

ABSENCE DE GROUPEMENTS AMINÉS LIBRES DANS L'OCYTOCINE

par

MICHEL PRIVAT DE GARILHE,
 HANS MAIER-HÜSER ET CLAUDE FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

L'ocytocine a été récemment isolée à l'état pur par LIVERMORE ET DU VIGNEAUD¹. L'analyse des acides aminés qui la constituent et la détermination de son poids moléculaire^{2,3}, indiquent qu'il s'agit d'un peptide contenant un résidu de chacun des huit aminoacides suivants: glycocolle, leucine, *isoleucine*, proline, tyrosine, acide aspartique, acide glutamique, cystine*, et possédant trois groupements facilement libérables sous forme d'ammoniac, vraisemblablement trois groupements amide. La simplicité relative de cette composition permet d'aborder avec espoir de succès la structure de l'ocytocine. L'une des premières recherches à faire dans ce sens est celle de savoir si l'ocytocine est un peptide présentant des extrémités, et dans ce cas, de déterminer le ou les acides aminés éventuellement placés en tête et en queue de chaîne**, ou bien si l'ocytocine est un peptide cyclique. Dans le présent travail, nous avons cherché à caractériser la présence éventuelle du ou des acides aminés initiaux.

On sait que plusieurs méthodes permettent de caractériser les acides aminés initiaux dans un peptide ou dans une protéine. Parmi celles-ci, deux ont été utilisées ici: celle de SANGER⁴ mettant en jeu la formation de dérivés dinitrophénylés et celle mettant en jeu la destruction des groupes aminés initiaux par l'acide nitreux, selon CONSDEN, GORDON ET MARTIN⁵.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'ocytocine utilisée, préparée au laboratoire d'après la technique de MAIER-HÜSER⁶, est un produit dont l'activité ocytocique, calculée pour une teneur en azote total de 16%³ est comprise entre 800 et 900 U.I./mg (mesures faites sur l'utérus de cobaye), et dont l'activité vasopressique (mesurée sur le rat d'après la technique de LANDGREBE, MACAULAY ET WARING⁷) est inférieure à 3 unités de vasopressine pour 100 unités d'ocytocine.

* Une étude des acides aminés de l'ocytocine pure nous avait permis de mettre en évidence la présence de ces mêmes acides aminés dans l'ocytocine. La publication de PIERCE ET DU VIGNEAUD² ayant eu lieu entre temps, il nous a paru inutile de publier nos résultats, que nous signalons simplement ici comme une confirmation de ceux des auteurs américains.

** Acides aminés initiaux ou en tête de chaîne = acides aminés dont le groupe NH₂ est libre. Acides aminés terminaux ou en queue de chaîne = acides aminés dont le groupe COOH est libre.

Bibliographie p. 476.

1. Action du fluorodinitrobenzène sur l'ocytocine

1 mg d'ocytocine pure est dissous dans 2 gouttes de solution de bicarbonate de sodium à 1% ; on vérifie après dissolution que le p_H de la solution est voisin de 8.5 ; on ajoute ensuite 3 gouttes d'une solution fraîchement préparée de fluorodinitrobenzène à 4% dans l'alcool éthylique à 95°. Le tout, contenu dans un tube scellé, est agité à la température ordinaire pendant deux heures, temps au bout duquel on évapore à sec. On épouse le résidu trois fois avec quelques gouttes d'éther pour éliminer le plus possible l'excès de fluorodinitrobenzène. On hydrolyse ce résidu avec 0.3 ml de HCl 6 N, en tube scellé, pendant cinq heures à 110°. L'hydrolysat du dérivé dinitrophénylé obtenu, toujours en solution dans HCl 6 N, est épousé à l'éther ; tout dérivé dinitrophénylé formé à partir d'un acide aminé initial, s'il en existe, doit alors passer dans l'éther. Les autres acides aminés restent en solution acide. La fraction éthéro-soluble et la fraction acido-soluble sont alors étudiées séparément, chacune par chromatographie sur papier.

Etude de la fraction éthéro-soluble. La fraction éthérée contient toujours un peu de dinitrophénol provenant de la décomposition du fluorodinitrobenzène dont on n'a pas pu se débarrasser complètement. Il est possible d'éliminer ce dinitrophénol au moyen d'une chromatographie sur papier (Durieux 122) en utilisant comme solvant un mélange décaline + acide acétique^{8*} : on dépose la solution éthérée en haut de la feuille ; après le développement par le solvant, le dinitrophénol est complètement entraîné tandis que les dinitrophénylaminoacides éventuellement présents restent au point de départ. En effectuant une telle chromatographie sur la fraction éthérosoluble obtenue par traitement de l'ocytocine, on constate que la presque totalité de ce qui est dissous dans l'éther est entraîné par le mélange décaline + acide acétique. Il ne reste sur la ligne de départ qu'un liseré faiblement jaune correspondant à l'ancien contours des taches. On découpe la bande de papier renfermant ce liseré jaunâtre et débarrassé de toute trace de dinitrophénol ; on la sèche puis on élue son contenu par une solution de bicarbonate de sodium à 2% et on chromatographie à nouveau sur papier (Schleicher et Schüll 507) en utilisant comme solvant un mélange phénol + alcool isoamylique + eau^{**}, en présence de vapeur d'ammoniaque sous faible tension^{***}. On chromatographie parallèlement sur la même feuille les dinitrophénylaminoacides du Tableau I, synthétisés comme témoins. La substance à laquelle était dû le liseré jaunâtre forme alors une tache très faible dont le R_F (0.51) ne correspond à celui daucun des dérivés dinitrophénylés témoins. Il s'agit là évidemment d'un artefact. Il n'existe donc pas d'acide dinitrophénylaminé dans cette fraction.

Etude de la fraction acido-soluble. La fraction acido-soluble est soumise, en même temps qu'une solution d'acides aminés témoins et qu'un hydrolysat total d'ocytocine non traitée, à diverses chromatographies sur papier, qui toutes donnent des résultats concordants :

En utilisant comme solvant du phénol saturé d'eau, additionné de 0.1% de cupron, sur papier Schleicher et Schüll 507, et en révélant par la ninhydrine tous les acides aminés présents, la proline étant en outre décelée par l'isatine, on constate que la fraction

* Décaline saturée d'acide acétique anhydre. Ce mélange contient environ 1 partie d'acide acétique pour 10 parties de décaline.

** Mélange obtenu en agitant une partie de phénol pur, une partie d'alcool isoamylique et une partie d'eau, et en prélevant la phase surnageante que l'on filtre.

*** Au fond de la cage à chromatographie sont placés 300 ml d'une solution d'ammoniaque à 0.034% de NH₃.

TABLEAU I

R_F DE QUELQUES ACIDES DINITROPHÉNYLAMINÉSMélange phénol + alcool *isoamylique* + eau en présence de NH₃; Papier Schleicher et Schüll 507

Dérivé dinitrophénylé	<i>R_F</i>	Dérivé dinitrophénylé	<i>R_F</i>
Acide aspartique	0.03	Glycocolle	0.44
Acide glutamique	0.07	Valine	0.69
Cystine	0.12	Histidine	0.70
Proline	0.27	Phénylalanine	0.75
Tyrosine	0.27	<i>Isoleucine</i>	0.76
Dinitrophénol	0.28	Leucine	0.78
Sérine	0.32	Lysine (di)	0.79
Thrénine	0.43	α -Arginine	0.83

acido-soluble fournit nettement les taches correspondant aux substances suivantes, dont les *R_F* sont indiqués entre parenthèses, et à celles-là seulement: acide aspartique (0.01), cystine (0.02), acide glutamique (0.07), glycocolle (0.10), leucine et *isoleucine*, non séparées (0.59), proline (0.63), *o*-dinitrophényltyrosine (0.80).

En utilisant sur la même espèce de papier un mélange butanol + acide acétique + eau*, on obtient, toujours à partir de la fraction acido-soluble, les taches suivantes et celles-là seulement: cystine (0.03), acide aspartique (0.12), glycocolle (0.14), acide glutamique (0.18), proline (0.26), *isoleucine* (0.59), leucine (0.67), *o*-dinitrophényltyrosine (0.73). La séparation de ces taches, et en particulier la séparation de celles correspondant respectivement à la leucine, à l'*isoleucine* et à l'*o*-dinitrophényltyrosine, est ici excellente.

On retrouve donc dans la fraction acido-soluble tous les acides aminés de l'ocytocine sous leur forme libre, sauf la tyrosine que l'on retrouve sous forme de son dérivé *o*-dinitrophénylé.

Remarques

1. En ce qui concerne la tyrosine, on observe que dans tous les chromatogrammes de la fraction acido-soluble, la tyrosine a disparu; par contre, ces chromatogrammes montrent une tache ne correspondant à aucun des acides aminés de l'ocytocine non traitée, tache dont le *R_F*, avec les solvants utilisés ici, est supérieur à celui de n'importe lequel des autres acides aminés présents. La comparaison de cette tache avec celle fournie par de l'*o*-dinitrophényltyrosine témoin**, permet d'affirmer que cette tache correspond bien à cette dernière substance. La transformation quantitative de tyrosine en *o*-dinitrophényltyrosine, est ici particulièrement importante: étant donné en effet que le groupe phénolique de la tyrosine réagit avec le fluorodinitrobenzène plus difficilement que les groupes aminés primaires ou secondaires (proline), la formation d'*o*-dinitrophényltyrosine au cours du traitement de l'ocytocine par le fluorodinitrobenzène, prouve que le peptide se trouvait dans des conditions convenables pour réagir.

2. En ce qui concerne le glycocolle, on peut se demander si le fait de ne pas trouver de dinitrophénylglycocolle dans la fraction éthéro-soluble et de retrouver quantitative-

* Mélange obtenu en agitant 40 parties de butanol, 10 parties d'acide acétique et 50 parties d'eau, et en prélevant la phase surnageante que l'on filtre. La phase aqueuse est placée au fond de la cage à chromatographie.

** *o*-Dinitrophényltyrosine synthétisée d'après SANGER⁴ à partir de la chloracétyltyrosine.

ment le glycocolle libre dans la fraction acido-soluble est bien une preuve que son groupe aminé, dans l'ocytocine, n'est pas libre. On pourrait en effet penser que le dinitrophényl-glycocolle qui se formerait au cas où le glycocolle serait en tête de chaîne peptidique, se détruiraient au cours de l'hydrolyse du dinitrophénylpeptide, par suite de sa fragilité bien connue^{9,10} en régénérant une quantité importante de glycocolle libre. Les expériences suivantes montrent que cette hypothèse est à rejeter:

a. On traite 3.5 mg de dinitrophénylglycocolle pur par 0.5 ml de HCl 6 N, en tube scellé, pendant 15 heures à 110°. On obtient alors une solution jaune orangé contenant en suspension un produit noirâtre rappelant les humines qui se forment lors de l'hydrolyse de certaines protéines. On élimine HCl par évaporation à sec, sous vide, on reprend par quelques gouttes d'eau distillée, on filtre, puis on évapore de nouveau à sec; on remet enfin en solution dans 1 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 1%. Cette solution est chromatographiée (phénol + cupron, papier Whatman no. 4) en même temps qu'une solution témoin de 3.5 mg de dinitrophénylglycocolle dans 1 ml de la même solution de bicarbonate. On constate ainsi que la solution correspondant au dinitrophénylglycocolle traité renferme encore une quantité notable, quoique inférieure à la quantité initiale, de dinitrophénylglycocolle, mais ne contient ni glycocolle libre ni dinitrophénol.

b. On synthétise le dérivé dinitrophénylé de la glycylleucine en partant de 0.3 mg de ce dipeptide; cette quantité est de l'ordre de grandeur de tout dipeptide isolé à partir de 1 mg d'ocytocine. Ce dérivé dinitrophénylé est traité par HCl dans les mêmes conditions que la dinitrophénylocytocine, et l'hydrolysat est épousé à l'éther. L'analyse chromatographique (phénol + alcool isoamylique + eau, papier Schleicher et Schüll 507) montre que la fraction éthérösoluble renferme environ dix fois plus de dinitrophénylglycocolle qu'il est nécessaire pour caractériser cette substance par la méthode employée. Quant à la fraction acido-soluble, elle ne renferme pas trace de glycocolle.

3. En ce qui concerne la proline, dont le dérivé dinitrophénylé paraît encore plus fragile que celui du glycocolle⁹, les mêmes réflexions que pour ce dernier acide aminé viennent à l'esprit. En fait, les expériences suivantes confirment que le groupe NH de la proline n'est pas libre dans l'ocytocine:

a. On traite 2.4 mg de dinitrophénylproline pure par 0.3 ml de HCl 6 N, en tube scellé à 110° pendant 5 heures. La solution obtenue est épousée par l'éther. La fraction éthérösoluble et la fraction acido-soluble sont analysées chacune par chromatographies sur papier, dans les mêmes conditions que pour la dinitrophénylocytocine. On retrouve ainsi une quantité importante (au moins 30% de la quantité initiale) de la dinitrophénylproline dans la phase éthérösoluble, et seulement des traces d'une substance qui réagit sur le papier à l'isatine, comme le fait la proline, dans la fraction acido-soluble.

b. On traite 0.9 mg de dinitrophénylocytocine par HCl 10 N, en tube scellé, à 110° pendant 3 heures. Dans ces conditions, la dinitrophénylproline, si elle existe, ne doit pas être sensiblement décomposée⁹. Au bout de 3 heures, la solution acide est diluée par de l'eau distillée de telle sorte que la concentration de HCl soit ramenée à 6 N. On extrait à l'éther. La phase aqueuse acide, séparée de la phase éthérée et soigneusement débarrassée de l'éther dissous, est ensuite replacée en tube scellé à 110° et maintenue à cette température pendant 19 heures.

La fraction éthérösoluble, correspondant à une hydrolyse de 3 heures par HCl 10 N, est débarrassée du dinitrophénol par une première chromatographie utilisant le mélange décaline + acide acétique; le résidu est ensuite chromatographié sur papier Durieux 122

à l'aide du mélange tétrachlorure de carbone 56 + isopropanol 40 + solution aqueuse de benzoate de potassium $M/20^{11}$. Une telle chromatographie ne met en évidence qu'une très faible tache, située à l'emplacement que pourrait occuper la dinitrophénylproline, mais correspondant à une quantité inférieure à 5 μg de cette substance, ce qui représente 2 à 3 % seulement de la quantité de dinitrophénylproline qui aurait dû se former si le groupe NH de la proline avait été libre dans l'ocytocine. C'est donc un résultat négligeable.

La fraction acido-soluble, correspondant à une hydrolyse de 3 heures par HCl 10 N, suivie d'une hydrolyse de 19 heures par HCl 6 N, a été débarrassée de HCl en excès par les opérations habituelles. Chromatographiée sur papier Whatman no. 1, en utilisant le mélange butanol + acide acétique + eau, elle s'est montrée renfermer tous les acides aminés de l'ocytocine, et en particulier la proline. Par comparaison avec une quantité déterminée de proline témoin, on constate que l'on retrouve dans la fraction en question la quasi-totalité de la proline initialement contenue dans l'ocytocine.

2. Action de l'acide nitreux sur l'ocytocine

Etant donné que l'ocytocine ne renferme qu'une molécule de chacun des acides aminés qui la constituent, la réaction de l'acide nitreux sur le peptide est ici une méthode de choix pour la caractérisation d'un acide aminé éventuellement placé en tête de chaîne : un tel acide aminé devrait en effet, après hydrolyse du peptide traité par l'acide nitreux, avoir totalement disparu de tout chromatogramme sur papier.

0.5 mg d'ocytocine en solution dans une goutte de HCl 6 N sont placés sur un verre de montre et soumis à l'action des vapeurs nitreuses pendant 25 minutes, dans une enceinte dont la température est maintenue entre 30 et 35° par immersion dans un thermostat. La solution est ensuite évaporée plusieurs fois sous vide, après additions successives de HCl 6 N pour chasser les composés nitreux. Le résidu est hydrolysé par 0.2 ml de HCl 6 N, en tube scellé, 15 heures à 110°, et l'hydrolysat est soumis aux opérations habituelles, avant d'être chromatographié sur papier*.

La chromatographie sur papier de l'hydrolysat obtenu à partir de l'ocytocine traitée par l'acide nitreux, est faite parallèlement à celle d'un hydrolysat d'ocytocine non traitée, en utilisant le mélange butanol + acide acétique + eau, sur papier Schleicher et Schüll 507. Sauf en ce qui concerne la tyrosine, on retrouve quantitativement les mêmes acides aminés dans les chromatogrammes correspondant à l'ocytocine traitée et à l'ocytocine témoin. Le chromatogramme correspondant à l'ocytocine traitée ne montre plus que des traces de tyrosine ; mais la tyrosine de l'ocytocine n'a pas été désaminée : elle a fourni un produit de réaction secondaire jaunâtre, visible avant révélation par la ninhydrine, de même R_F (0.18) que celui de l'acide glutamique. Il s'agit là d'un produit résultant de la nitrosation du noyau et l'on sait⁵ que la formation de ce produit s'observe couramment au cours du traitement, par l'acide nitreux, d'un peptide contenant de la tyrosine, même lorsque celle-ci est à l'intérieur de la chaîne peptidique.

On peut donc conclure que, dans l'ocytocine, aucun acide aminé ne présente de groupe NH₂ susceptible de réagir avec l'acide nitreux.

* Nous avons vérifié que cette technique, appliquée à l'alanylglycine et à la glycylleucine, permet d'obtenir la disparition radicale des acides aminés initiaux de ces peptides.

DISCUSSION

L'ensemble des résultats précédents conduit à la conclusion que l'ocytocine est un peptide ne possédant pas de groupe aminé, primaire ou secondaire, libre. Cette conclusion pourrait faire penser au premier abord que l'ocytocine est un peptide cyclique, ou plus exactement, du fait de la présence de cystine dans la molécule, un peptide bicyclique. Mais on pourrait aussi imaginer que l'ocytocine ne présente qu'un seul cycle; d'après PIERCE ET DU VIGNEAUD³ en effet, il existe dans l'ocytocine trois groupes amide: on peut supposer que deux d'entre eux correspondent aux deux groupes carboxyliques apportés par le résidu d'acide aspartique et par le résidu d'acide glutamique, et que le troisième nécessite la présence d'un troisième groupe carboxylique, ce qui, par contre coup, implique la présence dans l'ocytocine d'un groupe amine disponible. Pour accorder cette manière de voir avec les résultats actuels, on pourrait alors supposer que ce groupe amine primaire ou secondaire, appartenant au premier acide aminé de la chaîne, soit substitué par un radical non azoté tel qu'un radical acétyle par exemple. Mais ce ne sont là que des hypothèses. Pour savoir ce qu'il en est, nous poursuivons actuellement des essais de détermination du troisième groupe carboxylique amidé éventuellement présent, et de détermination du radical hypothétique fixé sur le groupe amine initial.

RÉSUMÉ

Aucun acide aminé engagé dans la molécule d'ocytocine ne réagit ni avec le fluorodinitrobenzène, ni avec l'acide nitreux. L'ocytocine est donc un peptide ne possédant pas de groupe aminé, primaire ou secondaire, libre. L'ocytocine pourrait être ainsi soit un peptide bicyclique, du fait de la présence de cystine, soit un peptide monocyclique dont le groupement carboxylique terminal se trouverait sous forme d'amide, et dont le groupe aminé initial serait substitué par un radical non azoté.

SUMMARY

The amino acids constituting the oxytocine molecule do not react with fluorodinitrobenzene or with nitrous acid. Therefore oxytocine is a peptide which does not possess a free, primary or secondary amino group. Oxytocine could be either a bicyclic peptide, because of the presence of cystine, or a monocyclic peptide in which the end carboxylic group is an amide group, and the initial amino group is substituted by a nitrogen-free radical.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Aminosäuren aus denen das Ocytocin-Molekül zusammengesetzt ist reagieren weder mit Fluorodinitrobenzol noch mit salpetriger Säure. Das Ocytocin ist also ein Peptid, welches keine freie, primäre oder sekundäre Aminogruppe enthält. Das Ocytocin könnte entweder — durch die Gegenwart von Cystin — ein bicyclisches Peptid sein, oder ein monocyclisches Peptid, dessen endständige Carboxylgruppe als Amid vorliegen würde und dessen erste Aminogruppe durch einen stickstofffreien Rest substituiert wäre.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. H. LIVERMORE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 180 (1949) 365.
- ² J. G. PIERCE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 359.
- ³ J. G. PIERCE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 77.
- ⁴ F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- ⁵ R. CONSDEN, A. H. GORDON ET A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 41 (1947) 590.
- ⁶ H. MAIER-HÜSER, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- ⁷ F. W. LANDGREBE, M. H. I. MACAULAY ET H. WARING, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh B*, 62 (1946) 202.
- ⁸ G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- ⁹ R. P. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- ¹⁰ D. W. WOOLLEY, *J. Biol. Chem.*, 179 (1951) 593.
- ¹¹ R. MONIER ET L. PÉNASSE, *Compt. rend.*, 230 (1950) 1176.