

L'OCYTOCINE ET LA VASOPRESSINE DU MOUTON: RECONSTITUTION D'UN COMPLEXE HORMONAL ACTIF

JACQUELINE CHAUVET, MARIE-THÉRÈSE LENCI ET ROGER ACHER

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

(Reçu le 9 juin, 1959)

SUMMARY

Oxytocine and vasopressine of sheep: reconstitution of an active complex

From sheep posterior hypophysis a complex was obtained containing 90 % of the oxytocic and vasopressic activity of the gland. The complex is an association of oxytocine and vasopressine with a protein, neurophysine. This complex was dissociated by TCA and the three components were purified by chromatography. The reconstitution of the complex from the elements was realised under specified conditions. Analogous complexes were obtained from glands of cow, horse and pig. It is possible to bring about associations between the hormones and neurophysines of different species.

INTRODUCTION

L'ocytocine et la vasopressine contractent avec une protéine de la post-hypophyse, la neurophysine, une association particulière¹. Cette propriété a été utilisée par ACHER, LIGHT ET DU VIGNEAUD² dans la mise au point d'un procédé de purification rapide des deux peptides. La méthode a permis récemment d'isoler les hormones du cheval³ du mouton⁴ et de l'homme⁵. Le présent mémoire d'une part apporte des informations particulières sur la formation du complexe dans l'extrait de glandes de mouton, d'autre part précise les conditions de sa reconstitution à partir de l'ocytocine, la vasopressine et la neurophysine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Techniques utilisées

Dosage de l'activité ocytocique: L'activité ocytocique a été dosée en mesurant la contraction de l'utérus de rate, selon la méthode de HOLTON⁶.

Dosage de l'activité vasopressique: L'activité vasopressique a été déterminée d'après l'élévation de la pression sanguine chez le rat anesthésié selon le procédé de LANDGREBE *et al.*⁷.

Chromatographie sur carboxyméthylcellulose: L'échangeur utilisé possède une capacité de 0.55 mequiv./g et provient d'une cellulose Solka-Floc type 20 (Lot 1007-Brown C°, Berlin, New Hampshire, USA). La cyclisation est effectuée suivant PETERSON ET SOBER⁸.

Chromatographie sur Amberlite-IRC 50 (XE-64): L'échangeur est traité suivant HIRS *et al.*⁹, et tamisé sous forme de sel de sodium. La fraction passant au tamis 100 est utilisée.

Préparation du complexe actif

Le matériel de départ est une poudre acétonique de posthypophyses de mouton*. Chez cette espèce, l'hypophyse possède un lobe postérieur minuscule, représentant environ le 1/50 de la glande, et pesant environ 10 mg à l'état sec.

Le Tableau I indique, à titre de comparaison, les teneurs en activités ocytocique et vasopressique des poudres acétoniques de post-hypophyses de quatre espèces de mammifères.

TABLEAU I
ACTIVITÉS BIOLOGIQUES DES POUDRES ACÉTONIQUES POST-HYPOPHYSAIRES

<i>Espèce</i>	<i>Activité ocytocique unités/mg</i>	<i>Activité vasopressique unités/mg</i>
Boeuf	1.0	1.1
Porc	1.4	1.4
Cheval	0.9	0.8
Mouton	0.8	0.8

Les préparations de complexe actif de mouton ont été effectuées sur des lots de 30 g de poudre titrant 0.8 unités U.S.P. ocytocique ou vasopressique par mg. On extrait une première fois par 1 l d'acide sulfurique 0.01 *N* (20 h à 5°) puis une deuxième fois avec 500 ml d'acide. Les extraits sont réunis (1.3 l) et le pH est ajusté à 3.9 avec de l'acide sulfurique *N*. Le complexe actif est alors précipité par addition de chlorure de sodium à raison de 100 g/l (16 h à 5°). Le précipité est séparé par centrifugation, remis en suspension dans 150 ml d'eau et dialysé jusqu'à élimination totale du chlorure. Le pH est ajusté à 3.9 (solubilisation du complexe) et le volume est porté à 700 ml avec de l'eau. On ajoute alors un volume égal de tampon acétate de sodium *M* à pH 3.9. On effectue ensuite une précipitation fractionnée à l'aide de chlorure de sodium.

Lors de la préparation du complexe actif à partir des glandes de boeuf¹, de porc¹⁰ et de cheval⁸, on recueille la fraction précipitant entre 25 et 65 g de NaCl/l. Nous avons constaté qu'une précipitation importante du complexe s'effectue ici avant d'atteindre le titre de 25 g de NaCl/l et nous avons donc recueilli la fraction précipitant entre 10 et 65 g (une nuit à 5°). Le précipité est séparé, redissous dans 125 ml d'eau et après addition d'un volume égal de tampon acétate *M* pH 3.9, le complexe est à nouveau précipité par addition de NaCl (65 g/l). On répète trois fois cette opération, puis le produit final est dialysé contre l'eau et lyophilisé.

Le Tableau II indique les rendements en complexe actif obtenus à partir de poudre acétonique de post-hypophyses de quatre espèces. Ce rendement est exceptionnellement bon dans le cas de la poudre post-hypophysaire du mouton (92 % des activités initiales).

On constate que si les poudres acétoniques ont des teneurs en activité assez

* Les glandes ont été fournies par les Etablissements Choay que nous sommes heureux de remercier ici.

voisines (*cf.* Tableau I), les rendements en complexe actif varient d'un tissu à l'autre. Ceci est probablement dû aux différences de solubilité des neurophysines car c'est cette solubilité qui conditionne la précipitation du complexe. D'autre part il est à noter que les activités spécifiques des différents complexes sont du même ordre.

TABLEAU II
RENDEMENT EN COMPLEXE ACTIF *

Espèce	Complexe actif g	Activité ocytotique unités/mg	Activité vasopressive unités/mg
Boeuf	1.5	18-20	18-20
Porc	1.5	18	18
Cheval	0.8	20	10
Mouton	4.2	18	18

* Pour 100 g de poudre acétonique.

Dissociation du complexe actif

Le complexe est dissous dans l'acide acétique 0.25 % à une concentration de 1 %. On ajoute alors un volume convenable d'acide trichloracétique à 100 % (p/v) de façon à porter la concentration finale de la solution à 5 % en acide. La neurophysine est précipitée, mais les peptides demeurent dans le liquide surnageant. On sépare le précipité par centrifugation, et le culot est remis en suspension dans un volume égal d'acide acétique 0.25 %. On répète la précipitation dans les mêmes conditions et on sépare le précipité par centrifugation.

Neurophysine: Le précipité est remis en suspension dans l'eau, et dialysé plusieurs jours contre l'eau pour éliminer l'acide trichloracétique (pH final 4.7). Puis la suspension est lyophilisée. Le rendement est de 75 mg de neurophysine pour 100 mg de complexe.

La neurophysine est chromatographiée sur carboxyméthylcellulose (CM-cellulose). On utilise une colonne de 1 × 15 cm initialement équilibrée avec un tampon acétate de sodium 0.1 M pH 4. 20 mg de neurophysine, dissous dans 20 ml de tampon acétate sont alors introduits dans la colonne. On établit ensuite un gradient de pH à l'aide d'un tampon acétate de sodium 0.1 M pH 5.2 (chambre de mélange: 50 ml). On collecte des fractions de 1 ml (débit 60 ml/h) et on détermine la présence des protéines par la réaction de FOLIN selon LOWRY *et al.*¹¹. Le résultat de la chromatographie est indiqué par la Fig. 1.

Le constituant principal représente 70 % du matériel chromatographié. Les fractions de 140 à 170 ml sont réunies et la solution est dialysée contre l'eau. Le pH (5.2) est alors ajusté à 4 avec de l'acide acétique et on effectue à nouveau une chromatographie sur carboxyméthylcellulose dans les mêmes conditions. Le résultat est indiqué par la Fig. 2.

Ocytocine et vasopressine: Après précipitation de la neurophysine par l'acide trichloracétique, les deux solutions surnageantes qui contiennent les hormones (80 % des activités initiales) sont réunies et l'acide est éliminé par passage sur une colonne d'Amberlite IR-45 forme acétate (1.5 × 10 cm). On lave la colonne à l'eau, et les deux hormones sont quantitativement récupérées dans le filtrat (pH 3.5). La purification de l'ocytocine et de la vasopressine du mouton est réalisée par chromato-

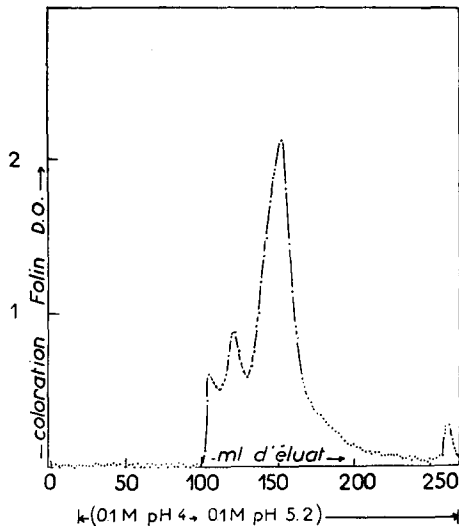


Fig. 1. 1^{ère} chromatographie de la neurophysine sur carboxyméthylcellulose (colonne de 1×15 cm initialement équilibrée avec un tampon acétate de soude $0.1 M$ à pH 4. Gradient avec un tampon acétate $0.1 M$ pH 5.2. Chambre de mélange 50 ml).

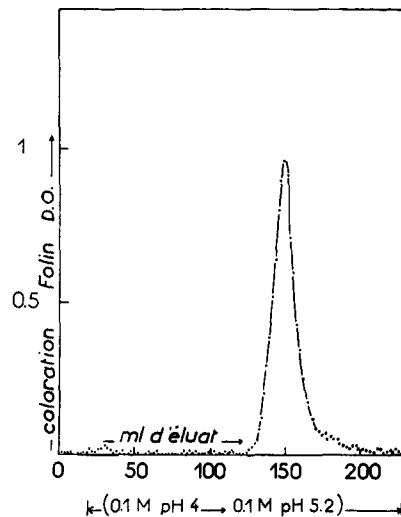


Fig. 2. 2^{ème} chromatographie de la neurophysine sur carboxyméthylcellulose (conditions identiques à celles de la Fig. 1; détails dans le texte).

graphie sur colonne d'Amberlite IRC-50 dans des conditions déjà décrites⁴. La solution est passée sur l'échangeur forme H et les hormones demeurent adsorbées au sommet de la colonne. Celle-ci est équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium $0.1 M$ à pH 5.0. L'ocytocine est d'abord éluée en établissant un gradient de pH et de force ionique avec une solution d'acétate d'ammonium $0.5 M$ pH 7.7 (chambre de mélange 50 ml) puis la vasopressine est éluée en élevant le gradient avec une solution d'acétate d'ammonium $0.75 M$ pH 7.7 (cf. Fig. 3).

Les tubes contenant respectivement les activités ocytotique et vasopressique sont rassemblés, et l'acétate d'ammonium est éliminé par évaporation sous vide. Les peptides ainsi obtenus paraissent chromatographiquement et électrophorétiquement purs⁴.

Les comportements électrophorétiques des ocytocines du mouton et du cheval ainsi que ceux des vasopressines du mouton et du boeuf sont identiques comme l'indique le Tableau III.

L'étude des structures chimiques a montré que l'ocytocine et la vasopressine du mouton étaient respectivement identiques à l'ocytocine et à la vasopressine du boeuf et du cheval⁴.

Reconstitution du complexe actif

On utilise une solution (2.4 ml) contenant 25 unités de vasopressine et 20 unités d'ocytocine/ml. Le pH est amené à 3.9 avec de la soude $0.1 N$, et le volume est ajusté à 3 ml avec un tampon acétate de sodium M à pH 3.9. On dissout ensuite la neurophysine de précipitation à raison de 1 mg/ml: les proportions des activités vasopressique et ocytotique sont alors respectivement de 20 unités et 17 unités/mg de protéine.

On ajoute ensuite 100 mg de NaCl/ml et on laisse la précipitation s'effectuer pendant 11 h à 0°. 80 à 90 % des activités se trouvent dans le précipité. Celui-ci est séparé par centrifugation et dialysé contre l'eau pendant une nuit pour éliminer le chlorure de sodium. On constate alors que 75 à 80 % des activités initiales ont été fixées par la protéine précipitée et ne sont pas dialysables. Le complexe reformé possède une activité vasopressique de 15 unités/mg et une activité ocytotique de 13 unités/mg alors que le complexe initial titrait 18 unités vasopressique ou ocytotique/mg.

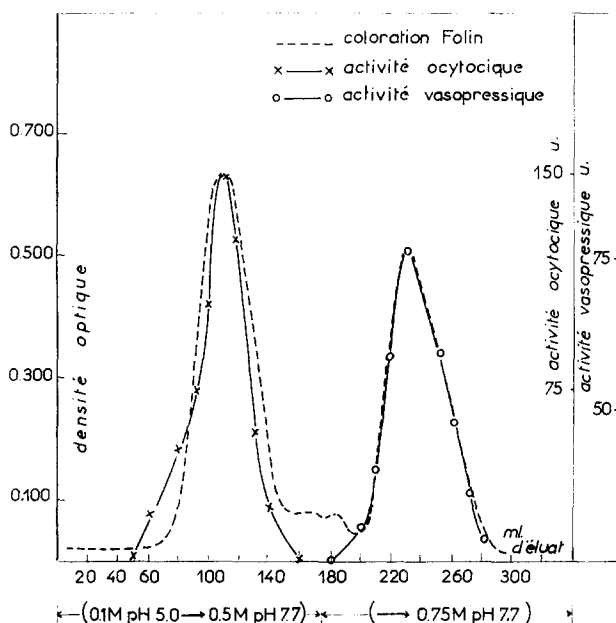


Fig. 3. Chromatographie de l'ocytocine et de la vasopressine sur Amberlite IRC-50. (Colonne de 0.9 × 10 cm équilibrée avec un tampon acétate d'ammonium 0.1 M pH 5.0. Gradient avec une solution d'acétate d'ammonium 0.5 M pH 7.7, puis 0.75 M pH 7.7. Chambre de mélange: 50 ml).

TABLEAU III

ELECTROPHORÈSE DE L'OCYTOCINE ET DE LA VASOPRESSINE DU MOUTON

Electrophorèse sur bandes de papier Whatman No. 1 (10 × 50 cm) sous une tension de 10 V/cm. Durée 5 h (pH 4: durée 4 h). Tampons: pH 4 (citrate-phosphate 0.05 M); pH 5 (acétate d'ammonium 0.05 M); pH 6.5 (acétate de pyridine 0.06 M); pH 8.6 (véronal-soude 0.06 M). Chemine-ments en mm vers la cathode, mesurés par rapport à la dinitrophényl éthanolamine.

	pH 4	pH 5	pH 6.5	pH 8.6
Ocytocine du mouton	71	81	26	2
Ocytocine du cheval	71	78	25	3
Vasopressine du mouton	103	123	71	65
Vasopressine du boeuf	101	123	71	60

DISCUSSION

Deux arguments plaident en faveur de la spécificité de l'adsorption de l'ocytocine et de la vasopressine sur la neurophysine: (a) L'absence de peptides étrangers adsorbés sur cette protéine lorsque le complexe a été purifié par plusieurs reprécipitations au moyen de chlorure de sodium. En effet la vasopressine et l'ocytocine apparaissent

comme les seuls peptides présents dans le liquide surnageant lorsque le complexe a été dissocié par l'acide trichloracétique, et la neurophysine éliminée (*cf.* Fig. 3). (b) La reconstitution de l'association à partir des deux hormones et de la neurophysine.

En général, le complexe reformé possède des activités spécifiques un peu plus faibles que celles du complexe initial. Les peptides semblent moins fortement liées à la protéine dans le premier cas: le rendement en activités du complexe reformé (75–80 %) est plus faible que celui constaté lors de la préparation du complexe actif d'origine (92 %). La différence est significative, et va dans le même sens pour les deux activités. Il est vraisemblable que la neurophysine résultant de la précipitation par l'acide trichloracétique n'est pas absolument identique à la neurophysine d'extraction, et un certain type de dénaturation a pu se produire entraînant une diminution de l'aptitude à fixer les deux peptides. Le traitement par l'acide trichloracétique ne semble toutefois pas produire des modifications profondes si on en juge par la solubilité de la neurophysine.

Il est intéressant de noter à ce sujet que SCHWERT¹² a montré que la sérumalbumine de boeuf précipitée par l'acide trichloracétique paraissait identique à la sérumalbumine initiale lorsque les deux produits étaient comparés par ultracentrifugation, électrophorèse, par les courbes de solubilité et l'aptitude à cristalliser.

L'examen du Tableau II indique que les différents complexes obtenus à partir des post-hypophyses de différentes espèces possèdent des activités ocytocique et vasopressique égales, et constantes d'un produit à l'autre à l'exception du complexe obtenu à partir de glandes de cheval. Au lieu de posséder les deux activités avec une teneur de l'ordre de 18 unités/mg, ce produit a une activité ocytocique de 20 unités/mg et une activité vasopressique de 10 unités/mg. Chez le boeuf, le cheval et le mouton, on trouve la même ocytocine et la même vasopressine. La différence doit donc porter sur la neurophysine qui chez le cheval paraît particulière. Pour élucider cette question, nous avons effectué la reconstitution du complexe, en utilisant la neurophysine du cheval. L'expérience a été conduite dans les conditions décrites ci-dessus, mais en utilisant 1 mg de protéine de cheval par ml au lieu de 1 mg de protéine de boeuf. Le complexe reformé possède une activité ocytocique de 18 unités/mg et une activité vasopressique de 11 unités/mg soit pratiquement les activités spécifiques du complexe d'origine, avec le même rapport. D'autre part, au cours de la chromatographie sur CM-cellulose, la neurophysine du cheval a un comportement différent des neurophysines du boeuf et du mouton qui paraissent semblables à ce point de vue. L'étude des différentes neurophysines est actuellement en cours.

RÉSUMÉ

A partir de post-hypophyses de mouton a été obtenu un complexe actif renfermant 90 % des activités ocytocique et vasopressique de la glande et formé par l'association de l'ocytocine et de la vasopressine avec une protéine, la neurophysine. Le complexe a été dissocié par l'acide trichloracétique et les trois substances ont été purifiées par chromatographie. La reconstitution du complexe à partir de ses éléments a été assurée en respectant les conditions de formation. Des complexes analogues ont été obtenus à partir de glandes de boeuf, de cheval et de porc; il est possible de réaliser des associations interspécifiques entre hormones et neurophysines d'origines différentes.

REMERCIEMENT

Nous sommes heureux de remercier Mlle R. JOURDAN de sa collaboration dévouée.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. ACHER, J. CHAUVET ET G. OLIVRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 421.
- ² R. ACHER, A. LIGHT ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 116.
- ³ R. ACHER, J. CHAUVET ET M. T. LENCI, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 2005.
- ⁴ R. ACHER, J. CHAUVET ET M. T. LENCI, *Compt. rend.*, 248 (1959) 1435.
- ⁵ A. LIGHT ET V. DU VIGNEAUD, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 98 (1958) 692.
- ⁶ P. HOLTON, *Brit. J. Pharmacol.*, 3 (1948) 328.
- ⁷ F. N. LANDGREBE, M. H. F. MACAULAY ET H. WARING, *Proc. Roy. Soc. Edinburgh. B*, 62 (1946) 202.
- ⁸ E. A. PETERSON ET H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 751.
- ⁹ C. H. W. HIRS, S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 493.
- ¹⁰ R. ACHER ET C. FROMAGEOT, *Ergeb. Physiol. u. exptl. Pharmacol.*, 48 (1955) 287.
- ¹¹ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ¹² G. W. SCHWERT, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 139.

Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960) 266-272

A COMPARISON OF SOME *VIC* GLYCOL DEHYDROGENASE SYSTEMS FOUND IN *AEROBACTER AEROGENES**

MARVIN LAMBORG** AND NATHAN O. KAPLAN

Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, Waltham, Mass. (U.S.A.)
The McCollum-Pratt Institute, The Johns Hopkins University, Baltimore, Md. (U.S.A.)

(Received May 8th, 1959)

SUMMARY

Two DPN-requiring *vic* glycol dehydrogenases can be isolated from extracts of a variant of *A. aerogenes*. Deamino DPN can replace the DPN requirement of enzyme A (obtained from cells grown on a glycerol-salts medium) and the 3-acetylpyridine analogue of DPN can replace the DPN requirement of enzyme B (obtained from cells grown on a glucose-salts media). Deamino DPN cannot replace the DPN requirement of enzyme B nor can the 3-acetylpyridine analogue substitute for DPN with enzyme A.

Enzymes A and B can be distinguished by properties other than pyridine nucleotide specificity. For example, they can be identified by differences in stability and in pH optima. Finally, enzyme A was found to be inducible.

Though enzymes A and B are physically inseparable, they are immunologically unrelated since no cross reactions take place.

Several closely related strains of bacteria were found to differ widely in their ability to carry out DPN (and DPN analogue) mediated oxidations of *vic* glycols.

* Publication No. 33 of the Graduate Department of Biochemistry, Brandeis University, and contribution No. 267 of the McCollum-Pratt Institute.

** Predoctoral Fellow of the National Cancer Institute, National Institutes of Health, United States Public Health Service, 1957-1958. Present address: The John Collins Warren Laboratories of the Huntington Memorial Hospital of Harvard University at the Massachusetts General Hospital, Boston, Mass.