

## Short Communications and Preliminary Notes

### Sur les relations entre l'ocytocine et la vasopressine d'une part et la protéine de Van Dyke d'autre part

On sait que les deux hormones de la posthypophyse, l'ocytocine et la vasopressine, ont été récemment obtenues sous forme de peptides purs dont la constitution est maintenant bien connue<sup>1,2,3,4</sup> et dont la synthèse a même été réalisée<sup>5,6</sup>. Il nous a paru intéressant de rechercher la nature des relations existant entre ces peptides et une protéine, douée à la fois des propriétés physiologiques de l'ocytocine et de celles de la vasopressine, qui a été isolée à l'état apparemment homogène par VAN DYKE *et al.*<sup>7</sup>

Nous avons préparé cette protéine selon ces auteurs<sup>7</sup>: 100 g de poudre acétonique de lobes postérieurs d'hypophyse de bœuf ont fourni 900 mg de protéine possédant les activités (U.I.) ocytocique, vasopressique et antidiurétique dans le rapport où elles existent dans la glande (1:1:1) et renfermant 14 % de l'activité initiale. L'activité par mg d'azote, les constantes de diffusion ( $D_{220} = 8.5 \cdot 10^{-7}$ ) et de sédimentation ( $s_{220} = 2.7 \cdot 10^{-13}$ ) sont les mêmes que celles indiquées par les auteurs américains; le poids moléculaire calculé d'après ces dernières est de 30,000 environ. L'activité ocytocique ou vasopressique est d'environ 550 U.I. par micromolécule de protéine; c'est approximativement l'activité d'une micromolécule d'ocytocine<sup>8</sup> ou de vasopressine pures<sup>9</sup>.

Les expériences suivantes tendent à montrer que la protéine de VAN DYKE est constituée par une association molécule à molécule entre trois constituants: une protéine, le peptide ocytocine et le peptide vasopressine; elles indiquent d'autre part que cette association entre les trois constituants peut être facilement rompue.

1. *Dissociation par électrodialyse.* Lorsque la protéine, purifiée par précipitations répétées en solution saline<sup>7</sup>, est finalement dialysée contre l'eau pour être débarrassée des sels avant lyophilisation, toute l'activité ocytocique et vasopressique ainsi que la totalité de l'azote restent à l'intérieur du sac. Les activités ne sont donc pas dissociables par simple dialyse contre l'eau. Par contre lorsque cette protéine (15 mg de poudre dissous dans 35 ml d'eau), placée dans le compartiment central d'un appareil à ionophorèse à trois compartiments, est soumise à l'électrodialyse (tension de 120 volts/cm, 5 heures, 25°), on recueille à la cathode 67 % de l'activité vasopressique, 10 % de l'activité ocytocique et 9 % de l'azote. L'électrodialyse permet donc de dissocier les deux activités et d'obtenir à la cathode un produit dont l'activité par mg d'azote (830 U.I.) s'est rapprochée de celle du peptide vasopressine (2,000-2,500 U.I.). En utilisant un procédé ionophorétique de ce genre, HASELBACH ET PIGUET<sup>10</sup> ont réussi à obtenir à partir d'un extrait brut de lobes postérieurs d'hypophyse un produit dont l'activité ocytocique est assez d'autre part en accord avec ceux d'IRVING ET DU VIGNEAUD<sup>11</sup> qui ont observé la séparation des deux activités au cours d'une électrophorèse effectuée sur un jus de presse de posthypophyse.

2. *Dissociation par précipitation.* La protéine (50 mg) en solution à 1% dans l'acide acétique 0.01 N est précipitée par l'acide trichloracétique à 5%. On constate que 8 % de l'azote de l'activité ocytocique et 70 % de l'activité vasopressique demeurent en solution. Cette solution diluée est placée dans le compartiment central de l'appareil à ionophorèse; après passage du courant (40 volts/cm, 20 heures, 20°), on recueille le liquide cathodique qui renferme les substances actives sans acide trichloracétique. Dans ce liquide deux polypeptides peuvent être mis en évidence par ionophorèse sur papier; leurs cheminements sont respectivement parallèles à ceux de l'ocytocine et de la vasopressine pures (révélation sur des bandes témoins par le bleu de bromophénol)<sup>12</sup>. Lorsque le papier est découpé en bandes de 2 cm de large et qu'après élution par l'eau, on dose les activités se trouvant dans chacune d'elles, on ne trouve pratiquement d'activité ocytocique qu'au niveau de l'ocytocine pure, et d'activité vasopressique qu'au niveau de la vasopressine. D'autre part les substances correspondantes ont respectivement les mêmes compositions en acides aminés que les peptides témoins. La précipitation de la protéine par l'acide trichloracétique à 5% libère donc de l'ocytocine et de la vasopressine.

3. *Dissociation au cours de la distribution par contre-courant.* 20 mg de poudre sont traités par contre-courant dans le système butanol secondaire-acide trichloracétique à 0.5%, chaque phase étant de 5 ml. Après 24 transferts, chaque tube est homogénéisé par addition d'eau, et on effectue les dosages d'activités et d'azote. La Fig. 1 indique les résultats obtenus. On récupère environ 80 % de l'activité ocytocique dans les tubes de 11 à 14 et 35 % de l'activité vasopressique dans les tubes de 7 à 9. Les contenus de ces tubes sont rassemblés en une fraction ocytocique et une fraction vasopressique qui sont soumises à l'électrodialyse pour être débarrassées de l'acide trichloracétique et du butanol. Par chromatographie sur papier on constate que les produits actifs ainsi purifiés ont respectivement les mêmes comportements que les peptides vasopressine et ocytocine purs. D'autre part la

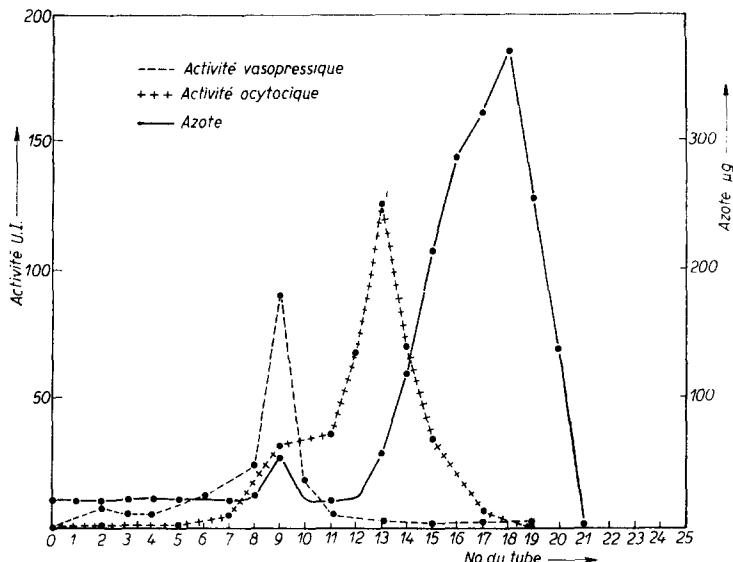


Fig. 1. Distribution par contre-courant de la protéine de VAN DYKE (20 mg de poudre soumis à la distribution dans le système butanol secondaire - acide trichloracétique 0.5 %, le volume de chaque phase étant de 5 ml)

vasopressine et l'oxytocine, soumises à la distribution par contre-courant dans le système décrit, possèdent les mêmes coefficients de partage que les principes actifs obtenus par ce procédé à partir de la protéine de VAN DYKE.

De l'ensemble de ces expériences il semble que l'on puisse conclure que l'activité de cette protéine correspond bien à la fixation des peptides oxytocine et vasopressine qui sont seuls responsables des activités hormonales de l'association. Une objection à cette conception eût résidé dans le fait que la réduction par la cystéine n'inactiverait ni l'oxytocine, ni la vasopressine<sup>13</sup> alors qu'elle inactiverait la protéine<sup>7</sup>. En fait nous avons répété les expériences de réduction de la protéine par la cystéine, dans les conditions décrites par VAN DYKE *et al.*<sup>7</sup> sans pouvoir constater aucune inactivation.

Il apparaît ainsi qu'il existe une association entre une protéine que nous proposons d'appeler *neurophysine*, et les deux peptides *oxytocine* et *vasopressine*. Il est encore impossible de définir le mode d'union en jeu ainsi que de décider s'il s'agit d'un artefact, ou au contraire d'une association présentant une signification biologique profonde.

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

ROGER ACHER  
GEORGES MANOUSSOS  
GHISLAINE OLIVRY

- <sup>1</sup> H. TUPPY ET H. MICHL, *Monatsh.*, 84 (1953) 1011.
- <sup>2</sup> V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER ET S. TRIPPETT, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 949.
- <sup>3</sup> V. DU VIGNEAUD, H. C. LAWLER ET E. A. POPENOË, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 4880.
- <sup>4</sup> R. ACHER ET J. CHAUVET, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 421.
- <sup>5</sup> V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS ET P. G. KATSOYANNIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 3115.
- <sup>6</sup> V. DU VIGNEAUD, D. T. GISH ET P. G. KATSOYANNIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 4751.
- <sup>7</sup> H. B. VAN DYKE, B. F. CHOW, R. O. GREEP ET A. ROTHEN, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 74 (1942) 190.
- <sup>8</sup> J. G. PIERCE, S. GORDON ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 929.
- <sup>9</sup> P. FROMAGEOT, R. ACHER, H. CLAUSER ET H. MAIER-HUSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 424.
- <sup>10</sup> C. H. HASELBACH ET A. R. PIGUET, *Helv. Chim. Acta*, 35 (1952) 2131.
- <sup>11</sup> G. W. IRVING ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) 485.
- <sup>12</sup> H. G. KUNKEL, S. P. TAYLOR ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 559.
- <sup>13</sup> R. R. SEALOCK ET V. DU VIGNEAUD, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 54 (1935) 433.