

CHROM. 3653

## ÉTUDE DES FRACTIONS OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DU VENIN DE *NAJA NAJA ATRA* SUR SULPHOÉTHYL-SEPHADEX

L. BRISBOIS, N. RABINOVITCH-MAHLER, P. DELORI ET L. GILLO

*I.I.F.-I.M.C., Laboratoire de Biochimie et**C.P.R.S.-C.E.R.I.A., Laboratoire d'Enzymologie tumorale,**14a, rue Simonis, Bruxelles (Belgique)*

(Reçu le 18 juin 1968)

---

### SUMMARY

*A study of the fractions of the venom of *Naja naja atra* obtained by chromatography on sulphoethyl-Sephadex*

The venom of *Naja naja atra* was fractionated on sulphoethyl-Sephadex into fourteen clearly different fractions. The experimental conditions are described. A number of enzymatic activities were studied, *viz.* phospholipase A, cholinesterase, L-amino acid oxidase, adenosine triphosphatase, 5'-nucleotidase, ribonuclease, phosphodiesterase, nicotinamide dinucleotide phosphatase and hyaluronidase, as well as several inhibiting activities of enzymatic processes, *viz.* inhibition of anaerobic glycolysis, inhibition of the cytochrome oxidase system and inhibition of acetylcholinesterase. The following biological activities are described: toxicity, anticoagulation, cytotoxicity, and the direct haemolytic factor. The well separated fractions were analysed by electrophoresis on acrylamide gel and their molecular size was estimated by means of gel filtration.

---

### INTRODUCTION

Depuis quelques années, les venins de serpents sont l'objet d'un intérêt toujours plus vif, non seulement parmi les chercheurs engagés dans l'étude des toxines, mais aussi et surtout parmi les biochimistes, qui y trouvent un éventail enzymatique incomparable, et parmi les pharmacologistes, qui voient, dans les nombreuses activités physiologiques des venins, des ressources thérapeutiques nouvelles.

L'étude de ces activités exige l'isolement préalable, à l'état pur, des composés qui en sont responsables.

Les dextrans modifiés, commercialisés en 1962, ont depuis lors, grâce à leur excellent pouvoir de résolution, fait largement leurs preuves dans la séparation des constituants de complexes protéiques. Cependant cette méthode n'a, jusqu'à présent, été que très peu appliquée au fractionnement des venins de cobra. A notre connaissance les seules expériences effectuées dans ce domaine sont celles de VICK, CIUCHTA, BROOMFIELD ET CURRIE<sup>32</sup> qui, en 1966, utilisèrent le fractionnement sur carboxyméthyl-Sephadex pour l'isolement de fractions physiologiquement actives d'un venin

de cobra et celles de LO, CHEN ET LEE<sup>21</sup> qui, en 1967, utilisèrent le même support pour le fractionnement primaire d'un venin de *Naja naja atra*.

La plupart des constituants protéiques du venin de *Naja naja atra* étant de nature basique, l'utilisation pour leurs fractionnements de gels échangeurs cationiques du type carboxyméthyl ou sulphoéthyl semblait s'imposer. Les approches expérimentales nous ont conduits<sup>30</sup> à choisir le sulphoéthyl-Sephadex qui semblait donner une résolution nettement supérieure.

L'objet du présent article est de décrire les conditions expérimentales de ce mode de fractionnement, de fournir, pour les différentes fractions obtenues, les rendements pondéraux, les caractéristiques spectrales, les activités enzymatiques et inhibitrices d'enzymes ainsi que la localisation de certaines activités biologiques.

Pour les fractions présentant une bonne résolution, les analyses électrophorétiques en gel d'acrylamide et les profils de filtration sur une colonne calibrée en poids moléculaire seront également étudiés.

## MATÉRIEL

### Matériel biologique

*Venin.* Nous avons utilisé comme matériel de départ un échantillon de venin de cobra (*Naja naja atra*) qui nous a été aimablement fourni sous forme lyophilisée par le professeur C. C. YANG du Kaohsiung Medical College de Formose.

Le venin est conservé à +4°, à l'abri de l'humidité et de la lumière.

La toxicité, dose léthale à 50 %, de l'échantillon utilisé lors d'injections par voie intrapéritonéale est de 400 µg/kg. Il contient 0.54 % de Zn et 0.25 % de Mg. L'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide fait apparaître 17 disques<sup>12</sup>. La filtration sur gel (Sephadex G 50) fait apparaître 6 pics et montre la présence d'une forte proportion de substances à faible poids moléculaire (cf. Fig. 3).

*Cellules.* Les cellules ascitiques d'Ehrlich sont originaires de l'Institut Mario Negri de Milan (Prof. GARATTINI). Elles sont maintenues sur des souris par inoculations péritonéales hebdomadaires de 0.2 ml d'une dilution à 20 % dans du sérum physiologique du fluide ascitique collecté entre le 7ème et le 10ème jour après l'inoculation.

La densité cellulaire est évaluée par comptage à la cellule de Thomas ou au Coulter counter et est ajustée à la concentration voulue par dilution au moyen d'une solution isotonique.

### Matériel chimique

L'eau utilisée est désionisée; tous les réactifs sont de qualité analytique.

Les membranes d'ultrafiltration proviennent de Membranfilter, Göttingen. Les gels Sephadex et les Sephadex modifiés sont fournis par Pharmacia, Uppsala, tandis que le Bio-Gel est obtenu chez Bio-Rad, Richmond, Calif.

## MÉTHODES

### Dosage des protéines

Une unité optique à cellule de passage (Uvicord II, LKB) permet de mesurer en continu la D.O. à 280 mµ de l'éluat à la sortie de la colonne de chromatographie.

Les protéines sont dosées par mesure des densités optiques à 260 et 280 m $\mu$  relevées en cellules de 1 cm grâce à un spectrophotomètre Unicam SP 800 ainsi que par la méthode colorimétrique de LOWRY<sup>22</sup> dérivée de la méthode de FOLIN<sup>4</sup>.

#### Essais enzymatiques

La *phospholipase A* (phosphatide acyl-hydrolase, E.C. 3.1.1.4.) est déterminée suivant la méthode de NEUMANN ET HABERMANN<sup>23</sup>.

La *cholinestérase* (acétylcholine acyl-hydrolase, E.C. 3.1.1.8.) est mesurée suivant la méthode colorimétrique de KRAMER ET GAMSON<sup>18</sup>.

La *L-amino-acide oxydase* (L-amino-acide O<sub>2</sub> oxydoréductase, E.C. 1.4.3.2.) est estimée manométriquement suivant ZELLER ET MARITZ<sup>36</sup>.

L'*adénosine triphosphatase* (adénosine triphosphate-pyrophosphohydrolase, E.C. 3.6.1.8.) est mesurée suivant YANG *et al.*<sup>34</sup>.

Les activités *ribonucléasique* (polyribonucléotide 2-oligonucléotidotransférase, E.C. 2.7.7.16.) et *déoxyribonucléasique* (déoxyribonucléotide oligonucléotidohydrolase, E.C. 3.1.4.5.) sont testées suivant la méthode de SHAPIRA<sup>20</sup>.

La *5'-nucléotidase* (5'-ribonucléotide phosphohydrolase, E.C. 3.1.3.5.) est estimée suivant la méthode de BABKINA ET VASILENKO<sup>2</sup>.

La *phosphodiesterase* (orthophosphate diester phosphohydrolase, E.C. 3.1.4.1.) est dosée par la méthode spectrophotométrique de BOMAN ET KALETTA<sup>5</sup>.

La *NADase* (nicotinamide dinucléotide phosphohydrolase, E.C. 3.6.1.9.) est mesurée par détermination de la vitesse de clivage du NADH suivant la technique de REEVES ET FIMOIGNARI<sup>27</sup>.

L'*hyaluronidase* (hyaluronate lyase, E.C. 4.2.99.1.) est estimée selon la méthode turbidimétrique de KASS ET SEASTONE<sup>17</sup>, modifiée par TOLKSDORF<sup>31</sup>.

*Inhibiteur de la glycolyse anaérobie.* Le taux de glycolyse anaérobie des cellules ascitiques d'Ehrlich (10 $\cdot$ 10<sup>6</sup>/ml) est déterminé à l'appareil de WARBURG par mesure du dégagement de CO<sub>2</sub> formé à partir de bicarbonate lors de l'apparition d'acide lactique dans le milieu<sup>33</sup>.

*Inhibiteur du système cytochrome oxydase.* L'inhibition du système cytochrome oxydase est mesurée selon la méthode de CHATTERJEE<sup>10</sup> basée sur l'oxydation d'un substrat *p*-phénylènediamine.

*Inhibiteur de l'acétylcholinestérase.* L'inhibition de l'acétylcholinestérase est mesurée selon la méthode manométrique d'AMNON ET VOSS<sup>1</sup> citée par LEE *et al.*<sup>20</sup>. On utilise comme source d'acétylcholinestérase vraie le venin de *Bungarus coeruleus* (acétylcholine acetyl-hydrolase, E.C. 3.1.1.7.).

#### Méthodes biologiques

*Détermination des toxicités.* Pour la détermination des toxicités, des souris Swiss de 25-30 g reçoivent des injections intrapéritonéales de doses croissantes du produit à tester en solution dans 0.2 ml de sérum physiologique.

La LD<sub>50</sub> (Bibl. 3) est la dose (mg/kg) qui tue 50 % des souris en 24 h. La mortalité est toutefois contrôlée pendant au moins 72 h.

*Activité anticoagulante.* La détermination de l'activité anticoagulante est basée sur une méthode que nous avons mise au point et qui consiste en une mesure turbidimétrique du temps de coagulation du plasma de cheval citraté et recalcié.

*Cytotoxicité.* La cytotoxicité est déterminée sur des cellules ascitiques du car-

cinome d'Ehrlich. On mesure le pourcentage de cellules devenues perméables au vert de Lissamine<sup>10</sup> après incubation pendant 3 h dans du sérum physiologique à 37° en présence de différentes doses de substance à tester.

*Hémolyse directe.* Le facteur hémolytique direct (DLF) est mis en évidence par mesure spectrophotométrique à 540 m $\mu$  de l'hémoglobine libérée lors de l'incubation de globules rouges (200 · 10<sup>6</sup>/ml de sérum physiologique) en présence des produits à tester à 30° pendant 60 min<sup>13</sup>.

### Méthodes physico-chimiques

*Spectres ultraviolets.* Les spectres ultraviolets des substances obtenues ont été relevés en cuvettes de 1 cm au moyen d'un spectrophotomètre Unicam SP 800.

*Electrophorèse en gel de polyacrylamide.* Les électrophorèses en gel de polyacrylamide sont effectuées suivant la méthode d'ORNSTEIN ET DAVIS<sup>25, 26</sup> (gel à 7.5 % de monomère; pH 8.9) pour les protéines à caractère acide, et suivant la méthode modifiée de REISFELD, LEWIS ET WILLIAMS<sup>28</sup> (gel à 15 % de monomère; pH 4.3) pour les protéines basiques<sup>12</sup>.

*Filtration sur gel — répartition des poids moléculaires.* Les fractions sont soumises à la filtration sur gel de dextrane (Sephadex G 50 fine) sur une colonne de 200 cm de haut et de 1 cm de diamètre, en utilisant comme éluant une solution d'acétate d'ammonium 0.1 M, pH 6.8.

TABLEAU I

STANDARDS UTILISÉS POUR CALIBRER LA COLONNE DE FILTRATION SUR GEL

Substance	Abréviations utilisées	Origine	Poids moléculaire
Vitamine B <sub>2</sub>	B 2	Roche (Bâle)	376
Vitamine B <sub>12</sub>	B 12	Uclaf (Paris)	1,355
ACTH synthétique	ACTH	Organon	3,500
Cytochrome C	Cyt. C	Sigma	12,400
Ribonucléase A	RNAse	Sigma	13,700
$\alpha$ -Chymotrypsine	$\alpha$ -Chym.	Koch-Light	25,000
Blue-Dextran	BD	Pharmacia	2,000,000

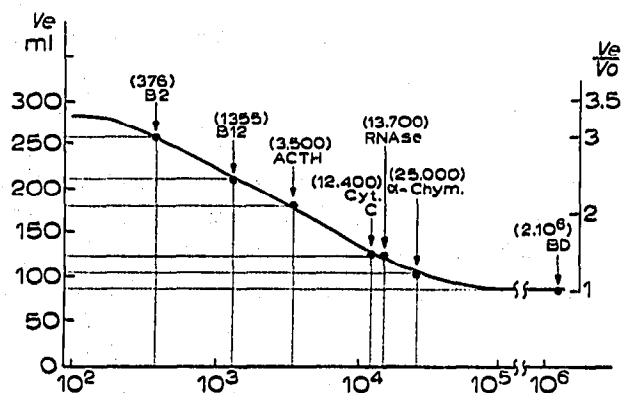


Fig. 1. Relation entre le poids moléculaire et le volume d'éluion. Colonne: Sephadex G 50 fine; diamètre 1 cm, hauteur 200 cm. Éluant: acétate d'ammonium 0.1 M, pH 6.8. Vitesse d'éluion: 0.17 ml/min (pompe péristaltique). Température: 20-25°. Abréviations utilisées, voir le Tableau I.

Les essais sont effectués à la température ambiante. Le débit de la colonne est imposé et maintenu constant par une pompe péristaltique située à la sortie de la colonne; il est de 0.17 ml/min. La pression hydrostatique de l'éluant au-dessus de la colonne est de 20 cm; elle est maintenue constante par une alimentation continue en éluant.

Le calibrage de la colonne est effectué au moyen de différentes substances de poids moléculaires connus (Tableau I, Fig. 1). Dans les conditions opératoires utilisées, les volumes d'éluion sont reproductibles à  $\pm 1\%$ .

## RÉSULTATS

### Fractionnement

Des approches effectuées sur microcolonnes (diamètre 0.5 cm, hauteur 20 cm) au moyen de différents supports et pour différents modes d'éluion nous ont permis<sup>30</sup> de déterminer les conditions optimales de fractionnement du venin de cobra.

C'est sur base de ces essais d'orientation que nous avons soumis le venin de *Naja naja atra* au fractionnement sur sulfoéthyl-Sephadex dans les conditions décrites ci-dessous.

Le SE Sephadex C 25 (40-120  $\mu$ ), après traitements successifs par NaOH 0.5 M, NaCl 0.5 M et HCl 0.5 M suivant le protocole habituel, est équilibré à pH 6.0 au moyen d'un pH-stat.

Après une dernière filtration sur verre fritté, le gâteau est remis en suspension dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 6.0. Le gel est introduit dans une colonne pour former un lit homogène de 1.5 cm de diamètre et de 25 cm de haut, et enfin lavé abondamment par le même tampon.

Un échantillon de 500 mg de venin lyophilisé de cobra formosan (*Naja naja atra*) est dissous dans 10 ml du tampon phosphate 0.05 M, pH 6.0. L'éluion est effectuée au moyen d'un appareil à gradient à deux chambres identiques<sup>15</sup> suivant le protocole détaillé au Tableau II.

La vitesse d'éluion est réglée en sortie de colonne par une pompe péristaltique maintenant un débit de 0.17 ml/min.

Des fractions de 6 ml sont collectées automatiquement. La courbe d'éluion (Fig. 2) est suivie en continu par mesure de l'extinction à 280 m $\mu$ .

TABLEAU II

SCHEMA D'ÉLUION

	Chambre		Étape I		Étape II		Étape III		Étape IV	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Volume (ml)	200	0	200	200	250	250	250	250	250	250
[PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ]	0.05 M	—	0.05 M	0.05 M	0.05 M	0.05 M	0.05 M	0.05 M	0.05 M	0.05 M
[NaCl]	0	—	0	0.33 M	0.30 M	0.50 M	0.45 M	1 M		
pH	6.0	—	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0

**TABLEAU III**  
RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX

		No. fractions													
		I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Rendement pondéral		15%	0.5%	2%	1.5%	1%	2.2%	4%	3%	7%	11%	5%	8%	5%	1%
Folin		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D.O. 280 m $\mu$		1	0.75	1.5	1.2	1.2	1.3	1.7	1.6	1.5	1.3	1.6	1.1	1.5	1
D.O. 260 m $\mu$															

**TABLEAU IV**  
COMPOSITION ENZYMATIQUE DES FRACTIONS

		No. fractions													
		I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Phosphodiesterase		0	0	0	0	0.42	4.06	3.47	0	0	0	0	0	0	0
5'-Nucléotidase		0	0	0	0.05	0	0	0	0.06	0.45	0	0	0	0	0
ATPase		-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
RNase		0	0	0	0	0	0	0	0	6.5	0	0	0	0	0
NADase		0	0	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
Cholinestérase		3.6	0	0	0.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-Amino acide oxydase		+++	0	0	++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lécithinase A		++	0	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyaluronidase		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
												+++	++	+	+

TABLEAU V

ACTIVITÉS INHIBITRICES

	No. fractions													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Inhibition glycolyse anaérobie	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+	0
Inhibition cytochrome C oxydase	+++	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inhibition acétyl-cholinestérase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0	0	0

TABLEAU VI

ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

	No. fractions													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Activité anticoagulante	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hémolyse directe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	0
Perméabilité vert lissamine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+++	+	0
Toxicité + de	10,000	10,000	5,000	10,000	2,500	10,000	10,000	2,500	500	5,000	7,500	2,500	4,000	10,000
L.D. <sub>50</sub> (µg/ml) - de	-	-	10,000	-	5,000	-	-	3,500	1,000	7,500	10,000	3,500	5,000	-

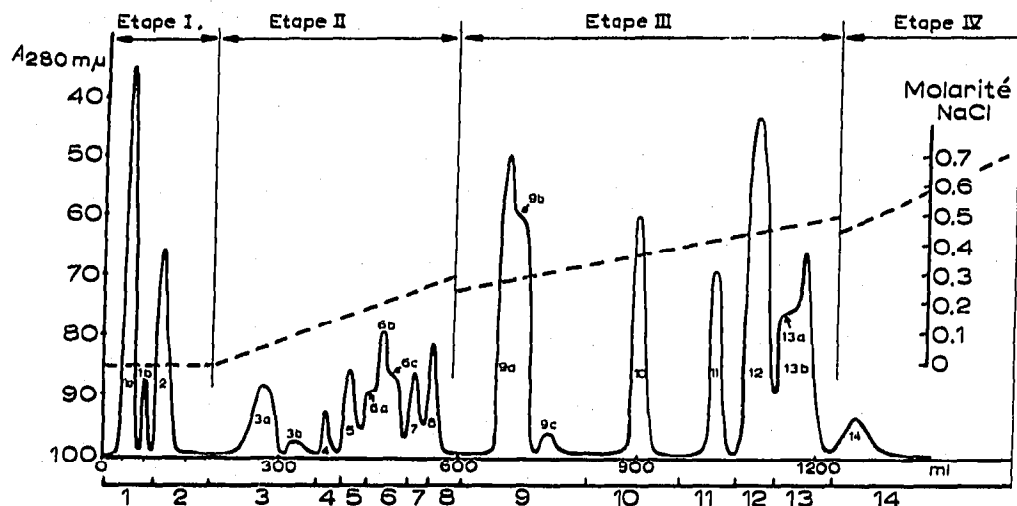


Fig. 2. Fractionnement du venin de *Naja naja atra* sur SE-Sephadex C 25. Colonne: diamètre 1.5 cm. Hauteur: 25 cm. Échantillon: 500 mg venin lyophilisé. Débit: 0.17 ml/min (pompe péristaltique). Tampon:  $\text{PO}_4^{3-}$ , 0.05 M. Gradients linéaires: NaCl 0 → 0.6 M.

### Dessalination

Les tubes issus du fractionnement sont regroupés sur base du profil d'éluion (Fig. 2) et les fractions ainsi obtenues sont dessalinées soit par ultrafiltration au travers d'une membrane de collodion, soit par filtration sur une colonne de gel moléculaire Bio-Gel P<sub>2</sub> (hauteur 90 cm, diamètre 1.5 cm); l'éluion se fait par de l'acétate d'ammonium 0.1 M, pH 6.8.

### Caractéristiques des fractions

Les fractions obtenues sont caractérisées par leur rendement, leur teneur en protéines contrôlée par le réactif de FOLIN ET CIOCALTEU<sup>14</sup> et leurs caractéristiques spectrales (Tableau III), par leurs activités enzymatiques (Tableau IV) et "anti-enzymatiques" (Tableau V), et par un certain nombre d'activités que nous avons regroupées sous le vocable de "biologiques" (Tableau VI).

Les rendements ont été calculés sur base des pesées des fractions après lyophilisation.

Le rendement pondéral obtenu en sommant les rendements partiels est de 68.5%. Sachant que 7 à 10% du venin s'échappe à l'ultrafiltration, on peut admettre un rendement global de 75%. Les différentes fractions présentent des spectres normaux de protéines avec un maximum à 279 mμ et un minimum à 251 mμ. Seules les fractions No. 2 et No. 14 présentent des spectres particuliers.

Signalons enfin que la fraction No. 1 présente une coloration jaune qui peut être attribuée à la riboflavine.

### FILTRATION SUR GEL — ÉLECTROPHORÈSE

A titre de contrôle et en vue de déterminer la répartition des masses moléculaires dans les fractions obtenues, un certain nombre de celles-ci ont été soumises à la filtration sur gel Sephadex G 50 sur une colonne analytique préalablement calibrée



au moyen de substances de référence de poids moléculaire connu (Tableau I). La courbe de calibrage de cette colonne est donnée à la Fig. 1.

Les courbes d'élu-tion obtenues pour les substances de référence, pour le venin total (*Naja naja atra*) et pour certaines fractions sont données à la Fig. 3. (Nous n'avons pas jugé nécessaire de reproduire les profils d'élu-tion des fractions 3 à 7 du fait du peu de résolution dans cette zone.) Pour chacune de ces fractions, les images électrophorétiques (gel d'acrylamide) placées vis-à-vis des profils d'élu-tion fournissent une indication de la complexité de la fraction considérée. Dans ces électrophé-rogrammes schématisés, la flèche symbolise le point d'application, la partie droite

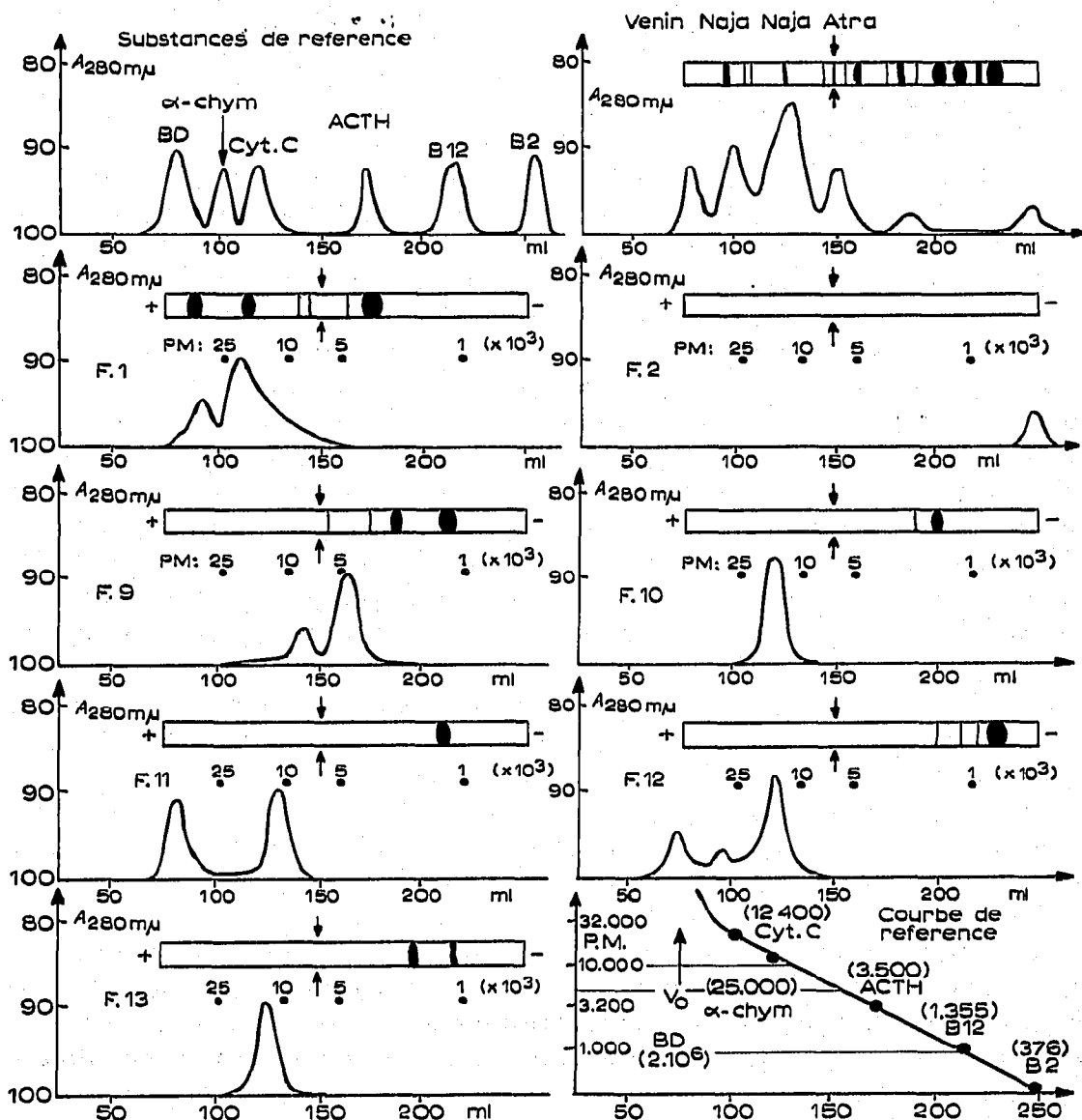


Fig. 3. Étude comparative par électrophorèse en disque et par filtration sur gel Sephadex G 50 des fractions obtenues lors de la chromatographie sur SE-Sephadex du venin de *Naja naja atra*. Les fractions peuvent être comparées au venin total et à un certain nombre de substances de référence utilisées pour calibrer la colonne de dextrane.

représente l'électrophorèse en milieu acide (pH 4.3) et la partie gauche l'électrophorèse en milieu alcalin (pH 8.9).

#### CONCLUSIONS ET DISCUSSION

L'étude enzymatique ou pharmacologique approfondie d'un constituant d'un venin nécessite d'obtenir ce constituant à l'état pur. Les techniques classiques de purification (les précipitations, par exemple) comportent une suite de processus à faible pouvoir de résolution et conduisent à un simple enrichissement en une espèce moléculaire au détriment de toutes les autres.

Ces méthodes sont en voie de disparition: elles sont progressivement remplacées par des techniques nouvelles, fondées principalement sur la chromatographie et l'électrophorèse préparative. On peut dès lors entrevoir la possibilité du fractionnement intégral d'un complexe tel que le venin de cobra et l'obtention simultanée d'un grand nombre de ses composants à l'état hautement purifié.

Les résultats présentés dans cette étude veulent être une contribution à cette évolution des techniques. En effet, par l'association d'un fractionnement à haut pouvoir résolutif comme le SE Sephadex et de la filtration sur gel moléculaire, on peut espérer obtenir un certain nombre de fractions à l'état fortement purifié.

Le procédé décrit dans cet article permet d'obtenir quatorze fractions. Par un examen attentif de la courbe d'élution, on en dénombre même une vingtaine.

Les spectres ultra-violetts et les analyses des fractions au réactif de FOLIN font nettement apparaître la nature non protéique (principalement nucléotidique) du pic 2 et celle non exclusivement protéique du pic 14.

Les différentes activités enzymatiques apparaissent relativement bien séparées et leurs coefficients de purification sont dans la plupart des cas satisfaisants.

La fraction No. 1 contient des substances acides à pH 6.0; nous avons pu notamment y localiser la cholinestérase, l'activité anticoagulante et la lécithinase A qui, comme on sait, inhibe le système enzymatique de la respiration mitochondriale par destruction d'un facteur lipidique important entre le cytochrome B et le cytochrome C<sup>24</sup>.

Le FAD passe également dans ce premier pic (1a). La séparation des constituants contenus dans cette première fraction pourrait probablement se faire assez aisément par passage sur une colonne d'échangeur anionique.

La fraction No. 2 est essentiellement nucléotidique.

Le groupe de fractions portant les No. 3 à 8 représente la zone de résolution la moins bonne. Cette zone contient presque tous les enzymes.

La fraction No. 9 s'est avérée la plus toxique.

Cette toxicité semble pouvoir être attribuée à la cobrotoxine<sup>35</sup>. Du point de vue enzymatique, elle contient la RNase enrichie 6.5 fois, ainsi que la 5'-nucléotidase et l'ATPase pour lesquelles le rendement enzymatique est nettement moins bon.

Il est cependant bien connu que ces deux dernières enzymes sont particulièrement fragiles et il se pourrait que certains moyens préventifs de protection permettent d'éviter cette chute d'activité<sup>4</sup>.

La fraction No. 10, bien que se présentant sous une forme relativement purifiée, n'a pu jusqu'à présent être identifiée à un composant connu du venin. Aucune activité enzymatique ni biologique n'a pu y être décelée.

L'inhibiteur de l'acétylcholinestérase a pu être localisé dans la fraction No. 11; les profils d'élution obtenus pour cette fraction lors de la filtration sur gel Sephadex G 50 nous laissent espérer la possibilité d'une bonne purification de cet inhibiteur par couplage des deux techniques.

La fraction No. 12 agit comme inhibiteur de la glycolyse anaérobie<sup>9</sup> et contient le facteur capable de provoquer la perméabilité de cellules au vert de lissamine. Ces deux facteurs pourraient n'être que deux manifestations d'un même phénomène et correspondre au facteur P6 cytotoxique vis-à-vis des cellules du sarcome de Yoshida décrit par BRAGANCA *et al.*<sup>6,7</sup>. Il est par ailleurs très probable, au vu de ses propriétés, que la protéine B 12 décrite tout récemment par LARSEN ET WOLFF<sup>10</sup> comme ayant des activités inhibitrices vis-à-vis des phénomènes de transport au niveau de la membrane de cellules adipiques soit une troisième manifestation de la même substance.

La substance hémolytique directe (DLF)<sup>11</sup> semble pouvoir être complètement dissociée des activités précédentes et a pu être localisée dans la fraction No. 13.

L'utilisation analytique de la filtration sur gel nous a permis non seulement d'estimer la répartition des masses moléculaires, mais aussi de juger de l'efficacité éventuelle de son couplage avec la chromatographie sur SE-Sephadex pour la purification de certains composants.

Ainsi, les analyses électrophorétiques en gel d'acrylamide nous ont été précieuses dans l'estimation du degré de purification obtenu. Bien que ce type de fractionnement montre des possibilités telles qu'il mérite un intérêt certain, il faut constater que le rendement obtenu (75 %) devrait pouvoir être amélioré.

La présence de grosses quantités de sel jointe à l'existence dans les venins d'une forte proportion de substances de taille relativement faible, crée des difficultés expérimentales. De fait, dans les fractionnements de venins du type *Naja* et principalement dans le cas du *Naja naja atra*, la dessalination des fractions obtenues reste l'un des problèmes principaux.

La dialyse est exclue du fait de la trop forte proportion de molécules de faible poids moléculaire.

L'ultrafiltration au travers de membranes de collodion (limite de rétention: PM 1.000), bien que donnant des résultats satisfaisants, entraîne encore la perte de 7 à 10 % du venin et on constate parfois des précipitations sur la membrane. Il est à noter que les substances passant au travers de la membrane peuvent être récupérées en soumettant le venin total à une ultrafiltration dans l'eau préalablement à tout autre processus de fractionnement.

La dessalination par filtration sur gel fortement réticulé présente également des difficultés: on observe avec certains supports des absorptions irréversibles même lorsqu'on utilise des solutions d'élution à force ionique élevée. De plus, l'élution des sels est parfois trop proche de celle des protéines<sup>10</sup> pour obtenir une dessalination satisfaisante; ce phénomène est probablement dû à un entraînement des sels par une des protéines constituantes du venin<sup>8</sup>.

L'utilisation d'un gradient de "sel volatil" (s'éliminant à la lyophilisation) constitue une importante simplification de la technique. Elle diminue considérablement les manipulations et est de ce fait beaucoup moins traumatisante.

Bien que donnant des résultats encourageants la résolution obtenue par ce mode d'élution n'est cependant pas encore aussi bonne que celle donnée par le tampon

phosphate et le gradient NaCl. Des essais en ce sens sont actuellement poursuivis dans notre laboratoire.

#### REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos remerciements à la Province de Brabant et à la F. W. Breth Foundation, de New York, pour le soutien tant financier que moral qu'elles nous ont apporté au cours de ce travail.

#### RÉSUMÉ

Le venin de *Naja naja atra* a été fractionné en quatorze fractions bien distinctes par chromatographie sur sulphoéthyl-Sephadex. La composition de ces fractions est étudiée. Un certain nombre d'activités enzymatiques ont été mesurées: la phospholipase A, la cholinestérase, la L-amino acide oxydase, l'adénosine triphosphatase, la 5'-nucléotidase, la ribonucléase, la phosphodiesterase, la nicotinamide dinucléotide pyrophosphatase et l'hyaluronidase. Plusieurs inhibiteurs de processus enzymatiques ont été estimés (inhibition de la glycolyse anaérobie, inhibition du système cytochrome oxydase et inhibition de l'acétylcholinestérase). Certaines activités biologiques, comme la toxicité, le pouvoir anticoagulant, la cytotoxicité, le facteur lytique direct sont également décrites. Les électrophérogrammes en gel d'acrylamide sont donnés pour les fractions les mieux séparées; les répartitions de tailles moléculaires dans ces fractions ont été estimées par la technique de la chromatographie sur gel de dextrane.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. AMNON ET G. VOSS, *Arch. Ges. Physiol.*, 235 (1935) 393.
- 2 G. T. BABKINA ET S. K. VASILENKO, *Biokhimiya*, 29 (1964) 230.
- 3 B. BEHRENS ET G. KARBER, *Arch. Exptl. Pathol. Pharmacol.*, 177 (1935) 378.
- 4 W. BJÖRK, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 483.
- 5 H. G. BOMAN ET U. KALETTA, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 619.
- 6 B. M. BRAGANCA, P. G. BRADINATH ET J. E. AMBROSE, *Nature*, 207 (1965) 534.
- 7 B. M. BRAGANCA, N. T. PATEL ET P. G. BRADINATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 136 (1967) 508.
- 8 L. BRISBOIS, *Thèse (I.I.F.-I.M.C.)* Bruxelles, 1966.
- 9 L. BRISBOIS, N. RABINOVITCH-MAHLER ET L. GILLO, *Experientia*, 24 (1968) 673.
- 10 K. CHATTERJEE, *Indian J. Med. Res.*, 37 (1949) 241.
- 11 E. CONDREA, A. DE VRIES ET J. MAGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 84 (1964) 60.
- 12 P. DELORI ET L. GILLO, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 531.
- 13 H. M. DOERY, *Biochem. J.*, 70 (1958) 535.
- 14 O. FOLIN ET V. CIOCALTEU, *J. Biol. Chem.*, 73 (1927) 627.
- 15 R. HENRY, G. WIRIOT ET LE BALC'H, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 505.
- 16 B. HOLMBERG, *Exptl. Cell. Res.*, 22 (1960) 406.
- 17 E. M. KASS ET C. V. SEASTONE, *J. Exptl. Med.*, 79 (1944) 319.
- 18 N. KRAMER ET R. M. GAMSON, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 251.
- 19 P. R. LARSEN ET J. WOLFF, *Biochem. Pharmacol.*, 16 (1967) 2003.
- 20 C. Y. LEE, C. C. CHANG ET K. KAMIJO, *Biochem. J.*, 62 (1956) 582.
- 21 T. B. LO, Y. H. CHEN ET C. Y. LEE, *J. Chinese Chem. Soc., Ser. II*, 13 (1966) 25.
- 22 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FAIR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 23 W. NEUMANN ET E. HABERMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 296 (1954) 166.
- 24 A. P. NYGAARD, M. U. DIANZANI ET G. F. BAHR, *Exptl. Cell. Res.*, 6 (1954) 453.
- 25 L. ORNSTEIN ET B. J. DAVIS, *Anal. N. Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 321.
- 26 L. ORNSTEIN ET B. J. DAVIS, *Anal. N. Y. Acad. Sci.*, 121 (1964) 404.
- 27 W. J. REEVES ET G. M. FIMOIGNARI, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3853.

- 28 R. A. REISFELD, U. J. LEWIS ET D. E. WILLIAMS, *Nature*, 195 (1962) 281.
- 29 R. SHAPIRA, *Anal. Biochem.*, 3 (1962) 308.
- 30 J. SLEGGERS, J. SIMON, L. BRISBOIS, L. PEETERS ET L. GILLO, *J. Chromatog.*, 36 (1968) 241.
- 31 S. TOLKSDORF, dans D. GLICK (Rédacteur), *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. 1, Interscience, New York, 1954, p. 439-444.
- 32 J. A. VICK, A. P. CIUCHTA, C. BROOMFIELD ET B. T. CURRIE, *Toxicon*, 3 (1966) 237.
- 33 O. WARBURG (Rédacteur), *The Metabolism of Tumors*, Constable and Co., London, 1931.
- 34 C. C. YANG, C. J. CHEN ET C. C. SU, *J. Biochem. (Tokyo)*, 46 (1959) 1201.
- 35 C. C. YANG, *J. Formosan Med. Assoc.*, 63 (1964) 325.
- 36 E. A. ZELLER ET A. MARITZ, *Helv. Chim. Acta*, 27 (1944) 1888.

*J. Chromatog.*, 37 (1968) 463-475