

Filtration sur gel moléculaire en couche mince des venins de Colubridés

La filtration sur gel moléculaire suivant la technique de la chromatographie en couche mince est d'origine récente ; elle fut mise au point par DETERMANN¹, JOHANSON ET RYMO² et MORRIS³.

Dès 1962, les gels fins de dextrane (200-400 mesh) utilisés en couche mince avaient permis la séparation de protéines dont les masses moléculaires s'échelonnaient de 15,000 à 70,000. Ce n'est cependant qu'à l'apparition sur le marché de gels superfins (400 mesh) sous forme de "perles" que la méthode put se développer.

En 1964, utilisant la technique de filtration sur gel en couche mince, JOHANSON ET RYMO⁴ s'attachent à la séparation des protéines du sérum sanguin tandis que MORRIS³ effectue une étude sur un groupe de quatorze protéines dont les masses moléculaires s'échelonnent de 13,000 à plus d'un million ; il met en évidence une corrélation entre le R_{Hb} observé et la masse moléculaire. Cette technique sera reprise ultérieurement par DETERMANN⁵.

Récemment, ROBERT⁶ décrit l'application des couches minces de Sephadex G-50 à la séparation de mucopolysaccharides et de peptides tandis que HANSON, JOHANSON ET RYMO⁷ utilisent une technique bidimensionnelle en combinant la filtration et l'électrophorèse.

Matériel et méthodes

Les gels "Sephadex" sont mis à gonfler pendant 48 h dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7, chargé en NaCl 0.5 M (tampon d'éluion). Le gel est étendu au moyen d'un étaleur Unoplan-Shandon sur une épaisseur de 0.8 mm et les plaques sont déposées horizontalement pendant 24 h dans une enceinte fermée dont le degré hygrométrique est maintenu constant par équilibre avec le tampon d'éluion.

Les échantillons contenant 20 à 200 μg dissous dans 1 à 5 μl de tampon sont déposés à 3 cm du bord inférieur de la plaque à l'aide d'une micropipette "microcaps", en veillant à ne pas endommager le gel.

La filtration est conduite suivant la technique de chromatographie descendante décrite par MORRIS³. Elle s'effectue dans l'enceinte fermée décrite plus haut et nécessite de 8 à 15 h pour des plaques de 20 cm. Les plaques sont alors retirées de l'enceinte, appliquées sur une feuille de papier (Whatman 3 MM) et séchées à l'étuve à 60°. On obtient ainsi un négatif sur papier que l'on colore par immersion pendant 1 h dans une solution aqueuse de Noir Amido 10 B à 0.5 % dans l'acide acétique à 5 % jusqu'à obtention d'un fond incolore, puis on le sèche à l'étuve.

Les distances parcourues par les différentes protéines (dp) sont mesurées et rapportées à la distance parcourue par l'hémoglobine (dh) utilisée comme substance colorée de référence. Le rapport dp/dh des deux distances mesurées est le R_{Hb} de la protéine considérée.

Résultats et discussion

La méthode décrite ci-dessus permet d'obtenir aisément et d'une manière reproductible une "image chromatographique" du venin ou de la fraction de venin étudiée.

Les Fig. 1 et 2 illustrent le pouvoir de résolution de la technique vis-à-vis de quelques protéines de référence et vis-à-vis de différents venins.

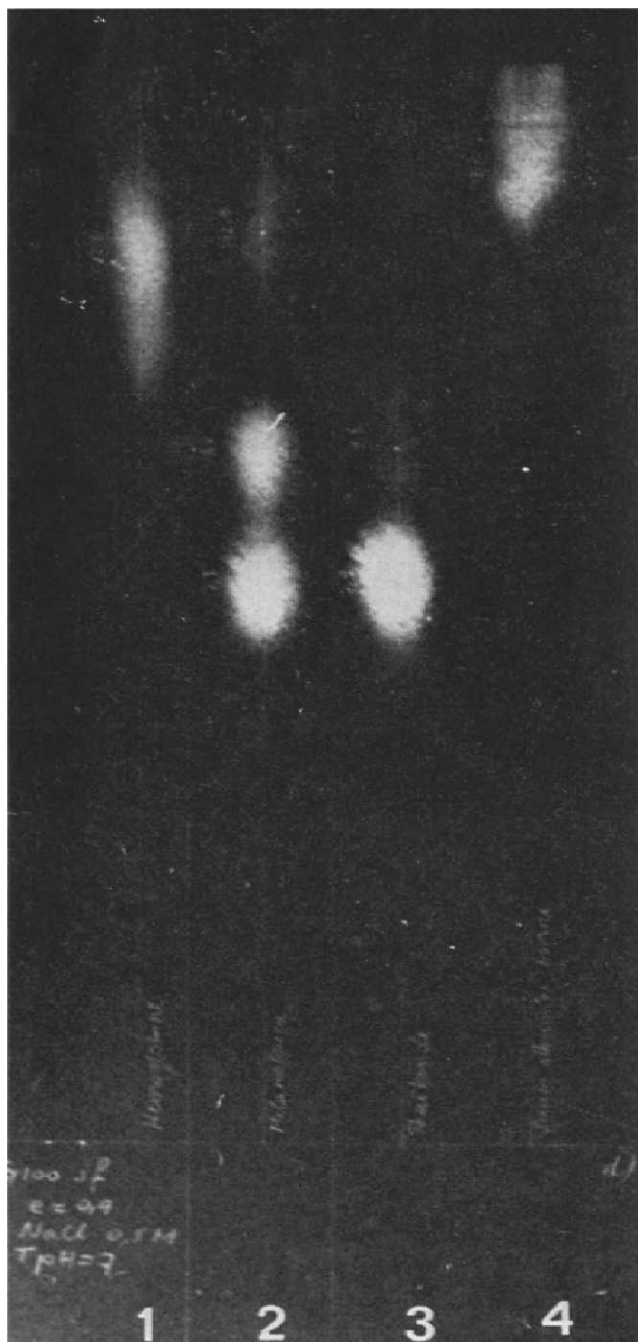


Fig. 1. Négatif sur papier obtenu après filtration sur gel Sephadex G-100 sf en couche mince, élution par tampon phosphate/NaCl pH 7, $\mu = 0.9$. I = Hémoglobine; II = venin de *Naja mélanoleuca*; III = venin de *Naja naja* (Thaïlande); IV = sérum albumine bovine.

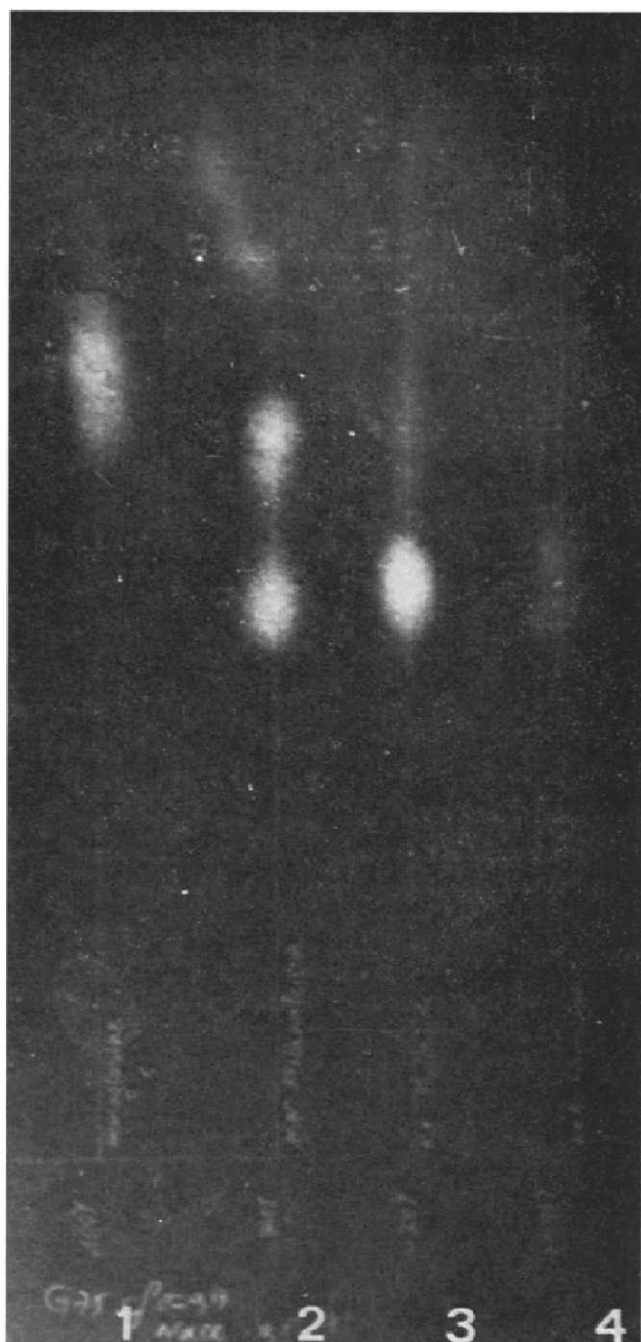


Fig. 2. Négatif sur papier obtenu après filtration sur gel Sephadex G-75 sf en couche mince. Elution par tampon phosphate/NaCl pH 7, $\mu = 0.9$. I = Hémoglobine; II = venin de *Naja mélanoleuca*; III = venin de *Naja naja* (Thaïlande); IV = venin de *Naja naja atra* (Formose).

Les résultats obtenus sur plus de cent chromatoplaques ont été rassemblés, classés et comparés dans les Tableaux I-III. On peut en conclure qu'il existe une analogie de comportement des différents venins du genre *Naja* vis-à-vis de la filtration sur gel en couche mince. En effet, leurs chromatogrammes présentent des spots de

TABLEAU I
DÉTERMINATION DE R_{Hb} DE DIFFÉRENTES PROTÉINES

Protéines	Abréviation	Masse moléculaire	R_{Hb} sur G-200	R_{Hb} sur G-100	R_{Hb} sur G-75
Cytochrome C	Cyt C	13 000	0.75	0.65	
Lysozyme	Lys	14 500	0.70	0.65	
α -Chymotrypsine	α -Chym	22 500	0.87	0.81	
Hémoglobine	Hb	34 000*	1	1	1
Serum albumine bovine	SAB mono bi	35 000 70 000	1.08 1.26	1.08 1.20	1.04 1.25

* L'hémoglobine se comporte lors de la filtration sur gel comme une molécule dédoublée.

TABLEAU II
COMPORTEMENT DES VENINS DE *Naja naja atra* ET *Naja melanoleuca* ET DE LA SERUM ALBUMINE BOVINE LORS DE LA FILTRATION SUR DES GELS DE DIFFÉRENTES RÉTICULATIONS. R_{Hb} OBTENUS

Gel	<i>Naja naja atra</i> (Nna)					<i>Naja melanoleuca</i> (Nm)					Serum albumine bovine	
	Fraction I	I'	II	III	IV	I	II	III	III'	IV	I	II
G-75	0.58	—	0.78	1.00	1.25	0.60	0.79	1.04	—	1.17	1.04	1.25
G-100	0.60	0.64	0.79	1.05	1.23	0.64	0.83	1.07	—	1.31	1.08	1.20
G-200	0.70	—	0.88	1.12	1.41	0.70	0.86	1.07	1.38	1.48	1.08	1.26

TABLEAU III
COMPARAISON DES R_{Hb} DE QUELQUES VENINS SUR SEPHADEX G-100

Venins	Abréviation	Fraction			
		I	II	III	IV
<i>Naja naja atra</i>	N na	0.64	0.79	1.05	1.23
<i>Naja melanoleuca</i>	N m	0.64	0.83	1.07	1.30
<i>Naja naja</i> (Thaïlande)	N nT	0.64	0.82	1.08	1.32
<i>Naja nivea</i>	N nivea	0.64	0.80	1.07	peu visible
<i>Bothrops jararaca</i>	—	0.79	1.08	—	—

même R_{Hb} quoique de concentrations différentes. Par contre, on constate qu'un venin de *Bothrops* (Vipéridé) présente un chromatogramme foncièrement différent.

La comparaison des chromatogrammes obtenus pour les venins et pour différentes protéines de référence montre que dans le cas du venin de *Naja naja atra* la grosse majorité des constituants se situe dans une zone de poids moléculaires faibles (6 000 à 20 000). Par contre, dans le cas du venin de *Naja melanoleuca*, on constate la

présence d'une zone importante de constituants de poids moléculaires moyens (20 000 à 30 000).

En tant que technique de contrôle, la filtration sur gel en couche mince est loin d'atteindre les performances de l'électrophorèse sur gélose ou sur acrylamide. Elle nous a cependant à plusieurs reprises apporté de précieux renseignements notamment dans la prévision du comportement des venins sur colonnes de Sephadex et dans des estimations de poids moléculaires sur des quantités de matériel protéique de 50 à 100 μg .

A la lumière des résultats obtenus, il nous semble pouvoir dire que l'utilisation de cette méthode ne se justifie que pour des substances disponibles en très faibles quantités (moins de 1 mg). En effet, les résultats obtenus sur microcolonnes calibrées avec des quantités de l'ordre de 1 à 10 mg sont nettement supérieurs et requièrent moins de manipulations. L'utilisation de ces microcolonnes dans des buts analytiques fera l'objet d'une publication ultérieure.

Nous remercions la Province de Brabant et la F. W. Breth Foundation grâce auxquelles ce travail a pu être accompli.

*Service de Biochimie, Institut des Industries de Fermentation,
Institut Meurice-Chimie, 1, Avenue Emile Gryson,
Bruxelles 7 (Belgique)*

F. CROMMELYNCK
L. BRISBOIS
J. PEETERS
L. GILLO

- 1 H. DETERMANN, *Experientia*, 18 (1962) 430.
- 2 B. G. JOHANSON ET L. RYMO, *Acta Chem. Scand.*, 16 (1962) 2067.
- 3 C. J. O. R. MORRIS, *J. Chromatog.*, 16 (1964) 167.
- 4 B. G. JOHANSON ET L. RYMO, *Acta Chem. Scand.*, 18 (1964) 217.
- 5 H. DETERMANN ET M. WOLFGANG, *Z. Anal. Chem.*, 212 (1965) 211.
- 6 G. P. ROBERT, *J. Chromatog.*, 22 (1966) 90.
- 7 A. HANSON, G. JOHANSON ET L. RYMO, *Clin. Chim. Acta*, 14 (1966) 391.

Reçu le 9 août 1967