

## MODIFICATIONS DANS LA STRUCTURE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ÉDIFICE CONTRACTILE AU COURS DU CYCLE DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

par

M. DUBUISSON

*Laboratoire de Biologie générale, Faculté des Sciences, Université de Liège (Belgique)*

### INTRODUCTION

Pendant fort longtemps, les recherches effectuées sur le muscle, et qui ressortissaient de trois disciplines différentes: la morphologie, la physiologie et la biochimie, sont restées sans connections; les techniques auxquelles ces domaines devaient faire appel étaient de nature trop différente et les résultats obtenus par les divers chercheurs offraient peu de recoupements. Nul n'ignore encore le rôle de pionnier que notre Maître O. MEYERHOF, que nous fêtons ici, a joué dans ce rapprochement, si extraordinairement fécond, entre la physiologie et la biochimie du muscle. Ses travaux sont si classiques, si nombreux, constituent un exemple si merveilleux de logique, de profondeur et de perspicacité, qu'ils forment une gerbe modèle dont nous sommes loin d'avoir cueilli aujourd'hui tous les épis. Je ne puis évoquer sans une certaine émotion des notions — comme celles qui établissent les relations quantitatives entre le travail du muscle et son métabolisme — qui nous sont devenues maintenant si familières que nous avons presque oublié qu'elles ne furent pas tout de suite évidentes et qu'il a fallu bien du génie et du talent pour les établir; je ne puis contempler sans émerveillement la liste des enzymes qui interviennent dans le cycle des générateurs d'énergie du muscle et dont un si grand nombre ont été découverts par ce Maître.

Transformations moléculaires d'une part, travail musculaire de l'autre: qu'avons-nous entre les deux?

Que sait-on aujourd'hui du mécanisme grâce auquel l'énergie chimique est transformée en travail mécanique?

Hélas, la route est difficile. Les deux domaines se recoupent au niveau de la machine musculaire, formée de protéines de structure qui sont d'autant plus difficiles à étudier qu'elles existent, *in vivo* et *in situ*, non pas comme la plupart des protéines-enzymes: librement dissoutes dans le suc musculaire et par conséquent aisément extractibles sans trop de risques de modifications, mais sous une forme d'association très particulière qui assure précisément cette structure. Les procédés d'extraction nous forcent à briser celle-ci pour ne retrouver, dans nos extraits, que des morceaux dont le degré de dispersion, l'orientation spatiale, la structure et les groupements prosthétiques éventuels sont indiciblement bousculés. Si nous commençons aujourd'hui à connaître un certain nombre de propriétés de ces protéines de structures, considérées *in vitro*, disons le tout de suite:

*Bibliographie p. 36/37.*

nous sommes fort loin de pouvoir nous représenter l'édifice contractile *en place dans le muscle* et toute tentative consistant à expliquer comment, par l'intervention de cet édifice, les générateurs d'énergie produisent un travail, ne peut être par conséquent que fort spéculative et tout au plus une source plus ou moins suggestive d'hypothèses de travail, ce qui n'est d'ailleurs pas un faible mérite.

Le nombre de protéines de structure qui ont été l'objet de recherches est déjà considérable: citons la myosine (elle-même vraisemblablement complexe: myosines  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  (DUBUISSON<sup>1</sup>),  $\gamma$  (DUBUISSON<sup>2</sup>), l'actine (STRAUB<sup>3</sup>, <sup>4</sup>, <sup>5</sup>) (sous la forme monomère: G-actine et polymère: F-actine), la combinaison des actines aux myosines (F-actomyosine, G-actomyosine<sup>6</sup>), la tropomyosine de BAILEY<sup>7</sup>, la N protéine de GERENDAS ET MATOLTSY<sup>8</sup>. On possède les méthodes pour extraire ces protéines et les séparer les unes des autres et les résultats obtenus sont déjà qualitativement et quantitativement très reproductibles.

Ces techniques ont toutes en commun d'attaquer la pulpe musculaire, préalablement finement divisée par des procédés mécaniques, par des solutions dont les caractéristiques principales ne sont pas tant de posséder une action spécifique sur la solubilité de ces molécules que d'avoir une influence spécifique sur leur *extractibilité*, c'est-à-dire *une action disruptive sur les forces qui maintiennent en place ces protéines de structure*<sup>9</sup>.

Tous ceux qui ont extrait ces protéines savent cela et je n'enfoncerais qu'une porte ouverte en le répétant. Mais peut-être n'a-t-on pas suffisamment songé au parti que l'on peut en tirer, sur un terrain où la physiologie rencontre cette biochimie particulière. Personne ne contestera que *l'édifice contractile doit posséder, à l'état raccourci, une structure bien différente de celle qu'il possède à l'état relâché. Cette différence: c'est le noeud du problème*. Elle implique un remaniement des éléments constitutifs, des modifications des relations spatiales, physico-chimiques, des changements dans les modes de liaison. On peut ainsi, *a priori*, prévoir que *l'extractibilité des protéines de structure ne peut être la même si l'on part de pulpe de muscle contracté ou de muscle au repos*. Et l'on saisit aussi tout de suite que, dans la mesure où il est possible:

a) de préparer des pulpes musculaires répondant à ces deux états extrêmes du cycle contractile: l'état de *relâchement* et l'état de *contracture*;

b) d'analyser *qualitativement* et *quantitativement* la composition protidique de ces extraits;

c) d'établir l'existence *de changements d'extractibilité* de l'une ou l'autre de ces protéines de structure:

l'on se trouve à même d'aborder le problème de la contraction musculaire par un nouvel angle, à la fois physiologique et biochimique et, par conséquent, de nature à apporter des renseignements inédits au problème général de la connaissance du mécanisme de la fonction<sup>9</sup>, <sup>10</sup>.

C'est dans ce domaine que mes collaborateurs et moi travaillons depuis un certain nombre d'années.

Je voudrais ici offrir à mon Maître O. MEYERHOF, sous la forme d'un aperçu général de nos résultats\*, les fruits de notre modeste contribution à l'étude du problème de la contraction musculaire, dont il fut l'un des plus intenses animateurs.

\* Les travaux effectués dans notre laboratoire, et dont il sera question dans cet article, sont cités dans les références sous les numéros: 1, 2, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 28, 29, 34, 36, 37.

# I. PRÉPARATION D'EXTRAITS PROTIDIQUES DE PULPES DE MUSCLES DE LAPIN SE TROUVANT DANS UN INSTANT DÉFINI DU CYCLE DE LA CONTRACTION

La préparation d'extraits musculaires quelconques nécessite toujours a) la division mécanique du tissu, b) l'extraction à basse température pour éviter les dénaturations, autolyses, etc.

1. Lorsqu'il s'agit de muscles *normaux et au repos*, il faut que ni le hachage, ni l'abaissement de température n'entraînent une stimulation des fibres musculaires. De nombreux tâtonnements ont montré que le procédé le plus sûr consiste tout d'abord à refroidir le muscle, non pas brutalement en le plongeant dans l'eau glacée ou l'air liquide, ce qui conduit à coup sûr à une certaine stimulation ou même une contracture, au moins des fibres périphériques<sup>11</sup>, mais *graduellement*, en plaçant les muscles *non encore excisés* dans une chambre froide (1 à 2° C) pendant au moins une heure. On peut ensuite hacher le tissu au moyen d'un broyeur à viande du genre Latapie, ou placer le muscle refroidi dans une enceinte à —20 à —30° C, dans laquelle le muscle se congèlera et pourra être ensuite coupé au microtome à congélation\*, en tranches de 20 à 40  $\mu$  d'épaisseur. Ce dernier procédé fournit des extraits plus riches et de composition plus constante que l'autre<sup>11</sup>.

S'il s'agit d'obtenir des muscles se trouvant à l'état de raccourcissement maximum, provoqué, par exemple, par la stimulation électrique, le seul moyen connu d'immobiliser le tissu en cet état consiste à le plonger dans l'air liquide. Nous avons montré que le procédé est moins sûr que l'on pouvait a priori le supposer: le refroidissement brusque paralyse, dans une certaine mesure, les processus d'excitation au niveau de certaines fibres avant que celles-ci aient pu être saisies par la congélation. Aussi observe-t-on fréquemment, au moment de l'immersion — bien que le téτανos électrique soit maintenu —, un relâchement musculaire, plus ou moins considérable<sup>9, 10</sup>. L'obtention, par cette méthode, de fibres musculaires contractées est donc souvent un effet du hasard et nécessite un certain tâtonnement.

Plus sûr à obtenir est l'état de raccourcissement maximum que fournissent certains agents ou facteurs contracturants tels le monoiodoacétate<sup>12</sup>, la strychnine<sup>13</sup>, le *rigor mortis*<sup>13</sup>.

2. Quel que soit le procédé utilisé pour la dilacération du tissu, la mise en solution de certaines protéines demande la présence de solutions salines, dont l'action doit être plus ou moins prolongée et facilitée par une agitation appropriée, suffisamment douce cependant pour éviter l'apparition de mousse dont on connaît l'influence, par action de surface, sur la dénaturation des protéines. Comme on le sait, l'action dissolvante des solutions salines sur les globulines est, *grosso modo*, proportionnelle à  $\mu = \sum \frac{1}{2} CV^2$ , où C est la concentration des ions et V leur valence, à condition de rester en deçà de la limite du *salting out*. Mais la nature des ions n'est pas sans influence; elle dépend de leur degré d'hydratation et de leur pouvoir de s'associer aux protéines. Il en résulte que l'utilisation de solutions de composition diverse conduit à l'obtention d'extraits qui peuvent révéler des richesses dissemblables en protéines. Les différences constatées peuvent porter sur la "qualité" comme sur la "quantité" de protéines extraites. (C'est ainsi que l'actomyosine est plus aisément mise en solution dans les solutions de KCl que dans les solutions de MgCl<sub>2</sub>, de même force ionique, et que (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> extrait peu de myosine  $\beta$ ,

\* Nous utilisons pour cela un microtome à congélation dont le mouvement est entraîné par un moteur électrique, ce qui permet de débiter 100 g de muscle en dix minutes.

qui paraît dénaturée *in situ* sous l'influence de ce sel<sup>9</sup>). Ce qui nous paraît essentiel, c'est d'éviter, autant que possible, *du moins au cours d'une première étape de ce genre d'études*, l'utilisation d'électrolytes dont on sait par avance l'influence nuisible sur le degré de polymérisation de certaines protéines (KI), sur la grandeur des particules (urée), sur leur solubilité (Ca, métaux lourds). Le plus prudent est d'employer des ions "naturels" tels que  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $HPO_4^{--}$ ,  $H_2PO_4^-$ , aux  $p_H$  les plus physiologiques possible.

3. Jusqu'à quel point ces méthodes d'extraction permettent l'obtention de solutions de protéines *inaltérées* est un problème qu'il convient tout d'abord de bien poser. Il est évident que les solutions de protéines obtenues à la suite d'une extraction aussi prudente que possible ne peuvent jamais être considérées comme des solutions au sein desquelles les molécules sont dispersées sous une forme *identique* à celle qui existe à l'intérieur du myone. Les protéines peuvent être associées, *in vivo*, de façon bien plus complexe et avoir été dissociées d'un support insoluble, ou séparées de groupements prosthétiques qui y sont naturellement attachés, par l'action même des solutions salines d'extraction. Elles peuvent aussi se trouver, *in vivo*, sous une forme orientée, peu soluble, passer dans les solutions d'extraction dans un état beaucoup plus dispersé, plus chaotique; et y présenter une structure secondaire (enroulements ou déplissements des chaînes principales) totalement différente. Lorsque nous envisageons des conditions d'extraction qui fournissent un minimum d'altération des constituants protidiques, ceci veut signifier, par conséquent, que ces conditions seront celles dans lesquelles s'observera un minimum de dénaturation, c'est-à-dire de formation de produits insolubles, sans préjuger des autres modifications que nous venons d'envisager. Nous trouvons, en effet, dans le muscle, un exemple curieux fourni par les myosines  $\beta$ . Ces protéines, une fois isolées, sont solubles au  $p_H$  7.2 et à  $\mu$  0.20. Cependant une solution d'extraction de cette composition n'extraît que très peu de myosine  $\beta$  d'une pulpe musculaire finement divisée: il faut utiliser des solutions de force ionique comprises entre 0.5 et 1 pour extraire au maximum ces myosines; mais une fois dispersées, on peut garder ces protéines en solution à  $\mu$  0.20<sup>9</sup>. Nous sommes ici en présence d'un cas typique d'extraction d'une molécule qui n'existe sûrement pas, *in vivo et in situ*, dans l'état où nous la trouvons dans l'extrait; mais, sans autres recoupements, il n'est pas possible de dire si ce fait est dû à une moindre solubilité, *in vivo*, parce que la molécule présenterait une orientation pseudo-cristalline de ses molécules ou parce qu'elle y serait combinée avec d'autres substances, sous la forme d'un complexe insoluble, mais que les solutions salines dissocient. Nous trouverons encore plus loin d'autres exemples analogues.

Mais c'est là précisément une situation des plus précieuses pouvant contribuer à éclaircir le problème des transformations physiologiques *in vivo et in situ*, des protéines musculaires. A égalité de conditions d'extraction, si deux muscles, considérés à des états fonctionnels différents, fournissent systématiquement des extraits de composition dissemblable, c'est précisément parce que les forces de liaison sont plus solides dans l'un des deux cas, forces que la solution d'extraction n'est pas capable de briser. Et ceci montre combien il est important, dans la poursuite de ce genre d'études, d'utiliser des solutions dont l'action sur les protéines et les forces de liaison qui les unissent soit aussi tempérée que possible, par la nature et la concentration des ions qu'elles contiennent comme par leur  $p_H$ . On sait, à propos de ce dernier facteur, que le  $p_H$  des solutions d'extraction a une influence considérable sur la stabilité des extraits soumis à la dialyse. JACOB<sup>14, 15</sup> a montré, dans mon laboratoire, par l'étude systématique d'extraits dialysés

48 heures à toute une série de  $p_H$ , la formation de complexes d'agrégation dénaturés dans les zones acides et établi que la zone de sécurité est relativement étroite et se confond avec les  $p_H$  biologiques: 6.5-7.6.

## II. TECHNIQUE RENDANT POSSIBLE L'ANALYSE QUANTITATIVE ET QUALITATIVE DES EXTRAITS AVEC UN MINIMUM D'ALTÉRATION

La méthode la meilleure sera évidemment celle qui permettra une analyse des extraits avec un minimum de manipulations: il faut tâcher de ne point modifier le  $p_H$ , la force ionique, la concentration relative de chaque constituant, etc. On sait que deux splendides techniques nous permettent, aujourd'hui, d'analyser des extraits dans de semblables conditions: l'ultracentrifugation et l'électrophorèse. La dernière, due surtout aux recherches de TISELIUS, a été, de beaucoup, la plus utilisée; elle est généralement plus facilement accessible aux laboratoires de biochimie et fournit des résultats plus sélectifs que l'ultracentrifugation; nous l'employons intensivement pour l'étude des protéines musculaires depuis 1942. Elle permet de déterminer, par la mesure des déplacements de frontières protidiques (gradients), sous l'influence d'un champ électrique: le nombre de constituants présents, la vitesse de chacun d'eux au  $p_H$  choisi et, par conséquent, le p.i. (vitesse nulle), les proportions de chacun des constituants par la mesure des surfaces occupées par chaque gradient sur les clichés et, dans une certaine mesure, leur degré d'homogénéité, c'est-à-dire la tendance à l'"étalement" de ces gradients dans le temps, qui résulte à la fois de cette hétérogénéité et des phénomènes de diffusion moléculaires. La seule manipulation à faire subir aux extraits consiste à les dialyser pendant au moins 40 heures, à 0° C, contre une solution de  $p_H$  et de force ionique choisie.

Il convient de préciser que les diagrammes électrophorétiques correspondant à des extraits tissulaires ne peuvent révéler *toutes* les protéines présentes dans cet extrait: on ne peut pratiquement déceler une composante que si sa concentration dans l'extrait dépasse, en valeur absolue, 0.02%, par la méthode de TISELIUS-LONGSWORTH<sup>16, 17</sup>. Comme la concentration totale en protéines des extraits dialysés est rarement supérieure à 3%, seuls sont décelables les constituants dont le taux, dans l'extrait, est supérieur à 2%. Encore faut-il que les substances présentes seulement en faibles quantités possèdent, au  $p_H$  considéré, une vitesse qui ne soit pas trop voisine de celle d'autres constituants. Dans le cas du muscle, le nombre important de gradients de protéines et leur hétérogénéité moléculaire font que ces gradients se séparent en général incomplètement; les conditions sont donc défavorables pour mettre en évidence la présence de protéines dont la concentration est peu importante. Or, beaucoup de protéines (surtout les protéines-enzymes) existent dans le muscle à des concentrations faibles; ainsi s'explique le nombre relativement restreint de gradients différents dans les tracés d'électrophorèse, alors que les travaux enzymologiques nous laissent prévoir la présence, dans le muscle, d'un nombre beaucoup plus considérable de protéines solubles dans les solutions salines (une cinquantaine peut-être?).

## III. EXISTENCE DE MODIFICATIONS D'EXTRACTIBILITÉ DE CERTAINES PROTÉINES MUSCULAIRES DU LAPIN SELON LE MOMENT DU CYCLE DE LA CONTRACTION

Aucune description ne peut remplacer l'examen et le commentaire des deux figures ci-dessous qui représentent, chez un même Lapin (muscles homolatéraux), d'une part,

*Bibliographie p. 36/37.*

le cliché électrophorétique d'un *muscle normal et au repos*, haché et extrait pendant une heure, au moyen de 1.5 volumes de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.048 m —  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.006 m —  $\text{NaCl}$ : 0.20 m (24 heures de dialyse contre la même solution) et, d'autre part, celui d'un *muscle contracté*, immobilisé en cet état dans l'air liquide et traité ensuite de la même façon que le muscle témoin\*.

Ces deux clichés montrent que ces muscles fournissent des extraits différents en plusieurs points.

1. En ce qui concerne le groupe des *myogènes*, nous sommes ici en présence en réalité d'une collection de protéines, de vitesses électrocinétiques fort semblables, qui presque toutes apparaissent déjà dans les extraits *aqueux* de muscles et qui doivent être considérées comme des protéines existant, *in vivo et in situ*, sous une forme soluble<sup>9</sup>. Ces pro-

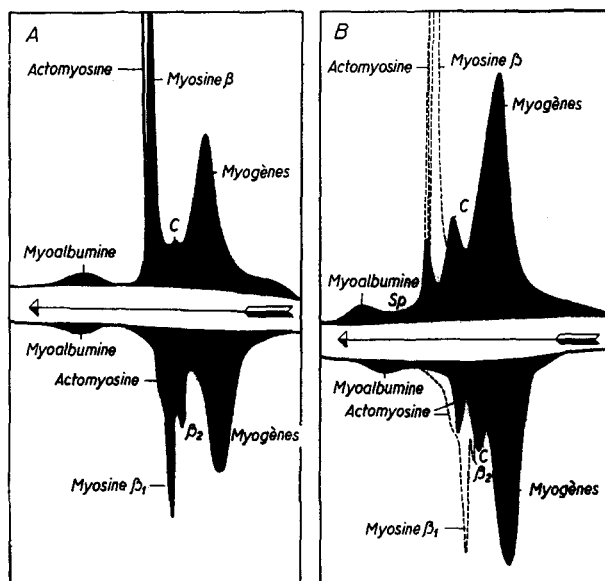


Fig. 1. Protéinogrammes électrophorétiques (méthode de TISELIUS-LONGSWORTH) d'extraits musculaires du Lapin,  $\mu$ : 0.35, pH: 7.40,  $\sim$  50000 secondes d'électrophorèse. En A, muscles *normaux et au repos*, refroidis lentement. En B, muscles *contractés* par stimulation et immobilisation dans cet état par congélation instantanée. En traits interrompus: les gradients de l'actomyosine et des myosines  $\beta_1$  et  $\beta_2$  du muscle normal au repos.

téines comprennent le myogène de WEBER<sup>18</sup>, les myogènes A et B de BARANOWSKI<sup>19-22</sup>, l'aldolase<sup>22b</sup> (qui est une partie du myogène A de BARANOWSKI (ENGELHARDT<sup>23</sup>, MEYERHOF ET BECK<sup>24</sup>), la glycéraldéhyde déshydrogénase (CORI, STEIN ET CORI<sup>25</sup>), la phosphoglucomutase (NAJJAR<sup>26</sup>) et probablement bien d'autres protéines-enzymes dont la vitesse électrocinétique ne nous est pas encore connue<sup>9, 17, 27</sup>.

Rien ne permet de distinguer le groupe d'ensemble de ces myogènes dans les extraits de muscles au repos ou de muscles contractés; il semble bien que la distribution quantitative et qualitative de ces protéines dans les extraits ne subisse pas de modification au cours du cycle de la contraction<sup>14, 28, 29</sup>.

\* Nous n'envisagerons pas, dans cet article, le cas du muscle épuisé par stimulations répétées dont le cas s'apparente plus à l'étude du métabolisme musculaire qu'à celle du mode de fonctionnement de l'édifice contractile (DUBUISSON<sup>27</sup>).

2. Aucune différence ne s'observe non plus au niveau du gradient  $h$  (JACOB<sup>14</sup>) qui représente la myoalbumine de BATE-SMITH<sup>30</sup>.

3. En dehors du cas des myogènes et de la myoalbumine, *la distribution de tous les autres constituants est modifiée dans l'état de contraction.*

Ces autres constituants sont :

a. *Les myosines.* Electrophorétiquement, la myosine classique de WEBER-EDSALL<sup>31, 32</sup> préparée selon GREENSTEIN ET EDSALL<sup>33</sup>, à partir de muscles au repos, est caractérisée par trois gradients que nous avons appelé à l'époque de ces recherches: myosines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>2, 34, 9</sup>. BANGA ET SZENT-GYÖRGYI<sup>35</sup> ont montré que ces préparations de myosine, selon GREENSTEIN ET EDSALL, contiennent deux constituants: la myosine proprement dite et une combinaison de cette myosine (actomyosine) à une protéine du stroma, l'actine, plus tard isolée par STRAUB<sup>3-5</sup>, et que l'on peut obtenir des échantillons contenant des taux variables de ces deux constituants en faisant varier le temps d'extraction: plus celui-ci est prolongé, plus il y a de l'actomyosine en solution.

Ayant réussi plus tard à séparer deux myosines,  $\alpha$  et  $\beta$ <sup>36</sup>, des trois constituants électrophorétiques de la myosine, nous avons pu montrer que le gradient  $\alpha$  correspond réellement à l'actomyosine de SZENT-GYÖRGYI et le gradient  $\beta$  à la myosine proprement dite<sup>9</sup>. La myosine  $\gamma$ , d'ailleurs très faiblement représentée dans ces extraits, n'a pas encore pu être isolée.

L'aspect des gradients actomyosine et myosine des extraits totaux de muscles normaux est caractéristique<sup>2, 34</sup>. Ces deux gradients, de vitesse voisine, ne se séparent que lorsque les électrophorèses sont suffisamment prolongées. Le premier (actomyosine) est toujours beaucoup plus aigu que le gradient de la myosine dans le compartiment ascendant de la cellule d'électrophorèse. La forte viscosité des solutions d'actomyosine freine considérablement les phénomènes de diffusion qui sont la cause principale de l'étalement des gradients; en outre, le gradient d'actomyosine sépare nettement la colonne de protéines en deux régions: l'une turbide et une autre non turbide (les solutions d'actomyosine possèdent une turbidité élevée).

Dans le compartiment descendant, le gradient actomyosine est, au contraire, fortement étalé dans les extraits totaux. Cet aspect dissymétrique existe aussi pour le gradient de la myosine qui paraît unique du côté ascendant, mais nettement bifide du côté descendant ( $\beta_1$  et  $\beta_2$ <sup>1</sup>). Les raisons de ces asymétries sont encore peu évidentes; elles résultent sans doute d'interactions entre l'actomyosine et la myosine, car si l'on étudie électrophorétiquement des solutions pures d'actomyosine ou de myosine, les figures ascendantes et descendantes sont symétriques pour chacune de ces protéines<sup>36</sup> (compte tenu de la dissymétrie classique due au principe même de la méthode électrophorétique).

Les caractéristiques électrocinétiques (en  $10^{-5}$  cm/volt/sec) de ces deux gradients sont ( $\mu$ : 0.40 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.048 m —  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.006 m —  $\text{NaCl}$ : 0.25 m,  $p_H$ : 7.3 à 7.4<sup>9</sup>):

	asc.	desc.
actomyosine . . . . .	— 3.1	—
myosine . . . . .	— 2.9	— 2.4 ( $\beta_1$ ) — 2.6 ( $\beta_2$ )

Si l'on se reporte maintenant aux extraits de muscles contractés, les différences sont extrêmement grandes. Il n'y a plus ici qu'une très faible quantité d'actomyosine visible cette fois, à l'anode comme à la cathode, tandis que le gradient des myosines  $\beta$

a complètement disparu<sup>1</sup>. (Ce qui explique précisément la visibilité des gradients d'actomyosine et à l'anode et à la cathode).

Mais il existe encore d'autres différences entre le muscle normal et le muscle contracté. Dans ce dernier cas, les extraits contiennent une composante nouvelle, que nous avons appelé provisoirement "*contractine*" et qui est toujours absente ou faiblement représentée dans les extraits de muscles normaux (dont les fibres ne sont d'ailleurs pas toujours exemptes d'un certain degré de contracture<sup>10</sup>). Les caractéristiques électrocinétiques de cette nouvelle composante sont, dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus<sup>9</sup>:

asc.	desc.
— 2.35	— 2.05

Enfin, dans les extraits de muscles contractés, entre les gradients formés par l'actomyosine et la myoalbumine, on voit accumulé une certaine quantité de matériel protidique très hétérogène, *sp*, visible aussi bien du côté descendant que du côté ascendant et qui représente une augmentation notable du matériel *sp* toujours présent, mais en faibles quantités, dans les extraits de muscles normaux.

Ajoutons que les constatations décrites ci-dessus sont valables, *quelles que soient les causes de la contracture* (ac. monoiodoacétique, strychnine, *rigor mortis*) et identiques aux cas de contraction par stimulation et immobilisation par l'air liquide<sup>13</sup>.

#### DISCUSSION

Inextractibilité totale des myosines  $\beta$  par KCl, apparition de contractine et de certaines protéines du groupe *sp*, voilà des faits essentiels qui caractérisent la contraction ou la contracture, *quelle que soit la cause de celle-ci*. Et le parallélisme entre le degré de raccourcissement et ces modifications protidiques est si étroit qu'en cas de contracture incomplète (*rigor mortis* en voie de formation), on peut observer des états intermédiaires caractéristiques<sup>13</sup>.

Or, si au lieu par exemple d'immobiliser le muscle, amené en contraction par un bref tétanos, dans l'air liquide, on interrompt l'excitation pour le laisser se relâcher, il fournira le même extrait protidique que le muscle normal. Les modifications d'extractibilité du muscle contracté *doivent donc être réversibles*; elles ne se constatent que si l'on saisit la machine "sur le vif".

Examinons tout d'abord le cas des myosines  $\beta$ . Le passage en solution de ces myosines ne peut être une simple dissolution. Tout d'abord, les quantités de cette substance que l'on peut extraire d'un muscle dépendent du degré de division du tissu, ce qui n'est point le cas pour les protéines appartenant au groupe des myogènes<sup>11</sup>. Les muscles, finement divisés au moulin à viande genre Latapie fournissent — toutes autres conditions étant égales — moins de myosine que les muscles coupés finement au microtome à congélation en tranches de 0.02 mm<sup>11</sup>. Les myosines appartiennent donc à des structures spatialement peu accessibles aux solutions salines, sans doute parce qu'elles sont protégées par des structures morphologiques. Rappelons ensuite (voir p. 28) que de nombreux dosages nous ont montré que l'extraction des myosines  $\beta$  nécessite des solutions plus concentrées que celles qui permettent de garder simplement en solution ces mêmes myosines. Ces substances isolées sont en effet très solubles à une force ionique de 0.20 à 0.25 (KCl 0.25 m, de  $p_H$  7.00); mais si l'on fait agir semblable solution sur la

pulpe musculaire, on extrait seulement  $\frac{1}{6}$  des myosines que l'on peut obtenir si l'on traite la pulpe musculaire avec une solution de KCl 0.6 m<sup>9</sup>. Ceci indique qu'entre les myosines  $\beta$  isolées et les myosines  $\beta$  telles qu'elles existent *in situ* dans le muscle, il existe de profondes dissemblances que l'on peut sans doute rapporter au fait que, dans ce dernier cas, ces myosines font partie de structures complexes dont elles se dissocient d'autant plus aisément qu'on les attaque par des solutions salines concentrées.

A la lumière des travaux de l'école de SZENT-GYÖRGYI<sup>6, 36</sup>, qui montrent l'affinité de la myosine pour cette protéine du stroma: l'actine, on pourrait penser que les structures complexes auxquelles nous venons de faire allusion sont constituées par de l'actomyosine. Mais si tel était le cas, il faudrait admettre que la solution d'extraction brise les forces de liaison entre l'actine et les myosines  $\beta$  (ces forces paraissent devoir être des ponts SH<sup>37, 38</sup>) et permette la dispersion de cette dernière dans l'extrait, tandis que l'actine resterait insoluble dans les conditions de nos extractions. Malheureusement, les solutions d'actomyosine ne sont jamais scindées en actine et en myosine sous l'influence de sels (KCl: 0.6 m); s'il en était autrement, il ne pourrait jamais y avoir d'actomyosine dissoute dans une solution saline.

Quoi qu'il en soit de la nature du complexe auquel sont normalement associées les myosines  $\beta$ , nous devons admettre, puisque ces myosines sont devenues inextrac-tibles dans la pulpe de muscles contractés ou contracturés, que le raccourcissement a modifié leurs forces de liaison: elles sont désormais inaccessibles aux solutions salines utilisées. Il est sans doute assez pertinent de penser que c'est l'établissement de ces forces de liaison même qui entraîne la mise en tension (contraction isométrique) ou le raccourcissement (contraction isotonique) de la machine contractile et leur disparition qui assure son relâchement.

En ce qui concerne la *contractine*<sup>1</sup>, on peut envisager plusieurs causes à son apparition dans les extraits de muscles contractés. Il est tout d'abord possible que la contractine, dont l'apparition accompagne la disparition des myosines  $\beta$ , soit en réalité une partie des protéines  $\beta$  transformée, par exemple, par le gain ou la perte de quelque groupement prosthétique qui en modifierait les propriétés électrocinétiques. Signalons cependant qu'il ne semble exister aucune relation quantitative entre la disparition des myosines  $\beta$  et l'apparition de contractine dans le cas des contractures non maximales. Il est possible d'admettre aussi que l'on a affaire à une protéine qui devient extractible lorsque la machine est à l'état raccourci, parce qu'elle est libérée à ce moment de complexes, ordinairement indissociables par les solutions salines. On en arriverait en somme, dans cette dernière éventualité, à constater, pour la contractine, l'inverse de ce qui se présente pour les constituants de la myosine  $\beta$ , qui ne sont plus libérables par KCl, lorsque le muscle est à l'état contracté<sup>9</sup>.

Quant à la nature de la contractine, nous savons seulement ceci: cette protéine précipite mal dans les conditions où précipite le myosine de WEBER-EDSALL (actomyosine + myosines  $\beta, \gamma$ ), soit à  $\mu$ : 0.05 et au p<sub>H</sub> 6.3. Elle ne peut être extraite du muscle contracté à une force ionique inférieure à 0.15–0.20. Elle ne peut non plus correspondre à la phosphorylase b de CORI<sup>39, 40</sup>, qui apparaît dans les muscles fatigués par suite de la transformation de phosphorylase a, car elle n'est jamais présente dans les muscles fatigués par stimulations et relâchés; de plus, le taux de contractine est bien supérieur à celui des phosphorylases<sup>9</sup>. On ne peut exclure, a priori, cette possibilité que la contractine corresponde à cette protéine dont nous avons trouvé des traces dans la plupart des préparations de myosine de WEBER-EDSALL du Lapin et que nous avons, à cette époque,

*Bibliographie p. 36/37.*

appelée myosine  $\gamma^2$ . Nous l'avions trouvée beaucoup plus abondante dans les préparations de myosine faites à partir de muscles de Mollusques (muscles pédieux), qui sont d'ailleurs des muscles très excitables et qu'on ne peut réduire en pulpe sans en provoquer la contracture. Au  $p_H$  7.3 à 7.4 et  $\mu$  0.35 à 0.40, la vitesse de la contractine est de — 2.35 (asc.) et de — 2.05 (desc.); celle de la myosine  $\gamma$  est, dans les mêmes conditions, pratiquement la même, peut-être un peu plus faible (— 2.25) (asc.). Il y a lieu cependant de noter que, contrairement à la myosine  $\gamma$ , la contractine ne précipite pas dans les conditions où précipite la myosine de WEBER-EDSALL dans laquelle on reconnaît la présence de myosine  $\gamma$ , bien qu'en faibles quantités. Enfin, de récentes analyses électrophorétiques effectuées sur des échantillons de G-actine, de F-actine et de tropomyosine\* montrent que la contractine ne peut être aucune de ces protéines-là. Par contre, il semble qu'existe certaines analogies, qui font l'objet de recherches actuelles, entre la contractine et la N-protéine de GERENDÁS ET MATOLTSY<sup>8</sup> qui entre dans la constitution des portions isotropes des myofibrilles. L'emplacement même de ce nucléoprotéide dans la fibre musculaire donnerait un intérêt particulier à ce rapprochement.

On peut se demander maintenant s'il n'est pas possible de trouver des solutions d'extraction qui possèdent la propriété a) ou bien de briser les forces de liaison qui maintiennent si solidement les myosines  $\beta$  à d'autres substances au moment de la contraction et qui seraient en conséquence susceptibles d'extraire ces protéines d'un muscle contracté ou contracturé; b) ou bien de briser les forces de liaison qui rendent inextractible la contractine des muscles normaux. C'est également ce qui fait l'objet de nos recherches actuelles, dont les résultats préliminaires, fort encourageants, seront publiés sous peu et semblent devoir être de nature à éclairer grandement la connaissance de la structure de l'édifice contractile.

#### CONCLUSIONS

Seules les protéines extraites par les solutions de force ionique élevée doivent être considérées comme des constituants engagés *in vivo et in situ*, dans des complexes qui sont par eux-mêmes insolubles. Or, il se trouve précisément que ce sont ces protéines là dont l'extraction est la plus modifiée au cours du cycle de la contraction. Il est ainsi tout naturel de penser que le fonctionnement de la machine contractile est essentiellement caractérisé par la formation ou la dissociation de ces complexes. Cette conclusion est en harmonie avec les théories suggérées par SZENT-GYÖRGYI<sup>6, 36</sup>, selon lesquelles le mécanisme de la contraction résulterait de la transformation de l'actomyosine sous l'influence de sels et d'A.T.P.; mais ceci n'est qu'une solution approchée, comme le reconnaît d'ailleurs lui-même ce chercheur. Tout d'abord, la myosine elle-même est une substance compliquée. Elle est constituée d'au moins deux composantes électrophorétiques:  $\beta_1$  et  $\beta_2$ ; elle contient l'A.T.Pase<sup>41</sup>, qui est un enzyme n'étant vraisemblablement qu'accroché à la myosine; elle contient encore d'autres enzymes: une désaminase<sup>42</sup>, l'apoférent d'un enzyme susceptible de transformer l'arginine et l'histidine en créatine<sup>43</sup>. Le cycle de la contraction affecte aussi une autre myosine: la composante  $\gamma$ , électrocinétiquement distincte de  $\beta^2$ . Le substrat auquel les myosines peuvent se lier contient sûrement l'actine de STRAUB (sous la forme de F-actine vraisemblablement, étant donnée la force ionique du muscle) et peut-être même la tropomyosine de BAILEY

\* Recherches inédites.

et la nucléoprotéine de GERENDAS ET MATOLTSY. Enfin, la liaison des myosines à l'édifice contractile au moment de la contraction est concomitante de la libération de la contractine, nettement distincte de l'actomyosine et des myosines  $\beta_1$  et  $\beta_2$ . Ce sont là des faits qui permettent de penser que la machine contractile est beaucoup plus compliquée que l'on serait tenté de le croire. Déjà, les travaux de l'école de SZENT-GYÖRGYI ont montré par la découverte de l'actomyosine, que les myofibrilles ne sont pas uniquement constituées de myosine, comme on l'avait cru jusqu'alors; mais il serait dangereux de penser que le schéma de la contraction musculaire construit sur la base actomyosine — ATP — KCl —  $MgCl_2$  est satisfaisant, malgré ce que certaines expériences faites avec des fils préparés au moyen de cette substance peuvent avoir de spectaculaire (super-précipitation ou forte déshydratation (cynaerèse) sous l'influence de sels ou d'A.T.P.<sup>44-49</sup>). On ne fera certes jamais trop d'expériences dans le genre de celles qui furent faites par NEEDHAM et collaborateurs<sup>50, 51</sup>, ainsi que par l'école de SZENT-GYÖRGYI, sur les propriétés des myosines sous l'action de telle ou telle substance; mais on n'en fera jamais assez pour poser tout d'abord, dans toute son ampleur, le problème "physiologique" qui consiste à déterminer *combien de protéines* appartiennent réellement aux structures dont les modifications assurent le mécanisme de la contraction et du relâchement musculaires et comment se modifient leurs modes de liaison au cours du cycle de la contraction. C'est une première contribution à ce genre d'investigation dont les résultats ont été résumés ici. Ils montrent qu'en s'efforçant de dissocier les complexes protidiques, avec le moins de brutalité possible, en attaquant leurs forces de liaison par des solutions d'extraction de composition appropriée, afin de libérer progressivement les éléments détachables, on peut, par des comparaisons faites sur des muscles se trouvant en divers états fonctionnels (relâchés, contractés) se rendre compte par la méthode électrophorétique, de l'établissement ou de la rupture de liaisons qui unissent les éléments qui participent à la contraction. Les résultats obtenus jusqu'ici sont encore fort difficiles à interpréter et ne peuvent pas encore, pas plus d'ailleurs que ceux obtenus par d'autres voies, servir à construire une théorie de la contraction et du relâchement musculaires. Si certains éléments permettent de penser que le cycle de la contraction est dû à la formation et à la dissociation de complexes constitués d'actine, de myosines  $\beta_1$  et  $\beta_2$ , de contractine, etc., il nous faut encore mieux connaître la structure de ces complexes et leurs modifications au cours du cycle de la contraction. Et ceci est un chemin dont le parcours est encore long et difficile.

#### RÉSUMÉ

L'édifice contractile doit posséder, à l'état raccourci, une structure bien différente de celle qu'il possède à l'état relâché. Cet édifice étant essentiellement constitué de protéines, on doit s'attendre à ce que l'extractibilité de ces substances, au moyen de solutions salines ayant une action plus ou moins disruptive sur les forces de liaison qui maintiennent les protéines en place dans l'édifice, doit être différente selon que l'on considère le muscle à l'état contracté — ou contracturé — ou relâché.

C'est effectivement ce que nous avons pu constater. Pour ne citer que les faits les plus saillants: tandis que les myosines  $\beta$  deviennent inextractibles par les solutions salines utilisées, lorsque la machine musculaire se trouve à l'état contracté, une nouvelle protéine: la contractine apparaît dans les extraits. Ces observations sont discutées. Il apparaît que la méthode d'investigation employée, qui fait appel simultanément à des techniques physiologiques, physico-chimiques et biochimiques, est loin d'avoir fourni tous les renseignements qu'elle est susceptible de nous apporter dans la connaissance du problème du mécanisme général de la contraction musculaire.

#### SUMMARY

The contractile apparatus must possess, in the shortened state, a structure which differs from that in the relaxed state. As it is essentially composed of proteins, one must expect the extractability

of these substances — as effected by salt solution, possessing a more or less disruptive action on the forces which keep the proteins in their place in the structure — to differ when the muscle is in state of contraction or relaxation.

This we have been able to observe. The most remarkable facts are: When the muscle is in state of contraction the myosins  $\beta$  cannot longer be extracted by the salt solutions employed, but then a new protein, the contractine, appears in the extracts. These observations are discussed. The method of investigation employed, requiring at one time physiological, physico-chemical and biochemical techniques, does not yet appear to have revealed all information it is expected to yield in contribution to the understanding of the mechanism of muscle contraction.

### ZUSAMMENFASSUNG

Der Kontraktionsapparat muss im verkürzten Zustand eine andere Struktur haben, als im Ruhezustand. Da er grösstenteils aus Proteinen besteht, so ist zu erwarten, dass die Extrahierbarkeit dieser Substanzen mit Salzlösungen aus kontrahiertem und ruhendem Muskel verschieden sein wird, denn die Salzlösungen wirken mehr oder weniger spaltend auf die Bindungen welche die Proteine in der Struktur zusammenhalten.

Wir konnten dies in der Tat beobachten. Nennen wir nur die hervorragendsten Fälle: Wenn der Muskel kontrahiert ist, können die  $\beta$ -Myosine nicht mehr durch Salzlösungen extrahiert werden, aber ein neuer Eiweisstoff, das Kontraktin, tritt in den Extrakten auf. Die verwendete Methode, die gleichzeitig von physiologischen, physiochemischen und biochemischen Arbeitsweisen Gebrauch macht, scheint noch lange nicht alle Aufklärungen zum Verständnis des Mechanismus der Muskelkontraktion gegeben zu haben, die sie verschaffen könnte.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 4 (1948) 437.
- <sup>2</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 2 (1946) 258.
- <sup>3</sup> F. B. STRAUB, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3.
- <sup>4</sup> F. B. STRAUB, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 23.
- <sup>5</sup> F. B. STRAUB, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 150.
- <sup>6</sup> A. SZENT-GYÖRGYI, *Chemistry of muscular contraction*, Acad. Press, New-York 1947.
- <sup>7</sup> K. BAILEY, *Nature*, 157 (1946) 368.
- <sup>8</sup> M. GERENDÁS ET A. G. MATOLTSY, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1948) 124.
- <sup>9</sup> M. DUBUISSON, *Biolog. Revs* (sous presse).
- <sup>10</sup> M. DUBUISSON, *Arch. intern. physiol.*, 61 (1948) 93.
- <sup>11</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 3 (1947) 372.
- <sup>12</sup> J. JACOB, *Experientia*, 3 (1947) 241.
- <sup>13</sup> P. CREPAX, J. JACOB ET J. SELDESCHTS, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- <sup>14</sup> J. JACOB, *Biochem. J.*, 41 (1946) 808.
- <sup>15</sup> J. JACOB, *Biochem. J.*, 42 (1948) 71.
- <sup>16</sup> M. DUBUISSON ET J. JACOB, *Bull. soc. roy. sci., Liège*, 3 (1945) 133.
- <sup>17</sup> M. DUBUISSON, *Les Protéines musculaires*. Exposés annuels de Biochimie Médicale, Série IX, Paris, Masson 1948.
- <sup>18</sup> H. H. WEBER, *Ergeb. Physiol.*, 36 (1934) 109.
- <sup>19</sup> L. CHROBAK ET T. BARANOWSKI, *Compt. rend. acad. sci. U.R.S.S.*, 28 (1940) 724.
- <sup>20</sup> T. BARANOWSKI, *Compt. Rend. soc. biol.*, 130 (1939) 1182.
- <sup>21</sup> T. BARANOWSKI, *Compt. Rend. acad. sci. U.R.S.S.*, 28 (1940) 722.
- <sup>22</sup> T. BARANOWSKI, *Biochimica U.R.S.S.*, 5 (1940) 174.
- <sup>22b</sup> E. C. BATE-SMITH, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1122.
- <sup>23</sup> V. A. ENGELHARDT, *Yale J. Biol. and Med.*, 15 (1942) 21.
- <sup>24</sup> O. MEYERHOF ET L. V. BECK, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 109.
- <sup>25</sup> G. T. CORI, M. W. SLEIN ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 565.
- <sup>26</sup> V. A. NAJJAR, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 281.
- <sup>27</sup> A. DISTÈCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 265.
- <sup>28</sup> J. JACOB, *Bull. soc. roy. sci. Liège*, 4 (1945) 231.
- <sup>29</sup> J. JACOB, *Experientia*, 2 (1946) 110.
- <sup>30</sup> E. C. BATE-SMITH, *Proc. Roy. Soc., B*, 124 (1937) 136.
- <sup>31</sup> J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.*, 89 (1930) 289.
- <sup>32</sup> A. V. MURALT ET J. T. EDSALL, *Trans. Faraday Soc.*, 26 (1930) 837.
- <sup>33</sup> J. P. GREENSTEIN ET J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.*, 133 (1940) 397.

- <sup>34</sup> M. DUBUISSON, *Différenciation électrophorétique et séparation de diverses composantes dans les myosines de muscles au repos et fatigués, de Mammifères et de Mollusques. Un symposium sur les Protéines*, Paris 1947.
- <sup>35</sup> I. BANGA ET A. SZENT-GYÖRGYI, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1941-1942) 5.
- <sup>36</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 2 (1946) 412.
- <sup>37</sup> J. GODEAUX, *Bull. soc. roy. sci. Liège* (1944) 217.
- <sup>38</sup> K. BAILEY ET S. V. PERRY, *Biachim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 506.
- <sup>39</sup> G. T. CORI ET C. F. CORI, *J. Biol. Chem.*, 158 (1945) 321.
- <sup>40</sup> G. T. CORI, *J. Biol. Chem.*, 158 (1945) 333.
- <sup>41</sup> V. A. ENGELHARDT, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 147.
- <sup>42</sup> FERDMAN, *Biochem. J. (Ukraine)*, 18 (1946) 110.
- <sup>43</sup> F. MENNE, *Z. physiol. Chem.*, 279 (1943) 105.
- <sup>44</sup> T. ERDÖS, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1941-42) 59.
- <sup>45</sup> T. ERDÖS, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 57.
- <sup>46</sup> M. GERENDÁS, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1941-42) 47.
- <sup>47</sup> M. GERENDÁS ET SZENT-GYÖRGYI, *Enzymologia*, 9 (1941) 117.
- <sup>48</sup> A. SZENT-GYÖRGYI, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1941) 17.
- <sup>49</sup> A. SZENT-GYÖRGYI, *Stud. Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 25.
- <sup>50</sup> J. NEEDHAM, S. C. SHEN, D. M. NEEDHAM ET A. S. C. LAWRENCE, *Nature*, 147 (1941) 766.
- <sup>51</sup> M. DAITY, A. KLEINZELLER, A. S. C. LAWRENCE, M. MIALI, J. NEEDHAM, D. NEEDHAM ET SHIH-SCHANG SHEN, *J. Gen. Physiol.*, 27 (1944) 355.

Reçu le 22 mars 1949