

REFERENCES

- ¹ O. HECHTER, *Vitamins and Hormones*, 13 (1955) 293.
- ² H. BERGMAYER AND W. DIRSCHERL, *Biochem. Z.*, 323 (1952) 104.
- ³ N. K. ADAM, J. F. DANIELLI, G. A. D. HASLEWOOD AND G. F. MARRIAN, *Biochem. J.*, 26 (1932) 1233.
- ⁴ J. F. DANIELLI, G. F. MARRIAN AND G. A. D. HASLEWOOD, *Biochem. J.*, 27 (1933) 311.
- ⁵ J. F. DANIELLI, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 746.
- ⁶ N. K. ADAM, F. A. ASKEW AND J. F. DANIELLI, *Biochem. J.*, 29 (1935) 1786.
- ⁷ E. A. DOISY, JR., M. N. HUFFMAN, S. A. THAYER AND E. A. DOISY, *J. Biol. Chem.*, 138 (1941) 283.
- ⁸ S. O. MORGAN AND H. H. LOWRY, *J. Phys. Chem.*, 34 (1930) 2385.
- ⁹ E. A. GUGGENHEIM, *Trans. Faraday Soc.*, 36 (1940) 397.
- ¹⁰ J. W. GIBBS, *Collected Works*, Vol. I, Yale University Press, New Haven, 1948, p. 219ff.
- ¹¹ A. SEIDELL, *Solubilities*, Vol. II, 3rd edition, D. Van Nostrand Co., Inc., New York, 1941.
- ¹² A. SEIDELL, *Solubilities*, Vol. III, (Supplement to 3rd edition) D. Van Nostrand Co., Inc., New York, 1952.
- ¹³ N. K. ADAM, *The Physics and Chemistry of Surfaces*, Oxford University Press, London, 1941.
- ¹⁴ J. F. DANIELLI AND J. T. DAVIES, *Advances in Enzymol.*, 11 (1951) 35.

Received January 28th, 1957

SUR LA PRÉSENCE DE CRÉATINE CHEZ LES INVERTÉBRÉS ET SA SIGNIFICATION BIOLOGIQUE

JEAN ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI ET YVONNE ROBIN

Laboratoire de Biologie marine, Collège de France, Concarneau, Finistère (France)

On a longtemps admis qu'à de rares exceptions près, chez certains Echinodermes et Protochordés^{1,2}, la créatine et son dérivé phosphorylé, la phosphocréatine, étaient biochimiquement caractéristiques des Vertébrés, comme l'arginine et la phospho-arginine l'étaient des Invertébrés. De nombreuses exceptions ne tardèrent cependant pas à se manifester. Dès 1946, de la créatine a été isolée des testicules d'oursin et d'étoile de mer et caractérisée dans ceux de plusieurs ascidies, de Protochordés et d'Annélides marins³. Le muscle de certains Annélides s'est par ailleurs montré renfermer un phosphagène se comportant comme la phosphocréatine lors de son hydrolyse acide en présence de molybdate⁴ et l'identification de la créatine dans les tissus de certains Vers marins⁵, puis celle de la phosphocréatine chez ces mêmes animaux⁶, ont été réalisées par la suite. Enfin, la créatine a été caractérisée chez un Alcyonnaire⁷ et chez des Spongiaires⁸.

Certains auteurs^{9,10,4,11}, ayant interprété la présence de la créatine chez des Invertébrés comme un indice de leur rattachement à des classes de transition entre Vertébrés et Invertébrés, il nous a paru intéressant de préciser la répartition de la créatine et de l'arginine chez ces derniers et d'étudier dans quelle mesure cette répartition pouvait correspondre au degré d'évolution des organismes envisagés. Nous avons donc entrepris de contrôler au moyen de techniques d'identification rigoureuses les résultats déjà acquis, obtenus pour la plupart dans des conditions n'offrant pas de garantie de spécificité (réactions à l' α -naphtol-diacytyle ou à l' α -naphtol-hypobromite sur des extraits tissulaires entre autres), et de les étendre, afin de définir le rôle biologique de la créatine chez les Invertébrés.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'identification de la créatine et de l'arginine dans divers tissus d'Invertébrés a été réalisée par chromatographie sur papier, selon la technique suivante:

(1) *Préparation des extraits*

Les tissus (muscle, tractus digestif ou génital, oeufs, spermatozoïdes, etc.) ont été broyés au sable ou au Waring-Blendor en présence de 2 à 3 volumes d'acide acétique à 2 %. Les homogénats étaient portés cinq minutes au bain-marie bouillant, puis centrifugés. Les extraits ainsi obtenus se sont, dans de nombreux cas, prêtés directement à la chromatographie sur papier dans divers solvants. Cependant, il a parfois été nécessaire de procéder à une purification préalable par passage sur colonne d'échangeur d'ions: les extraits acétiques ont alors été filtrés à travers une petite colonne de permutite C 50 (forme H); après lavage de la colonne à l'eau distillée, l'arginine et la créatine, fixées sur la résine, ont été éluées par l'ammoniaque 2 N, et l'éluat ammoniacal concentré sous vide.

(2) *Solvants*

La chromatographie des extraits a été réalisée sur papier Whatman No. 1 (chromatographie ascendante avec arginine et créatine témoins), dans les mélanges de solvants suivants: I. *n*-butanol-acide acétique-eau (73:10:17); II. pyridine, alcool isoamylique-acide acétique-eau (80:40:10:40); III. pyridine-alcool isoamylique-eau (80:40:70); IV. pyridine-alcool isoamylique-ammoniaque-eau (80:40:10:40); V. *n*-propanol-acide acétique-eau (73:10:17); VI. *n*-propanol-ammoniaque-eau (73:20:7).

(3) *Révélation des chromatogrammes*

Pour la recherche de l'arginine, les chromatogrammes étaient révélés par la réaction de Sakaguchi, spécifique des guanidines monosubstituées: le papier est d'abord pulvérisé avec un mélange préparé extemporanément de 0.2 ml de NaOH 40 % + 0.2 ml de solution aqueuse d'urée à 40 % + 0.2 ml de solution alcoolique d' α -naphтол à 1 % + H₂O q.s.p. 10 ml. Après séchage à froid, le papier est pulvérisé avec une solution d'hypobromite de sodium préparée par dilution 1/4 d'une solution stock récente contenant 0.9 ml de brome dans 100 ml de NaOH 10 %. Les dérivés guanidiques monosubstitués sont révélés sous forme de taches roses sur fond blanc.

Pour la recherche de la créatine, nous avons utilisé: (a) La réaction au diacétyl- α -naphтол, appliquée de la manière suivante: le chromatogramme est pulvérisé avec une solution préparée extemporanément par mélange de 16 ml H₂O + 2 ml NaOH 40 % + 2 ml solution alcoolique d' α -naphтол à 1 % + 1 goutte de diacétyl. La créatine, comme certaines autres guanidines mono- et disubstituées, apparaît après 1 à 2 minutes en violet sur fond crème. (b) La réaction de Jaffé au picrate alcalin, négative avec la créatine, mais positive avec la créatinine qui se forme par cyclisation de cette dernière lorsque le chromatogramme est chauffé pendant 1 heure à l'étuve à 110°. Le chromatogramme ainsi chauffé est pulvérisé avec un mélange de 8 ml acide picrique en solution saturée + 2 ml NaOH 40 %. La créatine cyclisée apparaît en orange sur fond jaune.

La créatine a pu ainsi être caractérisée dans les extraits étudiés non seulement par son R_F dans différents solvants mais aussi par ses critères d'identité: réaction positive avec le réactif au diacétyl- α -naphтол, négative avec le réactif au picrate alcalin avant chauffage du chromatogramme, positive avec ce même réactif après chauffage du chromatogramme pendant 1 heure à 110°.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le Tableau I. Si l'arginine est présente dans tous les tissus d'Invertébrés étudiés, à l'exception du muscle de quelques Annélides et de certains produits génitaux, la créatine n'en est pas moins assez largement répartie chez ces animaux. On la rencontre en effet en quantités importantes chez des Echinodermes (ophiures: *Amphipholis squamata*, *Ophiothrix fragilis*; tous les tissus de l'oursin, *Sphaerechinus granularis*, à l'exception des oeufs; testicules mûrs d'étoile de mer, *Martasterias glacialis*, et d'holothurie, *Leptosynapta inhaerens*), chez des Annélides Polychètes (divers tissus d'*Audouinia tentaculata*, *Dasybranchus caducus*, *Glycera convoluta*, *Lumbriconereis* sp., *Marphysa sanguinea*, *Scolophos armiger*, à l'exception des oeufs; spermatozoïdes d'*Arenicola marina*), chez des Géphyriens (produits génitaux de *Sipunculus nudus*), chez des Coelentérés (spermatozoïdes

d'anémone de mer, *Calliactis parasitica*) et chez des Spongiaires (tissus de diverses éponges; *Halichondria panicea*, *Hymeniacidon caruncula*, *Thetia lyncurium*).

DISCUSSION DES RÉSULTATS

La présence de créatine chez les Invertébrés peut être envisagée schématiquement sous un double aspect: comme un phénomène permanent (créatine du muscle) et comme un phénomène temporaire, ne se manifestant qu'en période de maturité sexuelle (créatine des spermatozoïdes).

Au premier cas se rattachent les animaux (oursins, ophiures, divers Annélides, éponges) dont les tissus et principalement le muscle sont riches en créatine, généralement accompagnée de son dérivé phosphorylé à liaison phosphorique riche en énergie, la phosphocréatine. Cette dernière a en effet été identifiée chez des oursins et des ophiures^{1, 2, 4}, chez des Annélides marins⁶ et chez une éponge^{*12}. La signification de la créatine semble alors liée à la formation d'un phosphagène musculaire, la phosphocréatine, jouant chez ces animaux le rôle assumé par différentes phosphoguanidines monosubstituées chez les autres Invertébrés.

Au second cas se retient des Invertébrés ne renfermant souvent pas, à l'état normal, de créatine dans leurs tissus, mais où ce dérivé apparaît dans les glandes génitales mâles au moment de la maturation sexuelle. La présence de créatine dans les testicules mûrs d'ascidies (*Boltenia* et *Microcosmus*), d'un oursin (*Strongylocentrotus*), d'une étoile de mer (*Asterias forbesii*), d'une holothurie (*Holoturia tubulosa*) et de plusieurs Annélides marins a été signalée par GREENWALD³, qui a pu, dans certains cas, mettre en évidence le dérivé phosphorique labile correspondant. Au cours de notre travail, nous avons confirmé ces résultats chez un oursin (*Sphaerechinus granularis*), une étoile de mer (*Martasterias glacialis*), une holothurie (*Leptosynapta inhaerens*), des Annélides (*Arenicola marina*, *Audouinia tentaculata*, *Dasybranchus caducus*), un Géphyrien (*Sipunculus nudus*) et une anémone de mer (*Calliactis parasitica*). L'absence de créatine dans les testicules en involution de l'étoile de mer, comme son apparition dans les glandes mûres (voir Tableau I), montre bien qu'il s'agit d'un phénomène temporaire, paraissant lié à la production des spermatozoïdes. Toutefois, comme l'avait entrevu GREENWALD³, la présence de créatine dans les produits génitaux mâles ne peut être généralisée à l'ensemble des Invertébrés; nous n'avons en effet décelé aucune trace de ce corps dans les testicules mûrs d'un Arthropode (*Maia squinado*) ni dans ceux d'un Nématode (*Ascaris lumbricoides*).

Si l'on cherche à interpréter le rôle de la créatine dans les spermatozoïdes de certains Invertébrés, il y a lieu de remarquer qu'on la rencontre uniquement dans des espèces à spermatozoïdes flagellés (oursin, étoile de mer, holothurie, div. Annélides, anémone de mer), alors que les espèces à spermatozoïdes amiboïdes, peu mobiles, (*Maia*, *Ascaris*) en sont dépourvues. On peut ainsi envisager que la créatine contribue à la mobilité des spermatozoïdes par l'intermédiaire de son dérivé phosphorique plus labile que ceux des guanidines monosubstituées (phosphoarginine, phosphoglycocyamine, phosphotaurocyamine, phospholombricine). Ainsi s'expliquerait également l'absence de créatine dans les oeufs, constatée par MENDE ET CHAMBERS¹³ chez les oursins et les étoiles de mer, et que nous avons vérifiée chez tous les Invertébrés dont

* Chez une autre éponge, *Hymeniacidon caruncula*, dont les extraits totaux renferment également de la créatine, mais où nous avons identifié le phosphagène à l'argininephosphate, la créatine pourrait provenir des produits génitaux.

TABLEAU I
RÉPARTITION DE LA CRÉATINE ET DE L'ARGININE DANS DIVERS TISSUS D'INVERTÉBRÉS

Espèces animales	Tissus	Créatine	Arginine
ECHINODERMES			
Echinides			
<i>Sphaerechinus granularis</i> Lmk.	Muscles bucaux	+	+
	Tractus intestinal	+	+
	Glandes génitales ♀ mûres	traces	+
	Oeufs	o	+
	Glandes génitales ♂ mûres	+	+
	Liquide spermatique	+	o
Stellerides			
<i>Martasterias glacialis</i> L.	Muscles pédieux	o	+
	Tractus intestinal	o	+
	Glandes génitales ♀ mûres	o	+
	Oeufs	o	+
	Glandes génitales ♂ mûres	+	+
	Glandes génitales ♂ en involution	o	+
Ophiurides			
<i>Amphipholis squamata</i> Da Chiaje	Animal entier	+	+
<i>Ophiotrix fragilis</i> L.	Animal entier	+	+
Holothurides			
<i>Leptosynapta inhaerens</i> Müller*	Muscle	o	+
	Tractus intestinal	o	+
	Glandes génitales ♂ mûres	+	+
ARTHROPODES			
Crustacés			
<i>Maia squinado</i> Risso	Muscle	o	+
	Hépatopancréas	o	+
	Glandes génitales ♀ mûres	o	+
	Oeufs	o	+
	Glandes génitales ♂ mûres	o	+
	Liquide spermatique	o	+
Insectes			
<i>Apis mellifica</i> L.	Animal entier	o	+
<i>Bombyx mori</i> L.	Animal entier	o	+
MOLLUSQUES			
Céphalopodes			
<i>Sepia officinalis</i> L.	Muscle	o	+
	Hépatopancréas	o	+
Gastéropodes			
<i>Helix pomatia</i> L.	Muscle	o	+
	Hépatopancréas	o	+
<i>Limnaea stagnalis</i> L.	Muscle	o	+
	Hépatopancréas	o	+
Lamellibranches			
<i>Mytilus edulis</i> L.	Muscle	o	+
	Hépatopancréas	o	+
<i>Ostrea edulis</i> L.	Muscle	o	+
	Oeufs	o	+
ANNÉLIDES			
Polychètes			
<i>Arenicola marina</i> L.	Muscle	o	o
	Tractus	o	+
	Oeufs	o	o
	Spermatozoïdes	+	o
<i>Audouinia tentaculata</i> Mtg.	Muscle	+	traces
	Tractus	+	+
	Oeufs	o	traces
	Spermatozoïdes	+	traces

* Animal hermaphrodite, mais dont les sexes ne sont pas mûrs en même temps.

TABLEAU I (suite)

RÉPARTITION DE LA CRÉATINE ET DE L'ARGININE DANS DIVERS TISSUS D'INVERTÉBRÉS

<i>Espèces animales</i>	<i>Tissus</i>	<i>Créatine</i>	<i>Arginine</i>
<i>Clymene lumbricoides</i> Qfg.	Muscle	o	o
	Tractus	o	+
<i>Dasybranchus caducus</i> Grube	Muscle	+	traces
	Tractus	+	+
	Spermatozoïdes	+	traces
<i>Glycera convoluta</i> Kfst.	Muscle	+	traces
	Tractus	+	+
<i>Lineus marinus</i> Mtg.	Animal entier	o	+
<i>Lumbriconereis</i> sp.	Muscle	+	traces
	Tractus	+	+
<i>Marphysa sanguinea</i> Mtg.	Muscle	+	o
	Tractus	+	+
<i>Nephtys hombergii</i>	Muscle	o	o
	Tractus	o	+
<i>Nereis diversicolor</i> Müller	Muscle	o	o
	Tractus	o	+
<i>Sabella pavonina</i> Sav.	Animal entier	o	+
<i>Scolophos armiger</i> Müller	Animal entier	+	traces
Oligochètes			
<i>Lumbricus terrestris</i> sp.	Muscle	o	o
	Tractus	o	+
Hirudinés			
<i>Hirudo medicinalis</i> L.	Muscle	o	o
	Tractus	o	+
GÉPHYRIENS			
<i>Phascolosoma elongatum</i> Kfst.	Muscle	o	traces
	Tractus	o	traces
<i>Sipunculus nudus</i> L.	Muscle	o	+
	Produits génitaux (œufs + spermatozoïdes)	+	+
NÉMATODES			
<i>Ascaris lumbricoides</i> L.	Animal entier	o	+
	Glandes génitales ♀ mûres	o	+
	Glandes génitales ♂ mûres	o	+
COELENTERÉS			
<i>Actinia equina</i> L.	Animal entier	o	+
<i>Anemonia sulcata</i> Penn.	Animal entier	traces	+
<i>Calliactis parasitica</i> Couch.	Animal entier	traces	+
	Muscle	o	+
	Spermatozoïdes	+	traces
SPONGIAIRES			
<i>Halichondria panicea</i> Johnstone	Animal entier	+	+
<i>Hymeniacidon caruncula</i> Bowerbank	Animal entier	+	+
<i>Thetia lyncurium</i> L.	Animal entier	+	+
PROTOZOAIRES			
<i>Tetrahymena geleii</i>	Animal entier	o	+

nous avons pu étudier les œufs au cours de ce travail (divers Echinodermes, Arthropodes, Mollusques et Annélides).

Notons enfin que la créatine est plus répandue chez les Invertébrés qu'on ne l'a longtemps supposé; on la rencontre en effet chez des Echinodermes, des Annélides,

des Géphyriens, des Coelentérés et des Spongiaires, où elle ne saurait cependant constituer un caractère de classe, puisque certaines espèces en sont dépourvues. Étant donnée la diversité de cette répartition, la signification biologique de la créatine dans le degré d'évolution des organismes étudiés n'apparaît pas clairement. Toutefois les anciennes théories, basées sur la présence de créatine chez les Echinodermes et faisant de ces animaux une classe de transition entre les Vertébrés et les Invertébrés^{9,10,4,11} ne sauraient désormais être retenues.

RÉSUMÉ

1. La répartition comparée de la créatine et de l'arginine a été étudiée, par chromatographie sur papier, dans divers extraits tissulaires d'Invertébrés.

2. Les résultats obtenus montrent que la créatine, moins universellement répandue chez ces animaux que l'arginine, y est néanmoins présente en quantités importantes chez des Echinodermes, des Annélides, des Géphyriens, des Coelentérés et des Spongiaires, où elle peut être rencontrée soit dans le muscle et divers tissus (à l'exception des oeufs), soit dans les spermatozoïdes.

3. Selon les modalités de sa répartition, la créatine peut être, d'une façon permanente, le constituant d'un phosphagène musculaire (divers Echinodermes, Annélides et Spongiaires) ou, temporairement, celui du phosphagène des spermatozoïdes (divers Echinodermes, Annélides, Géphyriens et Coelentérés).

4. En raison de la répartition de la créatine dans des espèces très variées, la présence de ce corps dans certains groupes d'Invertébrés ne saurait être invoquée comme un argument biochimique en faveur de leur rattachement à des classes de transition entre Vertébrés et Invertébrés.

SUMMARY

1. The relative distribution of creatine and arginine has been studied, by paper chromatography, in various tissue extracts of invertebrates.

2. The results obtained show that creatine, less universally present in these animals than arginine, is nevertheless present in significant quantities in echinoderms, annelids, gephyreans, coelenterates and sponges, in which it can be found either in the muscle and various tissues (with the exception of the eggs) or in the spermatozooids.

3. According to the circumstances of distribution the creatine may be, permanently, a constituent of muscular phosphagen (various echinoderms, annelids and sponges) or, temporarily, a constituent of the phosphagen of spermatozooids (various echinoderms, gephyreans and coelenterates).

4. Considering the distribution of creatine in widely differing species, the presence of this substance in certain groups of the invertebrates should not be invoked as a biochemical argument in favour of their attachment to the transition classes between the vertebrates and the invertebrates.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ O. MEYERHOF, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 12 (1928) 536; *Coll. Net.*, 16 (1941) 177.
- ² J. NEEDHAM, D. M. NEEDHAM, E. BALDWIN ET W. H. YUDKIN, *Proc. Roy. Soc. (London) B*, 110 (1932) 260.
- ³ I. GREENWALD, *J. Biol. Chem.*, 162 (1946) 239.
- ⁴ E. BALDWIN ET W. H. YUDKIN, *Proc. Roy. Soc. (London), B*, 136 (1950) 614.
- ⁵ Y. ROBIN, *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Paris, 1954.
- ⁶ G. E. HOBSON ET K. R. REES, *Biochem. J.*, 61 (1955) 549.
- ⁷ J. ROCHE, NG-V. THOI ET J. L. HATT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 71.
- ⁸ I. GARCIA ET F. MIRANDA, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 1187.
- ⁹ O. FLÖSSNER, *Ber. ges. Physiol. u. exptl. Pharmacol.*, 61 (1931) 351; *Sitzber. Ges. Beförder. ges. Naturw. Marburg*, 67 (1932) 1.
- ¹⁰ J. NEEDHAM ET D. M. NEEDHAM, *Science Progr.*, 26 (1932) 626.
- ¹¹ E. BALDWIN, dans *An Introduction to Comparative Biochemistry*, 2ème éd., Cambridge University Press, 1953, pp. 340-42.
- ¹² J. ROCHE ET Y. ROBIN, *Compt. rend. soc. biol.*, 148 (1954) 541.
- ¹³ T. J. MENDE ET E. L. CHAMBERS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 45 (1953) 105.

Reçu le 18 décembre 1956