

ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DE L'ACTION LÉCITHINASIQUE DU VENIN DE COBRA ET D'ABEILLE

M. A. CIASCA RENDINA ET F. BOVET-NITTI

Laboratoire de Chimie Thérapeutique, Institut Supérieur de Santé, Rome (Italie)

(Reçu le 22 avril 1959)

Dans des travaux antérieurs l'une de nous¹ a montré la possibilité d'appliquer la méthode manométrique de Warburg à la mesure de l'action enzymatique du venin de cobra vis à vis de la lécithine et d'autres esters gras de la choline. Le fait de pouvoir suivre en quelque sorte la cinétique du phénomène nous apparaissait comme un progrès par rapport aux méthodes utilisées jusqu'à ce jour et qui ne permettaient de mesurer que l'entité de la réaction accomplie. C'est dans le même esprit que nous nous sommes demandé s'il n'allait pas être possible de suivre cette réaction, outre que par la technique manométrique, par une analyse chromatographique des contenus des flacons de Warburg, ainsi que l'ont fait WHITTAKER ET WIJESUNDERA² dans le cas de l'hydrolyse de la succinylcholine par la cholinestérase sérique.

Si de nombreux auteurs se sont en effet servis de l'électrophorèse sur papier pour séparer les diverses fractions actives des venins de cobra (NEUMANN³, HABERMANN ET NEUMANN⁴, GRASSMANN ET HANNIG⁵) et d'abeille et si BUSSARD⁶ a tenté par une méthode analogue d'élucider la constitution du venin de *Naja-Naja*, l'on ne trouve pas à notre connaissance dans la littérature de travaux portant sur l'analyse chromatographique ou électrophorétique de l'action enzymatique elle-même exercée par les venins de serpents et d'insectes, si l'on excepte un travail très récent⁷ relatant l'action du venin de Crotale sur la lécithine du cœur de boeuf et l'examen par la chromatographie des résidus de plusieurs jours. Si le venin de Crotale⁸ a fait l'objet de nombreux travaux quant à sa nature, le détail de son action enzymatique reste encore à élucider en ce qui concerne les produits de dégradation. L'on sait toutefois qu'il est dénué d'action cholinestérasique⁹ et que, contrairement au venin de cobra, il exerce une action sur la coagulation du sang¹⁰.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Venins employés

Pour tous nos essais avec le venin de cobra nous nous sommes exclusivement servis d'un échantillon de venin de *Naja-Naja* provenant du Haffkine Institute de Bombay*. Dans le cas de venin d'abeille nous avons nous mêmes procédé à l'extraction des glandes d'un certain nombre d'insectes qui ont été ensuite desséchées à l'étuve à 37° et finement pulvérisées.

* Nous remercions vivement le Colonel S. S. BATHNAGAR qui nous a fourni le venin de cobra.

Substrat

Comme source de lécithine nous avons eu recours à une dilution de jaune d'oeuf à 10%.

Technique manométrique

L'hydrolyse de la lécithine a été suivie par la méthode de Warburg dans des conditions très voisines de celles décrites précédemment¹. Ringer 20, température à 30°. Toutes les solutions contenaient 0.2% de NaHCO₃, le volume total étant dans chaque flacon de 2 c.c. en tout. Le substrat (1.5 c.c.) était placé au milieu et l'enzyme (0.5 c.c.) dans le bulbe latéral. Les dilutions s'entendent pour la totalité du liquide mis en oeuvre. Les lectures ont été faites cinq minutes après mise en contact du substrat et de l'enzyme et ensuite aux intervalles indiqués pour le détail de chaque expérience. Pour arrêter la réaction enzymatique les contenus des flacons étaient immédiatement placés dans des éprouvettes maintenues dans la neige carbonique et portées ensuite à - 20°.

Chromatographie ascendante sur papier

Lécithine et lysocithine. Après de nombreux essais nous avons en définitive adopté la technique décrite par KIRCHNER ET KELLER¹¹ et rapportée par LEA, RHODES ET STOLL¹² et dont la modification essentielle sur les méthodes employées auparavant consiste dans le fait d'imprégner le papier (Whatman No. 3MM) d'acide silicique sec. Les méthodes essayées précédemment¹³⁻¹⁵ comme on le voit d'après le Tableau I, ne permettaient pas en effet une séparation assez nette des deux produits.

TABLEAU I

VALEURS DES R_F OBTENUS PAR LA CHROMATOGRAPHIE DES PRÉLÈVEMENTS DES RÉSIDUS DE FLACONS DE WARBURG AU COURS DE L'HYDROLYSE DE LA LÉCITHINE DU JAUNE D'OEUF PAR LE VENIN DE COBRA, SUIVANT LES DIVERSES TECHNIQUES EMPLOYÉES

<i>Papier employé</i>	<i>Solvant</i>	<i>Lécithine R_F</i>	<i>Lysocithine R_F</i>
Whatman No. 1 non traité ¹³	Alcool amylique-acétone (7:3)	0.70	0.60
Whatman No. 1 non traité ¹⁴	Chloroforme-éthanol-eau (80:20:2.5)	0.90	0.90
Whatman No. 1 non traité ¹⁵	Éthanol-eau (8:1)	0.90	0.90
Whatman No. 1 non traité ¹⁵	<i>n</i> -Butanol saturé d'eau	0.85	0.85
Whatman No. 3MM imprégné d'acide silicique ¹²	Méthanol-chloroforme (20:80)	0.78	0.20

Le papier Whatman No. 3MM, format 12.5 × 12.5 était imprégné d'acide silicique sec. Le solvant employé est du méthanol-chloroforme 20 : 80 sur lequel les papiers devant servir aux chromatogrammes sont laissés pendant une demie heure avant le développement¹². La quantité du liquide prélevé et déposée sur le papier était de 0.15 c.c. Après développement les chromatographies ont été révélées par la méthode de LEVINE ET CHARGAFF¹⁶ décrite pour les phospholipides contenant de la choline.

Acides gras. Afin de suivre complètement la réaction enzymatique aboutissant, outre qu'à la formation de lysocithine, également à la libération d'un acide gras, nous

avons extrait les contenus des flacons de Warburg trois fois par le chloroforme et avons ensuite effectué les chromatographies sur du papier à la paraffine suivant la technique de SPITERI¹⁷. Après développement l'on met en évidence les acides gras en les précipitant sous forme de sels de plomb par la coloration brune qu'ils donnent en présence de H₂S¹⁸.

1. Hydrolyse de la lécithine du jaune d'oeuf par le venin de cobra

Dans une première série d'expériences, utilisant les conditions expérimentales précédemment rapportées par l'une de nous, nous avons confirmé les observations montrant la rapidité de l'hydrolyse de la lécithine par le venin de cobra.

En mettant en présence dans un manomètre de Warburg une émulsion de jaune d'oeuf à 10% avec des dilutions de venin allant d'une concentration de 10⁻³ à 10⁻⁸ dans un milieu à pH 7.4 riche en bicarbonate, l'on observe dans les premières 20 minutes de l'expérience un dégagement de CO₂ correspondant à l'hydrolyse de la fonction ester et à la formation de l'acide gras.

À titre d'exemple, les valeurs trouvées pour l'expérience représentée graphiquement dans la Fig. 1 sont données dans le Tableau II.

TABLEAU II

Concentration du venin de cobra	mm ³ de CO ₂ dégagé en						
	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
10 ⁻³	128	215	234	237	237	237	237
10 ⁻⁴	105	178	220	236	240	240	243
10 ⁻⁵	65	128	155	177	192	192	197
10 ⁻⁶	45	60	87	94	98	107	116
10 ⁻⁷	0	12	14	24	28	33	38
10 ⁻⁸	0	12	14	13	16	13	16

Poursuivant l'expérience nous avons procédé à l'analyse chromatographique des contenus des flacons de Warburg prélevant le mélange de venin et de lécithine après des périodes déterminées d'incubation et interrompant à chaque fois la réaction par refroidissement à -20°.

Les chromatographies réalisées avec la méthode de LEA, RHODES ET STOLL, mettent en évidence la disparition progressive de la lécithine et sa transformation en lysocithine. Le parallélisme entre les résultats fournis par la méthode manométrique et l'analyse chromatographique apparaît clairement par la comparaison des données numériques de l'expérience et des chromatogrammes rapportées dans la Fig. 2; l'on observe la disparition rapide de la lécithine et sa transformation en lysocithine pour des concentrations de venin de cobra allant jusqu'à 10⁻⁴. À partir d'une concentration de 10⁻⁵ cette transformation est progressive et n'est complète qu'au bout d'une heure. À 10⁻⁶ le venin, au cours des dix premières minutes, forme des traces assez visibles de lysocithine, à 10⁻⁷ la trace de lysocithine n'apparaît qu'au bout d'une heure de mise en contact et à 10⁻⁸ l'on ne voit plus de formation de lysocithine.

Dans d'autres expériences l'utilisation de la méthode de SPITERI¹⁷ nous a permis de mettre en évidence au cours de l'effet du venin sur les lécithines du jaune d'oeuf une tâche indiquant la formation d'un acide gras et dont l'apparition est parallèle à

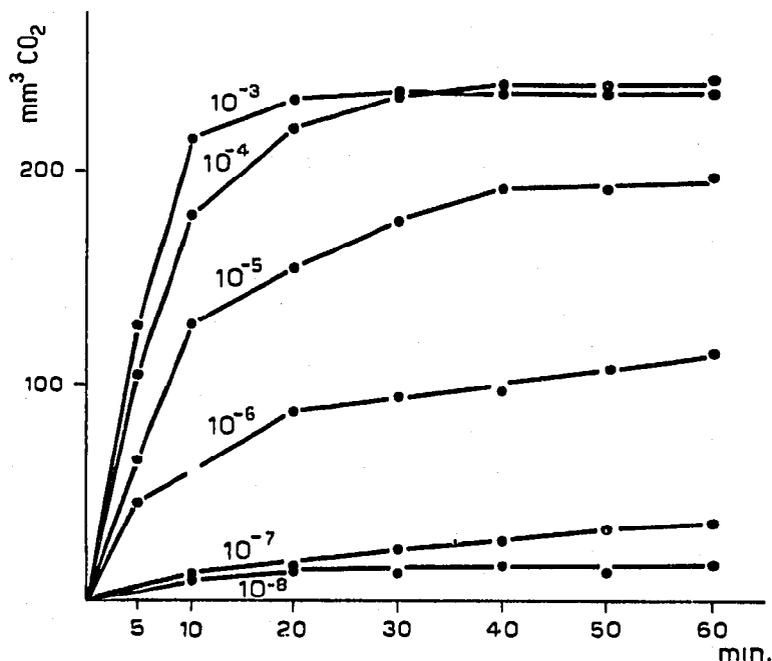


Fig. 1. Effet de différentes concentrations de venin de cobra sur une dilution de lécithine du jaune d'oeuf. Méthode manométrique de Warburg. Ringer 20, température 30°. En abscisse sont indiquées les intervalles de temps en minutes et en ordonnée les mm³ de CO₂ dégagé.

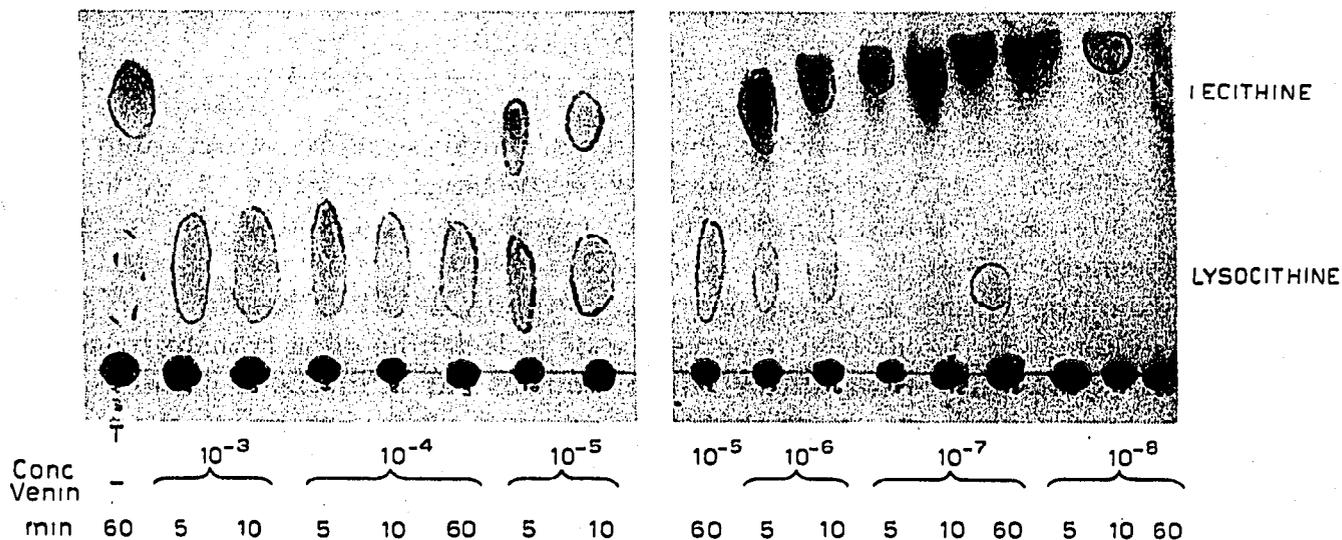


Fig. 2. Chromatographie ascendante de la lécithine du jaune d'oeuf et de la lysocithine formée au cours de son hydrolyse enzymatique par le venin de cobra. T = dilution de jaune d'oeuf à 10% après incubation à 30° et agitation pendant 60 min. Les chromatogrammes successifs correspondent aux dilutions de jaune d'oeuf à 10% après incubation à 30° en présence de concentrations décroissantes de venin de cobra (10⁻³ à 10⁻⁸) et pendant des intervalles de temps déterminés (5 à 60 min).

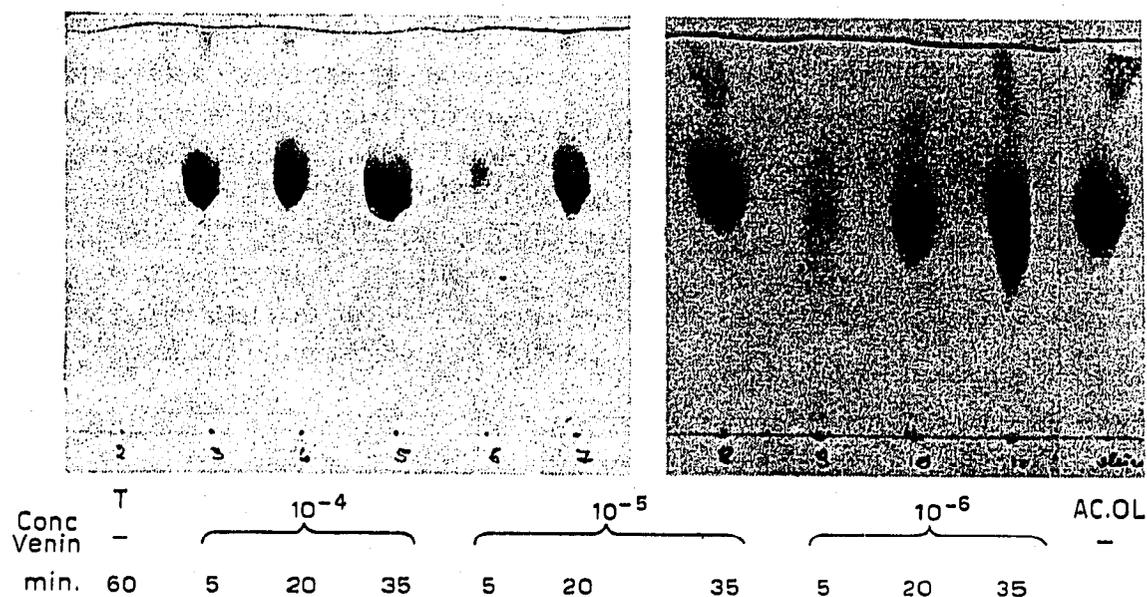


Fig. 3. Chromatographie ascendante des acides gras (acide oléique) formés au cours de l'hydrolyse enzymatique de la lécithine par le venin de cobra. T = dilution de jaune d'oeuf à 10% après incubation à 30° et agitation pendant 60 min. AC.OL. = chromatogramme de l'acide oléique. Les chromatogrammes successifs correspondent aux dilutions de jaune d'oeuf à 10% après incubation à 30° en présence de concentrations de venin en ordre décroissant (10^{-4} à 10^{-6}) et pendant des intervalles de temps déterminés (5 à 35 min).

celle de la lysocithine et correspond exactement aux phases de la disparition progressive de la lécithine; elle indique l'apparition de l'acide—probablement l'acide oléique—libéré au cours de l'hydrolyse de la lécithine par le venin (Fig. 3).

2. Action des inhibiteurs de la lécithinase; acide 4-aminophénylarsinique (Atoxyl)

Si l'estérase contenue dans le venin de cobra peut être inhibée par de nombreuses substances¹ la lécithinase A est par contre très résistante aux inhibiteurs habituels. À la suite des travaux de WILLSTAETTER ET MEMMEN¹⁹, de RONA ET AMMON²⁰ et de GYOTOKU²¹ sur l'action inhibitrice de certains arsénicaux sur la lipase du sérum, du foie et de l'estomac et bien qu'il n'ait pas été décrit d'action lipasique du venin de cobra, nous avons nous mêmes étudié²² l'action de quelques uns de ces dérivés sur la lécithinase A du venin de cobra. L'un des inhibiteurs qui mérite particulièrement de retenir l'attention est représenté par l'Atoxyl (acide 4-aminophénylarsinique) qui, dans nos essais antérieurs, s'est montré un antagoniste de l'action hémolytique du venin et a montré, au cours des essais réalisés avec la technique manométrique, une faible action inhibitrice de la lécithinase à des concentrations où il ne modifiait pas les propriétés estérasiques du venin. Nous avons trouvé intéressant d'en reprendre l'étude en associant la méthode manométrique à la recherche des produits de dégradation par l'analyse chromatographique.

À la concentration de 10^{-2} , l'Atoxyl exerce sur la lécithinase de cobra une action inhibitrice qui se traduit par un ralentissement de l'hydrolyse de la lécithine, et une diminution de la quantité totale de la lécithine hydrolysée.

Nous donnons les valeurs trouvées dans l'expérience dont le chromatogramme fait l'objet de la Fig. 4 dans le Tableau III.

TABLEAU III

Concentration du venin de cobra	mm ³ de CO ₂ dégagé en				
	5 min	10 min	20 min	30 min	40 min
10 ⁻⁴	124	190	197	201	205
10 ⁻⁴ + Atoxyl 10 ⁻²	64	116	155	162	187
10 ⁻⁵	50	93	150	163	165
10 ⁻⁵ + Atoxyl 10 ⁻²	16	50	75	82	82

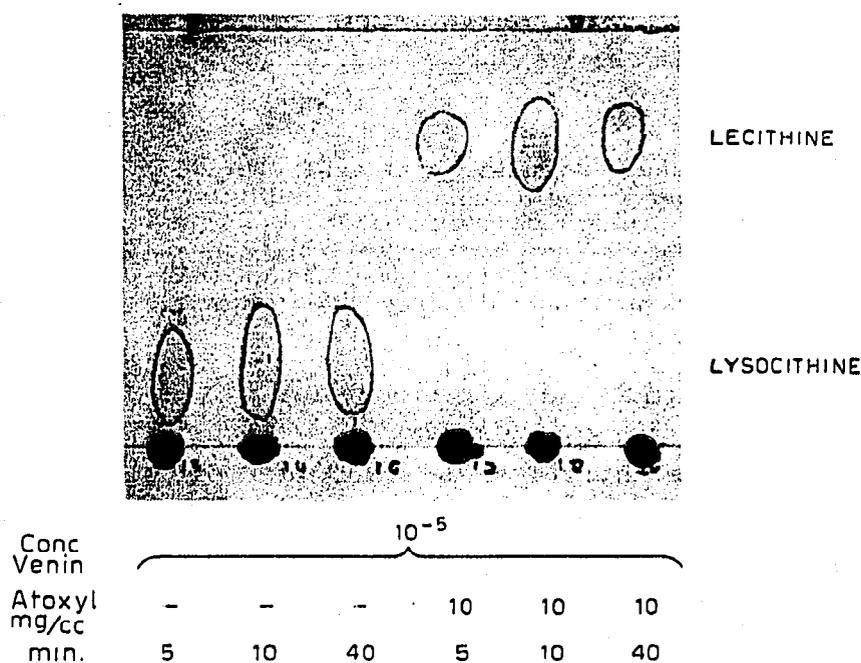


Fig. 4. Chromatographie ascendante de la lécithine du jaune d'oeuf et de la lysocithine formée au cours de son hydrolyse enzymatique par le venin de cobra sans et avec l'adjonction de 10 mg/c.c. d'Atoxyl intervenant comme inhibiteur de l'action lécithinasique. Les conditions expérimentales sont identiques à celles de la Fig. 2.

Dans des expériences réalisées parallèlement nous avons pu également observer que l'Atoxyl, en ralentissant ou en s'opposant à la formation de lysocithine, retarde également l'apparition de l'acide gras.

3. Action lécithinasique du venin d'abeille (*Apis mellifica*)

Si la littérature est assez riche en renseignements sur le venin d'abeille dans ses rapports avec l'immunologie, la thérapie de certains phénomènes douloureux et sur sa constitution⁴, il faut se reporter aux anciens travaux de CONTARDI ET ERCOLI²³ pour trouver des précisions sur la lécithinase A qu'il contient. Nous avons eu recours à ce poison pour avoir une vérification supplémentaire de l'analyse chromato-

phique et avons en effet retrouvé des effets très comparables à ceux obtenus avec le venin de cobra. Des concentrations supérieures à celles du venin de cobra sont nécessaires pour que la méthode manométrique soit utilisable et ce venin s'avère pratiquement presque sans action à partir d'une dilution de 10^{-6} . Dans l'interprétation de ces résultats il faut cependant tenir compte du fait que, tandis que le venin de cobra est pur, celui d'abeille est constitué par un extrait de la glande tout entière ne contenant qu'un quart au maximum de venin.

Dans une expérience où nous avons mis en jeu les deux venins contemporanément, nous avons trouvé les valeurs dans le Tableau IV.

TABLEAU IV

Concentrations des venins	mm ³ de CO ₂ dégagé en			
	5 min	20 min	40 min	60 min
Cobra 10^{-5}	65	152	182	187
Abeille 10^{-5}	38	54	64	83
Cobra 10^{-6}	43	87	98	116
Abeille 10^{-6}	7	17	25	25

L'étroite analogie entre les actions lécithinasiques exercées par les venins d'abeille et de cobra ressort également avec netteté de l'examen chromatographique des produits de la réaction.

La Fig. 5 montre une disparition progressive de la lécithine et l'apparition de la lysocithine avec des effets très superposables à ceux déjà observés dans le cas du

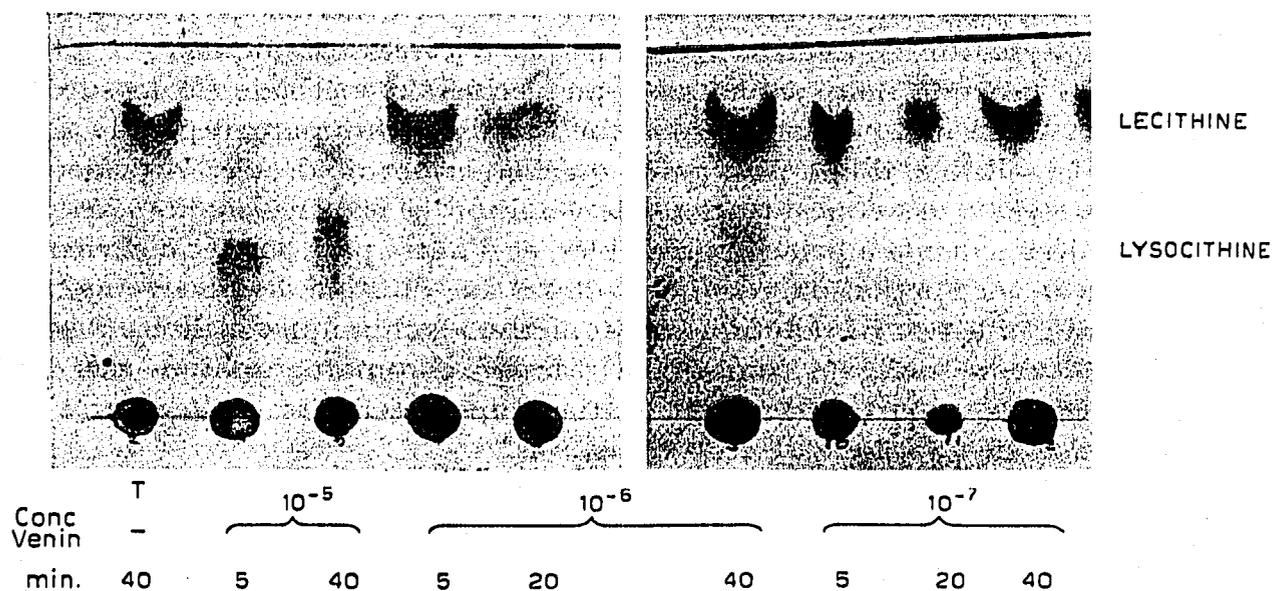


Fig. 5. Chromatographie ascendante de la lécithine du jaune d'oeuf et de la lysocithine formée au cours de son hydrolyse enzymatique par le venin d'abeille. Les conditions expérimentales sont analogues à celles de l'expérience rapportée à la Fig. 2.

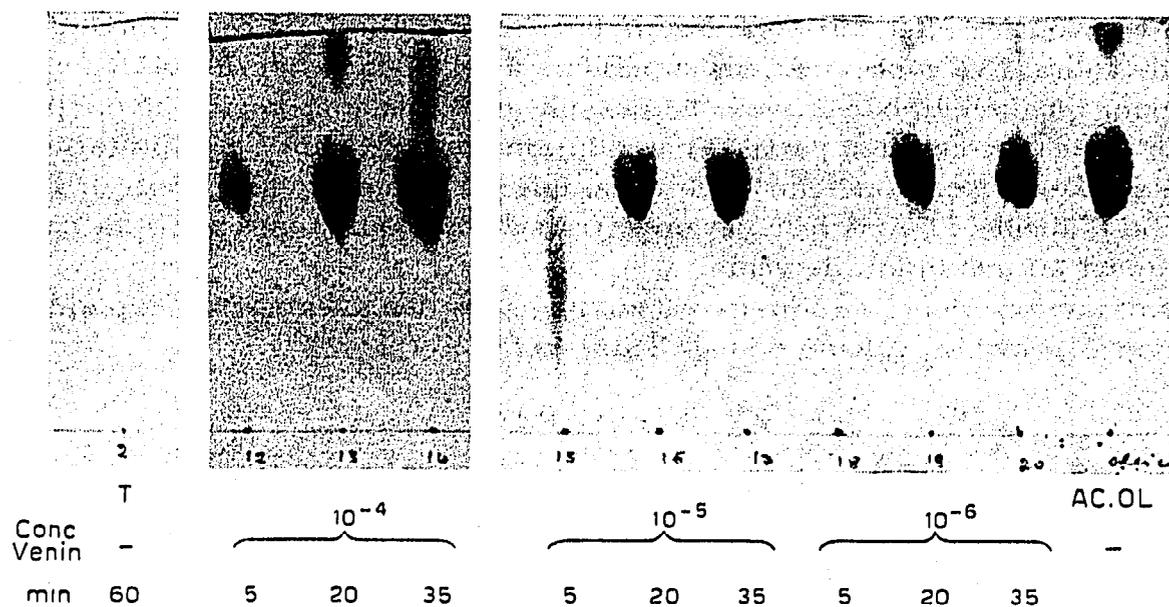


Fig. 6. Chromatographie ascendante des acides gras (acide oléique) formés au cours de l'hydrolyse enzymatique de la lécithine par le venin d'abeille. Conditions expérimentales identiques à celles de la Fig. 3.

venin de cobra. La présence de l'acide gras dégagé est également facilement identifiée par voie chromatographique (Fig. 6).

CONCLUSIONS

L'analyse chromatographique de l'hydrolyse enzymatique de la lécithine du jaune d'oeuf par le venin de cobra et d'abeille suivie par la méthode manométrique de Warburg nous a permis de confirmer la nature de cette action et d'identifier les produits d'hydrolyse, mis en évidence jusqu'ici par d'autres techniques.

En plus du fait que nous avons ainsi pu vérifier la méthode de mesure déjà proposée par l'une de nous, il est apparu que l'analyse chromatographique s'avère très fidèle et très sensible, d'une part parce qu'elle permet de déceler la présence de produits d'hydrolyse à des concentrations de venin où la réaction manométrique ne donne que des dégagements à peine appréciables, et d'autre part parce qu'elle consent de mettre en évidence l'action du venin de cobra à une dilution de 0.0001 mg/c.c., ce que ne permettait ni le test hémolytique ni les méthodes chimiques utilisées jusqu'ici.

Il faut également souligner combien la réaction chromatographique des acides gras s'avère sensible, apportant une vérification supplémentaire de la nature et de l'allure de l'action enzymatique de ces venins.

ADDENDUM

Alors que ce travail était déjà en cours d'impression, nous avons eu connaissance d'une étude sur l'effet du venin de cobra sur la lécithine marquée en ^{32}P et isolée à partir du foie de rat (MARINETTI, ERBLAND ET STOTZ²⁴). Ces mêmes auteurs ont

également examiné l'action du venin sur une lécithine isolée à partir du jaune d'oeuf: une chromatographie sur papier imprégné avec l'acide silicique dans un mélange de diisobutylcétone-acide acétique-eau (40:25:5) leur a permis d'observer la disparition de la lécithine et la formation de lysocithine sous l'influence du venin.

Le fait que, dans les conditions adoptées, la réaction s'avère relativement lente — les observations rapportées concernent l'effet du venin laissé en contact pendant 21 heures à la température ambiante — correspond aux résultats que nous avons précédemment obtenus²² et qui peuvent être attribués à la différence d'état physique sous lequel se trouve la lécithine du jaune d'oeuf fraîchement diluée et la suspension de lécithines préalablement purifiées.

RÉSUMÉ

Au cours de l'hydrolyse enzymatique des lécithines la chromatographie sur papier permet de suivre la disparition progressive du substrat, la formation de lysocithine et l'apparition des acides gras libérés.

La concentration de l'enzyme et la vitesse de la réaction ont été appréciées parallèlement par la méthode manométrique de Warburg et par la méthode chromatographique, cette dernière s'étant révélée particulièrement sensible.

Le venin de *Naja-Naja* et le venin d'*Apis mellifica* se révèlent encore actifs à la concentration de 10^{-6} ; la réaction est rapide et l'hydrolyse est pratiquement complète en moins d'une heure lorsqu'on utilise comme substrat la lécithine non purifiée du jaune d'oeuf.

La méthode se prête également à l'étude des inhibiteurs de ces enzymes et les auteurs ont pu mettre en évidence l'action de l'acide 4-aminophénylarsinique.

SUMMARY

During enzymic hydrolysis of lecithins it is possible, by means of paper chromatography, to follow the gradual disappearance of the substrate, the formation of lysocithin and the appearance of the liberated fatty acids. The concentration of the enzyme and the velocity of the reaction have been estimated both by the manometric method of Warburg and by the chromatographic method, the latter proving to be particularly sensitive.

The venom of *Naja Naja* and *Apis mellifica* were found to be still active at a concentration of 10^{-6} ; the reaction is rapid and the hydrolysis is practically complete in less than one hour if non-purified lecithin of egg yolk is used as substrate.

The method can also be employed to study the inhibitors of these enzymes, of which the authors demonstrated the action of 4-aminophenylarsonic acid.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ F. BOVET ET D. BOVET, *Ann. inst. Pasteur*, 69 (1943) 309;
F. BOVET-NITTI, *Experientia*, 3 (1947) 283.
- ² V. P. WHITTAKER ET S. WIJESUNDERA, *Biochem. J.*, 52 (1952) 3, 475.
- ³ W. NEUMANN, *Naturwiss.*, 39 (1952) 286.
- ⁴ E. HABERMANN ET W. NEUMANN, *Arch. exptl. Pathol. Pharmacol.*, 223 (1954) 388.

- ⁵ W. GRASSMANN ET K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.*, 296 (1954) 30.
- ⁶ A. BUSSARD ET R. COTÉ, *Compt. rend.*, 239 (1954) 915.
- ⁷ G. V. MARINETTI, J. ERBLAND ET E. STOTZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 861.
- ⁸ E. H. ESSEX, *Physiol. Revs.*, 25 (1945) 148.
- ⁹ B. N. GHOSH ET S. S. DE, *Nature*, 143 (1949) 380.
- ¹⁰ J. VELLARD, *Rev. inst. bacteriol. Carlos G. Malbrán*, 11 (1942) 144.
- ¹¹ J. G. KIRCHNER ET G. J. KELLER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1867.
- ¹² C. H. LEA, D. N. RHODES ET R. D. STOLL, *Biochem. J.*, 60 (1955) 353.
- ¹³ D. AMELUNG ET P. BÖHM, *Z. physiol. Chem.*, 298 (1954) 199.
- ¹⁴ T. H. BEVAN, G. I. GREGORY, T. MALKIN ET A. G. POOLE, *J. Chem. Soc.*, (1951) 841.
- ¹⁵ F. M. HUENNEKENS, D. J. HANAHAN ET M. UZIEL, *J. Biol. Chem.*, 206 (1954) 443.
- ¹⁶ C. LEVINE ET E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 465.
- ¹⁷ J. SPITERI, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 1355.
- ¹⁸ B. D. ASHLEY ET U. WESTPHAL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 56 (1955) 1.
- ¹⁹ R. WILLSTAETTER ET F. MEMMEN, *Z. physiol. Chem.*, 129 (1923) 1.
- ²⁰ P. RONA ET R. AMMON, *Biochem. Z.*, 181 (1927) 49.
- ²¹ K. GYOTOKU, *Biochem. Z.*, 217 (1930) 279.
- ²² F. BOVET-NITTI, *Thèse de Doctorat*, Paris, 1947 (non imprimée).
- ²³ A. CONTARDI ET A. ERCOLI, *Biochem. Z.*, 261 (1933) 276.
- ²⁴ G. V. MARINETTI, J. ERBLAND ET E. STOTZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 33 (1959) 2, 297.

J. Chromatog., 3 (1960) 111-120