

MÉTABOLISME DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

II. ISOLEMENT DE LA GUANIDOTAURINE (TAUROCYAMINE)
ET DE L'ACIDE GUANIDOACÉTIQUE (GLYCOCYAMINE) DES VERS MARINS

par

NGUYEN-VAN THOAI ET YVONNE ROBIN

*Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris
et Laboratoire de Biologie marine du Collège de France, Concarneau, (France)*

Nous avons établi dans un précédent mémoire¹⁰ que plusieurs vers marins dont les tissus sont dépourvus de produits d'oxydation de l'arginine (acides δ -guanido α -cétovalérianique et γ -guanidobutyrique) présentent à l'analyse chromatographique sur papier, outre celle de l'arginine, trois taches dont l'une semble correspondre à la glycocyamine et les deux autres à des guanidines monosubstituées inconnues. Afin de préciser le métabolisme de ces corps, nous avons procédé à l'isolement et à la caractérisation des produits correspondant aux taches chromatographiques repérées. L'un d'eux a été identifié à la glycocyamine et l'autre à la taurocyamine. Nous exposons les détails de ces recherches dans le présent mémoire.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Isolement et caractérisation de la guanidotaurine. 800 g d'arénicoles vivants (*Arenicola marina* L.) ont été broyés au waring blendor avec un litre d'eau. L'homogénéisat, ajusté à pH 3-4 avec de l'acide sulfurique concentré, est porté à l'ébullition 10 minutes, puis centrifugé. Le résidu est repris par 400 ml d'eau, porté à l'ébullition 5 minutes et centrifugé. Les deux extraits sont réunis et traités par l'acétate basique de plomb jusqu'à ce qu'ils ne précipitent plus par ce dernier. Après centrifugation, le précipité est lavé avec une solution à 1 % d'acétate de plomb jusqu'à ce que les eaux de lavage ne donnent plus la réaction de SAKAGUCHI.

Les extraits plombiques (environ deux litres) sont traités par SH_2 , avec agitation mécanique vigoureuse. Le précipité de SPb est séparé par filtration, remis en suspension dans l'eau et traité à nouveau par SH_2 . Le précipité de sulfures adsorbant énergiquement les dérivés guanidiques, il est nécessaire de répéter le lavage jusqu'à épuisement de ces derniers.

Tous les liquides réunis (4 litres) sont concentrés sous vide à siccité, et le résidu repris par l'alcool à 90° bouillant, puis filtré. La solution alcoolique abandonnée 2-3 jours à -5° laisse déposer une couche huileuse qu'on sépare par décantation. Celle-ci, riche en dérivés guanidiques, mais chargée en impuretés diverses, est traitée à part, en vue de la récupération des premiers. La solution alcoolique surnageante est concentrée sous vide et le résidu repris 4-5 fois par de petites portions d'alcool à 90° bouillant. Le résidu insoluble est éliminé. Les extraits alcooliques réunis sont concentrés à nouveau et le résidu est dissous dans 30 ml d'eau.

Cette solution est traitée par adsorption sur échangeurs d'ions. Une première colonne (28 × 400 mm) est remplie de permutite à cations C 50; la permutite est lavée avec 30-40 ml d'acide chlorhydrique N puis avec de l'eau jusqu'à ce que le liquide qui s'en écoule soit neutre (pH 7). Une seconde colonne est constituée par de la permutite à anions A 300, simplement lavée à l'eau.

On fait passer la solution à purifier sur la première colonne à raison de 2 gouttes par seconde. On lave la colonne avec de l'eau jusqu'à ce que le liquide ne présente plus de coloration rose avec le réactif de SAKAGUCHI (250 ml environ). L'arginine est fixée sur la colonne et seul le corps cherché est filtré. On concentre le filtrat sous vide et reprend le résidu par 30 ml d'eau. On filtre la solution à travers la deuxième colonne de permutite et on lave celle-ci jusqu'à élution complète des dérivés guanidiques. Le filtrat doit être neutre (pH 7.5); s'il est acide on le repasse sur une deuxième colonne de permutite A 300. Le filtrat final est concentré sous vide à sec, et le résidu repris séparément par plusieurs portions d'éthanol. Chaque fraction alcoolique, additionnée de 5-6 volumes d'acétone est abandonnée à la cristallisation une nuit au frigidaire. Les fines aiguilles obtenues sont recristallisées plusieurs fois au mélange alcool-acétone (P.F.: 230-235°), puis finalement à l'eau (P.F.: 226-228°). Avec 800 g d'arénicoles on obtient environ 30 mg de produit dont une petite partie provient du liquide huileux séparé du premier extrait alcoolique.

La composition élémentaire du produit obtenu est la suivante:

C: 21.59-21.8%	H: 5.6-5.7%	N: 25.4-25.5%	S: 19.4%
Calculé pour la taurocyamine $C_3H_9O_3N_3S = 167$ (P.F.: 228-230°):			
C: 21.55%	H: 5.38%	N: 25.14%	S: 19.15%

Celle-ci a été préparée, non par action de la cyanamide sur la taurine^{4,5} mais par action sur celle-ci de la S-méthylisothiourée⁶. 3 g de taurine sont dissous dans 25 ml d'ammoniaque concentrée. On ajoute par petites portions 5 g de S-méthylisothiourée. On laisse réagir une nuit à la température ordinaire, puis on ajoute 2-3 volumes d'éthanol pour faire cristalliser la guanidotaurine formée. Le produit essoré est recristallisé plusieurs fois dans l'eau (P.F.: 228-230°).

Nous avons comparé les R_F de la taurocyamine et du corps isolé des arénicoles. Nous avons utilisé comme solvants les mélanges⁶:

- butanol - acide acétique - eau 73:10:17
- pyridine - alcool isoamylique - acide acétique - eau 80:40:10:40
- pyridine - alcool isoamylique - ammoniaque - eau 80:40:10:40
- pyridine - alcool isoamylique - eau 80:40:70
- propanol normal - ammoniaque - eau 73:20:7
- phénol saturé d'eau.

Les taches révélées au mélange α -naphthol-hypobromite de Na⁷ montrent que le produit isolé des arénicoles et la taurocyamine présentent toujours les mêmes R_F quel que soit le solvant utilisé.

Nous avons examiné la répartition des deux guanidines monosubstituées, l'arginine et la taurocyamine dans les muscles et le tractus digestif des animaux qui en renferment. Deux vers *Arenicola marina* L. et le *Clymene lumbricoides* Qfg. ont été ouverts longitudinalement. Le tractus digestif est prélevé et le muscle gratté soigneusement au scalpel de façon à éliminer tous débris de tractus digestif. Muscle et tractus digestif sont broyés séparément au mortier avec du sable, puis homogénéisés avec deux volumes d'eau.

L'homogénéisat, acidifié avec de l'acide acétique (pH 3-4), est porté 5 minutes au bain-marie bouillant et filtré, le filtrat traité par 3 volumes d'éthanol est centrifugé et le liquide surnageant concentré sous vide. Après reprise par de l'eau du résidu, la solution filtrée est soumise à la chromatographie, en prenant comme corps de référence l'arginine, la taurocyamine isolée des arénicoles et le produit préparé par synthèse. Les résultats obtenus montrent que l'arginine et la taurocyamine sont toutes deux et seules présentes dans le tractus digestif, tandis que cette dernière est seule présente dans le muscle.

Isolement et caractérisation de la glycoxyamine. 300 g de *Nereis* vivants sont broyés avec 500 ml d'eau. L'homogénéisat acidifié par l'acide sulfurique concentré (pH 3) est porté 15 minutes à l'ébullition. Après filtration, le précipité est extrait 3 fois à l'eau bouillante. Les extraits réunis sont traités par 80 ml de solution commerciale d'acétate basique de plomb, puis centrifugés et le résidu lavé 3 fois avec une solution diluée d'acétate de plomb. Les liquides réunis sont traités par SH_2 , filtrés et le précipité de sulfures lavé 3 fois comme il a été indiqué. Tous les filtrats sont concentrés sous vide et le résidu repris par de l'eau.

La solution est passée sur une colonne de permutite à cations C 50. Après lavage à l'eau, le produit est élué par de l'ammoniaque 2 *N* et l'éluat concentré sous vide. La solution obtenue par redissolution du résidu d'évaporation est filtrée sur une colonne de permutite à anions A 300. Le filtrat est passé ensuite sur une petite colonne de Decalso F qui retient l'arginine. Le filtrat concentré à un petit volume, additionné d'acide picrique en milieu acide est abandonné à la cristallisation. Le picrate est recristallisé dans le méthanol puis dans l'eau.

Le picrate, redissous dans un peu d'eau, est passé sur une petite colonne de permutite A 300 qui fixe fortement l'acide picrique. Le filtrat concentré au bain-marie et abandonné à 3° fournit des cristaux qui sont recristallisés puis lavés à l'alcool, l'éther et desséchés sous vide sur P_2O_5 . Le dosage de l'azote correspond à N: 35.95% (glycoxyamine pure N: 35.86%).

La chromatographie sur papier en présence de six solvants définis plus haut montre que la guanidine monosubstituée isolée et la glycoxyamine se comportent de façon identique.

Le muscle et le tractus digestif de *Nereis* extraits séparément comme il a été indiqué plus haut pour les arénicoles et soumis à la chromatographie montrent que le premier tissu renferme uniquement de la glycoxyamine tandis que la même guanidique est associée à l'arginine dans le tractus digestif. Par ailleurs la révélation des chromatogrammes au moyen du mélange diacétyle- α -naphthol⁶ ou du picrate alcalin après chauffage 1 heure à 100°, ne permet pas de déceler la présence de créatine chez les *Nereis*.

DISCUSSION

Si le dérivé diméthylé de la guanidotaurine, l'astérubine, a été isolée depuis longtemps des étoiles de mer², l'intérêt biologique de la taurocyamine n'a pas été pris en considération jusqu'à présent. Préparée par ENGEL⁴, et par DITTRICH⁵, ses propriétés hypoglycémiantes ont été étudiées par ACKERMANN ET HEINSEN¹, mais sa présence chez les organismes vivants et son rôle biologique ont passé inaperçus. Un fait semble maintenant établi: la guanidotaurine constitue avec l'arginine la seule guanidine monosubstituée chez certains types de vers, par ailleurs dépourvus de produits d'oxydation de l'arginine. Contrairement à celle-ci, qui est présente seulement dans le tractus digestif, la taurocyamine se rencontre aussi bien dans le muscle que dans les organes.

Ce dernier fait laisse prévoir que la taurocyamine joue le rôle d'accepteur de phosphate ($\sim P$) assumé ailleurs par la créatine et l'arginine.

Quant à la glycocyamine, sa présence dans les urines de mammifères a été signalée depuis longtemps¹², mais la signification biologique de ce corps n'a été envisagée que par la découverte de son rôle de précurseur dans la biogenèse de la créatine³. Ce corps a été trouvé également chez les invertébrés (ophiures, oursins) renfermant de la créatine, dont la répartition s'explique par la présence simultanée de l'acide guanidoacétique et de transméthylases. Certains invertébrés doués de pouvoir méthylant, mais dépourvus de glycocyamine, ne renferment pas de créatine⁹. La présence exclusive de la glycocyamine dans les muscles de polychètes errantes et de némertiens, alors qu'elle est associée à celle de l'arginine dans les tractus digestifs, l'absence de créatine chez les *Nereis* suggèrent un autre rôle biologique, analogue à celui que nous avons attribué à la taurocyamine chez les polychètes sédentaires et le géphyrien étudiés. Pour l'une et l'autre des guanidines, des dérivés phosphoriques labiles ont d'ailleurs déjà pu être mis en évidence¹¹.

RÉSUMÉ

1. Une nouvelle guanidine monosubstituée biologique, la taurocyamine, a été isolée sous forme de base libre à partir des arénicoles. Elle est également présente chez plusieurs polychètes sédentaires et certains géphyriens. Elle est localisée aussi bien dans le muscle que dans le tractus digestif, tandis que l'arginine, seul autre constituant guanidique trouvé, est absente des muscles.

2. La glycocyamine a été isolée sous forme de picrate et de base libre à partir des *Nereis*. On la trouve chez plusieurs polychètes errantes et certains némertiens. Chez les *Nereis*, dépourvus de créatine, elle est associée à de l'arginine dans le tractus digestif, mais elle est seule présente dans le muscle.

SUMMARY

1. A new biological mono-substituted guanidine, taurocyamine, has been isolated from *Arenicolidae* in the form of a free base. It is also present in several sedentary *Polychaetae* and certain *Gephyreae*. It is localised in the muscle as well as in the alimentary canal, whereas arginine, the only other guanidic constituent found, is absent from muscle.

2. Glycocyamine has been isolated as the picrate and free base from *Nereis*. It is also found in several moving *Polychaetae* and certain *Nemertinae*. In *Nereis*, deprived of creatine, it is combined with arginine in the alimentary canal, but is present alone in muscle.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein neues biologisches, monosubstituiertes Guanidin, das Taurocyamin wurde in Form seiner Base aus Arenicoliden isoliert. Es ist ebenfalls in mehreren festsitzenden Polychäten und gewissen Gephyreen vorhanden. Es ist sowohl im Muskel, wie im Verdauungskanal lokalisiert, während Arginin, der einzige andere aufgefundene Guanidinbaustein, im Muskel fehlt.

2. Glycocyamin wurde in Form des Pikrates und der freien Base aus *Nereis* isoliert. Man findet es bei mehreren nicht festsitzenden Polychäten und gewissen Nemertinen. Bei *Nereis* ohne Kreatin ist es mit Arginin im Verdauungskanal verbunden, ist aber im Muskel frei vorhanden.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ D. ACKERMANN ET H. A. HEINSEN, *Z. physiol. Chem.*, 235 (1935) 115.
- ² D. ACKERMANN, *Z. physiol. Chem.*, 232 (1935) 206.
- ³ H. BORSOOK ET J. W. DUBNOFF, *J. Biol. Chem.*, 132 (1940) 559; 160 (1945) 635.
- ⁴ E. DITTRICH, *J. prakt. Chem.*, 18 (1978) 63.
- ⁵ R. ENGEL, *Ber. deut. chem. Ges.*, 8 (1875) 1597.
- ⁶ J. ROCHE, NG. V. THOAI ET J. L. HATT, en préparation.
- ⁷ J. ROCHE, W. FELIX, Y. ROBIN ET NG. V. THOAI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1688.
- ⁸ E. SCHUTTE, *Z. physiol. Chem.*, 279 (1943) 52.
- ⁹ NG. V. THOAI ET Y. ROBIN, *Compt. rend.*, 232 (1951) 452.
- ¹⁰ NG. V. THOAI, J. ROCHE ET Y. ROBIN, *Biochim. et Biophys. Acta*, 11 (1953) 403.
- ¹¹ NG. V. THOAI, J. ROCHE, Y. ROBIN ET NG. V. THIEM, *Compt. rend. soc. biol.*, 147 (1953) 1241.
- ¹² C. J. WEBER, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 32 (1934) 172.

Reçu le 26 octobre 1953