

PROPRIÉTÉS ÉCHANGEUSES D'IONS DU GEL DE DEXTRANE (SEPHADEX)

APPLICATION À LA MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE RÉTENTION RÉVERSIBLE DES PROTÉINES BASIQUES DE FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE

FRANÇOIS MIRANDA, HERVÉ ROCHAT ET SERGE LISSITZKY

*Biochimie Médicale, Faculté de Médecine,
Marseille (France)*

(Reçu le 23 mai 1961)

Les premiers résultats concernant la filtration des protides sur gel de dextrane (Sephadex)^{1,2} nous ont incités à étudier le comportement à cet égard des toxines de scorpions (scorpamines) dont nous poursuivions l'isolement^{3,4}. Ces substances, solubles dans l'eau, ont été caractérisées comme des protéines basiques d'un poids moléculaire de 12,000 environ⁵. L'application de cette nouvelle méthode de tamisage moléculaire était susceptible de fournir, sur le plan analytique, des renseignements complémentaires sur la nature des toxines. Elle pouvait également permettre, d'un point de vue préparatif, d'inclure cette étape dans le processus de purification. Nous décrivons, dans ce mémoire, la mise au point d'une méthode de rétention réversible appliquée aux toxines de scorpions et aux protéines basiques de faible poids moléculaire (ribonucléase, lysozyme) et nous discutons la contribution apportée par nos observations à la théorie de la filtration sur gel de dextrane.

MATÉRIEL

Les toxines de deux espèces de scorpions nord-africains (*Androctonus australis* L. et *Buthus occitanus* Am.) se présentaient sous deux formes: extraits obtenus par la méthode de purification récemment proposée⁴; venins émis par l'animal par excitation manuelle ou électrique^{6,7} et desséchés sous vide. L'hémoglobine a été préparée selon DERRIEN *et al.*⁸. Les autres protéines ont été obtenues commercialement: ribonucléase (3 fois cristallisée) et lysozyme (2 fois cristallisé) (Worthington Biochemical Corporation), insuline amorphe (Lilly).

Les produits chimiques étaient de la meilleure qualité analytique (Merck purissime ou Prolabo R.P.). Les gels de dextrane (Sephadex G-50 et Sephadex G-25) provenaient de Pharmacia (Uppsala). Toutes les solutions ont été réalisées avec de l'eau désionisée puis bidistillée dans un appareil entièrement en verre Pyrex.

MÉTHODES

(1) Méthodes générales

Les filtrations sur Sephadex ont été conduites suivant les indications de GELOTTE⁹. Dans une colonne en verre Pyrex de 30 × 4 cm, le lit de Sephadex avait une hauteur de 4 à 23 cm. Certaines opérations ont été réalisées avec un gel équilibré contre une solution saline ou l'eau pure, l'élution étant conduite avec le solvant utilisé pour l'équilibration*. Pour d'autres, on a procédé à une élution aqueuse suivie d'une élution saline avec ou sans dispositif de gradient; les solutions salines mères étaient: acétate d'ammonium (AcNH₄) 0.5 à 2.6 M; NaCl 1 à 10 %. Débit de 60 à 360 ml/h pour une pression hydrostatique de 70 cm**. Fractions de 2.5 à 28 ml. Les valeurs de la résistivité ont été déterminées avec un pont de Kohlraush (LKB producteur, Stockholm). Le dosage des protéines a été réalisé par mesure de la D.O. à 280 mμ. Les chlorures ont été détectés au nitrate d'argent et titrés par la méthode de Charpentier-Volhard. Les déterminations de pH ont été faites avec un pH mètre (Carpeni-Constant) d'une précision de ± 0.01 unité pH.

(2) Étude de la méthode de rétention réversible

(a) Mode opératoire: on applique, au sommet de la colonne, contenant un lit de Sephadex G-25 de 23 cm de hauteur, abondamment lavé à l'eau, une solution aqueuse de protéine dessalée par dialyse ou lyophilisation (cas de AcNH₄). On élue dans un premier temps par un grand volume d'eau (2 à 5 fois le volume de la colonne), puis on installe un dispositif de gradient selon GRÉGOIRE *et al.*¹⁰ en utilisant un récipient mélangeur de 1 l.

(b) Détermination des volumes caractéristiques V_o et V_i (V_o est le volume extérieur aux grains du gel, V_i le volume intérieur d'imbibition des grains)***: deux méthodes totalement indépendantes ont été utilisées et leurs résultats comparés. La première méthode (méthode des pesées) permet d'obtenir directement la valeur absolue de V_i par le calcul et de connaître indirectement V_o . On a:

$$V_i = p \times W_r$$

où p est le poids sec de Sephadex et W_r la valeur indiquée pour le "water regain" (dans le cas particulier: $70 \times 2.5 = 175$ ml). Pour avoir V_o , on pèse la colonne vide et la colonne contenant le lit de Sephadex humide. Si l'on désigne par D la différence des pesées, on a:

$$D = p + V_i + V_o$$

d'où l'on tire:

$$V_o = D - (p + V_i)$$

(dans le cas particulier, $V_o = 364 - (70 + 175) = 119$ ml).

* Ces expériences, réalisées dans un solvant homogène, seront appelées, dans la suite du texte, filtration en milieu aqueux ou filtration en milieu salin, suivant le cas.

** Un débit ralenti par un grand nombre d'opérations successives, par suite du tassement de la colonne, peut être ramené à sa valeur originelle par un simple lavage de la colonne de bas en haut.

*** Dans tous les calculs ci-dessous, on admet que la densité de l'eau est égale à 1.

Contrairement à la précédente, la deuxième méthode (méthode des filtrations tests) donne directement V_0 et indirectement une valeur relative de V_t . V_0 représente le volume qui s'écoule avant l'apparition dans l'effluent d'une substance de poids moléculaire suffisamment élevé pour que l'accès des grains lui soit interdit. Avec une suspension aqueuse d'encre de Chine (3 gouttes dans 5 ml d'eau) déposée sur une colonne lavée à l'eau et éluée avec le même solvant, on trouve pour V_0 une valeur de 115 ml. Par contre, avec une solution d'hémoglobine (25 mg dans 5 ml d'eau) déposée sur une colonne équilibrée avec une solution de NaCl à 1 % ou un tampon phosphate-cyanure (tampon 3 de ALLEN *et al.*¹¹), puis éluée avec les mêmes solutions, on trouve dans les deux cas 130 ml, chiffre légèrement supérieur au précédent. Le léger décalage existant entre les valeurs données par l'encre de Chine et l'hémoglobine peut être attribué aux forces d'adsorption que subit cette dernière molécule de la part du gel*. Pour connaître V_t , on mesure le volume qui s'écoule avant l'apparition dans l'effluent d'une substance de structure telle qu'on puisse admettre qu'elle pénètre librement dans le gel et qu'elle n'y subit aucune action parasite. On obtient ainsi, en principe, $V_0 + V_t$. On déduit V_t de la relation :

$$V_t = (V_0 + V_t) - V_0.$$

Cependant, en utilisant NaCl comme substance test, on trouve :

$$V_t = 255 - 115 = 140 \text{ ml.}$$

Ce chiffre est nettement plus faible que celui obtenu par la méthode des pesées (175 ml). Cela tient à ce que l'on n'obtient pas, par la dernière méthode la valeur absolue de V_t , mais plutôt $K_D V_t$, avec :

$$K_D = \frac{V_e - V_0}{V_t}$$

où V_e représente le volume d'éluion. En fait, on a montré⁹ que les substances qui diffusent librement dans le gel ont un K_D de 0.8, un cinquième de l'eau d'imbibition se comportant comme de l'eau liée. Cela semble être le cas du chlorure de sodium puisque l'on a effectivement $140:175 = 0.8$.

(c) Étude du gradient : les premières expériences sur Sephadex ont montré que les toxines de scorpions, fixées sur le gel en milieu aqueux, étaient facilement éluées par des solutions salines de faible force ionique (AcNH_4 0.05 M). La Fig. 1a représente le fractionnement des protéines (courbe A) et l'évolution de la conductivité** exprimée en

* Avec le lysozyme, dans les mêmes conditions, on obtient pour V_0 la même valeur que pour l'hémoglobine; dans ce cas, c'est l'échange d'ions qui doit jouer un rôle retardateur (*cf.* DISCUSSION).

** On note sur la courbe B₂ une diminution de la conductivité au moment de l'éluion des protéines et tant que la concentration saline reste très faible. FLODIN relève le phénomène dans d'autres circonstances¹² et l'attribue à un effet Donnan du même type que celui que réalise la dialyse avec laquelle le passage sur Sephadex présente beaucoup d'analogies. L'effet Donnan, dans le cas de protéines basiques se comportant comme des ions P⁺, se traduit par l'exclusion partielle des cations diffusibles de la solution. Nous avons observé, pour notre part, un autre phénomène pouvant participer à la baisse de la conductivité et consistant dans le "masquage" des

molarité de AcNH_4 (courbes B) en fonction du volume d'effluent. Les courbes B mettent en évidence l'importance du gradient effectif qui s'établit à l'intérieur d'une colonne de gros diamètre (4 cm) dans un système dit "sans gradient" (la zone de variation des concentrations s'étale sur 150 ml). Dans le but d'obtenir la meilleure résolution possible par élution au moyen des sels, nous avons utilisé un dispositif de gradient. La comparaison de la courbe 2-A et de la courbe 2-B (Fig. 2) montre la lenteur de l'augmentation de la concentration saline de l'effluent dans un système avec gradient, bien que la concentration de la solution mère de AcNH_4 soit 10 fois supérieure à celle de la solution utilisée dans le système sans gradient. La comparaison de la Fig. 3 et de la Fig. 1-A permet de constater l'amélioration ainsi obtenue dans le fractionnement d'une solution contenant les scorpamines. En réalité, ce type de fractionnement ne se produit qu'avec des extraits relativement impurs, *i.e.* contenant

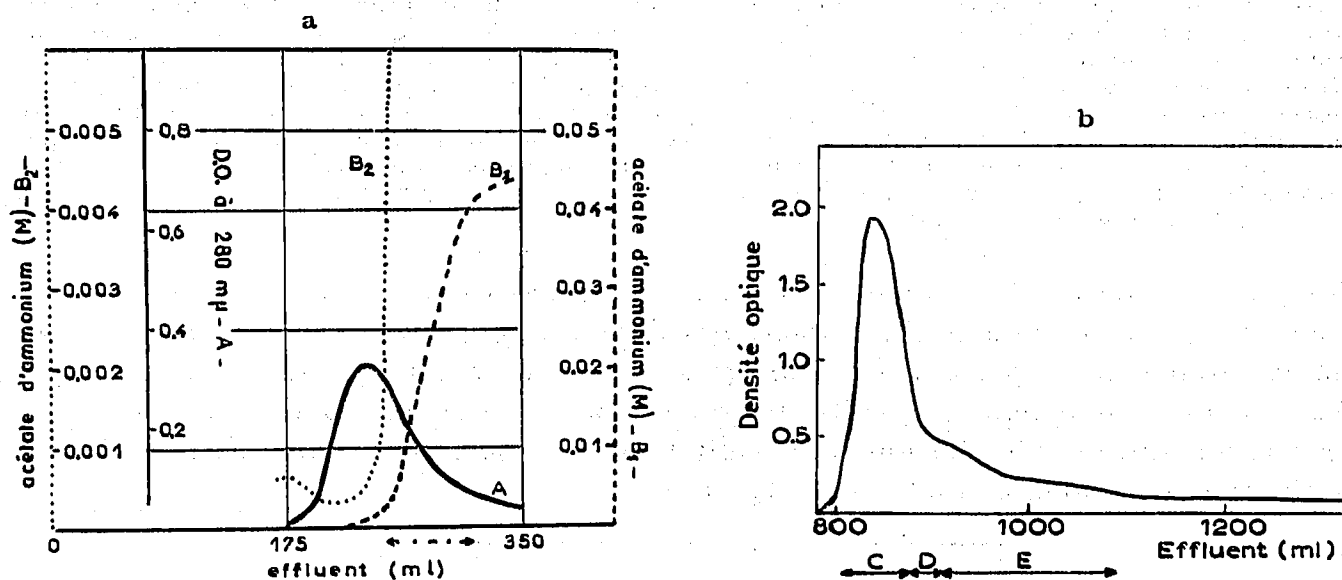


Fig. 1. (a) Elution des protéines d'un extrait toxique de telsons de scorpions sous l'action des sels dans un système dit "sans gradient". La courbe en trait plein (A) correspond à l'élution des protéines dont la fraction toxique est figurée sur l'axe des abscisses par la flèche ($\leftarrow\text{---}\rightarrow$); la courbe en trait interrompu (B₁) représente l'évolution de la molarité d' AcNH_4 avec une faible sensibilité (axe des ordonnées à droite); la courbe en trait pointillé (B₂) exprime le même phénomène avec une sensibilité 10 fois plus grande (axe des ordonnées à gauche). Seul le début de la courbe B₂ a pu être représenté dans ce nouveau système de coordonnées. Conditions expérimentales: colonne de 30×4 cm; lit de Sephadex G-25 de 23 cm de hauteur lavé à l'eau; extrait placé sur la colonne: solution aqueuse de 80 mg de la fraction C de la chromatographie préparative sur Amberlite représentée sur la Fig. 1b. Les fractions protéiques éluées à l'eau n'apparaissent pas sur la figure où sont seules représentées les fractions éluées par AcNH_4 0.05 M. (b) Schéma de la chromatographie préparative sur Amberlite CG-50 en tampon acétate d'ammonium 0.5 M de pH = 5.60 où figure la fraction C utilisée dans l'expérience précédente.

anions par les protéines basiques. C'est ainsi que si l'on recherche les chlorures par le nitrate d'argent dans l'effluent d'une colonne sur laquelle on a fixé du lysozyme en milieu aqueux, puis que l'on élue avec un gradient de NaCl (expériences 8 à 12 du Tableau II), on commence à observer, à partir d'un certain volume d'effluent, un léger précipité, puis une réaction franchement négative et, de nouveau, des précipités, cette fois de plus en plus abondants. Les fractions où l'on n'observe pas de précipité sont celles où la protéine commence à apparaître en quantités importantes alors que la concentration saline est encore faible. Des observations du même ordre ont été faites par REYNAUD dans un travail¹³ sur les anomalies de l'électrophorèse en veine liquide avec des tampons dilués qui met en évidence, d'une manière particulièrement démonstrative, l'interaction des protéines avec les anions.

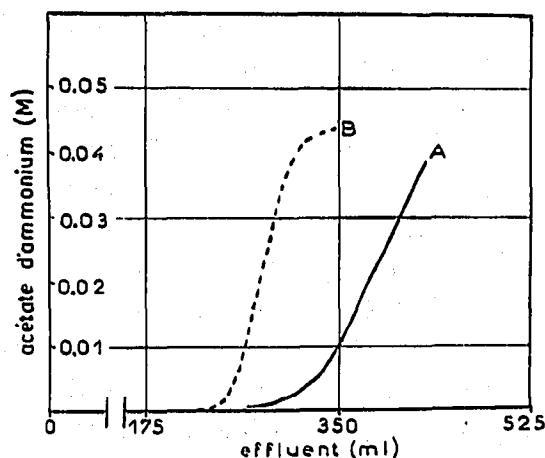


Fig. 2. Comparaison des concentrations salines dans l'effluent pour des systèmes "avec" et "sans" gradient. En trait plein: courbe A (système avec gradient: solution mère 10 fois plus concentrée que celle que l'on a utilisée dans le système sans gradient: AcNH_4 0.5 M au lieu de AcNH_4 0.05 M). En trait interrompu: courbe B (système sans gradient) identique à la courbe B_1 de la Fig. 1a. Même colonne que précédemment.

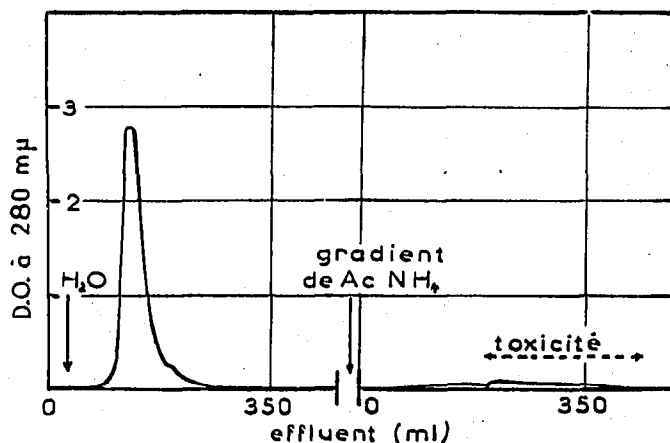


Fig. 3. Filtration dans un système avec gradient d'un extrait de scorpamines très impur. Même colonne que dans Fig. 1; même extrait que celui utilisé dans l'expérience de la Fig. 1a (courbe A); même gradient que celui représenté par la courbe A de la Fig. 2. Les protéines sont représentées par la courbe en trait plein. La fraction toxique s'étend sur toute la longueur de la flèche en trait interrompu.

des protéines de propriétés très différentes. Avec des extraits très purifiés (extraits aqueux de venins "manuels"), le fractionnement des protéines avec le gradient de sel est pratiquement imperceptible (Fig. 4) et le maintien d'un gradient doux risque d'abaisser le rendement (par suite de traînées sur la colonne) ou tout au moins, de réaliser une très grande dilution du produit. C'est pourquoi, on a, dans ce cas, utilisé de préférence un gradient rapide (AcNH_4 2.6 M).

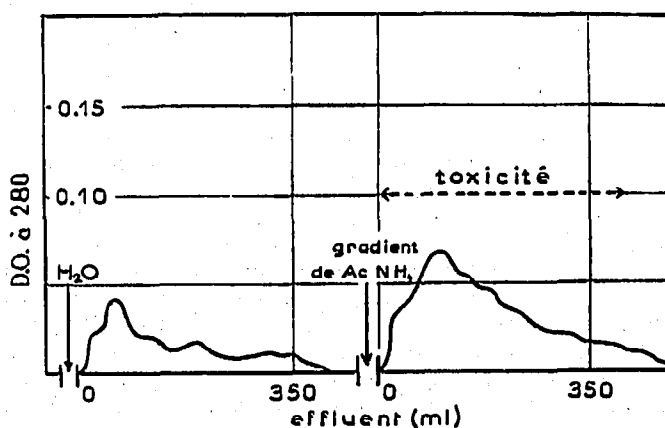


Fig. 4. Filtration d'un extrait toxique très pur. Même colonne que précédemment. La solution filtrée sur la colonne est une solution aqueuse de 30 mg de venin "manuel". Le gradient a été établi à partir d'une solution de AcNH_4 2.6 M. Mêmes conventions d'écriture que dans la Fig. 3.

RÉSULTATS

(Les résultats exposés ci-dessous ont tous été réalisés avec la colonne décrite en tête du paragraphe consacré à la méthode de rétention réversible.)

(1) *Comportement des scorpamines*

Dans son aspect qualitatif, le phénomène a été décrit au chapitre MÉTHODES. L'aspect quantitatif comporte l'étude de la capacité des colonnes. Dans le Tableau I, on a

TABLEAU I

CAPACITÉ D'UN LIT DE SEPHADEX G-25 DE 23 × 4 CM VIS-À-VIS DE DIFFÉRENTS EXTRAITS TOXIQUES

Expérience No.	Espèce	Définition du matériel filtré sur Sephadex	Toxicité (nombre de DL50*)	Présence de fractions aqueuses toxiques
1	<i>Buthus</i>	lyophilisat provenant d'un fractionnement préparatif sur Amberlite	1020	0
2	<i>Buthus</i>	même type de matériel	3997	0
3	<i>Buthus</i>	même type de matériel	26078	+
4	<i>Buthus</i>	extrait aqueux de venin obtenu par la méthode d'excitation électrique	5178	+
5	<i>Buthus</i>	même extrait	4571	+
6	<i>Buthus</i>	lyophilisat des fractions aqueuses obtenues dans les deux opérations précédentes	3900	0
7	<i>Androctonus</i>	extrait aqueux de venin obtenu par la méthode d'excitation électrique	6157	+
8	<i>Androctonus</i>	extrait aqueux de venin obtenu par la méthode d'excitation manuelle	6350	0
9	<i>Androctonus</i>	même extrait	9208	+

* Dose létale 50 p. 100 pour la souris blanche de 20 g calculée selon B. BEIRENS ET C. KARBBER, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 177 (1935) 379.

indiqué, pour quelques expériences, l'existence ou non d'un débordement du pouvoir fixateur du gel; les expériences 8 et 9, réalisées avec des quantités différentes de la même solution, sont particulièrement significatives. Le rendement en toxine éluée est compris entre 80 et 100 %.

 (2) *Cas de quelques protéines de poids moléculaire faible*

Le Tableau II résume les expériences les plus caractéristiques.

 (3) *Filtration d'une solution de chlorure de sodium dans l'eau*

La colonne avait été préalablement traitée à l'acide acétique N et lavée abondamment à l'eau. La Fig. 5 montre, en fonction du volume d'effluent, l'éluition des chlorures (courbe A) et l'évolution du pH (courbe B). On voit se développer, dès le début du fractionnement, une zone acide située légèrement en avant du pic de NaCl. Dès les

TABEAU II
TABEAU RÉCAPITULATIF D'EXPÉRIENCES DE FILTRATION SUR UN LIT DE SEPHADEX G-25 DE 23 × 4 CM DE DIFFÉRENTES PROTÉINES DE FAIBLE POIDS MOLÉCULAIRE

Expérience No.	Protéine	Conditions expérimentales*	Quantités sorties de la colonne						Récupération totale	
			Quantités placées sur la colonne		Dans le milieu d'équilibration de la colonne		Dans le gradient de sel suivant une élution aqueuse		En unités de D.O.	En %
			En poids (mg)	En unités de D.O.	Eau	En unités de D.O.	En %	En unités de D.O.		
1	Ribonucléase native	A	5	3.45	0	0	2.94	85.2	2.94	85.2
2		A	10	6.90	0.486	7	6.021	87.3	6.507	94.3
3		A	20	13.80	2.187	15.8	—	—	—	—
4		B	20	13.80	5.4	39.1	8.48	61.4	13.88	100
5		C	20	13.80	1.701	12.3	10.574	76.6	12.275	88.9
6	Ribonucléase performique	A	5	2.575	1.809	70.2	0.743	28.9	2.552	99.1
7	Lysozyme	D	5	10.25	0	0	10.14	98.9	10.14	98.9
8		A	5	10.25	0	0	9.65	94.1	9.65	94.1
9		A	10	20.50	0	0	20.73	100	20.73	100
10		A	20	41	0	0	41.9	100	41.9	100
11		A	40	82	0	0	81.05	99.6	81.65	99.6
12		A	80	164	0.481	0.3	167.935	100	168.416	100
13	Insuline	E	5	4.547	3.471	76.3	—	—	—	—

* Aux différentes lettres inscrites dans cette colonne correspondent les conditions expérimentales suivantes: A = colonne préalablement lavée à l'eau, puis éluee successivement par l'eau et par un gradient de sel; B = colonne préalablement traitée par l'acide acétique N et lavée à l'eau, puis éluee successivement par l'eau et par un gradient de sel; C = colonne préalablement traitée par la soude N et lavée à l'eau, puis éluee successivement par l'eau et par un gradient de sel; D = colonne préalablement équilibrée dans une solution saline et éluee par la même solution saline; E = colonne préalablement lavée à l'eau, puis éluee par l'eau.

premières fractions, d'autre part, on trouve des traces de chlorures non dosables mais se révélant à AgNO_3 . La fraction la plus acide accuse un pH de 2.69 correspondant à une quantité totale de 5μ équiv. de HCl , soit 0.05 ml de HCl 0.1 N. Par contre, après l'élution des chlorures, la courbe du pH tend vers des valeurs supérieures à 7.

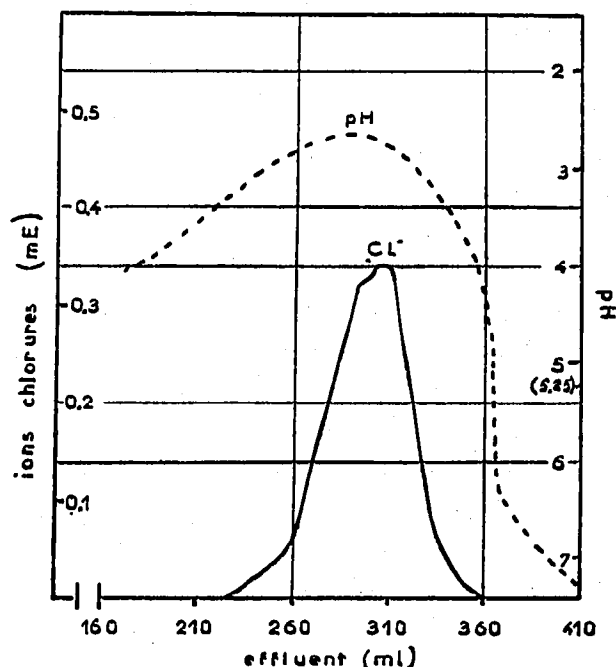


Fig. 5. Filtration du chlorure de sodium dans l'eau pure. Même colonne que dans Fig. 1 ayant subi un prétraitement par $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 1 N. La solution filtrée est constituée par 5 ml de solution aqueuse de NaCl à 10 %. En trait plein la courbe représentant l'élution des ions chlorures (courbe Cl^-). En trait interrompu la courbe des pH (courbe pH). L'échelle des pH a été disposée par ordre décroissant. Le pH de l'eau bidistillée utilisée dans l'expérience était 5.25.

(4) Cas de l'hémoglobine

L'hémoglobine qui n'entre pas dans le groupe des protéines basiques étudié précédemment, a été utilisée comme substance test pour la mesure de V_0 par la méthode de filtration. Cette opération a été faite en solution saline. En effet, dans l'eau, l'hémoglobine reste totalement fixée sur la colonne (la capacité de la colonne, dans ce cas, est beaucoup plus grande que précédemment : de l'ordre de 1 g). L'application d'un gradient de sel conduit alors à l'élution de 2 fractions représentant 90 % de la totalité. Si la colonne a été traitée préalablement avec NaOH 1 N, on constate qu'une fraction importante (30 %) s'élue avec l'eau. Dans les deux cas, environ 10 % de l'extrait restent fixés au sommet de la colonne. Cette fraction présente, par ailleurs, les caractères de la méthémoglobine.

DISCUSSION

(1) Démonstration du phénomène d'échange d'ions

La rétention sur Sephadex des toxines de scorpions en milieu aqueux n'entre pas dans le cadre d'un tamisage moléculaire puisque l'on peut laver la colonne avec des volumes

d'eau aussi importants que $5(V_0 + V_t)$ sans parvenir à déceler la moindre toxicité dans l'éluat. D'ailleurs, le Sephadex G-25 étant donné pour exclure les molécules de P.M. 4000 et les résultats de l'ultracentrifugation s'accordant pour conférer aux toxines un P.M. de 12,000, il y avait une impossibilité théorique à concevoir une pénétration quelconque dans les grains du gel. Le comportement des scorpamines en milieu salin le confirme puisqu'elles sortent, dans ces conditions, dans le volume V_0 . Il en est de même pour le lysozyme (P.M.: 15,000, $\text{pH}_1 = 11$) qui subit dans l'eau une rétention plus énergique que celle des toxines et sort, en milieu salin (expérience 7 du Tableau II) pratiquement dans le volume V_0 .

Quant au mécanisme de la rétention, deux types de données paraissent significatives: (a) Qualitatives: les toxines de scorpions sont des protéines à pH_1 basique; il en est de même de l' α -chymotrypsinogène qui est retenu dans les mêmes circonstances¹⁴; nous avons utilisé d'autres protéines de la même famille; ribonucléase, lysozyme, avec un résultat identique. Par contre, les protéines à pH_1 neutre ou acide (insuline, ribonucléase à pH_1 modifié par oxydation performique) sortent principalement dans l'eau (Tableau II). (b) Quantitatives: elles concernent l'importance du pouvoir de rétention de la colonne. Le Tableau I, consacré aux scorpamines, indique qu'il y a débordement de la colonne autour de 4000 DL_{50} — soit 12 mg ou 10 μ équiv. — pour la toxine de *Buthus* et autour de 6000 DL_{50} — soit 6 mg ou 5 μ équiv. — pour la toxine d'*Androctonus**. Le Tableau II montre que l'affinité du Sephadex croît avec le pH_1 des protéines: c'est ainsi que la ribonucléase (P.M. = 14,000, $\text{pH}_1 = 9.5$), qui a un comportement électrophorétique très voisin de celui des toxines, est fixée par le gel dans les mêmes proportions que celles-ci. Le lysozyme, de pH_1 nettement plus élevé (11.0), est beaucoup plus retenu. Corrélativement, la sortie des protéines dans le gradient de sel doit se faire par ordre de pH_1 croissant: c'est ainsi que le lysozyme sort avec un léger retard sur la ribonucléase. Quoi qu'il en soit, les valeurs de la capacité de la colonne vis-à-vis des protéines basiques restent faibles et constituent une présomption supplémentaire en faveur d'un mécanisme d'échange d'ions, si l'on tient compte des observations de GELOTTE⁹ sur la filtration des petites molécules.

La preuve de l'échange d'ions est apportée par la filtration d'une solution de NaCl à 10 % sur une colonne traitée par $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 1 N, opération destinée à régénérer les fonctions carboxyliques pouvant se trouver à l'état de sels. On peut constater sur la Fig. 5 que tous les éléments du raisonnement suivant sont vérifiés: NaCl doit sortir de la colonne avec un volume d'effluent de $V_0 + 0.8 V_t$ soit 255 ml. HCl doit se former en petite quantité, compte tenu de la faible concentration des groupements ionisés sur le Sephadex (10 μ equiv./g de gel sec d'après GELOTTE⁹). Cependant, il doit prendre naissance tout au long de la colonne, au fur et à mesure que progresse le front de NaCl. Sa migration doit obéir en partie à la règle de la "sorption négative" établie par GELOTTE⁹ pour les acides à l'état de traces en milieu aqueux pur ($K_D = 0.2$). Les premières molécules de HCl formées doivent apparaître à partir du volume $V_0 + 0.2 V_t$ soit 150 ml, se signalant par un abaissement du pH et des réactions faibles avec

* 1 DL_{50} correspond à 3 μg de toxine pour *B. occitanus* et à 1 μg pour *A. australis*.

AgNO_3 . Le sommet de la courbe du pH^* doit se trouver pratiquement dans la zone du chlorure de sodium où la migration de HCl est perturbée. Dans cette zone, HCl se forme continuellement. Mais, du fait de la tendance à son exclusion du gel par répulsion électrostatique, la valeur minimum du pH doit précéder légèrement le maximum de la valeur obtenue pour les chlorures. Enfin, après le passage de NaCl , il reste quelques ions Na^+ fixés sur la colonne. Ceux-ci vont amener un relèvement sensible du pH , en particulier par neutralisation du CO_2 de l'eau et apparition dans l'effluent de bicarbonates à dissociation alcaline.

Le phénomène d'échange se présente naturellement sous une forme plus complexe lorsqu'il met en jeu des protéines. C'est ainsi que les expériences comportant un pré-traitement du gel font apparaître un aspect particulier du mécanisme. Le Tableau II montre qu'une colonne lavée à la soude est plus active qu'une colonne lavée à l'acide. Les protéines basiques utilisées ont été isolées en présence d'électrolytes, à un pH voisin de la neutralité. Elles se trouvent sous forme de sels avec une forte concentration d'anions neutralisants, puisqu'elles fonctionnent alors essentiellement comme cations. Une des modalités de l'échange pourrait donc consister dans la capture d'un anion de la protéine par un cation en équilibre avec un carboxyle du Sephadex. Il se formerait ainsi, à partir de ces ions de petit diamètre (donc, très actifs), une molécule de sel diffusible entraînée par le flux. Corrélativement, la protéine base s'accroche sur le carboxyle libre, ce qui n'exclut pas que d'autres liaisons puissent s'établir, par la suite, entre les deux macromolécules**.

(2) Échange d'ions et loi d'action des masses

L'échange d'ions réalisé par le Sephadex ne se manifeste pratiquement que dans l'eau pure, c'est-à-dire dans un milieu peu chargé en ions. Dans ces conditions, les carboxyles du gel, bien qu'en faible concentration, peuvent jouer un rôle déterminant vis-à-vis des substances à séparer, si celles-ci se trouvent elles-mêmes dans des concentrations du même ordre. Nous avons observé des phénomènes analogues avec les carboxyles des papiers de chromatographie^{15, 16}. L'échange d'ions est par excellence, un mécanisme régi par la loi d'action des masses dont nous vérifions ici plusieurs applications:

(a) Le déplacement joue en faveur des groupements échangeurs fixes (carboxyles), même lorsqu'ils sont plus faibles que les groupements ionisés du solvant (chlorures par exemple). En effet, les combinaisons qui se forment à la surface du gel sont immédiate-

* La valeur du pH au sommet de la courbe: 2.69 exclut définitivement toute possibilité de pouvoir expliquer le phénomène de la baisse du pH par un "relargage" dans l'effluent, sous l'action de NaCl , de reliquats de l'acide acétique avec lequel on avait traité préalablement la colonne. Celle-ci avait été lavée avec 4 l d'eau (K_D de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ selon GELOTTE⁹: 0.8).

** Le principe de la fixation sur le gel, de la molécule protéique par une seule fonction carboxylique est satisfaisant pour l'esprit parce qu'il expliquerait pourquoi des traces de sels suffisent à décrocher les protéines et, d'autre part, pourquoi l'activité est pratiquement intégralement conservée. Il convient, par ailleurs, de signaler, lors des pré-traitements du gel, des différences de gonflement notables: rétraction en milieu acide et dilatation en milieu alcalin. Ces variations de l'état d'hydratation sont liées, très probablement, à des modifications ioniques et ne sont pas sans rappeler le comportement d'une résine carboxylique du type Amberlite CG-50 dans les mêmes conditions. Elles pourraient également participer, dans une certaine mesure, à l'explication de ces changements dans les propriétés de rétention du Sephadex vis-à-vis des protéines basiques.

ment soustraites au milieu qui leur a donné naissance sous l'action du flux (généralement très rapide avec le Sephadex).

(b) Dans le cas où la capacité de la colonne semble être débordée, on fixe cependant beaucoup plus de protéines avec une solution concentrée qu'avec une solution diluée*. Ainsi l'expérience 3 du Tableau I met en jeu, au départ, 5 fois plus de toxines que l'expérience 4. Cependant, la toxicité sortie dans l'élution aqueuse est comparable dans les deux cas. Même remarque au sujet de la ribonucléase (expériences 2 et 3 du Tableau II)**.

(c) Les expériences sont difficilement reproductibles pour peu que les conditions changent (expériences 7 et 8 du Tableau I): différences dans la composition des extraits soumis au fractionnement (variation de concentration des protéines étrangères et traces de sels minéraux jouant le rôle d'inhibiteurs compétitifs), présence d'ions dans l'eau (CO₂), état de saturation des carboxyles du Sephadex (fonction des traitements antérieurs de la colonne).

(3) Cas de l'hémoglobine

Les propriétés physico-chimiques et la structure de l'hémoglobine, ainsi que la forte capacité des colonnes de Sephadex vis-à-vis de cette protéine, militent en faveur d'un phénomène d'adsorption. Cependant, il est vraisemblable que l'application de la méthode décrite ci-dessus puisse conduire, dans certains cas, à des séparations intéressantes, compte non tenu des risques de dénaturation.

Nous venons de décrire une technique qui permet dans un temps très court (2 h environ), et pratiquement sans dénaturation, de purifier très efficacement des solutions de scorpamines en séparant les fractions aqueuses inactives des fractions salines actives (Fig. 6). Dans le cadre de la poursuite de nos recherches sur l'isolement des protéines basiques sur gel de dextrane, une étude est en cours sur l'amélioration de la résolution des protéines à l'intérieur du gradient de sel. Nous disposons à cet égard d'un excellent test: la chromatographie des scorpamines sur Amberlite CG-50 où les deux principes toxiques du venin de chacune des espèces de scorpions se distinguent parfaitement⁵.

* La notion de capacité doit, par conséquent, être précisée, même lorsqu'il y a débordement de la colonne. On peut considérer une capacité relative qui est fonction de la quantité de substance déposée sur la colonne. La capacité absolue est la valeur vers laquelle tend la capacité relative lorsque la concentration de la solution croît. Cette valeur ne dépend, elle, que de la quantité de gel utilisée. La nature du gel intervient également. Nous avons utilisé, les deux types de gel, pour lesquels l'effet de tamisage ne pouvait intervenir: G-50 et G-25, qui excluent les molécules de P.M. > 10,000. G-25 présente 2 avantages: (1) il retient par tamisage moins d'impuretés que G-50 puisque son degré de branchement est plus élevé; (2) étant plus dense, il offre une capacité d'échange plus grande dans le même volume.

** Ces observations donnent la solution d'un problème pratique: la purification d'un extrait contenant une quantité de substances supérieure à ce que peut admettre une colonne sans débordement. On pourrait utiliser une méthode consistant à diviser l'extrait initial en deux parties aliquotes que l'on traiterait séparément. On recueille les éluions aqueuses qui sont rassemblées, concentrées et repassées sur colonne. Cela représente en tout 3 filtrations. Par contre, on peut passer la totalité de l'extrait sur colonne, concentrer les fractions aqueuses actives et, dans une deuxième opération, achever la purification. Un exemple numérique est fourni par les résultats des expériences 1, 2 et 3 du Tableau II. L'intérêt de la méthode est encore plus évident lorsque *n* opérations de filtration sont nécessaires.

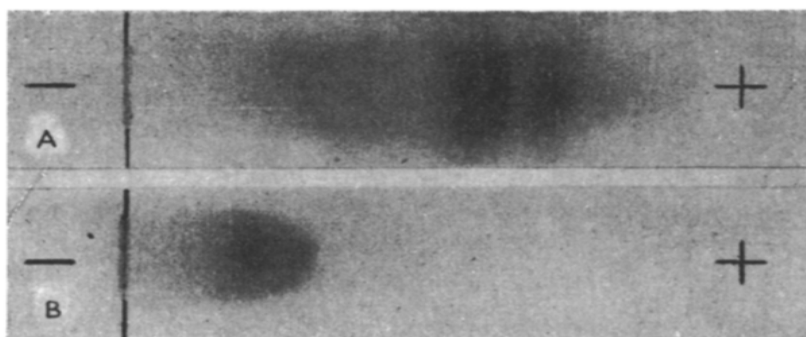


Fig. 6. Photographie des électrophorogrammes obtenus après passage sur Sephadex G-25 d'une fraction chromatographique toxique provenant des telsons de *Bulhus occitanus*. A = élution par l'eau (non toxique), B = élution par l'acétate d'ammonium 0.05 M (toxique). Tampon véronal, force ionique 0.1, pH = 8.6; papier: Schleicher et Schüll 2043 a Mg1; 120 V; 0.3 mA/cm; durée 15 h; révélation amido-schwarz 10 b; technique à contre-courant.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. S. FRONTINO qui a organisé la collecte des scorpions à Méchéria (Algérie). Nous sommes également très reconnaissants au Dr. J. REYNAUD d'avoir réalisé les mesures de conductivité.

RÉSUMÉ

1. Le pouvoir échangeur d'ions du gel de dextrane Sephadex a été utilisé dans une technique de rétention réversible des toxines de Scorpions.
2. La méthode a été généralisée aux protéines basiques de faible poids moléculaire (ribonucléase, lysozyme).
3. Le phénomène est régi par la loi d'action des masses dont plusieurs conséquences pratiques ont été vérifiées.

SUMMARY

1. The ion-exchange properties of dextran gel (Sephadex) were utilized in a method for the reversible retention of the toxins of scorpions.
2. The method was generalized and applied to basic proteins of low molecular weight (ribonuclease, lysozyme).
3. The phenomenon is governed by the law of mass action, of which several practical consequences were verified.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 193.
- ² W. BJÖRK ET J. PORATH, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 1256.
- ³ F. MIRANDA ET S. LISSITZKY, *Biochim. Biophys. Acta*, 30 (1958) 217.
- ⁴ F. MIRANDA, H. ROCHAT ET S. LISSITZKY, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 379.
- ⁵ F. MIRANDA ET S. LISSITZKY, *Nature*, 190 (1961) 443.
- ⁶ S. LISSITZKY, F. MIRANDA, P. ETZENSPERGER ET J. MERCIER, *Compt. rend. soc. biol.*, 150 (1956) 741.
- ⁷ S. LISSITZKY ET F. MIRANDA, *Bull. soc. pharm. Marseille*, 5 (1956) 121.
- ⁸ Y. DERRIEN, G. LAURENT ET M. BORGOMANO, *Bull. soc. chim. biol.*, 42 (1960) 519.

- ⁹ B. GELOTTE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 330.
¹⁰ J. GRÉGOIRE, J. GRÉGOIRE ET N. LIMOZIN, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 767.
¹¹ D. W. ALLEN, W. A. SCHROEDER ET J. BALOG, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 1628.
¹² P. FLODIN, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 103.
¹³ J. REYNAUD, *Étude et essais d'interprétation des anomalies de l'électrophorèse en veine liquide de faible force ionique*, Thèse Sciences Phys., Paris, 1959, 158 p.
¹⁴ P. E. WILCOX ET J. LISOWSKI, *Federation Proc.*, 19 (1960) 333.
¹⁵ F. MIRANDA ET S. LISSITZKY, *Compt. rend.*, 243 (1956) 1458.
¹⁶ F. MIRANDA ET S. LISSITZKY, *J. Chromatog.*, 2 (1959) 354.

J. Chromatog., 7 (1962) 142-154