

Une note concernant la centrifugation fractionnée de foie de rat

Le schéma de centrifugation différentielle mis au point par DE DUVE et ses collaborateurs¹ dans leurs travaux sur le foie de rat se caractérise principalement par la séparation de la fraction mitochondriale en une fraction lourde M, contenant la majeure partie des mitochondries, et une fraction légère L, enrichie en lysosomes.

Dans certaines expériences, où nous avons été amenés à utiliser des rats non à jeun, nous avons remarqué que la constitution de cette fraction légère L différait dans une certaine mesure de celle que l'on observait chez les rats mis à jeun une vingtaine d'heures avant le sacrifice; le pourcentage d'activité enzymatique trouvé dans cette fraction était toujours plus faible dans les préparations provenant d'animaux non à jeun. Nous croyons que ce phénomène trouve son origine dans la présence d'une quantité importante de glycogène dans la fraction L.

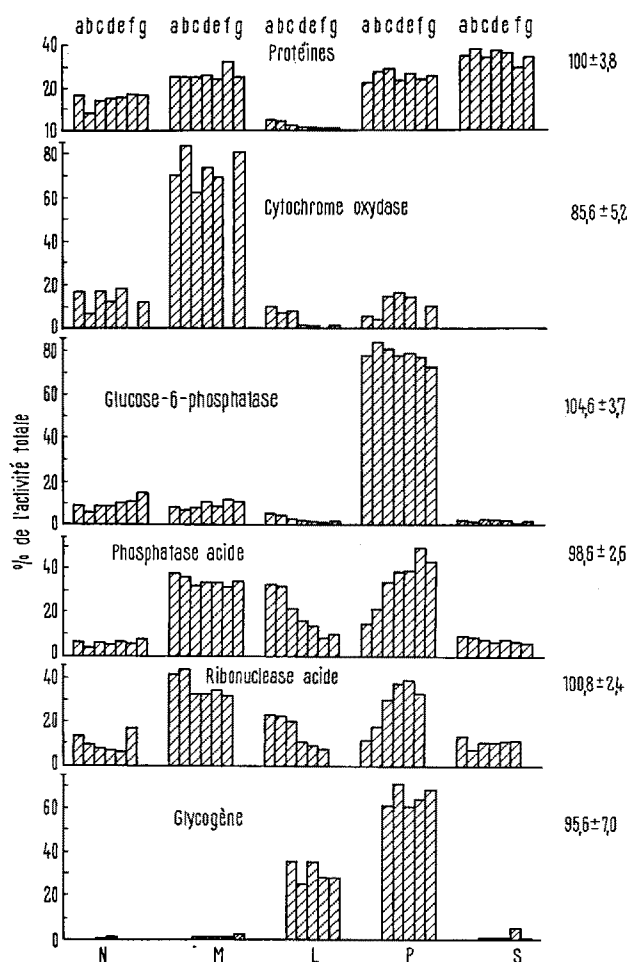
Nous avons utilisé dans nos expériences des rats mâles Wistar de 200 à 300 g. Les centrifugations différentielles ont été effectuées suivant la méthode de DE DUVE et al.¹ et conduisent à la séparation des fractions nucléaire N, mitochondriale lourde M, mitochondriale légère L, microsomale P et soluble S à partir de l'homogénat, préparé dans le saccharose 0,25 M. Les mesures enzymatiques sont également réalisées suivant les techniques décrites par ces auteurs; les protéines sont mesurées par la méthode de LOWRY et al.²

Pour la détermination du glycogène des fractions, les protéines sont d'abord précipitées par l'acide trichloracétique à 5%. On centrifuge et récolte le liquide surnageant. Le culot est lavé 2 fois dans le TCA à 6,7% et les liquides surnageants sont ajoutés au premier. Le glycogène de l'extrait acide est obtenu par 3 précipitations successives avec de l'éthanol à 70%. Il est dissous dans l'eau bidistillée et dosé par la méthode à l'anthrone suivant SEIFTER et al.³, en utilisant le glucose comme étalon.

La figure illustre la façon dont se distribuent la phosphatase acide et la ribonucléase acide, 2 enzymes lysosomiaux, la cytochrome oxydase, ferment mitochondrial, la glucose-6-phosphatase, enzyme des microsomes, les protéines et le glycogène après centrifugation différentielle d'homogénats de foie de rat à jeun et non à jeun.

Les distributions enzymatiques trouvées chez les animaux à jeun correspondent à celles décrites par DE DUVE et al.¹. La modification la plus frappante des distributions fermentaires mesurées chez les animaux non à jeun consiste en une diminution nette du pourcentage des enzymes et des protéines récupéré dans la fraction mitochondriale légère L. Ce phénomène est surtout manifeste en ce qui concerne les hydrolases lysosomiales qui normalement se retrouvent en quantité importante dans cette fraction. Par contre, la fraction microsomale P est nettement plus riche en ces enzymes dans le cas des animaux non à jeun.

Le tableau signale les taux de glycogène trouvés dans les foies des animaux utilisés dans ces expériences. On remarque que les modifications de distribution que nous avons signalées sont d'autant plus marquées que le foie contient plus de glycogène. Or, comme le montre la figure, ce composé se retrouve principalement dans les fractions L et P; aussi, croyons-nous que les modifications de distribution qui touchent ces fractions, que nous avons trouvées chez les rats non à jeun, sont dues à la grande quantité de glycogène qu'elles contiennent. Celui-ci change vraisemblablement l'organisation du culot de centrifugation à partir duquel la fraction mitochondriale légère L est préparée d'autant plus facilement que celle-ci ne contient quantitativement que peu de protéines donc d'éléments structurés. Chez les animaux non à jeun, on



Distribution des enzymes, des protéines et du glycogène après centrifugation différentielle: N, fraction des noyaux; M, fraction mitochondriale lourde; L, fraction mitochondriale légère; P, fraction des microsomes et S, fraction soluble. Les chiffres à droite donnent le pourcentage de récupération moyen et la déviation standard, calculés sur la totalité des fractionnements. (a) Moyenne de 3 fractionnements réalisés sur des animaux ayant jeûné pendant 20 h; (b), (c), (d) animaux nourris ad libitum; (e) animal ayant reçu une injection journalière de 25 mg de cortisol pendant 3 jours, puis sacrifié le quatrième jour; (f), (g) animaux privés de nourriture pendant 30 h puis recevant de la nourriture ad libitum pendant les 7 h précédant le sacrifice.

Taux de glycogène trouvés dans les foies des animaux utilisés dans les expériences décrites à la figure. Les valeurs sont exprimées en g par 100 g de foie

(a)	(b)	(c)	(d)	(e)	(f)	(g)
< 0,1	4,1	4,52	6,10	7,41	7,67	8,40

¹ C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX et F. APPELMANS, *Biochem. J.* 60, 604 (1955).

² O. H. LOWRY, N. J. ROSENBOUGH, A. L. FARR et R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* 193, 265 (1951).

³ S. SEIFTER, S. DAYTON, B. NOVIC et E. MUNTWYLER, *Archs Biochem. Biophys.* 25, 191 (1950).

voit effectivement dans le culot qui donnera la fraction L, une masse blanchâtre de glycogène qui occupe principalement le fond de ce culot. Il est probable, dans ces conditions que la décantation réalisée après la centrifugation entraîne beaucoup plus facilement les éléments de la fraction L, qui se trouvent tassés au-dessus de ce culot de glycogène, avec comme conséquence leur sédimentation ultérieure dans la fraction microsomale P.

Summary. Significant differences were observed in enzymic composition of L and P fractions between fasting and fed animals. The L fraction contains a smaller percentage and the P fraction a higher percentage of the enzymic activity of the homogenate when the rat is fed,

which can be explained by the sedimentation in the L fraction of a high proportion of the glycogen accumulated in the liver of fed animals. The presence of this component changes the organization of the centrifugation pellet so that, during the decantation of the L fraction, subcellular structures sedimenting in this fraction are sucked off and recuperated in the next centrifugation pellet, i.e. in the microsomal P fraction.

P. TULKENS et R. WATTIAUX

Laboratoire de chimie physiologique, Facultés universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur (Belgique), 17 octobre 1967.

The Effect of UV-Irradiation on Glucobrassicin and Other Glucosinolates (Mustard Oil Glucosides)

The glucoside glucobrassicin (GBR), i.e. 3-indolylmethylglucosinolate, isolated first from *Brassica* species¹, is the main precursor of the goitrogenic thiocyanate (SCN^-) and of the indole auxins (plant growth-regulators) in these and many other plants^{2,3}. These active substances are liberated from GBR by the enzyme myrosinase. The products of this enzymatic cleavage depend on the pH of the medium. At pH 7, GBR splits to yield glucose, sulphate, 3-hydroxymethylindole (3-OH-MI), respectively 3,3'-di-indolylmethane (Di-IM) and SCN^- . At pH 4, 3-indolylacetonitrile (IAN) is the primary indolic cleavage product, along with glucose, bisulphate and sulphur.

Although the aqueous solutions of GBR are relatively stable, they are very sensitive to UV-light. We have investigated this fact in some detail and the essential results are discussed in the present communication.

The GBR used was prepared in our laboratory as the tetramethyl ammonium salt (of 97% purity) according to GMELIN and VIRTANEN¹. Aqueous solutions of GBR were irradiated in quartz cells ($d = 1$ cm) at a distance of 15 cm from the UV source, a 'Chromatolux' tubular lamp of Pleuger Inc. (G8TL, 8 W, emitting principally at 2537 Å without additional filtration).

The time course decomposition of GBR was followed by measurement of the absorbancy of the solution at 230 nm (spectrophotometer CF₄-Optica Milano) (results in Figure 1). The initial steep decrease in absorbancy is supposed to characterize the decomposition of GBR and, after the minimum has been reached (at 3 min), the small rise and slow subsequent change is probably due to the formation of the final decomposition products. The minimum value is supposed to represent the point of intersection of 2 curves. It is important to note that long, continuous irradiation of the sample causes the same changes in absorbancy (curve 1) as a short, only 3 min long exposure (curve 2).

For the identification of the decomposition products, the solutions of GBR (1 mg/ml) were irradiated as already described for 10, 20 and 45 min. At first it may be accentuated that the pH of the solutions fell from pH 7.0 to pH 3.7 after 10 min irradiation and then no further change was observed. The presence of sulphate in the solutions was proved (as Ba-salt). The other products were identified by means of paper chromatography (Figure 2). An unknown product (X on Figure 2; green fluorescence with formaldehyde reagent⁴, $R_f = 0.56$) appeared after 10 min irradiation, but it vanished on further irradiation. The other 4 final products were

identified as glucose, SCN^- , 3-OH-MI and Di-IM. From this it is evident that all the products of photolysis are identical with the products of enzymatic cleavage of GBR by myrosinase. Quantitatively, 83.3% of the initial GBR (50 µg/ml) was decomposed after 3 min of UV-irradiation (estimated from the amount of liberated SCN^-). The remaining GBR decomposed probably to IAN, as a result of the fall in the pH of the solution. For comparison, the exposure of the same GBR-solution to sunlight resulted in 55% decomposition of glucoside. Also, after exposing the solution to gamma radiation (100 kR Co⁶⁰), there followed a 41% decomposition of GBR, but the products formed at UV-irradiation were not found in this case.

The UV-irradiation of some other glucosinolates, sin-albin, sinigrin, glucoiberin and progoitrin, produced a

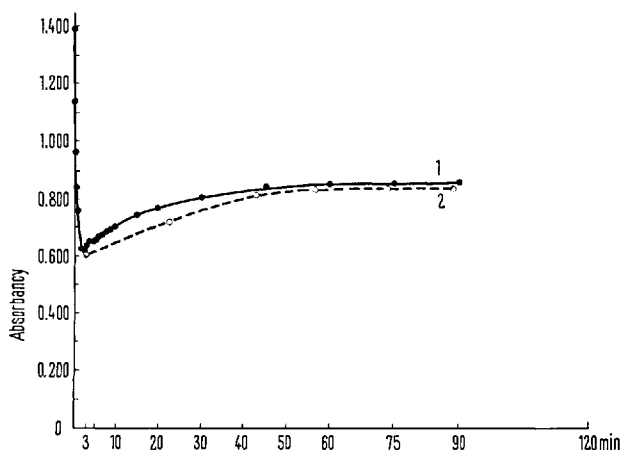


Fig. 1. The changes of absorbancy at 230 nm after UV-irradiation of water solution of glucobrassicin (50 µg/ml). Curve 1, continuously irradiated solution; curve 2, the solution irradiated for 3 min then left without further irradiation.

¹ R. GMELIN and A. I. VIRTANEN, *Ann. Acad. Sci. fenn. Ser. A. II. Chemica* 107 (1961).

² M. KUTÁČEK and K. OPLIŠTILOVÁ, *Fiziologiya Rast.* 11, 867 (1964).

³ H. SCHRAUDOLF, *Experientia* 21, 520 (1965).

⁴ Ž. PROCHÁZKA, V. ŠANDA and K. MACEK, *Colln. Czech. chem. Commun. Engl. Edn* 24, 2928 (1959).