

## PRÉPARATION À PARTIR DES MÉDULLO-SURRÉNALES DE BOEUF DE GRANULES CHROMAFFINES TRÈS PURIFIÉS

J. C. DELARUE\*

Unité de Biologie Chimique et Expérimentale Institute G. Roussy, Villejuif, France

(Received 25 July; accepted 14 September 1967)

**Abstract**—Highly purified chromaffin granules were obtained from ox adrenal medullae by two ultracentrifugations of a large-granule fraction layered on a simplified sucrose gradient. Mitochondria, lysosomes and microsomes which are localised in the large granule fraction are eliminated by the two gradients and the chromaffin granules obtained are, practically, free of contamination.

LES CATÉCHOLAMINES présentes dans les médullo-surrénales sont contenues dans des particules cytoplasmiques spécifiques appelées granules ou vésicules chromaffines. Ces granules contiennent également de fortes quantités de nucléotides (ATP) et de protéines.

Les méthodes employées pour l'isolement de ces granules utilisent des gradients de densité réalisés à partir de solutions de saccharose et permettent d'obtenir des granules purifiés mais contaminés encore en moyenne à 10%, essentiellement par des mitochondries.<sup>3,6,10</sup>

Le but de ce travail est de décrire une méthode d'isolement de granules chromaffines très purifiés par utilisation d'un double gradient de saccharose. Ce double gradient est très simplifié et basé sur le fait que, pour les médullo-surrénales de boeuf, les granules chromaffines sont plus denses qu'une solution 1,6 M de saccharose alors que les autres particules parasites (mitochondries, lysosomes et microsomes) sont moins denses. Il est donc possible de sédimenter les granules chromaffines grâce à une solution hypertonique de saccharose de densité uniforme.<sup>2,4,12</sup> Toutefois, l'introduction au fond d'une légère couche de solution de saccharose très hypertonique permet une récupération plus facile des granules en évitant qu'ils ne s'agglomèrent au fond du tube.

### METHODES

#### *Préparation des granules bruts*

La méthode utilisée est celle de Blaschko *et al.*<sup>3</sup> modifiée par Helle.<sup>7</sup>

Les surrénales de boeuf sont prélevées dès l'abattage de l'animal. La partie corticale est éliminée le plus rapidement possible et la partie médullaire est conservée dans la glace jusqu'à son arrivée au laboratoire. Elle est alors finement découpée, et broyée avec une solution de saccharose 0,3 M dans un homogénéiseur du type Potter-Elvehjem. La suspension obtenue est ensuite centrifugée à 600 g pendant 15 min pour éliminer noyaux et débris cellulaires. Le surnageant est centrifugé pendant 15 min à

\* Avec la collaboration technique de J. Trentesaux et Y. Bergogne.

10.300 g Le culot de granules obtenu est remis en suspension dans du saccharose 0,3 M, et centrifugé à nouveau 15 min à 10.300 g. Toutes ces centrifugations sont effectuées à  $+4^{\circ}\text{C}$ . Le culot de cette 2e centrifugation, remis en suspension dans du saccharose 0,3 M, constitue la suspension de granules bruts.

*Isolement des granules purifiés par double gradient de densité*

Les trois tubes du rotor SW39L d'une ultracentrifugeuse Spinco sont préparés en mettant successivement dans chacun d'eux: 0,5 ml d'une solution de saccharose 2,25 M et 2 ml d'une solution de saccharose 1,6 M. Ces gradients sont préparés quelques heures avant leur utilisation. On introduit alors dans chaque tube 1 ml de la suspension de granules bruts (Fig. 1a) et les tubes sont soumis à une centrifugation de 1 heure à 36.000 t/mn à  $+4^{\circ}\text{C}$ . A la fin de la centrifugation, on obtient 4 couches (Fig. 1b) qui sont séparées avec une Pipette Pasteur en commençant par le haut du tube. La fraction 4, qui contient les catécholamines (voir les Résultats) est diluée au 1/2 avec une solution de saccharose 0,3 M et cette dilution est introduite sur les tubes

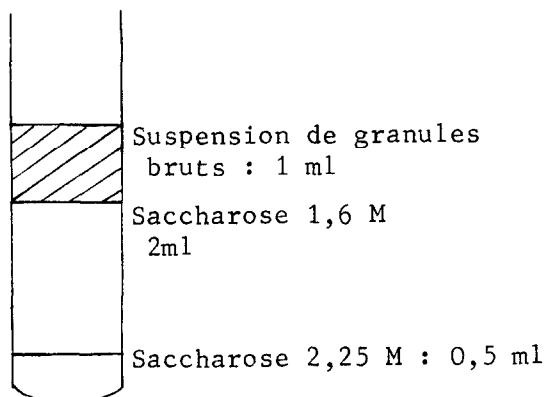


FIG. 1a. Aspect du tube à centrifuger avant la centrifugation. Les granules bruts sont en suspension dans une solution de saccharose 0,3 M.

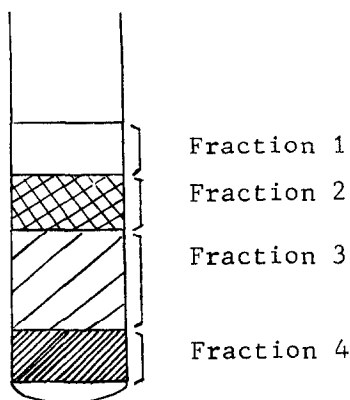


FIG. 1b. Aspect du tube après la centrifugation dans le rotor SW39L à 36 000 t/mn pendant 1 heure

d'un nouveau gradient identique au précédent. Ce gradient est centrifugé dans les mêmes conditions que précédemment et les 4 couches obtenues sont séparées. La fraction 4 de ce 2e gradient contient les granules chromaffines très purifiés. Les fractions collectées sont conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'au moment des dosages. Ceux-ci doivent être effectués dans un délai maximum de 48 heures suivant la collection des fractions.

### *Analyse des fractions*

Dans toutes les fractions, les catécholamines ont été déterminées par la méthode de Roston<sup>11</sup> qui permet de déterminer séparément adrénaline et noradrénaline.

La déshydrogénase succinique mitochondriale a été dosée par mesure de la réduction du cytochrome c à  $550\text{ m}\mu$  en présence de cyanure suivant la technique de Kuff et Schneider.<sup>8</sup>

Le dosage de la glucose -6- phosphatase contenue dans les microsomes a été effectué à pH 6,5 à partir du glucose 6 phosphate de la manière suivante: Glucose 6 phosphate 0,094 M pH 6,5 (0,5 ml), EDTA 0,01 M pH 6,5 (0,1 ml), Tampon histidine 0,1 M pH 6,5 (0,2 ml), Solution enzymatique ou dilution (0,2 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (0,5 ml). Laisser incubé 45 min à  $37^{\circ}$ . acide trichloracétique à 8% (5 ml). Dosage de phosphore libéré dans le surnageant par la méthode de Fiske et Subbarow<sup>5</sup> contre un blanc réalisé sans substrat. On effectue également un témoin réactif dans lequel la suspension enzymatique n'est pas introduite. Dans les conditions opératoires, la réaction enzymatique est linéaire jusqu'à une quantité de phosphore libéré égale à  $10\text{ }\mu\text{g}$ .

Le dosage de la phosphatase acide contenue dans les lysosomes a été effectué à pH 5,0 à partir du  $\beta$ -glycérophosphate de Sodium de la manière suivante:  $\beta$ -glycérophosphate 0,5 M pH 5,0 (0,4 ml), Tampon acétate de Na 1 M pH 5,0 (0,1 ml) Saccharose 0,3 M (0,25 ml), Solution enzymatique ou dilution (1 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (0,25 ml) Laisser incubé 20 min à  $37^{\circ}$ . acide trichloracétique à 8% (10 ml). Dosage dans le surnageant du phosphore libéré par la méthode de Fiske et Subbarow<sup>5</sup> contre un témoin dans lequel le substrat est ajouté à la fin de la réaction, après la déprotéinisation trichloracétique. Dans les conditions opératoires décrites, la réaction enzymatique est linéaire jusqu'à une quantité de phosphore libéré égale à  $26\text{ }\mu\text{g}$ .

Le dosage des protéines a été réalisé par la méthode de Lowry<sup>9</sup> après précipitation des protéines par  $\text{ClO}_4\text{H}$  1N, ceci de façon à éliminer l'interférence des catécholamines dans la réaction des protéines avec le réactif de Folin-Ciocalteu.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'aspect du tube à la fin de la centrifugation à 36 000 t/min pendant 1 heure est indiqué dans la Fig. 1b.

Cet aspect est indentique au cours du 1er et du 2e gradient à la différence près que la fraction 2 est moins importante dans le 2e gradient puisque la majorité des mitochondries et autres particules parasites est éliminée au cours du 1er gradient (voir plus loin). La fraction 3 est plus ou moins trouble suivant la richesse de la préparation initiale de granules bruts.

Le tableau 1 montre les résultats obtenus au cours du 1er gradient. Ces résultats sont exprimés en pourcentage en fonction des quantités récupérées dans toutes les fractions, et représentent la moyenne de 4 déterminations. Les pourcentages de

récupération en fonction du matériel de départ, c'est-à-dire les granules bruts, sont indiquées dans le tableau.

De ce tableau, il ressort :

TABLEAU 1

Répartition de la déshydrogénase, succinique des catécholamines, des Protéines, de la phosphatase acide et de la glucose-6-phosphatase au cours du 1<sup>er</sup> gradient de centrifugation (voir les méthodes; isolement des granules purifiés).

Les résultats sont exprimés en pourcentage en fonction des quantités récupérées et représentent la moyenne de 4 déterminations.

Les fractions correspondent à celles indiquées dans la Fig. 1 b.

Fraction	Déshydrogénase succinique	Adrénaline	Nor-Adrénaline	Protéines	Phosphatase	Glucose-6- phosphatase
I	traces	5,2	12,3	2,1	—	—
II	77,5	11,7	11,3	39,6	84,8	85,4
III	6,5	6,0	4,4	11,0	—	—
IV	14,0	77,0	72,0	44,8	17,7	13,4
Pourcentage de récupération en fonction de la quantité introduite	85,5	101,5	83,9	70,7	non déterminé	non déterminé

(1) Que la déshydrogénase succinique (mitochondries), la phosphatase acide (lysosomes) et la glucose-6-phosphatase (microsomes) sont localisées en majeure partie dans la fraction 2.

(2) Que les catecholamines (granules chromaffines) se trouvent par contre dans la fraction 4.

(3) Que les protéines se séparent en 2 fractions sensiblement égales correspondant à la localisation des mitochondries, lysosomes et microsomes d'une part et des granules chromaffines d'autre part.

Après ce 1<sup>er</sup> gradient, la contamination des granules est donc en moyenne de 15% (mitochondries: 14%, lysosomes: 17,7%, microsomes: 13,4%).

Le tableau 2 montre les résultats obtenus au cours du 2<sup>e</sup> gradient. Ils sont également exprimés en pourcentage en fonction des quantités récupérées dans toutes les fractions. Les pourcentages de récupération en fonction du matériel introduit (c'est-à-dire la fraction 4 du 1<sup>er</sup> gradient) sont indiqués dans le tableau.

Plusieurs points ressortent de l'analyse de ce tableau :

(1) La contamination des granules chromaffines contenues dans la fraction 4 par les mitochondries est pratiquement négligeable puisqu'elle ne représente qu 4,0% ( $28,6\% \times 14\%$ ) des mitochondries initialement présentes dans les granules non purifiés.

(2) Nous n'avons pas pu doser la phosphatase acide ni la glucose-6-phosphatase dans les différentes fractions de ce 2<sup>e</sup> gradient. Néanmoins, étant donné la répartition identique de ces 2 enzymes et de la déshydrogénase succinique au cours du 1<sup>er</sup> gradient, on peut admettre, à priori, une répartition identique au cours du 2<sup>e</sup> gradient et donc une élimination presque complète des lysosomes et microsomes.

(3) D'autre part le nombre de micromoles de catécholamines par mg d'azote protéique est au moins aussi élevé (17 à 18) que celui trouvé par d'autres auteurs (15), ce qui est un critère de pureté des granules.

## CONCLUSION

Nous isolons donc, grâce à ce double gradient, des granules chromaffines très purs, pratiquement exempts de mitochondries, de lysosomes et de microsomes. Ce système de double gradient est donc très utile lorsqu'on veut étudier, par exemple; les protéines contenues dans ces granules, la contamination étant négligeable. Mais par contre, nous pouvons remarquer que nous avons un pourcentage important (environ 20%)

TABLEAU 2

Répartition de la déshydrogénase succinique, des catécholamines et des Protéines au cours du 2<sup>e</sup> gradient de centrifugation (voir les méthodes: isolement des granules purifiés).

Les résultats sont exprimés en pourcentage en fonction des quantités récupérées et représentent la moyenne du nombre de déterminations indiquées dans la dernière ligne.

Les fractions correspondent à celles indiquées dans la Fig. 1 b.

Fractions	Déshydrogénase succinique	Adrénaline	Nor-Adrénaline	Protéines
I	2,1	24,2	19,5	5,3
II	51,5	8,8	11,6	12,4
III	17,8	8,9	7,8	12,2
IV	28,6	58,1	61,2	70,0
Pourcentage de récupération en fonction de la quantité introduite	81,8	91,7	80,3	109,6
Nombre de déterminations effectuées	3	6	5	6

de catécholamines dans le surnageant. Ceci correspond probablement, non pas à un éclatement des granules car dans ce cas le pourcentage des protéines dans le surnageant serait identique, mais à une libération des catécholamines à partir des granules.

Enfin cette méthode peut également être utilisée pour préparer une fraction mitochondriale à peu près exempte de granules chromaffines mais contenant des lysosomes et des microsomes.

*Remerciements*—Nous tenons à remercier le Professeur C. Bohuon pour les conseils qu'il nous a prodigué et Madame F. Guerinot pour l'aide qu'elle nous a apportée.

Les médullo-surrénales de boeuf nous ont été obligeamment fournies par les Laboratoires CHOAY.

## BIBLIOGRAPHIE

1. P. BANKS, *Biochem. J.* **101**, 18 c (1966).
2. H. BLASCHKO, G. V. R. BORN, A. D'IORIO and N. R. EADE, *J. Physiol., Lond.* **133**, 548 (1956.).
3. H. BLASCHKO, J. M. HAGEN and P. HAGEN, *J. Physiol., Lond.* **139**, 316 (1957).
4. N. R. EADE, *J. Physiol., Lond.* **141**, 183 (1958).
5. C. M. FISKE and X. SUBBAROW, *J. biol. Chem.* **66**, 375 (1925).
6. A. FORTIER, J. LEDUC and A. D'IORIO, *Rev. Can. Biol.* **18**, 110 (1959).
7. K. B. HELLE, *Molec. Pharmac.* **2**, 298 (1966).
8. E. L. KUFF and W. C. SCHNEIDER, *J. biol. Chem.* **206**, 677 (1954).
9. O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARRAND and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
10. A. PHILIPPU and H. J. SCHÜMANN, *Experientia* **20**, 547 (1964).
11. S. ROSTON, *Analyt. Chem.* **206**, 1363 (1958).
12. A. D. SMITH and H. WINKLER, *Biochem. J.* **103**, 480 (1967).