

- ²⁵ A. L. LEHNINGER, B. L. RAY AND M. SCHNEIDER, *J. Biophys. Biochem., Cytol.*, 5 (1959) 97.
²⁶ A. L. LEHNINGER AND M. SCHNEIDER, *Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's*, 313 (1958) 138.
²⁷ B. CHANCE, *Proc. Internat. Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto*, Pergamon Press, London, 1958, p. 295.
²⁸ J. B. CHAPPELL, to be published.
²⁹ L. ERNSTER AND O. LINDBERG, *Ann. Rev. Physiol.*, 20 (1958) 13.
³⁰ S. J. COOPERSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 392.
³¹ A. L. LEHNINGER, *Harvey Lectures*, 49 (1955) 176.
³² L. ERNSTER, *Biochem. Soc. Symposia, Cambridge Engl.*, 16 (1959) 54.

Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960) 483-494

MÉCANISME DE L'INACTIVATION DE L'OCYTOCINE PAR LE TISSU UTÉRIN*

LUCIENNE AUDRAIN ET HUBERT CLAUSER

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

(Reçu le 25 Juin, 1959)

SUMMARY

Mechanism of inactivation of oxytocin by uterine tissue

Oxytocin, when incubated under aerobic conditions with uterine tissue is never inactivated, whereas irreversible inactivation occurs rapidly when the incubation is performed under anaerobic conditions. The inactivation seems to proceed in two steps: the first step consists in a reduction of the disulfide bridge of oxytocin by uterine tissue; the second step is an irreversible inactivation of reduced oxytocin by an enzyme system, which is liberated into the medium during incubation. This inactivation proceeds either through proteolysis or through irreversible formation of mixed disulfides.

Similar experiments have been done with other organs, such as liver, kidney and diaphragm; it has been shown that oxytocin is inactivated by these tissues, but that inactivation in these cases proceeds equally with the reduced and the unreduced form of oxytocin. The physiological significance of these results is discussed.

INTRODUCTION

De nombreux auteurs ont étudié l'inactivation des hormones posthypophysaires par différents tissus. Les expériences ont porté soit sur l'ocytocine¹⁻⁵, soit sur la vasopressine^{1,6}; une "ocytocinase" et une "vasopressinase", que les auteurs croient spécifiques** ont été décrites dans le plasma humain au cours de la gestation, par

* Un exposé préliminaire de certains résultats du présent travail a été fait au IVe Congrès International de Biochimie (Vienne, 1958).

** La spécificité de l'ocytocinase du plasma humain a été récemment établie par TUPPY *et al.*^{22,23} à l'aide de substrats synthétiques.

WERLE *et al.*^{7,8}. Le mécanisme de cette inactivation pourrait consister, d'après DICKER ET GREENBAUM⁶, soit en la rupture d'une ou de plusieurs liaisons peptidiques, soit en la réduction du pont disulfure de ces substances⁹.

Dans un précédent travail¹⁰, il a été établi que la réduction chimique du groupement disulfure de l'ocytocine provoquait une inactivation réversible de cette hormone. Alors que les travaux antérieurs avaient abouti à des conclusions contradictoires¹²⁻¹⁶, RESSLER¹¹, dans une récente publication, confirme l'inactivation de l'ocytocine par réduction. Le présent travail a pour but d'étudier le mécanisme d'inactivation de l'ocytocine par le tissu utérin, sur lequel cette hormone exerce sa principale action physiologique; il montre que l'ocytocine, mise en présence de tissu utérin, subit une inactivation irréversible, mais que cette dernière, pour avoir lieu, doit être précédée d'une réduction du pont disulfure de l'ocytocine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

L'ocytocine utilisée a été obtenue par la méthode de MAIER-HÜSER *et al.*¹⁷ et titre 125 U.I./mg. La cystéine est du chlorhydrate de L-cystéine (Hoffmann-La Roche). Toutes les opérations (réductions, incubations et dosages) ont été faites dans la solution de Tyrode décrite par JUNKMANN¹⁸, additionnée en cas d'anaérobiose de 2 mg de glucose/ml¹⁰. Les incubations ont lieu à 37°, dans des fioles de Warburg, soit dans une atmosphère d'azote ou d'oxygène purs, soit dans l'air. Les réductions préalables de l'ocytocine par la cystéine sont faites dans les conditions décrites précédemment¹⁰. Les rats utilisés sont de souche Wistar et pèsent entre 130 et 160 g. Toutes les expériences du présent travail ont été faites avec des organes entiers, dans des conditions où l'ocytocine pouvait exercer son action sur le muscle au cours de l'incubation. L'ocytocine est dosée sur l'utérus de rat suivant la méthode de HOLTON¹⁹; l'activité résiduelle de l'ocytocine après réduction est dosée sur l'utérus de rat en anaérobiose¹⁰, afin d'éviter la réoxydation de l'hormone. Une étude plus complète de cette méthode sera publiée ultérieurement.

RÉSULTATS

Inactivation de l'ocytocine par le tissu utérin en aérobiose et anaérobiose

La Fig. 1 montre l'inactivation, en fonction du temps d'incubation, d'une solution d'ocytocine incubée avec du tissu utérin de rat adulte. Les résultats indiquent que l'ocytocine est rapidement détruite en anaérobiose, alors qu'en présence d'oxygène, même après 3 h d'incubation, l'inactivation n'est pas significative*.

Le Tableau I groupe l'ensemble des résultats obtenus en incubant l'ocytocine avec du tissu utérin dans l'oxygène, dans l'air ou dans l'azote. L'inactivation de l'ocytocine est toujours rapide en atmosphère d'azote et pratiquement nulle en atmosphère d'oxygène; les résultats sont inconstants avec l'air, ce qui peut s'expliquer par une anoxie partielle du tissu. Le fait que l'inactivation n'ait lieu qu'en anaérobiose pouvait

* Note: des expériences préliminaires ont montré que, même en incubant pendant plusieurs heures en aérobiose, de l'ocytocine avec des quantités de tissu utérin telles que le rapport (poids du tissu/ocytocine) soit 50 fois plus élevé que celui indiqué sur la Fig. 1, aucune inactivation significative n'est observée. Ce résultat, obtenu avec des concentrations d'ocytocine proches de son seuil d'action physiologique (10^{-10} – 10^{-9} M) permet de supposer que l'ocytocine n'est pas inactivée lors de son action contracturante sur l'utérus en aérobiose.

Inactivation de l'ocytocine, en fonction du temps, par incubation en présence de tissu utérin

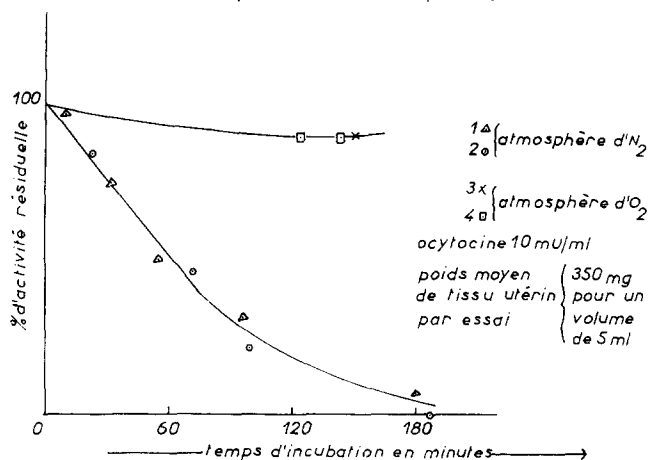


Fig. 1. Inactivation de l'ocytocine, en fonction du temps, en présence de tissu utérin; en abscisse: le temps exprimé en minutes; en ordonnée: activité résiduelle en %.

× □ Echantillons incubés en atmosphère d'oxygène.

△ ○ Echantillons incubés en atmosphère d'azote.

Poids moyen du tissu: 350 mg par échantillon pour un volume de 5 ml.

TABLEAU I

INACTIVATION DE L'OCYTOCINE PAR INCUBATION AVEC DU TISSU UTÉRIN

Température d'incubation: 37°—milieu Tyrode pH 7—volume total 5 ml.

Concentration d'ocytocine dans le milieu réactionnel (mU/ml)	Poids de tissu utérin dans chaque cellule (mg)	Temps d'incubation (h)	% d'activité résiduelle après incubation en atmosphère		
			d'azote	d'air	d'oxygène
10	405	1	40	—	—
10	377	1	67	—	—
10	285	1	25	—	—
10	295	1	—	88	—
3.75	1,251	1.30	10	—	—
10	351	2	20	—	—
10	372	2	—	100	—
10	414	3	25	—	—
10	312	3	8	—	—
10	231	3	10	—	—
10	426	3	—	85	—
10	342	3	10	—	—
10	399	3	—	60	—
10	306	3	10	—	—
10	428	3	—	62	—
10	349	3	7	—	—
10	349	3	0	—	—
10	342	3	—	—	90
10	414	3	—	—	90

suggérer qu'il ne s'agissait que d'une simple réduction enzymatique de l'ocytocine; la réoxydation de l'ocytocine réduite devait alors provoquer la réactivation de l'hormone, comme dans le cas de l'inactivation de l'ocytocine par réduction de son pont disulfure au moyen de cystéine¹⁰: en fait il n'a jamais été possible de réactiver l'ocytocine inactivée par le tissu utérin. Il faut signaler d'autre part que l'incubation, avec ce même tissu, d'ocytocine réduite par la cystéine empêche sa réactivation ultérieure par oxydation.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il doit y avoir intervention d'un mécanisme réducteur dans l'inactivation irréversible de l'ocytocine par l'utérus; on pouvait penser soit à l'activation, par réduction, d'un enzyme protéolytique à groupements -SH activables, tel qu'il en existe dans de nombreux tissus²⁰ et dont semblent se rapprocher l'"ocytocinase" et la "vasopressinase" déjà connues^{3,7-9}, soit à une réduction de l'ocytocine elle-même, qui serait suivie d'une protéolyse ou de la formation de disulfures mixtes inactifs du type de ceux décrits récemment par RESSLER¹¹.

Inactivation de l'ocytocine réduite par un système enzymatique libéré par le tissu utérin

Le Tableau II montre qu'un système enzymatique inactivant l'ocytocine irréversiblement a pu être mis en évidence dans le milieu d'incubation des organes, après élimination de ces derniers, mais que seule l'ocytocine préalablement réduite par la cystéine est inactivée irréversiblement dans ces conditions. La nature enzymatique de la réaction est indiquée par la perte complète du pouvoir inactivant sous l'effet de la chaleur sur le milieu d'incubation (100°, 8 à 10 min).

TABLEAU II

INACTIVATION IRRÉVERSIBLE DE L'OCYTOCINE PAR LE MILIEU D'INCUBATION DES UTÉRUS

Les concentrations d'ocytocine sont expérimentées en milliunités/ml. La quantité d'enzyme libéré dans le milieu d'incubation provient de 80 mg de tissu utérin/ml pour les expériences 1, 3, 4, et à 40 mg/ml pour l'expérience 2.

Expérience No.	Temps d'incubation minutes (37°) N ₂	Ocytocine non réduite				Ocytocine préalablement réduite					
		Initiale		Finale*		Avant incubation**		Après incubation***		Témoin§	
		Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%
1	60	24	100	24	100	6	25	4	16.5	—	—
2	90	10	100	10	100	—	—	—	—	—	—
3	150	25	100	25	100	4.8	19	5.8	23	—	—
4	180	25	100	—	—	7.5	30	7.5	30	22.5	90

* Ocytocine non réduite incubée avec le système enzymatique du milieu d'incubation.

** Ocytocine réduite réversiblement par la cystéine; activité restante avant incubation; dosée sur l'utérus en anaérobiose.

*** Ocytocine réduite identique à** incubée avec le système enzymatique et réoxydée avec O₂.

§ Ocytocine réduite identique à** incubée avec le système enzymatique bouilli et réoxydée avec O₂.

Le Tableau III précise ces observations: dans cette série d'expériences, les utérus ont été d'abord incubés pendant 90 min à 37°, en anaérobiose stricte; le milieu d'incubation provenant des organes ainsi préincubés et contenant l'enzyme inactivant est alors réparti en plusieurs échantillons, de façon à étudier en parallèle l'action du

TABLEAU III
INACTIVATION IRRÉVERSIBLE DE L'OCYTOCINE
PAR LE MILIEU D'INCUBATION DES UTÉRUS, EN PRÉSENCE DE CYSTÉINE

Les concentrations d'ocytocine sont données en milliunités/ml. La quantité d'enzyme libéré dans le milieu d'incubation provient de 100 mg de tissu utérin/ml pour les expériences 1, 2, 3 et 6, à 200 mg/ml pour l'expérience 4, et à 70 mg/ml pour l'expérience 5. Le milieu d'incubation est obtenu par préincubation des utérus en anaérobiose pendant 90 min. Les organes sont alors éliminés.

Expérience No.	Temps d'incubation minutes (37°) N ₂	Ocytocine non réduite						Ocytocine préalablement réduite					
		Initiale		Finale*		Témoin**		Avant incubation***		Après incubation§		Témoin§§	
		Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%
1	105	10	100	5	50	5	50	3.2	32	2.5	25	10	100
2	90	10	100	9	90	7	70	3.6	36	4.6	46	10	100
3	40	10	100	6.2	62	6.4	64	3	30	4.8	48	9.6	96
4	30	6.25	100	5 5	80 80	4	64	2.3	37	3.5 3.75	56 60	4.7	75
5	30	10	100	4	40	5.3	53	3	30	2 2.6	20 26	8	80
6	30	10	100	5.3 6	53 60	7	70	3	30	2 2.5	20 25	9	90
6	20	10	100	—	—	—	—	3	30	3.5	35	9	90
6	10	10	100	—	—	—	—	3	30	4.8	48	9	90

* Ocytocine non réduite incubée avec le système enzymatique du milieu d'incubation et une quantité de cystéine égale à celle de §.

** Ocytocine incubée comme en * sans système enzymatique, activité restante dosée sur l'utérus en anaérobiose.

*** Ocytocine réduite réversiblement par la cystéine; activité restante avant l'incubation dosée sur l'utérus en anaérobiose.

§ Ocytocine réduite identique à *** incubée avec le système enzymatique du milieu d'incubation et réoxydée avec O₂.

§§ Ocytocine réduite identique à *** incubée avec le système enzymatique du milieu d'incubation bouilli et réoxydée avec O₂.

système enzymatique inactivant sur l'ocytocine réduite ou non: (a) Le premier est incubé avec de l'ocytocine préalablement réduite par la cystéine; (b) Le second est incubé avec de l'ocytocine non réduite et une quantité de cystéine identique à celle apportée par l'ocytocine réduite du premier échantillon, afin de tenir compte d'un effet activateur éventuel de la cystéine sur le système enzymatique; (c) Le troisième est traité par ébullition et incubé ensuite avec de l'ocytocine réduite comme le premier échantillon; (d) Un témoin (sans milieu d'incubation), mesure la réduction de l'ocytocine par la cystéine au cours de l'incubation.

Tous ces échantillons sont d'abord incubés pendant des temps variables en anaérobiose stricte, afin de permettre l'inactivation enzymatique de l'ocytocine réduite ou non; l'activité de l'échantillon témoin est alors dosée en anaérobiose; les trois autres échantillons sont réoxydés pendant 120 à 180 min dans l'oxygène pur à 37°. L'activité ocytocique de ces échantillons est alors dosée.

Les résultats montrent que l'ocytocine réduite est inactivée irréversiblement par les enzymes contenus dans le milieu d'incubation, alors qu'avec ce même milieu bouilli la plus grande partie (80 à 100 %) de l'activité peut être retrouvée après réoxydation. L'ocytocine non réduite préalablement subit au cours de l'incubation une réduction de 30 à 50 %; l'inactivation irréversible de cette ocytocine par le tissu utérin est du

même ordre de grandeur; cette inactivation est toujours très inférieure à celle de l'ocytocine préalablement réduite. Il apparaît donc que c'est bien l'ocytocine réduite qui sert de substrat à l'enzyme inactivant; il n'est pas possible de préciser si le système enzymatique en question possède des -SH activables par la cystéine.

Inactivation de l'ocytocine par différents organes du rat

Les "ocytocinases" et "vasopressinases" connues^{7-9, 22, 23}, si elles semblent parfois activables par des réactifs à groupes -SH, détruisent indifféremment l'ocytocine réduite ou non réduite; il en est de même de la plupart des tissus qui inactivent l'ocytocine^{3, 9}.

Le Tableau IV montre qu'en effet les coupes de foie et de rein inactivent rapidement l'ocytocine en aérobiose comme en anaérobiose. Les muscles striés comme le diaphragme n'inactivent l'ocytocine qu'en anaérobiose. Le mécanisme de cette inactivation n'est cependant pas identique à celui qui a été mis en évidence pour

TABLEAU IV

INACTIVATION DE L'OCYTOCINE PAR INCUBATION AVEC DIFFÉRENTS ORGANES

La concentration d'ocytocine dans les cellules est de 20 milliunités/ml. Les temps d'incubation ont été de 120 minutes dans tous les cas.

Nature de l'organe	Poids de tissu dans chaque cellule (mg)	Atmosphère d'incubation	% d'activité résiduelle après 2 h d'incubation
Foie	377	N ₂	0
	330	O ₂	1
Rein	151	N ₂	10
	170	O ₂	0
Diaphragme	334	N ₂	15
	380	O ₂	86
Utérus	237	N ₂	23
	276	O ₂	100

TABLEAU V

INACTIVATION IRRÉVERSIBLE DE L'OCYTOCINE
PAR LE MILIEU D'INCUBATION DES DIAPHRAGMES EN PRÉSENCE DE CYSTÉINE

Temps d'incubation minutes (37°) N ₂	Ocytocine non réduite						Ocytocine préalablement réduite					
	Initiale	Finale*		Témoin**			Avant incubation***		Après incubation§		Témoin§§	
		Concn.	%	Concn.	%		Concn.	%	Concn.	%	Concn.	%
10	5	3.5	70	—	—		1.15	23	3.3	66	5	100
20	5	2.8	56	—	—		1.15	23	2.8	56	5	100
30	5	3.1	62	4	50		1.15	23	3.1	62	5	100
10	8	3.2	40	—	—		1.6	20	2.6	32	8	100
20	8	2.8	35	—	—		1.6	20	2.25	28	8	100
30	8	2.4	30	5	62		1.6	20	2	25	8	100

*, **, ***, §, §§ voir Tableau III.

l'utérus. En effet des expériences parallèles à celles qui ont été faites avec l'utérus (Tableau III) ont donné des résultats groupés dans le Tableau V.

Ces résultats montrent que le système enzymatique libéré par le diaphragme n'agit qu'en anaérobiose, mais attaque indifféremment l'ocytocine réduite et l'ocytocine non réduite.

DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats montre que l'inactivation de l'ocytocine par le tissu utérin semble s'effectuer en deux étapes: en effet, une inactivation de l'ocytocine non réduite exige la présence de l'organe lui-même dans le milieu d'incubation et des conditions anaérobies, tandis que l'inactivation irréversible de l'ocytocine réduite par la cystéine peut avoir lieu sous l'influence du milieu dans lequel les organes ont été préincubés. La perte du pouvoir inactivant du milieu sous l'action de la chaleur indique qu'il s'agit d'une réaction enzymatique: la première étape serait donc une réduction du pont disulfure de l'ocytocine, alors que la seconde étape pourrait s'envisager, soit sous la forme d'une protéolyse, soit sous la forme d'une catalyse enzymatique de la formation de disulfures mixtes. Il semble cependant que la nature de la réaction et notamment sa totale irréversibilité plaident en faveur d'une réaction protéolytique; en effet, RESSLER¹¹ a montré que les disulfures mixtes d'ocytocine, obtenus par voie chimique, pouvaient être au moins partiellement réactivés par rupture de ces disulfures au moyen de réducteurs convenables et réoxydation de l'ocytocine libérée. Dans le présent travail des essais de réactivation de l'ocytocine ont été faits au moyen de cystéine et de 2-3-dimercaptopropanol (BAL), et ont toujours donné des résultats négatifs, ce qui rend improbable l'existence de disulfures mixtes d'ocytocine dans le milieu d'incubation. De toute façon, et quel que soit son mécanisme d'action, ce système enzymatique est inactif sur l'ocytocine non réduite.

Ce fait suggère qu'en présence de l'organe entier, l'ocytocine subit une réduction de son pont disulfure, qui la sensibilise à l'action ultérieure du système protéolytique. L'absence d'inactivation de l'ocytocine en aérobiose prouverait alors, soit que le système protéolytique n'est pas actif en milieu oxygéné et qu'ainsi l'ocytocine inactivée par réduction peut ensuite se réactiver par réoxydation, soit que l'ocytocine n'est pas réduite en aérobiose. Il est également possible que les deux mécanismes enzymatiques agissent en aérobiose, mais que la réoxydation de l'ocytocine par l'oxygène moléculaire soit suffisamment rapide pour empêcher sa destruction. L'étude séparée de ces deux phénomènes, à l'aide par exemple d'inhibiteurs spécifiques est compliquée par la nature du dosage sur l'organe isolé.

Il paraît difficile, dans l'état actuel de ce travail, d'établir sa signification physiologique. La protéolyse qui se produit sur l'ocytocine réduite inactive, et en absence du muscle utérin, ne peut évidemment avoir aucun rapport avec l'action hormonale de l'ocytocine sur l'utérus. Quant à la réduction de l'ocytocine qui exige la présence de l'organe intact, il est possible d'envisager qu'elle soit liée à la contraction de l'utérus sous l'action de cette hormone: en effet, l'intégrité du pont disulfure est nécessaire à l'activité hormonale de l'ocytocine¹⁰ qui n'est pas inactivée par l'utérus en aérobiose au cours de son action; d'autre part, comme l'ocytocine réduite est autoxydable²¹ et qu'ainsi sa réduction par le myomètre en aérobiose pourrait passer inaperçue, un mécanisme d'action catalytique de l'ocytocine sur un substrat spécifique

du muscle utérin (par exemple une protéine à -SH de la membrane cellulaire) ne peut pas être exclu. Cependant, le présent travail ne permet d'apporter aucune preuve d'un tel mécanisme*.

RÉSUMÉ

L'ocytocine, incubée avec du tissu utérin de rat pubère en aérobiose ne disparaît pas, tandis qu'en anaérobiose elle est inactivée rapidement et irréversiblement. Cette inactivation comprend vraisemblablement deux étapes: la première est une réduction du pont disulfure de l'ocytocine par le tissu utérin lui-même; la deuxième est une inactivation irréversible de l'ocytocine réduite par un système enzymatique libéré dans le milieu d'incubation; cette inactivation est due soit à une protéolyse, soit à la formation irréversible de disulfures mixtes.

Des essais semblables avec d'autres organes (foie, rein, diaphragme) ont montré que l'ocytocine était également inactivée, mais que cette inactivation se produisait indifféremment avec de l'ocytocine réduite ou non réduite. La signification physiologique de ces résultats est discutée.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. LARSON, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 62 (1938) 346.
- ² S. LEBLOVA, I. RYCHLIK ET F. SÖRM, *IVe Congrès International de Biochimie, résumés des communications, Vienne, 1948*, Pergamon Press Ltd., section 9, No. 43, p. 108.
- ³ E. WERLE ET L. MAIER, *Naturwissenschaften*, 41 (1954) 380.
- ⁴ R. FRIED ET L. WÜST, *Naturwissenschaften*, 41 (1954) 238.
- ⁵ W. H. SAWYER, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 87 (1954) 463.
- ⁶ S. E. DICKER ET A. L. GREENBAUM, *J. Physiol. (London)*, 132 (1956) 199.
- ⁷ E. WERLE, A. HEVELKE ET K. BUTHMANN, *Biochem. Z.*, 309 (1941) 270.
- ⁸ E. WERLE ET E. A. KALVELAGE, *Biochem. Z.*, 308 (1941) 405.
- ⁹ S. E. DICKER ET A. L. GREENBAUM, *J. Physiol. (London)*, 141 (1958) 107.
- ¹⁰ L. AUDRAIN ET H. CLAUSER, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 191.
- ¹¹ C. RESSLER, *Science*, 128 (1958) 1281.
- ¹² R. R. SEALOCK ET V. DU VIGNEAUD, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 54 (1935) 433.
- ¹³ R. ACHER, J. CHAUVET ET G. OLIVRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 421.
- ¹⁴ J. M. GULLAND ET S. S. RANDALL, *Biochem. J.*, 29 (1935) 378.
- ¹⁵ J. M. GULLAND ET S. S. RANDALL, *Biochem. J.*, 29 (1935) 391.
- ¹⁶ H. B. VAN DYKE, B. F. CHOW, R. O. GREEP ET A. ROTHEN, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 74 (1942) 190.
- ¹⁷ H. MAIER-HÜSER, H. CLAUSER, P. FROMAGEOT ET R. PLONGERON, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 232.
- ¹⁸ K. JUNKMANN, in ABDERHALDEN, *Handbuch d. biol. Arbeitsmethoden* Abtl. 5 Teil 3b (1938) 1050.
- ¹⁹ P. HOLTON, *Brit. J. Pharmacol.*, 3 (1948) 328.
- ²⁰ J. S. FRUTON ET M. J. MYCEK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 11.
- ²¹ V. DU VIGNEAUD, C. RESSLER, J. M. SWAN, C. W. ROBERTS ET P. G. KATSOYANNIS, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 3115.
- ²² H. TUPPY ET H. NESVADBA, *Monatsh. Chem.*, 88 (1957) 977.
- ²³ W. MÜLLER-HARTBURG, H. NESVADBA ET H. TUPPY, *Arch. Gynäkol.*, 191 (1959) 442.
- ²⁴ C. T. O. FONG, I. L. SCHWARTZ, E. A. POPENOE, L. SILVER ET M. A. SCHOESSLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 2592.

* FONG et al.²⁴ après l'étude de l'action de la vasopressine tritiée sur le tissu rénal, concluent également à une réaction d'échange entre le pont disulfure de la vasopressine et des groupements -SH d'une protéine réceptrice de la cellule.