

MÉTABOLISME DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

IV. SUR UNE NOUVELLE GUANIDINE MONOSUBSTITUÉE BIOLOGIQUE:
L'ESTER GUANIDOÉTHYLSÉRYLPHOSPHORIQUE (LOMBRICINE)
ET LE PHOSPHAGÈNE CORRESPONDANT

par

NGUYEN-VAN THOAI ET YVONNE ROBIN

Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris (France)

Le métabolisme des vers marins diffère de celui des autres invertébrés tant par la dégradation de l'arginine que par la présence chez les Polychètes de composés guanidiques tels que la taurocyamine et la glyocyamine^{1, 2}. Celle-ci n'y joue pas le rôle de précurseur de la créatine qui en est absente, mais sert comme la première d'accepteur de de phosphates ($\sim P$) dans les muscles³. Chez les vers de terre, *Lumbricus terrestris* sp., une nouvelle guanidine monosubstituée est seule présente dans le muscle et son dérivé phosphorique labile peut jouer également le rôle de phosphagène au cours des contractions musculaires.

Nous rapportons dans le présent mémoire des recherches sur l'isolement et l'identification du nouveau dérivé guanidylé et de sa phosphamidine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Isolement du dérivé guanidylé

400 g de vers de terre sont broyés, extraits, traités par l'acétate de plomb et débarrassés du métal comme il a été indiqué dans un précédent mémoire².

Après élimination du sulfure de plomb, les extraits sont concentrés sous vide à siccité et le résidu repris par 40–50 ml d'eau. Cette solution est passée à travers une colonne de permutite à cations C 50, le guanidique fixé sur l'adsorbant, élué avec de l'ammoniaque 2 N, l'éluat concentré sous vide et le résidu repris par 40–50 ml d'eau. La nouvelle solution est filtrée à travers une colonne de permutite à anions A 300. Le filtrat est concentré sous vide, le résidu repris par de l'eau et la solution filtrée lentement sur une colonne de Decalso F qui fixe l'arginine.

Lorsque la défécation au sel de plomb et la purification sur échangeurs d'ions sont bien conduites, le filtrat obtenu après passage sur Decalso se prête à l'isolement du corps cherché. Dans ce but, il est évaporé à sec au bain-marie bouillant et le résidu repris par de l'éthanol 50 % bouillant. Après centrifugation et élimination des produits insolubles, le liquide est additionné de 2–3 volumes d'alcool. Il se sépare alors une couche inférieure huileuse, qui est réservée pour un traitement particulier, et le liquide surnageant est évaporé jusqu'à début de cristallisation. Après une nuit à la chambre froide, des aiguilles blanches sont séparées, recristallisées 3 fois dans l'alcool aqueux et une fois dans l'eau.

Le liquide huileux, abandonné à lui-même se prend en une masse solide que l'on redissout partiellement dans l'alcool 50 % bouillant. La solution additionnée de 2 à 3 volumes d'éthanol laisse précipiter le produit que l'on fait recristalliser dans l'alcool aqueux et dans l'eau.

Il arrive que le liquide obtenu après filtration sur Decalso, très chargé en impuretés, en particulier en acides aminés libres, ne se prête guère au fractionnement à l'alcool. Dans ce cas, nous le chromatographions sur une colonne (20 × 400 mm) de poudre de cellulose Whatman. La guanidine monosubstituée est éluée par un mélange méthanol-acide acétique-eau (80:10:20). Les diverses fractions (13 ml) obtenues sont chromatographiées sur papier Whatman n° 1 (mélange butanol-acide acétique-eau, 73:10:17) pour la localisation du produit. Les fractions entièrement exemptes d'acides aminés sont réunies (350 ml) et concentrées sous vide. La solution obtenue par redissolution du résidu dans l'eau se prête à la recristallisation.

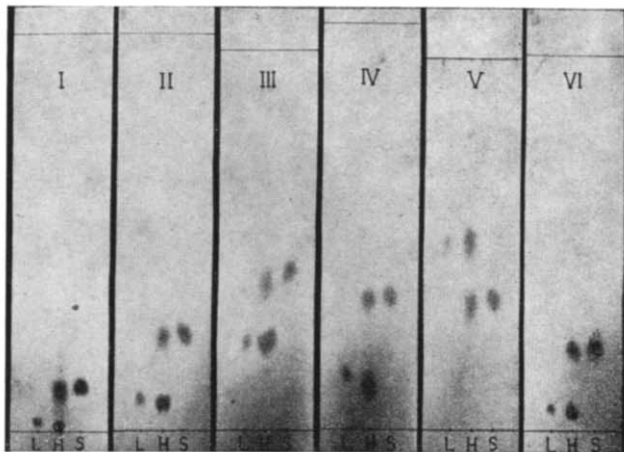
A partir de 400 g de vers on a pu obtenir ainsi 23 mg de produit pur fondant à 223–224°. Ce corps, que nous appelons *lombricine*, donne une réaction positive à la ninhydrine; il a pour composition élémentaire:

C 26.5%; H 5.7%; N 20.7%; P 11.7%.

Identification du diester guanidoéthylsérylphosphorique

2 mg de produit ont été traités par de l'acide sulfurique 6 N en tube scellé à 110° pendant 8 heures. Après élimination de l'acide sous forme de sel de baryum, l'hydrolysate est concentré sous vide et chromatographié.

Fig. 1. Identification de la sérine dans l'hydrolysate de la lombricine. Chromatogrammes sur papier Whatman n° 1 en solvants: I. (*n*-butanol, eau, acide acétique 73:17:10); II. (pyridine, *iso*amylol, eau, acide acétique 80:40:40:10); III. (pyridine, *iso*amylol, eau 80:40:70); IV. (pyridine, *iso*amylol, eau, ammoniacale à 20% 80:40:40:10); V. (phénol saturé d'eau); VI. (propanol, eau, ammoniacale à 20% 73:7:20). Révélation à la ninhydrine: L, lombricine; H, Lombricine hydrolysée (8 heures à 110° dans SO₄H₂ 6 N); S, Sérine.



Présence de la sérine. La révélation des chromatogrammes au moyen du réactif à la ninhydrine fait apparaître deux taches mauves, l'une correspondant au produit non hydrolysé, l'autre ayant le même R_F que celui de la sérine. Ce dernier fait est confirmé en employant 6 solvants différents (Fig. 1).

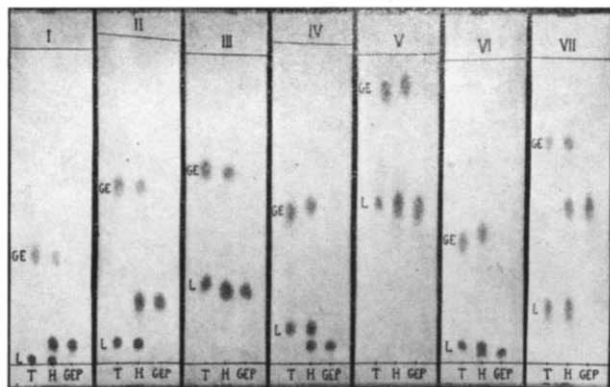


Fig. 2. Identification du guanidoéthanol et de l'acide guanidoéthylphosphorique dans l'hydrolysate de la lombricine. Chromatogrammes sur papier Whatman n° 1 en solvants I, II, III, IV, V, VI définis plus haut. Le septième solvant VII est constitué par le mélange méthanol, eau, acide acétique (80:20:10). Révélation au mélange α -naphtol-hypobromite de Na: L, Lombricine; GE, guanidoéthanol; H, Lombricine hydrolysée (8 heures à 110° dans SO₄H₂ 6 N).

Présence du guanidoéthanol et de l'ester guanidoéthylphosphorique. Les chromatogrammes révélés à l' α naphtol-hypobromite montrent également une hydrolyse partielle de la lombricine, marquée par la présence du produit initial L et l'apparition de deux nouvelles taches, l'une rose franc persistante, caractéristique de la plupart des guanidines monosubstituées l'autre rose violette, très labile mais reparaisant lors de nouvelles pulvérisations d'hypobromite (Fig. 2).

Bibliographie p. 79.

Les hypothèses de travail nous ayant conduits à supposer la présence dans la molécule de lombricine, du guanidoéthanol à côté de la sérine, nous avons préparé ce corps et son dérivé phosphorylé. Le guanidoéthanol est obtenu par action de la S-méthylisothiourée sur l'éthanolamine base en milieu ammoniacal⁴. En l'absence d'acides, ce corps cristallise facilement en mélange alcool-acétone. Il donne avec le réactif de SAKAGUCHI une coloration rose violette et présente le même R_F et la même labilité que la tache provenant de l'hydrolyse acide de la lombricine (Fig. 2, GE).

Le guanidoéthylphosphate est obtenu par action de l'oxychlorure de phosphore sur ce dernier dérivé guanidique. 500 mg de guanidoéthanol, mis en suspension fine dans 20 ml de pyridine anhydre, sont traités à -5° lentement et sous agitation mécanique, par 10 ml de pyridine contenant 2 g de POCl_3 . Après avoir maintenu l'agitation pendant une demi-heure, on ajoute 3 g de Cl_2Ca cristallisé et de la chaux vive pour amener le milieu à pH: 8-9. Le phosphate de calcium une fois éliminé, le produit est précipité par 3 volumes d'éthanol et purifié par dissolutions et précipitations répétées. Mis en solution, débarrassé du calcium au moyen de l'acide oxalique et chromatographié, le guanidoéthylphosphate présente le même R_F que la tache provenant de l'hydrolyse acide de la lombricine (Fig. 2, GEP). Le fait que les deux corps donnent une réaction positive avec l' α naphthol-hypobromite montre que le groupement NH_2 uréique est libre et que le radical phosphorique est estérifié par le groupement alcool, les guanidines disubstituées ne donnant pas de coloration avec ce réactif.

Identification du nouveau phosphagène: le phosphoguanidoéthylsérylphosphate

Des extraits séparés de tractus digestif et de muscle de vers de terre ont été préparés et chromatographiés comme il a été indiqué précédemment². Ils révèlent dans le premier la présence de l'arginine et de la lombricine et, dans le second, uniquement celle de l'ester guanidoéthylsérylphosphorique.

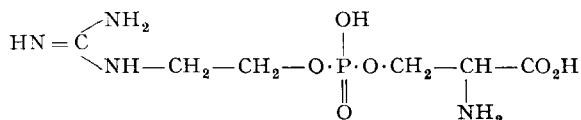
La localisation de la lombricine, rappelant celle de la taurocyamine, de la glyco-cyamine et de leurs dérivés phosphoriques labiles dans les muscles d'Arénicoles et de Nereis, signifie que le premier corps peut également jouer le rôle d'accepteur de phosphates ($\sim\text{P}$) au cours des contractions musculaires. Cette hypothèse est confirmée par l'analyse des extraits trichloracétiques des vers de terre, lesquels renferment un dérivé phosphorique hydrolysable en une minute à 100° par l'acide sulfurique 0.1 N en acide phosphorique libre et en une guanidine monosubstituée ayant le même R_F que le guanidoéthylsérylphosphate.

500 g de vers de terre ont été extraits à -5° successivement par des volumes égaux d'acide trichloracétique à 25, 10 et 10 %. Les extraits réunis sont additionnés d'un excès de chlorure de calcium, neutralisés par de la chaux vive en poudre (pH 8-9), et le précipité calcique éliminé. Le filtrat clair est précipité par 3 volumes d'éthanol et le nouveau précipité extrait à froid par l'acide chlorhydrique 0.1 N jusqu'à épuisement du phosphagène. Après addition de Cl_2Ca et de chaux vive la solution fractionnée à l'éthanol fournit un produit impur, mais qui se prête à la détermination du rapport guanidique combiné/P labile.

Le produit dissous dans l'eau est dosé en vue de la détermination du phosphore et du dérivé guanidique présents dans la solution, avant et après hydrolyse acide (SO_4H_2 0.1 N à 100° pendant une minute). Dans le dosage du dérivé guanidique au moyen du réactif α -naphthol-hypobromite, nous utilisons une courbe étalon établie à partir de l'acide guanidoéthylsérylphosphorique cristallisé, isolé des vers de terre. Le rapport dérivé guanidique libéré/phosphore libéré: $332 \mu\text{g}/37.2 \mu\text{g} = 8.9$ (valeur moyenne de 4 déterminations) est sensiblement le même que celui correspondant théoriquement au rapport lombricine/phosphore labile: $270/31 = 8.7$.

DISCUSSION

La composition élémentaire de la guanidine monosubstituée isolée des vers de terre et la nature des produits de son hydrolyse acide concourent à nous faire attribuer à la lombricine la structure suivante:

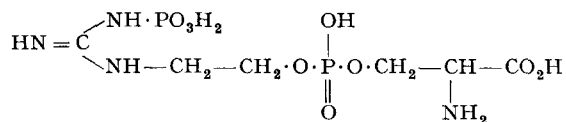


La composition élémentaire calculée à partir de cette formule

C: 26.6%; H: 5.5%; N: 20.8%; P: 11.5%

est pratiquement identique à celle trouvée sur le produit naturel que nous avons isolé. La présence du groupement aminé libre se traduit par la réaction positive à la ninhydrine. La proximité du groupement carboxyle libre explique qu'au cours de l'hydrolyse acide partielle la sérine se libère en premier lieu, le radical phosphorique restant attaché au guanidoéthanol.

Dans le cas du phosphagène, le radical phosphorique labile est fixé sur NH_2 guanidique



cette guanidique disubstituée ne donnant pas de coloration rose à l' α -naphthol-hypobromite.

La présence du guanidoéthylsérylphosphate chez les vers de terre, celle de la taurocyamine chez *Arenicola* et de la glyocyamine chez *Nereis*² soulignent la diversité du métabolisme des dérivés guanidylés chez les organismes vivants.

On peut noter enfin que le rôle d'accepteur de phosphate, au cours des contractions musculaires, n'est pas particulier à la créatine et à l'arginine, il apparaît comme dévolu également à la glyocyamine, à la taurocyamine et à la lombricine.

RÉSUMÉ

1. Une nouvelle guanidine monosubstituée biologique, le diester guanidoéthylsérylphosphorique (*lombricine*) a été isolée de *Lumbricus terrestris* sp. La structure chimique de ce corps a été établie par l'analyse des produits de son hydrolyse acide. La lombricine est associée à l'arginine dans le tractus digestif, mais est présente seule dans le muscle.

2. Le phosphagène correspondant, le phosphoguanidoéthylsérylphosphate, a été isolé et caractérisé.

SUMMARY

1. A new monosubstituted guanidine, the guanidoethylserylphosphoric diester (*lombricine*), has been isolated from *Lumbricus terrestris* sp. The chemical structure of this substance has been established by analysis of its acid-hydrolysis products. Lombricine is associated with arginine in the alimentary canal, but is present alone in the muscle.

2. The corresponding phosphagene, phosphoguanidoethylserylphosphate, has been isolated and characterized.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Ein neues biologisches monosubstituiertes Guanidin, der Guanidoäthylserylphosphorsäurediester (*Lombricin*) wurde aus *Lumbricus terrestris* sp. isoliert. Die chemische Struktur dieses Körpers wurde durch Analyse seiner sauren Hydrolysenprodukte festgestellt. Das Lombricin befindet sich neben Arginin im Verdauungskanal, aber es ist allein im Muskel vorhanden.

2. Das zugehörige Phosphagen, das Phosphoguanidoäthylserylphosphat wurde isoliert und charakterisiert.

BIBLIOGRAPHIE

¹ N. V. THOAI, J. ROCHE ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 403.

² N. V. THOAI ET Y. ROBIN, *id.*, 13 (1953) 533.

³ N. V. THOAI, J. ROCHE, Y. ROBIN ET N. V. THIEM, *Compt. rend. soc. biol.*, 147 (1953) 1241.

⁴ E. SCHUTTE, *Z. physiol. Chem.*, 279 (1943) 52.

Reçu le 9 janvier 1954