

## MÉTABOLISME DES DÉRIVÉS GUANIDYLÉS

VII. SUR UNE NOUVELLE GUANIDINE MONOSUBSTITUÉE BIOLOGIQUE:  
L'HIRUDONINE

YVONNE ROBIN, NGUYEN VAN THOAI ET LOUISE-ANNE PRADEL

*Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris,  
et Laboratoire de Biologie marine du Collège de France, Concarneau, Finistère (France)*

Nous avons signalé au cours de travaux antérieurs<sup>1,2</sup> l'existence chez la Sangsue, *Hirudo medicinalis* L., d'un dérivé guanidique monosubstitué nouveau présent en quantités importantes dans tous les tissus. Ce dérivé diffère par ses caractères chromatographiques de toutes les guanidines monosubstituées biologiques connues, en particulier de celles que nous avons précédemment identifiées chez d'autres Vers: glycocyamine et taurocyamine de diverses Polychètes marines<sup>3</sup>, lombricine du lombric<sup>4</sup>, où elles constituent la base de phosphagènes nouveaux<sup>5,6</sup>. La présence de ce dérivé comme unique constituant guanidique libre du muscle de Sangsue permet d'envisager qu'il pourrait participer chez cet animal à la formation d'un composé phosphorique labile ( $\sim$ P). Le présent article rend compte des recherches entreprises sur l'isolement et l'identification du nouveau dérivé, pour lequel nous proposons le nom d'*hirudonine*.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Isolement du dérivé guanidylé*

1000 g de sangsues vivantes (*Hirudo medicinalis* L.) sont anesthésiées au chloroforme et rapidement hachées, puis broyées au Waring blendor avec deux litres d'eau. La préparation est acidifiée à pH = 3-4 par l'acide sulfurique concentré et portée 5 minutes à l'ébullition. Après centrifugation, le résidu est repris 2 fois par un litre d'eau, réacidifié si nécessaire à pH = 3-4, porté 5 minutes à l'ébullition et centrifugé. Les liquides surnageants sont réunis et concentrés sous vide à environ 1200 ml. On ajoute alors 220 ml d'acétate basique de plomb (solution  $d = 1,32$ ) et, par petites portions, de l'ammoniaque concentrée jusqu'à ce que le précipité se sépare bien. On centrifuge et lave 2 fois le précipité avec 500 ml d'acétate basique de plomb à 2%, en ajoutant à chaque fois quelques gouttes d'ammoniaque pour faciliter la centrifugation. Les liquides surnageants opalescents sont réunis et traités par H<sub>2</sub>S pour éliminer l'excès de plomb. Le précipité de PbS est séparé par filtration sur Büchner, puis lavé à l'eau saturée de H<sub>2</sub>S jusqu'à ce que les liquides de lavage ne donnent plus la réaction de Sakaguchi. Les filtrats clairs ainsi obtenus sont réunis et concentrés sous vide à environ 500 ml.

La solution obtenue est traitée par adsorption sur Amberlite IRC 50 (mesh 30-40), alternativement sous forme acide et sous forme de sel de sodium. L'Amberlite IRC 50 acide est la forme commerciale; on la lave, avant l'emploi, à l'acide chlorhydrique 2 N, puis à l'eau, jusqu'à élimination totale de l'acide chlorhydrique. Le sel de sodium de l'Amberlite IRC 50 est préparé de la manière suivante: 100 g de résine, préalablement lavée sur Büchner avec 1 à 2 litres d'acide chlorhydrique 4 N, puis 2 fois avec de l'eau distillée, enfin avec de la soude 2 N jusqu'à ce que le filtrat soit alcalin, sont mis en suspension dans environ 3 volumes de soude N; on chauffe pendant une heure au bain-marie bouillant, on décante, on remet un autre volume de soude N, chauffe à nouveau une heure, décante et recommence l'opération une troisième fois; la résine est alors lavée à l'eau distillée et on la conserve sous forme humide. Au moment de l'emploi et après avoir été introduite dans la colonne appropriée, la résine sodique est tamponnée à pH = 7.0 en faisant passer très lentement à travers la colonne un tampon acéto-acétique M de

pH = 7.0 (3 volumes par volume de résine); la dernière fraction de tampon est laissée en contact pendant  $\frac{1}{4}$  d'heure avec la résine, qui est ensuite rincée à l'eau distillée.

On fait passer la solution à purifier à travers une première colonne ( $2 \times 45$  cm) d'Amberlite IRC 50 acide qui fixe le dérivé guanidique étudié. La colonne est lavée longuement à l'eau distillée, puis on élue le dérivé guanidique par l'acide acétique 2 M, jusqu'à ce que l'éluion, que l'on peut suivre au moyen de la réaction de Sakaguchi, soit presque totale; on termine alors avec un mélange d'acide chlorhydrique concentré et d'acide acétique 2 M (1:100). L'éluat est concentré à siccité sous pression réduite et séché sous vide sur KOH pour éliminer les dernières traces d'acide chlorhydrique. On reprend le résidu par 150 ml d'eau, on amène à pH = 8.0 par addition de lessive de soude et l'on filtre. La solution obtenue est passée à travers une deuxième colonne ( $1.3 \times 35$  cm) d'Amberlite IRC 50 sodique tamponnée à pH = 7.0 selon la technique indiquée ci-dessus. On lave à l'eau et le dérivé guanidique fixé sur la résine est élut par l'acide acétique M; on recueille l'éluat dès que la réaction de Sakaguchi devient positive, éliminant ainsi les premières fractions alcalines et neutres riches en sels. L'éluat acide est évaporé à sec sous pression réduite. Le résidu est repris par environ 80 ml d'eau et filtré à travers une troisième colonne ( $1.1 \times 15$  cm) d'Amberlite IRC 50 acide. Ce dernier passage a pour but d'éliminer les sels qui pourraient provenir de la colonne d'Amberlite IRC 50 sodique. Après lavage de la colonne à l'eau distillée, le dérivé guanidique est élut par l'acide acétique 0.5 M et l'éluat est recueilli à partir du moment où il présente la réaction de Sakaguchi. Lorsque l'éluion est terminée, le liquide est concentré sous pression réduite et le résidu est repris par 5 à 10 ml d'eau.

La solution ainsi obtenue est très pure et se prête à l'isolement de l'hirudonine sous forme de sulfate; celui-ci cristallise dès que l'on acidifie la solution par l'acide sulfurique dilué jusqu'à virage du rouge Congo. On laisse cristalliser  $\frac{1}{2}$  heure à 0°; le précipité est séparé par centrifugation, lavé à l'alcool à 95° et séché à l'alcool-éther puis à l'éther. Les eaux-mères, additionnées de l'alcool de lavage et d'un volume d'alcool, sont abandonnées une nuit au frigidaire; par centrifugation, on recueille une seconde fraction de sulfate moins pure, qui est dissoute dans le minimum d'eau bouillante et recristallisée par refroidissement à 0°. Les deux fractions sont réunies et recristallisées dans l'eau. Le sulfate ainsi obtenu se présente sous forme de fines plaquettes blanches (PF = 203-205° en tube capillaire). Mis en solution et chromatographié sur papier dans divers solvants il donne, par révélation des chromatogrammes à l'*a*-naphtol-hypobromite de sodium<sup>7</sup>, une seule tache correspondant au dérivé guanidique monosubstitué étudié. La révélation à la ninhydrine est négative.

Le rendement de la préparation varie de 160 à 390 mg de sulfate cristallisé pur par kg de sangsues, suivant l'origine des animaux. Les meilleurs rendements ont été obtenus à partir de sangsues fraîchement pêchées (étangs de Trévignon, région de Concarneau).

#### *Etude du picrate: détermination de la formule brute et du poids moléculaire*

Nous n'avons pu obtenir à l'état cristallisé ni la base, ni le chlorhydrate d'hirudonine. Par contre, l'acide picrique donne avec ce dérivé guanidylé un sel bien cristallisé, que nous avons choisi comme base pour l'étude de la constitution de l'hirudonine.

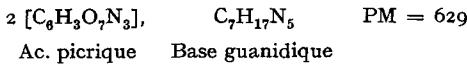
1. *Préparation du picrate d'hirudonine.* 30 mg de sulfate d'hirudonine sont dissous à chaud dans 1 ml d'eau distillée. On ajoute par petites portions une solution de 80 mg d'acide picrique dans 6 ml d'eau distillée. On laisse cristalliser lentement à la température de la pièce, puis une nuit au frigidaire. Le précipité est recueilli par centrifugation, lavé avec le minimum d'alcool et séché à l'alcool-éther puis à l'éther. Le picrate est recristallisé 2 fois par dissolution dans l'alcool à 50% bouillant et refroidissement à 0°. On obtient finalement 50 à 60 mg de picrate d'hirudonine cristallisé en plaquettes jaunes brillantes (PF = 236-238° en tube capillaire).

2. *Détermination de la formule brute du picrate d'hirudonine.* L'analyse élémentaire nous a donné les résultats suivants (chiffres moyens établis d'après les dosages effectués sur différentes préparations): C % = 35.77; H % = 3.85; O % = 35.6; N % = 24.48; cendres nulles; perte de poids sous vide à 100° nulle.

Si l'on tient compte du fait que le dérivé inconnu renferme au minimum 3 atomes d'azote correspondant au radical guanidique et qu'il ne renferme pas d'oxygène\*,

\* Ce dernier renseignement nous a été fourni par l'analyse élémentaire du chloroplatinate, sel également bien cristallisé (PF = 223-224° en tube capillaire).

la formule brute du picrate se rapprochant le plus de nos résultats analytiques,  $C_{19}H_{23}O_{14}N_{11}$ , se décompose ainsi:



La composition élémentaire correspondante serait: C % = théor. 36.25, trouvé 35.77; H % = théor. 3.68, trouvé 3.85; O % = théor. 35.59, trouvé 35.60; N % = théor. 24.48, trouvé 24.48.

*3. Détermination du poids moléculaire du picrate d'hirudonine.* La détermination du poids moléculaire d'un picrate est généralement basée sur le dosage de l'acide picrique. Les méthodes de dosage de celui-ci ne nous satisfaisant pas pleinement, nous avons mis au point une nouvelle technique. Le microdosage colorimétrique que nous avons utilisé au cours de ce travail est basé sur la coloration pourpre intense que donne l'acide picrique avec le cyanure de potassium en solution aqueuse à chaud et qui est due à la formation d'isopurpurate de potassium  $C_8H_4O_6N_5K$ . La sensibilité de cette réaction permet de doser 20 à 100  $\mu g$  d'acide picrique et d'effectuer ainsi la détermination du poids moléculaire d'un picrate sur des quantités de produit  $< 2$  mg.

La technique du dosage est la suivante: on introduit successivement dans un tube à essai la solution à doser, contenant 20 à 120  $\mu g$  d'acide picrique en solution aqueuse, de l'eau distillée q.s.p. 8 ml et 0.4 ml d'une solution aqueuse de cyanure de potassium à 1% récemment préparée. On chauffe 5 minutes au bain-marie bouillant, puis on refroidit rapidement le tube en l'immergeant dans l'eau froide et on lit après 15 minutes au Beckman, cuves 1 cm,  $\lambda = 4,700 \text{ \AA}$ .

Pour déterminer le poids moléculaire du picrate, on pèse très exactement environ 2 mg de produit, que l'on dissout dans un volume connu d'eau distillée (généralement 50 ml). On effectue le dosage de l'acide picrique sur une partie aliquote de cette solution, selon la technique indiquée ci-dessus. On établit en même temps une courbe étalon au moyen d'une solution connue d'acide picrique. Le poids moléculaire du picrate est donné par la formule:

$$PM = \left[ 229 \times \frac{p}{p'} \right]^n$$

où 229 = PM de l'acide picrique;  $p$  = poids de picrate dans la prise d'essai;  $p'$  = poids d'acide picrique dosé dans la prise d'essai;  $n$  = nombre de molécules d'acide picrique par molécule de picrate.

Le poids moléculaire du picrate d'hirudonine déterminé d'après cette méthode, pour  $n = 2$ , est: 626.

L'exactitude de la méthode, d'après les déterminations effectuées avec des picrates de poids moléculaire connu, est de  $\pm 1\%$ .

#### *Caractères de l'hirudonine*

A la différence de la plupart des bases guanidylées, l'hirudonine (base) n'a pu être cristallisée. Elle forme cependant des sels doubles aisément cristallisables avec l'acide sulfurique, l'acide picrique et l'acide chloroplatinique.

Parmi les nombreuses réactions d'identité essayées, seule la réaction de Sakaguchi, caractéristique du radical guanidique monosubstitué, est positive. Les  $R_F$  de l'hirudonine dans différents mélanges solvants, établis sur papier Whatman No. 1, à 20°, en chromatographie ascendante, sont les suivants:

*n*-butanol-eau-acide acétique (73:17:10): 0.03; pyridine-alcool isoamylque-eau-acide acétique (80:40:40:10): 0.24; pyridine-alcool isoamylque-eau (80:40:70): 0.02; pyridine-alcool isoamylque-eau-ammoniaque (80:40:40:10): 0.13; phénol

saturé d'eau: 0.70; *n*-propanol-eau-ammoniaque (73:7:20): 0.15; méthanol-eau-acide acétique (80:20:10): 0.18.

#### DISCUSSION

La nouvelle base biologique isolée chez *Hirudo medicinalis* L. sous forme de sels cristallisés se présente comme un corps renfermant un groupement guanidique monosubstitué (réaction de Sakaguchi positive). Sa formule brute ( $C_7H_{17}N_5$ ) montre qu'elle renferme en outre deux atomes d'azote qui ne sont pas engagés dans des groupements aminés primaires (réaction négative à la ninhydrine) et dont l'un est salifiable au même titre que le radical guanidique (formation de sels doubles avec les acides sulfurique, picrique et chloroplatinique).

Ce corps est le seul dérivé guanidique présent dans le muscle de la Sangsue, où il pourrait contribuer à la formation d'un nouveau phosphagène musculaire. L'analyse de nombreux extraits de muscle de Vertébrés et d'Invertébrés<sup>5,6,1</sup> nous a en effet montré que ce tissu ne renferme généralement en quantité appréciable qu'une seule base guanidylée, variable selon les espèces, et toujours accompagnée du dérivé phosphorylé correspondant.

L'étude du phosphagène et la détermination de la structure du dérivé guanidique de la Sangsue sont en cours.

#### RÉSUMÉ

1. Une nouvelle guanidine monosubstituée biologique a été identifiée dans le muscle de la Sangsue, *Hirudo medicinalis* L.

2. Le nouveau corps, que nous proposons d'appeler hirudonine, a été purifié par chromatographie sur Amberlite IRC 50 et cristallisé à l'état de sels doubles (sulfate, PF = 203-205°; picrate, PF = 236-238°; chloroplatinate, PF = 223-224°).

3. La détermination du poids moléculaire du picrate grâce à une nouvelle méthode de dosage de l'acide picrique et l'analyse élémentaire de ce sel permettent d'attribuer à l'hirudonine la formule brute  $C_7H_{17}N_5$  (PM = 171).

4. La présence de cette nouvelle base biologique, à l'exclusion de tout autre dérivé guanidique, dans le muscle de Sangsue, suggère qu'elle joue un rôle d'accepteur de phosphate analogue à celui assumé par les autres guanidines substituées déjà caractérisées à l'état libre dans les muscles.

#### SUMMARY

1. A new biological monosubstituted guanidine has been identified in the muscle of the leach, *Hirudo medicinalis* L.

2. The new substance, for which we propose the name "hirudonine", has been purified by chromatography on Amberlite IRC 50 and crystallized as the double salts (sulphate, m.p. 203-205°; picrate, m.p. 236-238°; chloroplatinate, m.p. 223-224°).

3. Determination of the molecular weight of the picrate, using a new method of estimating picric acid, and elementary analysis of the salt indicated an empirical formula of  $C_7H_{17}N_5$  (mol.wt. 171) for hirudonine.

4. The presence of this new biological base in the muscle of the leach, and the absence of any other guanidine derivatives, suggests that it plays the part of phosphate acceptor, analogous to that of the other substituted guanidines which have already been described as occurring in the free state in muscles.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> Y. ROBIN, *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1954.
- <sup>2</sup> J. ROCHE, NG-V. THOAI, Y. ROBIN ET L. A. PRADEL, *Compt. rend. soc. biol.*, 1956, (sous presse).
- <sup>3</sup> NG-V. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 533.
- <sup>4</sup> NG-V. THOAI ET Y. ROBIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 76.
- <sup>5</sup> NG-V. THOAI, J. ROCHE, Y. ROBIN ET NG-V. THIEM, *Compt. rend. soc. biol.*, 147 (1953) 1241.
- <sup>6</sup> NG-V. THOAI, J. ROCHE, Y. ROBIN ET NG-V. THIEM, *Compt. rend. soc. biol.*, 147 (1953) 1670.
- <sup>7</sup> J. ROCHE, W. FELIX, Y. ROBIN ET NG-V. THOAI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1688.

Reçu le 18 décembre 1956