

CHROM. 3540

Utilisation des dextrans modifiés pour le fractionnement du venin de cobra

Les celluloses modifiées ainsi que les gels moléculaires ont permis ces dernières années, de nombreuses nouvelles recherches dans le domaine des venins de serpents.

Il nous a semblé intéressant d'étudier d'une manière systématique les possibilités de séparation offertes par les dextrans modifiés récemment commercialisés* pour le fractionnement du venin de *Naja naja atra* sur lequel nous travaillons plus particulièrement¹. Ces supports chromatographiques n'ont été que peu utilisés jusqu'à présent pour le fractionnement des venins de serpents²⁻⁵ et à notre connaissance seuls VICK et coll.⁶ ont fractionné le venin de cobra par cette technique (CM-Sephadex) dans le but d'en isoler les fractions toxiques.

Les données bibliographiques⁷ ainsi que les études électrophorétiques réalisées précédemment dans notre laboratoire⁸ montrent que la majorité des constituants du venin de *Naja naja atra* se comportent comme des protéines basiques et nous nous sommes de ce fait principalement attachés à l'étude du fractionnement de ce venin sur des supports de type cationique: CM-Sephadex et SE-Sephadex.

Les essais d'orientation ont été effectués sur des quantités de venin de l'ordre de 30 mg au moyen de microcolonnes de 0.7×30 cm. Les gradients de concentration et de pH ont été obtenus au moyen d'un appareil à deux chambres du type de celui décrit par HENRY et coll.⁹.

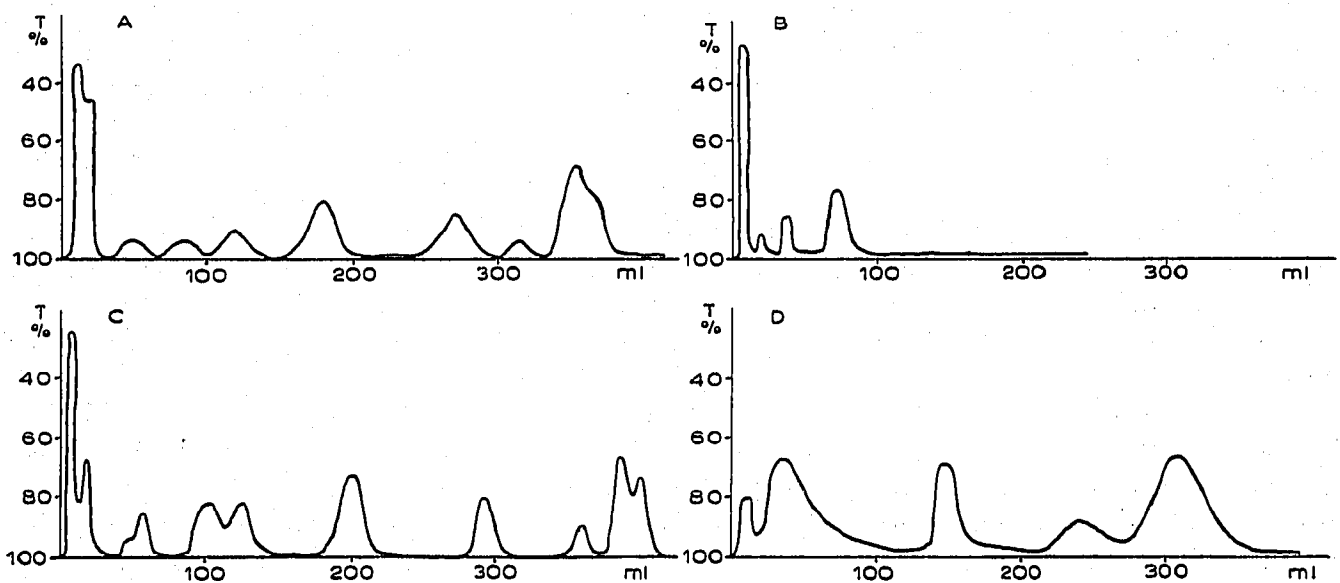


Fig. 1. Étude comparative sur microcolonne (diamètre: 0.7 cm, hauteur: 25 cm) des différents dextrans modifiés. (A) CM-Sephadex C 25. Échantillon: 30 mg venin. Gradient linéaire: $0 \rightarrow 0.5$ M NaCl. Tampon: pH 6.0 (PO_4^{3-} , 0.05 M). (B) DEAE-Sephadex A 25. Échantillon: 30 mg venin. Gradient linéaire: $0 \rightarrow 0.5$ M NaCl. Tampon: pH 8.0 (Tris-HCl, 0.05 M). (C) SE-Sephadex C 25. Échantillon: 30 mg venin. Gradient linéaire: $0 \rightarrow 0.5$ M NaCl. Tampon: pH 6.0 (PO_4^{3-} , 0.05 M). (D) SE-Sephadex C 50. Échantillon: 30 mg venin. Gradient linéaire: $0 \rightarrow 0.9$ M NaCl. Tampon: pH 6.0 (PO_4^{3-} , 0.05 M).

* Pharmacia, Uppsala, Suède.

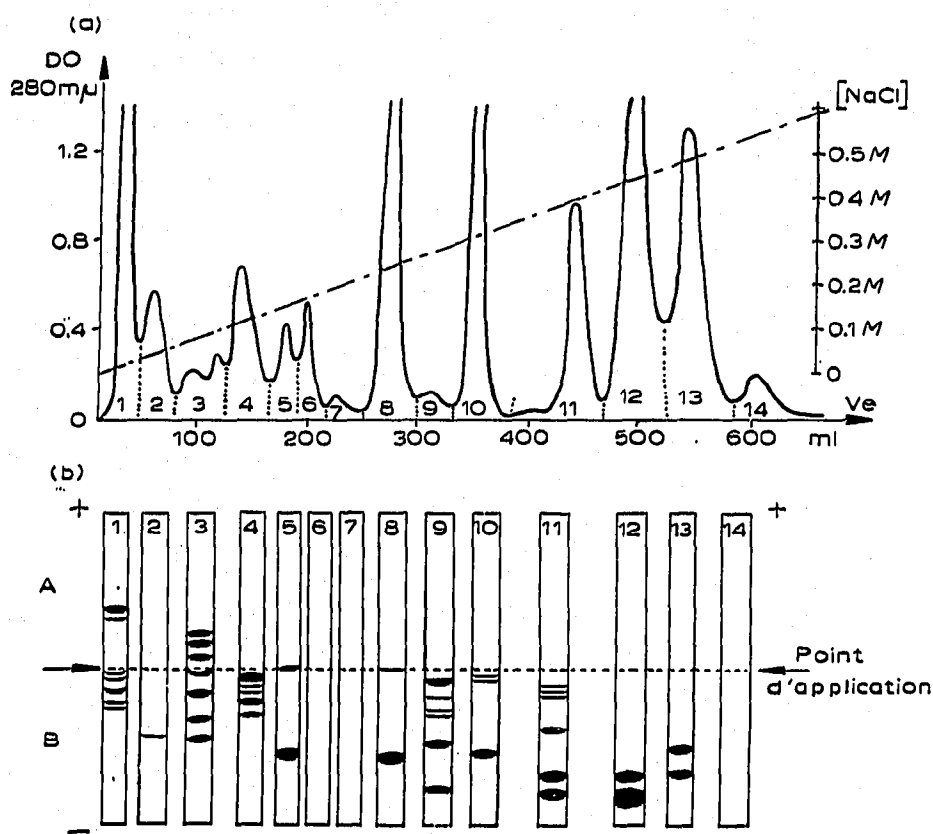


Fig. 2. (a) Fractionnement du venin de *Naja naja atra* sur SE-Sephadex C 25. Colonne: diamètre, 1.5 cm; hauteur: 40 cm. Échantillon: 500 mg venin lyophilisé. Débit: 0.5 ml/min (pompe péristaltique). Gradient linéaire: NaCl, 0 → 0.6 M. Tampon: 6.0 (PO_4^{3-} , 0.05 M). (b) Electrophorèse en disque (gel d'acrylamide). (A) gel à 7.5 % de monomère, pH 8.9; (B) gel à 15 % de monomère, pH 4.3.

Le débit de la colonne est réglé par une pompe péristaltique; il varie pour les microcolonnes entre 0.1 et 0.3 ml/min.

L'éluat est analysé directement à la sortie de la colonne par passage dans une unité optique type Uvicord II (280 m μ) qui permet l'enregistrement en continu de la courbe d'éluat.

De la série d'essais d'orientation effectués sur microcolonnes (Fig. 1), il résulte que:

(a) Comme prévu les échangeurs cationiques (CM et SE) donnent de meilleurs résultats que les anioniques (DEAE). Le CM-Sephadex fractionne mieux les protéines les moins basiques (où l'on retrouve principalement les enzymes) tandis que le SE-Sephadex donne une résolution supérieure des substances plus basiques (principalement protéines et peptides ne présentant aucune des activités enzymatiques classiques du venin de cobra).

(b) Toutes les autres conditions étant égales, la résolution est meilleure avec les gels échangeurs type C 25 (forte réticulation) qu'avec les C 50 (faible réticulation) ce qui peut s'expliquer par le fait que la majorité des constituants du venin sont des substances à faible poids moléculaire.

(c) Un gradient de concentration s'est avéré plus efficace qu'un gradient de pH.

Sur base des résultats obtenus au moyen de ces microcolonnes analytiques nous avons tenté l'extrapolation à des colonnes préparatives. Dans ce but nous avons soumis

500 mg de venin de cobra formosan (*Naja naja atra*) à la chromatographie sur SE-Sephadex C 25 sur une colonne de 1.5 cm de diamètre et 40 cm de haut, dans les conditions qui nous avaient précédemment fourni la meilleure résolution.

Le fractionnement obtenu est illustré à la Fig. 2; il nous a permis d'obtenir 14 fractions distinctes; l'analyse électrophorétique en gel d'acrylamide de chaque fraction permet de se faire une idée de leur degré de complexité.

Nous nous proposons, dans un prochain travail, d'étudier du point de vue chimique, physicochimique et enzymatique, la composition des fractions obtenues par la technique que nous venons de décrire. Certaines activités biologiques de ces fractions seront également prises en considération.

La méthode nous semble présenter des possibilités intéressantes et ouvrir de nouvelles voies d'investigation dans le domaine des venins de cobra.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à Madame KEPPENS qui a bien voulu se charger des analyses électrophorétiques des fractions. Nous remercions la Province de Brabant et la F. W. Breth Foundation pour l'aide morale et financière qu'elles ont accordée à ce travail.

*Institut des Industries de Fermentation,
Institut Meurice Chimie,
Service de Biochimie,
14a, rue Simonis,
Bruxelles 5, (Belgique)*

J. SLEGGERS
J. SIMON
L. BRISBOIS
J. PEETERS
L. GILLO

1 L. GILLO, *Ann. Soc. Roy. Sci. Med. Nat. Bruxelles*, 19 (1966) 121.

2 W. VOGT ET G. SCHMIDT, *Experientia*, 20 (1964) 207.

3 S. KURASHIGE, Y. HARA, M. KAWAKAMI ET S. MITSUHASHI, *Japan J. Microbiol.*, 10 (1966) 23.

4 H. C. CHEN ET C. OUYANG, *Toxicon*, 4 (1967) 235.

5 L. GROTTO, C. MOROZ, A. DE VRIES ET N. GOLDBLUM, *Biochim. Biophys. Acta*, 133 (1967) 356.

6 J. A. VICK, A. P. CIUCHTA, C. BROOMFIELD ET B. T. CURRIE, *Toxicon*, 3 (1966) 237.

7 E. M. BERTKE, D. D. WATT ET T. TU, *Toxicon*, 4 (1966) 73.

8 P. DELORI ET L. GILLO, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 531.

9 R. HENRY, G. WIRIOT ET LE BALC'H, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 505.

Reçu le 5 avril 1968

J. Chromatog., 36 (1968) 241-243