¹¹ H. A. KREBS, *The Enzymes*, J. B. SUMNER AND K. MYRBACK, vol. II, part. 2, p. 516. Academic Press, New York 1951.
- ¹² F. KUTSCHER, *Z. physiol. Chem.*, 32 (1901) 415.
- ¹³ A. E. PRATT, *J. Biol. Chem.*, 67 (1926) 35.
- ¹⁴ J. ROCHE, H. GIRARD, G. LACOMBE ET M. MOURGUE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 414.
- ¹⁵ J. ROCHE, NG. VAN THOAI ET P. F. GLAHN, *Experientia*, 8 (1952) 428.
- ¹⁶ J. ROCHE, W. FELIX, Y. ROBIN ET NG. VAN THOAI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1688.
- ¹⁷ P. K. STUMPF AND D. E. GREEN, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 387.
- ¹⁸ NG. VAN THOAI ET L. CHEVILLARD, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1147.
- ¹⁹ NG. VAN THOAI ET Y. ROBIN, *Compt. rend.*, 233 (1951) 452.
- ²⁰ E. A. ZELLER, *Advances in Enzymol.*, 8 (1948) 459.

Reçu le 25 février 1953