

Isolement de l'ocytocine du poulet

L'ocytocine a été isolée à partir de la post-hypophyse de différentes espèces de mammifères: boeuf^{1,2}, porc³, cheval⁴, mouton⁵ et homme⁶. Dans tous les cas, l'hormone obtenue possédaient la même composition chimique. Il nous a paru intéressant de déterminer si la composition observée est particulière à l'ocytocine des mammifères, ou au contraire se rencontre chez l'ocytocine d'espèces appartenant à d'autres classes de vertébrés.

Le dépouillement de 6,000 têtes de poulet* a fourni 4 g de poudre acétonique de post-hypophyses titrant environ 0.4 unité U.S.P. ocytocique ou vasopressique/mg. Deux préparations ont pu être effectuées, en utilisant chaque fois environ 2 g de matière première. Le procédé de purification employé est celui de ACHER, LIGHT ET DU VIGNEAUD⁷ qui met en jeu l'adsorption de l'ocytocine et de la vasopressine sur une protéine post-hypophysaire, la neurophysine: Le premier stade est une précipitation spécifique du complexe à partir de l'extrait par le chlorure de sodium, le deuxième une élimination de la protéine-support par l'acide trichloracétique et le troisième une séparation chromatographique de l'ocytocine et de la vasopressine. Les essais préliminaires ont montré que la précipitation du complexe par le chlorure de sodium s'effectuait ici avec un mauvais rendement, soit que la neurophysine du poulet ait une solubilité particulière, soit qu'elle ait subi une dégradation, les glandes n'ayant pas été prélevées dès la mort des animaux. Cependant le procédé a pu être mis en oeuvre en effectuant un apport de neurophysine étrangère. En effet il est possible de reconstituer le complexe à partir de ses trois éléments, en utilisant des neurophysines d'origines variées⁸.

2 g de poudre acétonique post-hypophysaire (940 unités ocytocique et 840 unités vasopressique) sont extraits à 5° deux fois par 60 ml H₂SO₄ 0.01 N. Après élimination des substances insolubles, l'extrait (106 ml, pH 5.1) est ajusté à pH 3.9 avec de H₂SO₄ N, et on ajoute 168 mg de neurophysine de cheval. Après solubilisation de la protéine, on ajoute du NaCl de façon à avoir une teneur en sel de 10%: le complexe précipite et on laisse à 5° pendant une nuit. Le précipité formé est séparé par centrifugation et redissous dans 18 ml d'acide acétique 0.03%. On dialyse contre l'eau jusqu'à élimination totale des chlorures (rendement des deux activités 90-95%). Le dialysé est acidifié avec de l'acide acétique (volume final 20 ml d'acide acétique à 0.25%) et la neurophysine est précipitée au moyen de l'acide trichloracétique à 5% dans les conditions antérieurement décrites⁷. Le liquide surnageant qui contient l'ocytocine et la vasopressine est débarrassé de l'acide trichloracétique par passage sur une colonne d'Amberlite-IR 45 (solution finale: 62 ml à pH 4 contenant 82% de l'activité ocytocique et 74% de l'activité vasopressique). La séparation de l'ocytocine et de la vasopressine est effectuée par chromatographie de gradient au moyen d'acétate d'ammonium sur une colonne d'Amberlite-IRC 50 dans les conditions déjà décrites⁴⁻⁷. La récupération de l'ocytocine est quantitative (770 unités). Les tubes contenant l'activité sont réunis et l'acétate d'ammonium est chassé par évaporation sous vide.

L'ocytocine du poulet se comporte comme l'ocytocine des mammifères au cours de la chromatographie sur colonne d'Amberlite-IRC 50 et au cours de la chromatographie sur papier dans les solvants *n*-butanol-acide acétique-eau (40:10:50) et

* Nous sommes heureux de remercier ici la Société Industrielle de Transformation de Produits Agricoles (Auxonne) qui nous a très aimablement fourni les têtes de poulet.

n-butanol-acide acétique-eau-pyridine (30 : 6 : 24 : 20). Les comportements au cours de l'électrophorèse sur papier à pH 3.5, 6.5 et 8.6 sont également identiques. L'hydrolyse du produit fournit les acides aminés constituants de l'ocytocine des mammifères avec en plus de faibles quantités d'alanine, de sérine et d'arginine. Une purification plus poussée a été obtenue par chromatographie préparative sur papier: l'ocytocine du poulet (180 unités), purifiée sur Amberlite IRC-50 et débarrassée de l'acétate d'ammonium, est chromatographiée dans le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau, l'ocytocine du cheval étant utilisée comme témoin. Après révélation de la bande témoin, on élue le matériel correspondant à l'ocytocine, et on hydrolyse par HCl 6 N, à 110° pendant 20 h. La composition en acides aminés du produit, établie par chromatographie semi-quantitative sur papier, est la suivante: (Cys)₂, Tyr, Ileu, Asp, -Glu, Pro, Leu, Gly, composition identique à celle de l'ocytocine des mammifères.

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

ROGER ACHER
JACQUELINE CHAUVET
MARIE-THÉRÈSE LENCI

¹ V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER ET C. TRIPPETT, *J. Biol. Chem.*, 205 (1953) 949.

² H. TUPPY, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 449.

³ J. G. PIERCE, S. GORDON ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 929.

⁴ R. ACHER, J. CHAUVET ET M. T. LENCI, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 2005.

⁵ R. ACHER, J. CHAUVET ET M. T. LENCI, *Compt. rend.*, 248 (1959) 1435.

⁶ A. LIGHT ET V. DU VIGNEAUD, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 98 (1958) 692.

⁷ R. ACHER, A. LIGHT ET V. DU VIGNEAUD, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 116.

⁸ J. CHAUVET, M. T. LENCI ET R. ACHER, *Biochim. Biophys. Acta*, 38 (1960) 266.

Reçu le 24 juillet 1959

Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960) 344-345

Studies of DPNH oxidase: on the mechanism of reaction

Previously¹, we have shown that purified DPNH oxidase contains bound diphosphopyridine nucleotide in a fluorescent form, suggesting that it is bound to the enzyme in a reduced state. DPN containing [8-¹⁴C]adenine was used to study the mode of binding of the pyridine nucleotide to DPNH oxidase and the relation of the binding to enzymic catalysis. Labeled DPN was obtained from Schwarz Laboratories, Mt. Vernon, New York. Concentrations of DPN and protein were determined as described previously¹. [¹⁴C]DPN was converted to [¹⁴C]DPNH by reduction with Na₂S₂O₄, excess dithionite being removed by aeration. DPNH oxidase was incubated at room temperature with either [¹⁴C]DPNH or [¹⁴C]DPN for 20 min and was then washed repeatedly by centrifugation until the wash fluid was free of ¹⁴C activity. The washed DPNH oxidase was analysed for total pyridine nucleotide and for ¹⁴C-labeled pyridine nucleotide. Table I shows the exchange of [¹⁴C]DPN and [¹⁴C]-DPNH, at varying concentrations of labeled pyridine nucleotide, with the pyridine nucleotide originally bound to the DPNH oxidase. Only in Expt. 6, after incubation

Abbreviations: DPN, DPNH, oxidized and reduced diphosphopyridine nucleotide.

Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960) 345-346