

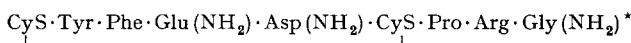
LA STRUCTURE DE LA VASOPRESSINE DE BOEUF

par

ROGER ACHER ET JACQUELINE CHAUVET

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

La structure de la vasopressine de boeuf



a été établie indépendamment par DU VIGNEAUD, LAWLER ET POPENOE¹ et par nous mêmes². Nous publions ici le détail des investigations nous ayant permis de démontrer cette structure.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Le produit** que nous avons étudié a été purifié selon le procédé de FROMAGEOT *et al.*⁵. La pureté a été contrôlée par ionophorèse sur papier (papier Whatman No. 3 tampon citrate-phosphate 0.05 M à pH 4, tension 10 volts/cm) et par chromatographie dans différents solvants (mélanges butanol-acide formique, pyridine-collidine, phénol saturé de tampon à pH 4, *cf.* Tableau II); après hydrolyse par HCl 5.7 N, on identifie par chromatographie sur papier (solvants butanol-acide formique, et phénol-ammoniac) huit acides aminés: cystine, arginine, acide glutamique, acide aspartique, glycine, proline, phénylalanine et tyrosine⁶. La composition quantitative est déterminée par chromatographie sur Dowex 50 selon la méthode de MOORE ET STEIN⁸. Les résultats (Tableau I) sont en parfait accord avec ceux obtenus par TURNER, PIERCE ET DU VIGNEAUD⁷.

Nous avons entrepris l'étude de la structure en nous basant sur le fait que la vasopressine ne contient par molécule qu'un seul résidu de chaque acide aminé constituant.

Dégénération dirigée de la molécule

Oxydation par l'acide performique. La présence de la cystine pouvait suggérer l'existence de deux chaînes peptidiques unies par un pont disulfure, disposition que l'on observe dans la molécule d'insuline¹³. Dans cette éventualité, il devait être facile de

* Les acides aminés sont représentés ici en utilisant les abréviations de BRAND ET EDSALL³, l'acide cystéique étant en outre figuré par le symbole CySO₃H. D'autre part nous avons adopté la convention de SANGER⁴ suivant laquelle lorsque l'enchaînement de deux acides aminés est connu, les symboles sont séparés par un point, l'acide aminé qui participe à la liaison par son carboxyle étant écrit en premier; lorsque l'enchaînement est inconnu, les symboles sont placés entre parenthèses et séparés par une virgule.

** La matière première nous a été aimablement fournie par les établissements Roussel que nous sommes heureux de remercier.

TABLEAU I
COMPOSITION DE LA VASOPRESSINE DE BOEUF

Acide aminé	Dosage selon MOORE ET STEIN ⁸	Dosage colorimé- trique spécifique	Référence
Acide aspartique	0.97	—	
Acide glutamique	1.03	—	
Proline	1.00	1.00	(8)
Glycine	1.12	—	
Tyrosine	0.70	0.96	(9)
Cystine	0.76	0.98	(10)
Phénylalanine	0.93	—	
Arginine	1.07	0.97	(11)
Ammoniac	3.30		

Les résultats sont exprimés en molécules par rapport à une molécule de proline en raison de la fidélité du dosage spécifique de CHINARD⁸. L'activité du produit est d'environ 500 U.I. par micro-molécule (activité mesurée sur le rat selon la méthode de LANDGREBE *et al.*¹²).

séparer l'un de l'autre, après oxydation par l'acide performique, deux fragments dont un seul eût renfermé un résidu basique.

8.5 mg de vasopressine dissous dans 0.1 ml du mélange oxydant (1 partie de H_2O_2 à 30 % pour 15 parties de HCOOH à 98 %) sont laissés 50 minutes à la température du laboratoire. On ajoute alors 0.1 ml d'eau et on évapore à sec en dessiccateur sur soude. On ajoute de nouveau 0.2 ml d'eau et on évapore une deuxième fois à sec. Les résultats de l'oxydation sont constatés par hydrolyse d'une fraction au moyen de HCl 5.7 N et chromatographie sur papier. Pour distinguer l'acide cystéique de la cystine on utilise le phénol tamponné à pH 10 suivant Mc FARREN¹⁴: l'acide cystéique se place au-dessus de l'acide aspartique. On observe ainsi que l'oxydation de la cystine est totale. D'autre part, par chromatographie sur papier dans les solvants habituels (butanol-acide formique et phénol-ammoniac) on constate que les autres acides aminés ne sont pas touchés, à l'exception de la tyrosine dont une partie s'est transformée en un nouvel acide aminé, très probablement la tyrosine X décrite par SANGER ET TUPPY¹⁵. Cette modification de la tyrosine ne s'observe pas si l'oxydation est effectuée à — 10° et le produit rapidement lyophilisé.

Le produit d'oxydation est étudié par ionophorèse sur papier et par chromatographie dans différents solvants. La vasopressine et l'arginine sont placées comme témoins. Les révélations sont effectuées avec la ninhydrine, l' α -nitroso- β -naphtol (réactif de la tyrosine) et l' α -naphtol (réactif de l'arginine)¹⁶. Dans tous les cas on ne peut mettre en évidence dans le matériel oxydé qu'une seule substance qui, comme la vasopressine, réagit mal à la ninhydrine mais bien avec les deux autres réactifs. Le Tableau II indique les résultats obtenus au cours de ces essais.

Il apparaît donc que la molécule de vasopressine est constituée par une chaîne peptidique unique.

Etude de l'enchaînement initial. Pour déterminer si la chaîne peptidique unique est cyclique ou ouverte, nous avons utilisé la technique de SANGER et la technique de EDMAN.

*Technique de SANGER*¹⁷. Environ 2 mg de vasopressine oxydée sont dissous dans 0.05 ml de triméthylamine à 5 %; on ajoute 0.1 ml d'une solution de fluorodinitrobenzène à 2 % dans l'acétone et on agite pendant 3 heures. L'excès de réactif est éliminé par extraction à l'éther. On évapore à sec dans le vide sur acide sulfurique. On reprend par 0.1 ml de HCl 5.7 N et hydrolyse à 105°, en tube scellé, pendant 9 heures. L'hydrolysat est extrait à l'éther: la quasi-totalité de la coloration jaune reste dans la phase aqueuse acide. Des huit dérivés dinitrophénolés que peuvent donner les constituants

TABLEAU II

COMPORTEMENT DE LA VASOPRESSINE ET DE LA VASOPRESSINE OXYDÉE
AU COURS DE CHROMATOGRAPHIES ET DE L'IONOPHORÈSE

Chromatographie. Papier Whatman No. 1; solvants: I = *n*-butanol 75 – acide formique 15 – eau 10; II = phénol saturé de tampon citrate phosphate 0.067 *M* à pH 4 (14); III = pyridine 60 – collidine 20 – eau 20. Les chiffres indiqués représentent les *R_F* des substances.

Ionophorèse. Papier Whatman No. 3; tampon citrate – phosphate 0.05 *M* à pH 4; tension 10 volts/cm. Les chiffres indiquent les distances en cm parcourues, après 7 heures, par les substances en direction de la cathode.

Substance	Chromatographie sur papier			Ionophorèse
	Solvants I	Solvants II	Solvants III	
Arginine	0.08	0.27	0.05	10
Vasopressine	0.04	0.81	0.80	5
Vasopressine oxydée	0.02	0.90	0.72	1

de la vasopressine oxydée, seuls celui de l'acide cystéique (DNP-acide cystéique) et celui de l'arginine sont acidosolubles. On peut facilement les identifier en utilisant la chromatographie sur papier dans le mélange butanol – acide formique – eau: le DNP-acide cystéique se place au niveau de l'alanine et le DNP-arginine au niveau de la leucine. Une fraction de la phase aqueuse acide est évaporée à sec et chromatographiée en présence des dérivés DNP synthétiques. Un seul dérivé dinitrophényl jaune, le DNP-acide cystéique, est ainsi identifié. Les autres acides aminés ne sont pas affectés par le dinitrofluorobenzène à l'exception de la tyrosine qui donne la O-DNP-tyrosine. D'autre part, la phase éthérée est évaporée à sec et chromatographiée sur papier dans le mélange phénol — alcool *isoamylique* suivant BISERTE ET OSTEUX¹⁸. On n'observe qu'une seule tache significative correspondant au dinitrophénol, artefact qui se produit souvent au cours de la réaction.

Technique d'EDMAN^{19, 20}. 6 mg de vasopressine oxydée à basse température (environ 5 micromolécules) sont dissous dans 1 ml de pyridine à 50% contenant 0.003% de bleu de bromothymol; on ajoute alors 0.025 ml de phénylisothiocyanate et on amène le pH à 8.5–9.0 avec de la triméthylamine. On agite pendant 2 heures à 38° en maintenant le pH aux environs de 8.5 par addition convenable de triméthylamine; l'excès de phénylisothiocyanate est alors éliminé (3 extractions avec 1.5 ml de benzène). La solution est ensuite évaporée à sec dans le vide sur acide sulfurique. On reprend par 0.2 ml d'un mélange acide acétique glacial – acide chlorhydrique 11.2 *N* (5:1 en volumes) et on maintient 1 1/2 heure à 38° afin d'effectuer l'hydrolyse spécifique. Le dérivé que donne l'acide cystéique avec le phénylisothiocyanate ne peut être extrait de la phase acide par l'éther. On le sépare du peptide restant par ionophorèse dans un appareil à 4 compartiments du type décrit par SYNGE²¹. Le compartiment anodique contient de l'acide sulfurique 0.1 *N*, le deuxième compartiment de l'acide acétique 0.5%, le troisième les produits de l'hydrolyse, le quatrième (compartiment cathodique) de l'eau. Les membranes sont constituées de cellophane; on applique une tension de 220 volts. Après 6 heures la séparation est complète. Le produit obtenu dans le compartiment 2 est chromatographié sur papier Whatman N° 1 dans le mélange butanol – acide formique; on chromatographie parallèlement le produit obtenu par action du phénylisothiocyanate sur l'acide cystéique. La révélation est effectuée à l'aide du réactif iodoplatinique de

TOENNIES ET KOLE²²: Les phénylthiohydantoïnes apparaissent en blanc sur fond rose. Les deux substances ont le même R_F (0.60) dans le solvant indiqué.

Les solutions des compartiments 3 et 4 sont réunies, évaporées à sec en dessiccateur et on effectue la deuxième dégradation sur le peptide restant. La copulation avec le phénylisothiocyanate et l'hydrolyse spécifique sont répétées comme il a été décrit. On évapore alors à sec, reprend par 0.2 ml d'eau, et extrait par l'éther (3 extractions avec 0.2 ml d'éther). Les phases éthérée et aqueuse sont évaporées à sec. L'hydrolyse d'une fraction du produit obtenu de la phase aqueuse (HCl 5.7 N, 20 heures à 105°) et la chromatographie sur papier indiquent la disparition de la tyrosine. L'hydrolyse barytique¹⁹ du produit obtenu de la phase éthérée (0.5 ml de baryte 0.25 N, 48 heures à 140°) et la chromatographie sur papier permettent d'identifier la tyrosine. Une série d'opérations identiques effectuées sur le peptide restant permet de caractériser la phénylalanine en troisième position. L'expérience n'a pas été poursuivie, mais les rendements des dégradations successives sont bons, et il semble qu'avec 5 micromolécules de peptide, on puisse déterminer ainsi l'enchaînement des quatre ou cinq premiers résidus. L'enchaînement initial des acides aminés dans la vasopressine oxydée est donc CySO₃H·Tyr·Phe.

Etude de l'enchaînement terminal. La trypsine coupant les chaînes peptidiques au niveau des carboxyles des bases devait scinder la vasopressine oxydée en deux peptides, un fragment initial renfermant le résidu d'arginine et un fragment terminal. Nous avons donc soumis la vasopressine oxydée à l'action de cet enzyme: environ 6 mg de vasopressine oxydée sont dissous dans 0.4 ml d'une solution de bicarbonate de soude à 0.025%. On ajoute alors 0.1 ml d'une solution de trypsine Worthington contenant 0.1 mg de trypsine (cette trypsine renferme 50% de SO₄Mg). On laisse 18 heures à 37°. On chromatographie l'hydrolysat sur papier Whatman No. 1 dans le mélange butanol-acide formique, pendant 24 heures. Après révélation à la ninhydrine, on observe une tache jaune sous la ligne de départ, une tache jaune devenant violette située entre l'arginine et la glycine, et une faible tache violette au niveau de la glycine. Les trois produits sont élusés du papier et hydrolysés. Le premier fournit tous les acides aminés de la vasopressine oxydée, à l'exception de la glycine. Le second et le troisième ne donnent que de la glycine. Par analogie avec les glycyl-peptides, on peut supposer que le produit réagissant en jaune avec la ninhydrine est de la glycine dont le carboxyle est bloqué. La gycinamide a été synthétisée suivant BERGELL ET VON WÜLFING²³ par action de l'ammoniaque sur la chloracétamide. Les comportements de la gycinamide synthétique et du produit inconnu, par chromatographie sur papier dans les trois solvants indiqués dans le Tableau II, ainsi que par ionophorèse sur papier à pH 4 sont identiques. Tous deux réagissent avec la ninhydrine en donnant une coloration jaune qui passe peu à peu au violet. La petite quantité de glycine libre provient sans doute d'une désamidation par suite du maintien à 37° pendant 18 heures. On en conclut que l'enchaînement terminal est Arg·Gly(NH₂). D'autre part la carboxypeptidase est sans action sur la vasopressine oxydée, ce qui est en accord avec la présence d'un résidu terminal amidé.

Dégénération non dirigée de la molécule

L'acide chlorhydrique concentré agissant à température peu élevée, hydrolyse les molécules protéiques en peptides courts d'une façon peu spécifique²⁴: en associant ces peptides courts à la manière d'un jeu de dominos, il est possible de reconstituer l'enchaînement initial des acides aminés.

8 à 10 mg de vasopressine oxydée sont dissous dans 1 ml d'acide chlorhydrique 11.2 N et hydrolysés à 37° en tube scellé pendant 3 ou 4 jours. On dilue alors avec 4 ml d'eau et l'acide chlorhydrique en excès est éliminé par évaporations répétées sous vide; l'hydrolysat est repris par l'eau afin d'effectuer les fractionnements. Au cours des premières recherches, les peptides basiques ont été séparés par chromatographie sur silice²⁵. Par la suite, les séparations par ionophorèse ont été préférées, car il est possible d'obtenir en une seule opération, trois fractions, acide, neutre et basique.

Séparation des peptides en groupes

Séparation par ionophorèse. On utilise le dispositif adopté par SANGER ET TUPPY¹⁵ comprenant un appareil à quatre compartiments séparés par des membranes de gélatine formolisée. Le compartiment anodique contient de l'acide sulfurique 0.1 N (55 ml), le deuxième compartiment de l'acide acétique à 0.5% (35 ml), le troisième, l'hydrolysat (35 ml) maintenu à pH 7 pendant toute l'opération par addition d'ammoniaque, le quatrième (cathodique) de l'ammoniaque 0.5 N (55 ml). On applique une tension de 220 volts. L'intensité du courant est de 40 mA au début, baisse peu à peu jusqu'à 8 mA au bout de 5 heures puis se stabilise. On obtient ainsi une fraction acide dans le compartiment 2, une fraction neutre dans le compartiment 3, et une fraction basique dans le compartiment cathodique. Ces fractions sont réduites à très petit volume par évaporation sous vide à 40°.

Séparation sur charbon. Les fractions acide et neutre sont passées sur charbon afin de séparer les produits aromatiques des non-aromatiques. On utilise des colonnes de 50 mg de charbon Activit 50 XP (diamètre 2 mm, hauteur 2 cm). La colonne est lavée d'abord avec 2 ml d'eau puis avec 2.5 ml d'acide acétique à 5%. La fraction (2 ml) est alors passée, puis on lave avec 6 ml d'acide acétique à 5%, pour extraire les produits non adsorbés. L'élution des substances aromatiques est effectuée avec 15 ml d'un mélange constitué par 20 parties d'acide acétique glacial, 15 parties d'acétate d'éthyle et 65 parties d'eau²⁶. Filtrats et éluats sont évaporés à sec. L'hydrolysat est ainsi divisé en 5 fractions: une fraction basique B, une fraction neutre aromatique N α , une fraction neutre non aromatique N β , une fraction acide aromatique A α et une fraction acide non aromatique A β .

Caractérisation des peptides de chaque fraction

Peptides basiques. La fraction B est chromatographiée sur papier Whatman No. 1 dans le mélange butanol - acide formique. On répartit le produit (0.5 ml) sur 3 bandes de 20 points distants de 0.5 cm, chaque bande étant encadrée de deux points témoins. Après chromatographie pendant 48 heures, on découpe les témoins et on effectue la révélation au réactif de SAKAGUCHI¹⁶, à la ninhydrine et à l'isatine²⁷. Le réactif de SAKAGUCHI permet de distinguer deux substances B₁ et B₂ (Fig. 1). La ninhydrine ne met en évidence que l'arginine libre, alors que l'isatine révèle en bleu deux prolyl-peptides²⁸ correspondant à B₁ et B₂. Les deux produits sont élusés du papier. Le produit

Acides aminés témoins	B	N β	A α	A β
IcysI ₂ ● Arg ●	B ₁ Arg _● B ₂ ○	○ N β ₁		○ A β ₁ CYSO ₂ H
Gly+Asp ● Glu ●				● ASP ● GLU
Tyr ●			○ A α ₁ + A α ₂	
Phe ○			○ A α ₂	

Fig. 1. Schéma des chromatographies des fractions sur papier Whatman No. 1 dans le mélange butanol - acide formique.

B_2 paraît pur par chromatographie dans les mélanges pyridine - collidine et phénol tamponné à pH 4, ainsi que par ionophorèse sur papier à pH 4²⁵; à l'hydrolyse, il fournit de la proline et de l'arginine. Le produit B_1 , chromatographié dans le mélange pyridine - collidine apparaît comme un mélange d'arginine libre et d'un peptide qui fournit à l'hydrolyse de la proline, de l'arginine et de la glycine.

La présence de la proline en position initiale dans le dipeptide B_2 a été confirmée par les méthodes de SANGER et d'EDMAN. La copulation du peptide avec le dinitrofluorobenzène a été réalisée dans les conditions déjà écrites. Le dinitrophénylpeptide a été hydrolysé 4 heures à 105° dans HCl 11.2 N puisque la dinitrophénylproline (DNP-proline) est plus résistante dans l'acide concentré²⁹. L'hydrolysat est extrait à l'éther. La chromatographie sur papier de la phase éthérée¹⁸ permet d'identifier une grande quantité de dinitrophénol et un peu de DNP-proline. La chromatographie de la phase acide permet d'identifier l'arginine et une quantité moindre de proline. En effet après 4 heures dans HCl 11.2 N à 105°, 50% de la DNP-proline sont hydrolysés en dinitrophénol et proline³⁰.

D'autre part, lorsque le peptide B_2 est copulé avec le phénylisothiocyanate, hydrolysé par le mélange acide acétique - acide chlorhydrique, et l'hydrolysat extrait à l'éther, on ne trouve dans la phase acide que de l'arginine libre. En conséquence, la structure du peptide B_2 est Pro·Arg. Puisque la proline est en position initiale dans le tripeptide B_1 (coloration bleue à l'isatine), on peut déduire d'après sa composition que sa structure est Pro·Arg·Gly. Nous avons confirmé cette structure en effectuant une hydrolyse partielle de 4 jours dans HCl 11.2 N à 37°. Après chromatographie sur papier de l'hydrolysat dans le mélange butanol - acide formique, on peut caractériser à côté de l'arginine, de la proline et de la glycine libre, le dipeptide Pro·Arg. Les peptides basiques permettent donc d'établir l'enchaînement Pro·Arg·Gly dans la vasopressine.

Dans une des premières préparations de vasopressine avaient été observés, mais en faibles quantités, deux prolylpeptides fournissant tous deux à l'hydrolyse de la proline, de l'arginine, de la glycine et de l'acide glutamique²⁵; toutefois ces peptides n'ont pas été retrouvés dans les autres préparations.

Peptides neutres. La fraction $N\alpha$ (éluat du charbon) ne contient pas de peptides en quantité significative, mais contient de la phénylalanine libre. La fraction $N\beta$ (filtrat du charbon) est placée sur papier Whatman N° 1 sur une bande de 15 points. Après chromatographie dans le mélange butanol - acide formique pendant 30 heures, on effectue la révélation des témoins à la ninhydrine: on peut distinguer un peptide réagissant faiblement en brun ($N\beta_1$, Fig. 1), la glycine et la proline. Le peptide réagit avec le réactif de Sakaguchi. Elué du papier et chromatographié dans divers solvants, il paraît pur. Par hydrolyse, il fournit de l'acide cystéique, de la proline et de l'arginine. Après copulation avec le dinitrofluorobenzène, le DNP-peptide est hydrolysé 6 heures par HCl 5.7 N; on extrait alors à l'éther mais la coloration jaune reste dans la phase acide. Par chromatographie sur papier de la phase acide dans le mélange butanol - acide formique, on caractérise le DNP-acide cystéique, la proline et l'arginine. La structure du peptide est donc $CySO_3H$ (Pro, Arg).

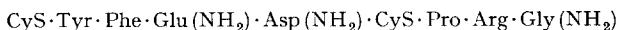
Peptides acides. Les deux fractions acides ($A\alpha$ et $A\beta$) sont chromatographiées sur papier dans le mélange butanol - acide formique pendant 30 heures, chaque fraction étant répartie sur 15 points. Après révélation des témoins à la ninhydrine, on distingue deux taches significatives dans l'éluat du charbon ($A\alpha$) et quatre dans le filtrat ($A\beta$) (Fig. 1).

Peptides de l'éluat. Les produits $A\alpha_1$ et $A\alpha_2$ élus du papier sont rechromatographiés dans le mélange pyridine — collidine. Le produit $A\alpha_1$ révèle deux constituants: $A\alpha'_1$ qui se place au niveau de l'acide glutamique, et $A\alpha''_1$ qui se place au niveau de la tyrosine. Le produit $A\alpha_2$ paraît pur. On détermine la composition des 3 peptides par hydrolyse et chromatographie sur papier: $A\alpha'_1$ contient Phe, Glu, Asp; $A\alpha''_1$ contient $CySO_3H$ Tyr; $A\alpha_2$ contient Phe, Glu. Par la technique de Sanger on détermine les structures: Phe·Glu; Phe(Glu, Asp) et $CySO_3H\cdot$ Tyr.

Peptides du filtrat. Le filtrat contient de l'acide cystéique, de l'acide aspartique et de l'acide glutamique libres ainsi qu'un peptide $A\beta_1$ réagissant en jaune-brun à la ninhydrine (Fig. 1) et qui à l'hydrolyse fournit Glu, Asp, et $CySO_3H$. Par la technique du fluorodinitrobenzène on détermine la structure Glu(Asp, $CySO_3H$). Un dipeptide (Glu, Asp) a été également observé au cours de recherches sur un hydrolysat de vasopressine non oxydée. Les peptides acides identifiés permettent d'établir les enchaînements $CySO_3H\cdot$ Tyr et Phe·Glu·Asp· $CySO_3H$ dans la vasopressine, et les peptides neutres et basiques l'enchaînement $CySO_3H\cdot$ Pro·Arg·Gly.

DISCUSSION

Les résultats de l'hydrolyse partielle acide permettent d'établir les trois enchaînements $CySO_3H\cdot$ Tyr, Phe·Glu·Asp· $CySO_3H$, et $CySO_3H\cdot$ Pro·Arg·Gly. D'autre part, la technique d'*EDMAN* ayant permis de montrer que l'enchaînement initial est $CySO_3H\cdot$ Tyr·Phe, on en déduit l'enchaînement $CySO_3H\cdot$ Tyr·Phe·Glu·Asp· $CySO_3H\cdot$ Pro·Arg·Gly. L'hydrolyse trypsique confirme la liaison Arg·Gly et indique que la glycine est amidée, puisqu'il y a libération de glycaminide. En outre, l'hydrolyse totale fournit 3 molécules d'ammoniac, il est très probable que les résidus d'acides aspartique et glutamique sont amidés. Comme les deux résidus d'acide cystéique proviennent de l'oxydation de la cystine, on peut attribuer à la vasopressine de boeuf la structure suivante:



Ces résultats appellent plusieurs remarques, les unes concernant les méthodes utilisées, les autres la structure elle-même.

La méthode d'*EDMAN* s'est révélée très efficace dans l'étude des peptides: elle exige moins de matériel qu'une hydrolyse partielle acide qui dégrade d'une façon non spécifique la molécule en nombreux fragments, d'où la nécessité de purifications longues et laborieuses des produits. Elle convient particulièrement à l'étude des tétra- ou pentapeptides que l'on peut obtenir des chaînes peptidiques par hydrolyse enzymatique. En contrepartie, l'hydrolyse acide permet d'établir à peu près tous les enchaînements d'un peptide plus long, alors que la méthode d'*EDMAN* est limitée aux premières liaisons. Dans ce cas, les deux méthodes se complètent et se confirment.

La trypsine a montré la spécificité d'hydrolyse observée par *BERGMANN* et ses collaborateurs^{31, 32} sur des substrats synthétiques puisque la seule liaison coupée est celle où participe le carboxyle d'une base. Cette spécificité, qui a été également constatée sur l'insuline³³ et sur le lysozyme³⁴ paraît donc assez rigoureuse.

Au cours de recherches effectuées sur une préparation de vasopressine, deux peptides ayant la proline en position initiale, et contenant en outre l'arginine, la glycine et l'acide glutamique, ont été observés. Par suite de l'existence de l'enchaînement

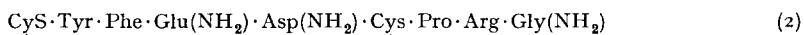
Pro·Arg·Gly, l'enchaînement Pro·Arg·Gly·Glu en avait été déduit²⁵. Il est possible que ces peptides traduisent l'union du peptide vasopressine à une protéine-mère telle que celle décrite par VAN DYKE et ses collaborateurs³⁵, la libération du peptide se faisant par rupture d'une liaison particulière au niveau de la glycine. Mais comme ces peptides n'ont pas été retrouvés dans les autres préparations, cette interprétation reste hypothétique.

Il est intéressant de noter que la structure de la vasopressine présente de frappantes analogies avec celle de l'ocytocine telle qu'elle a été indépendamment établie par TUPPY³⁶ et par DU VIGNEAUD, RESSLER ET TRIPPETT³⁷: la phénylalanine et l'arginine sont respectivement remplacées dans l'ocytocine par l'isoleucine et la leucine. Cette observation est à rapprocher du fait que la vasopressine pure possède une petite activité ocytocique³⁸.

Nous sommes heureux de remercier ici Mme OLIVRY dont la collaboration technique a été très précieuse dans la réalisation de ce travail.

RÉSUMÉ

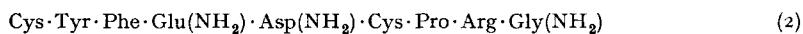
Le présent travail donne les détails des investigations ayant permis d'attribuer à la vasopressine de boeuf la structure suivante



Cette structure a été étudiée en mettant en oeuvre soit des méthodes de dégradation dirigée comme l'oxydation performique, l'hydrolyse récurrente d'EDMAN et l'hydrolyse trypsique, soit des méthodes de dégradation non spécifique comme l'hydrolyse partielle acide.

SUMMARY

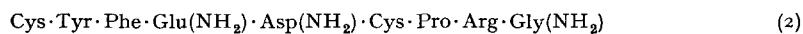
The present work gives the details of the investigations that led to attributing to ox vasopressin the following structure:



This structure has been studied using either the methods of conducted degradation such as performic oxidation, the recurrent hydrolysis of EDMAN, and trypsic hydrolysis, or the methods of non-specific degradation, such as partial acid hydrolysis.

ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit gibt die Einzelheiten der Untersuchungen, die es erlauben, für Rinder-Vasopressin folgende Struktur anzugeben:



Diese Struktur wurde gefunden sowohl mit Hilfe der Methoden des gerichteten Abbaues wie der Oxydation durch Perameisensäure als auch der Hydrolyse nach EDMAN und der Trypsinhydrolyse, oder mit unspezifischen Abbaumethoden wie partieller Säurehydrolyse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 V. DU VIGNEAUD, H. C. LAWLER ET A. POPENOË, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4880.
- 2 R. ACHER ET J. CHAUVET, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 487.
- 3 E. BRAND ET J. T. EDSELL, *Ann. Rev. Biochem.*, 16 (1947) 223.
- 4 F. SANGER, *Adv. in Prot. Chem.*, 7 (1952) 1.
- 5 P. FROMAGEOT, R. ACHER, H. CLAUSER ET H. MAIER-HÜSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 424.
- 6 S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 663.
- 7 R. A. TURNER, J. G. PIERCE ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 191 (1951) 21.
- 8 F. P. CHINARD, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 91.
- 9 O. FOLIN ET A. D. MARENZI, *J. Biol. Chem.*, 83 (1929) 89.
- 10 J. N. H. LUGG, *Biochem. J.*, 26 (1932) 2144.
- 11 S. SAKAGUCHI, *Japan Med. J.*, 1 (1948) 278.
- 12 F. W. LANDGREBE, M. H. F. MACAULAY ET H. WARING, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh B*, 62 (1946) 202.
- 13 F. SANGER, *Biochem. J.*, 44 (1949) 126.
- 14 E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- 15 F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 463.
- 16 R. ACHER ET C. CROCKER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 704.
- 17 F. SANGER ET E. O. P. THOMPSON, *Biochem. J.*, 53 (1953) 353.
- 18 G. BISERTE ET R. OSTEUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 50.
- 19 P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 4 (1950) 277.
- 20 P. EDMAN, *Acta Chem. Scand.*, 7 (1953) 700.
- 21 R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 49 (1951) 642.
- 22 G. TOENNIES ET J. J. KOLB, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
- 23 P. BERGELL ET H. VON WÜLFING, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.*, 64 (1910) 348.
- 24 A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 35 (1941) 294.
- 25 R. ACHER, J. CHAUVET ET P. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 471.
- 26 R. ACHER, J. CHAUVET, C. CROCKER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 167.
- 27 R. ACHER, M. JUTISZ ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
- 28 W. GRASSMAN ET K. V. ARNIM, *Ann.*, 519 (1938) 192.
- 29 R. R. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- 30 R. ACHER ET U. R. LAURILA, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 413.
- 31 M. BERGMANN, J. S. FRUTON ET H. POLLOCK, *J. Biol. Chem.*, 127 (1939) 643.
- 32 K. HOFMANN ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 130 (1939) 81.
- 33 F. SANGER ET H. TUPPY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 481.
- 34 R. ACHER, U. R. LAURILA, J. THAUREAUX ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 151.
- 35 H. B. VAN DYKE, B. F. CHOW, R. O. GREEP ET A. ROTHEN, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 74 (1942) 190.
- 36 H. TUPPY, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 449.
- 37 V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER ET S. TRIPPETT, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 949.
- 38 E. A. POPENOË, J. G. PIERCE, V. DU VIGNEAUD ET H. B. VAN DYKE, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 81 (1952) 506.

Reçu le 6 Mai 1954