

## CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PROTÉINOGRAMMES ÉLECTROPHORÉTIQUES D'EXTRAITS DE MUSCLES CONTRACTURÉS

par

P. CREPAX, J. JACOB ET J. SELDESLACHTS

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

DUBUISSON<sup>1</sup> vient de montrer que l'état de contraction entraîne une série de modifications spécifiques des conditions d'extractibilité et de solubilité des protéines musculaires: si l'on étudie comparativement, au moyen de la technique électrophorétique, les extraits préparés en partant de muscles à l'état de *repos* (voir DUBUISSON<sup>2, 3</sup>) à propos de la signification qu'il faut donner à cette expression) et de muscles *contractés*, on constate que, dans ce dernier cas, l'actomyosine est fortement diminuée et que les myosines  $\beta$  ( $\beta_1 + \beta_2$ ) sont complètement absentes. On trouve en plus des quantités remarquables d'une nouvelle composante (la contractine) absente ou, en tous cas, très faiblement représentée, dans les extraits de muscles normaux. Ces trois phénomènes—diminution d'actomyosine, disparition des myosines  $\beta$  et apparition de la contractine—sont des caractéristiques spécifiques des extraits de muscles de Lapin en état de contraction, au même titre que la disparition de l'actomyosine et la diminution des myosines  $\beta$  le sont des extraits de muscles fatigués (voir DUBUISSON<sup>4</sup>).

A la lumière de ces faits, qui témoignent d'une façon suggestive, et à plusieurs points de vue inattendus, de l'importance des rapports entre des états fonctionnels du muscle et les forces de liaison qui retiennent les protéines plus ou moins solidement unies à des complexes par eux-mêmes insolubles, nous présentons ici les résultats de recherches que nous avons conduites sur la composition protidique du muscle *dans différents états de contracture*. Tout d'abord, nous avons réexaminé la contracture monobromacétique qui avait déjà sommairement été étudiée par l'un de nous (JACOB<sup>5</sup>). (DUBUISSON<sup>1</sup> a signalé les analogies existant entre les diagrammes publiés à cette occasion et celles qu'il obtenait avec les muscles contractés par stimulation électrique et immobilisation instantanée dans l'air liquide). Nous avons ensuite étudié les muscles en tétanos strychnique et ceux en *rigor mortis*.

### TECHNIQUE

Nous avons conduit nos recherches sur des extraits musculaires totaux dont la composition était analysée au moyen de la technique électrophorétique. Dans quelques cas seulement nous avons eu recours à la préparation d'extraits fractionnés (myosines A et B de BANGA ET SZENT-GYÖRGYI<sup>6</sup>). L'animal employé a toujours été le Lapin et, sauf exception, on examinait chez *le même* Lapin, soit les muscles normaux, soit ceux contracturés.

Les différentes contractures étaient obtenues de la façon suivante:

a) l'injection lente de 1 ml d'une solution à 15% de monobromacétate sodique dans une des artères iliaques provoque une forte rigidité des muscles de la patte correspondante. L'autre patte,

dont les vaisseaux ont été obturés, reste souple et sert de témoin. Nous avons vérifié que ni l'ischémie prolongée, ni l'anesthésie de l'animal (nous avons utilisé soit le dial-éther, soit le pentothal sodique), ne modifient les diagrammes "normaux" de façon appréciable.

b) l'injection d'une dose de sulfate de strychnine de l'ordre de 1.5–2 mg par kg de Lapin produit, en peu de minutes, la mort de l'animal en crise tétanique. Tous les muscles sont fortement rigides.

c) les muscles en *rigor mortis* étaient prélevés sur des animaux qui, après la mort, avaient séjourné 18–24 heures dans la chambre froide.

Pour l'extraction de la pulpe musculaire, au préalable finement hachée\* au microtome à congélation (DUBUISSON<sup>7</sup>), nous avons employé des solutions de différentes compositions, dans le but de chercher à préciser les causes des changements d'extractibilité des protéines des muscles contracturés. C'est pourquoi, à côté de la solution phosphatique de force ionique  $\mu$  0.35 et de pH 7.4 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.048 m;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.006 m;  $\text{NaCl}$  0.2 m) qui donne les extraits les mieux adaptés — en raison des proportions relatives des différents constituants — à l'analyse électrophorétique des muscles normaux, nous avons employé, soit des solutions phosphatiques de plus grande force ionique:  $\mu$  0.40–0.45 (par addition de  $\text{NaCl}$  à la solution dont la composition est donnée ci-dessus), soit la solution de Weber-Edsall, c'est-à-dire la solution habituellement employée pour l'extraction des myosines\*\* (0.6 m de  $\text{KCl}$  et 0.03 m de  $\text{NaHCO}_3$ ).

Les extraits sont préparés à 1° C environ, en agitant la pulpe pendant 20 à 60 minutes, avec 1.5 à 2 vol de solution d'extraction. Après centrifugation (15' à 6000 tours), les extraits sont dialysés, en tubes de cellophane, pendant 48 heures à une température d'environ 2° C contre une solution de composition suivante:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.032 m,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.004 m,  $\text{NaCl}$ : 0.25 m. Le pH de cette solution est 7.1, la force ionique:  $\mu$  0.35. Dans quelques expériences, la dialyse était effectuée contre une solution de force ionique plus faible ( $\mu$  0.10). La composition de cette solution était:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 0.032 m,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ : 0.004 m; son pH était 7.61.

Sauf dans ce dernier cas, la dialyse ne s'accompagnait, dans aucun cas, de la formation d'un précipité appréciable. Après dialyse, les extraits sont centrifugés (5' à 11 500 tours) et ensuite analysés au moyen d'un appareillage du type TISELIUS-LONGSWORTH (DUBUISSON ET JACOB<sup>8</sup>). Le taux d'N des extraits est évalué au micro-kjeldahl.

## RÉSULTATS

Disons tout de suite qu'il ne convient pas de distinguer les trois types de contracture envisagés (monobromacétique, strychnique, *rigor mortis*), car les modifications que l'on observe sont qualitativement et quantitativement les mêmes. Nous reviendrons plus loin sur la signification de cette constatation.

Les extraits obtenus à partir de muscles contracturés sont toujours moins concentrés et moins turbides que ceux des muscles témoins: le taux d'N (mg d'N pour ml d'extrait) est de 3.55 ( $\pm$  0.11) dans le premier cas et de 4.33 ( $\pm$  0.21) dans le second cas\*\*\*. L'analyse électrophorétique montre que les différences portent exclusivement sur le groupe II (suivant la terminologie de JACOB<sup>8</sup>), c'est-à-dire sur le groupe des myosines. En effet, si l'on dialyse ces extraits contre des solutions de force ionique  $\leq$  0.15, ce qui entraîne la précipitation de la plus grande partie des myosines, toute différence entre les deux espèces d'extraits disparaît: la composition des autres groupes de constituants, beaucoup mieux analysables dans ces conditions en raison de la plus faible force ionique, n'apparaît nullement affectée par rapport à l'état de contraction (cf. DUBUISSON<sup>4</sup>).

\* Une éventuelle congélation (à  $-20^\circ$  C) de la pulpe ne modifie pas d'une façon appréciable les clichés électrophorétiques des muscles contractés. Il n'en est pas de même dans le cas des muscles normaux.

\*\* L'emploi de cette solution pour la préparation d'extraits totaux de muscles destinés aux recherches électrophorétiques, n'est, en conditions ordinaires, pas très favorable, à cause de la trop grande quantité de myosines qui passe en solution. De plus, même si le temps d'extraction est court, on obtient un pourcentage particulièrement élevé d'actomyosine. La viscosité et la turbidité très fortes de cette protéine font que les extraits qui la contiennent en quantité trop grande ne s'adaptent pas à l'analyse électrophorétique et toute dilution abaisserait au-dessous du niveau optimum la teneur totale en protéines.

\*\*\* Ces données correspondent à des extractions faites avec une solution phosphatique de force ionique  $\mu$  0.35 ajoutée à raison de 2 ml par gramme de tissu haché.

La morphologie du groupe II apparaît, au contraire, comme nous venons de le dire, profondément modifiée. Ce groupe comprend, dans les extraits de muscles contracturés, deux gradients: le plus rapide, assez aigu, relativement peu développé, accompagné de turbidité et très légèrement asymétrique. Il correspond presque certainement à la myosine  $\alpha$  ou actomyosine. L'un de nous (JACOB<sup>5</sup>), lors de ses premières observations sur la composition protidique des muscles contractés par le monobromacétate de sodium, avait posé cette affirmation sous forme dubitative et parlé d'une "protéine qui migre avec une vitesse voisine de celle de la myosine  $\alpha$ ". Ces doutes provenaient, soit du fait que la vitesse de migration électrocinétique de ce gradient ne semblait pas être exactement celle de l'actomyosine, soit du fait que ce gradient apparaît dans les protéogrammes de muscles contractés, très bien individualisé, aussi bien du côté ascendant que du côté descendant, et de façon à peu près symétrique. Or, dans les extraits totaux de muscles normaux, le gradient correspondant à l'actomyosine ne peut être que très difficilement décelé du côté descendant et, d'autre part, même à l'état électrophorétiquement pur, c'est-à-dire en dehors de ses rapports possibles avec d'autres constituants, l'actomyosine présente des deux côtés une asymétrie très forte.

Le gradient en question correspond-t-il réellement à l'actomyosine? Si, à un extrait de muscle contracté, l'on ajoute de l'actomyosine à l'état pur, il est impossible d'obtenir, même en prolongeant beaucoup le temps de l'électrophorèse, une séparation du gradient unique, qui correspond à cette protéine. Certes, dans les très nombreuses expériences que nous avons effectuées, nous avons constamment trouvé des valeurs de vitesse de migration plus élevées que dans le cas de l'actomyosine du muscle normal: 2.9 cm/V/sec au lieu de 2.75 cm/V/sec (à  $\mu$  0.35 et  $p_H$  7.0-7.1); mais cette différence de vitesse électrocinétique est de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales ( $\pm 5\%$ ) et, d'autre part, la vitesse de migration d'un gradient peut être modifiée par le voisinage d'autres composantes qui migrent dans le même milieu. JACOB<sup>9</sup> a établi, il est vrai, que l'importance de ce facteur, théoriquement important, n'est sûrement pas très grand dans le cas de la migration électrophorétique des constituants protidiques des extraits totaux des muscles de Lapin; mais il y a lieu de tenir compte que ces observations résultent de l'étude d'extraits obtenus et dialysés à une force ionique de  $\mu$  0.15, à savoir des extraits sûrement pauvres, sinon entièrement dépourvus de myosines, dont la forte concentration dans nos extraits à  $\mu$  0.35 et la haute viscosité modifient complètement la situation.

Nous pensons donc que le gradient le plus rapide du groupe II des extraits de muscles contracturés est bien de l'actomyosine; sa morphologie, presque symétrique dans les deux compartiments de la cellule électrophorétique, est très vraisemblablement due à l'impossibilité d'interférences avec les myosines  $\beta$  absentes de ces extraits.

Le second gradient du groupe II correspond à la contractine de DUBUISSON. La vitesse de ce gradient est nettement inférieure à celle des myosines  $\beta$ : 2.3 contre 2.8 cm/V/sec dans les conditions de  $p_H$  et de force ionique employées par DUBUISSON<sup>1</sup> ( $p_H$  7.4;  $\mu$  0.35), 2.1 contre 2.5 pour la même force ionique mais pour le  $p_H$  de 7.0 auquel nous avons opéré.

Les myosines  $\beta$  n'apparaissent pas dans nos extraits de muscles contracturés. Dans le but de mieux caractériser la nature de ce phénomène, nous avons essayé divers moyens pour tenter d'extraire les myosines  $\beta$  du muscle contracturé. Une augmentation de la *force ionique* (KCl + phosphates), pas plus que l'emploi de solutions telles que celles de Weber-Edsall, particulièrement adaptées à l'extraction de myosines, ne modifie les caractéristiques des diagrammes des extraits de muscles contractés. Le  $p_H$  auquel

on effectue l'extraction ne modifie pas non plus les résultats, si l'on reste dans une zone comprise entre  $p_H$  6 et  $p_H$  8. Mais si l'on se porte à des valeurs plus alcalines ( $p_H \geq 9$ ), il devient possible, au moyen de la solution de Weber-Edsall, d'extraire des myosines de muscles contracturés. La quantité de celles-ci reste pourtant assez faible par rapport à celle que l'on peut tirer, en conditions d'extraction ordinaire ( $p_H \sim 6.5$ ), d'un muscle normal.

Au point de vue *quantitatif*, les phénomènes que nous venons de décrire se chiffrent de la façon suivante:

Il y a environ 7% d'actomyosine dans les extraits de muscles normaux, 4.5% dans ceux des muscles contractés. La contractine présente dans les extraits de muscles contractés atteint 13 à 14%; le pourcentage dans lequel cette protéine peut être présente dans les extraits de muscles dits normaux ne dépasse jamais le taux de 4%, mais elle en est le plus souvent complètement absente.

Si, au lieu d'exprimer les quantités d'actomyosine et de contractine présentes dans les extraits de muscles normaux et contractés par rapport à la quantité totale de protéines, on choisit comme unité de référence le groupe des myogènes (groupe I de JACOB), rigoureusement identique dans les deux cas, on obtient les valeurs suivantes:

muscle normal: actomyosine/myogène: 11%; contractine/myogène: 0 à 7% et, pour les muscles contractés, respectivement: 6.3 et 20.7%.

L'étude quantitative des diagrammes obtenus dans les deux types de muscle confirme l'observation que DUBUISSON a faite sur les protéinogrammes des muscles contractés par stimulation, à savoir que le gradient *sp* DE JACOB, situé entre les compo-

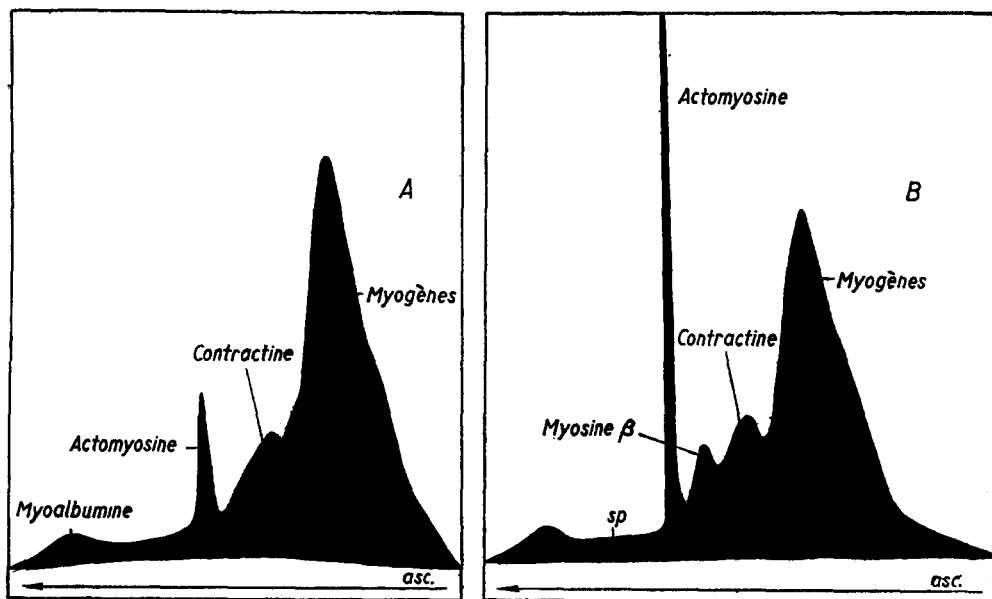


Fig. 1. Diagrammes électrophorétiques (selon LONGSWORTH) d'extraits totaux de muscles de Lapin en *rigor mortis*. Explication détaillée des conditions des expériences dans le texte. Force ionique:  $\mu$  0.35; tracés anodiques; états comparables de séparation. A. *Rigor mortis* accentué (exp. no. 73 — 57800 secondes d'électrophorèse à 1.61 V/cm —  $p_H$ : 7.07 — taux d'N de l'extrait: 4.30 mg/ml. B. Etat de *rigor* incomplètement développé (exp. no. 74 — 53200 secondes d'électrophorèse à 1.86 V/cm —  $p_H$  7.06 — taux d'N de l'extrait: 4.92 mg/ml)

Bibliographie p. 415.

santes  $\alpha$  et  $h$  apparaît toujours plus développé dans les extraits de muscles contracturés: 6.5% contre 4.3%.

Un commentaire particulier est nécessaire pour ce qui concerne la disparition des myosines  $\beta$ . L'absence de ces protéines dans les extraits de muscles contracturés est, comme nous l'avons dit, d'habitude complète. Il est pourtant possible d'en déceler de faibles quantités (au plus 6% au lieu de 18% dans les extraits de muscles normaux) lorsque le muscle a été contracturé par la strychnine ou, si au lieu d'attendre 18 à 24 heures avant que la *rigor mortis* ne soit complètement développée, on procède aux extractions 6 à 10 heures seulement après la mort de l'animal. Dans ce dernier cas, il est possible de trouver soit une plus grande quantité d'actomyosine, soit une certaine quantité de myosines  $\beta$  et il est certain qu'il existe une proportionnalité entre le degré de contracture développé et les modifications de la composition protidique des extraits. Dans la Fig. 1, nous avons reproduit les diagrammes d'une expérience typique: les extraits ont été préparés avec des muscles du même Lapin, les uns (muscles antérieurs des cuisses) fortement contracturés (A), les autres, au contraire, encore souples (B). Nous tenons pourtant à souligner que ce parallélisme entre les caractères macroscopiques des muscles et l'extractibilité de leurs protéines a été trouvé seulement dans ces cas particuliers d'un développement *incomplet* de la rigidité cadavérique, car même les muscles qui, 24 heures après la mort, gardent d'habitude un degré de souplesse presque normal (iléopsoas, les muscles de la ceinture abdominale) présentent des altérations protidiques à tous points de vue identiques à celles relevées sur les muscles fortement durcis par la contracture.

#### DISCUSSION

De ces observations se dégage ce fait important que les modifications des protéogrammes électrophorétiques observées sont identiques, qualitativement et quantitativement, *quel que soit le type de contracture envisagé*. C'est là un argument en faveur de la conception de DUBUISSON, selon laquelle *c'est l'état de raccourcissement du système contractile*, quelle qu'en soit la cause, qui se caractérise spécifiquement par les modifications décrites du protéinogramme: inextractibilité totale de la myosine  $\beta$  par KCl, apparition d'une protéine nouvelle: la contractine, et augmentation de la composante hétérogène sp. Et ce sont là des caractéristiques bien différentes de celles des protéogrammes de muscles *épuisés par stimulation*, mais *relâchés*, où l'on constate seulement la disparition de la myosine  $\alpha$  et une certaine diminution des myosines  $\beta$  (DUBUISSON). Ceci entraîne immédiatement cette conclusion que les modifications qui surviennent dans l'extractibilité des protéines du muscle contracté ou contracturé sont pour la plupart parfaitement réversibles, lors du relâchement musculaire, puisque si l'on épuise des muscles par des stimulations répétées, on ne peut en extraire ni la contractine, ni le matériel sp qui apparaît à chaque contraction; le seul vestige électrophorétique apparent est une certaine diminution de l'extractibilité des myosines  $\alpha$  et  $\beta$ .

ERDÖS a émis l'hypothèse que la diminution de l'extractibilité des myosines dans les muscles contracturés est due à un appauvrissement du muscle en ATP; cet auteur trouve, en effet, avec une régularité plus ou moins grande selon le type de contracture envisagé, une diminution de la teneur en ATP parallèle à l'inextractibilité des myosines observées. Mais celle-ci ne doit pas être la conséquence de celle-là, car les muscles contractés par une courte stimulation, comme ceux qu'a utilisés DUBUISSON, devraient

fournir beaucoup plus de myosines  $\beta$  qu'un muscle stimulé jusqu'à épuisement et qui a pratiquement épuisé ses réserves en ATP. Or, *c'est le contraire* que l'on observe. Qu'il y ait une relation entre la présence d'ATP et la solubilité des myosines  $\beta$  des muscles normaux ne fait cependant aucun doute: cette substance possède une action *accélérate* sur la dissolution de la myosine, vraisemblablement par son pouvoir de dissocier la myosine de l'actine; mais le cas des muscles contractés et des muscles fatigués ne peut s'intégrer dans une interprétation aussi simple.

Tout ceci indique que l'on est en présence de protéines qui peuvent, selon l'état fonctionnel du muscle, être plus ou moins fortement associées à des complexes insolubles; que les forces qui caractérisent ces liaisons sont plus ou moins solides et plus ou moins difficilement brisées par les solutions d'extraction utilisées. Comme ces processus, tels l'inextractibilité des myosines  $\beta$  et l'extractibilité de la contractine, pour ne citer que les deux faits principaux, sont essentiellement parallèles au degré de raccourcissement de la fibre musculaire, on comprend tout l'intérêt qui s'attache à l'étude de ces processus aussi réversibles que le sont le raccourcissement et le relâchement du muscle.

### RÉSUMÉ

Les modifications d'extractibilité des protéines musculaires des muscles contractés par stimulation et décrites par DUBUISSON se retrouvent identiques, qualitativement et quantitativement, quel que soit le type de contraction envisagé (contraction de LUNDSGAARD, *Rigor mortis*). C'est l'état de raccourcissement de la machine contractile qui conditionne ces modifications par l'établissement (cas des myosines) ou l'affaiblissement (cas de la contractine) de certaines forces de liaison.

### SUMMARY

The changes in extractability of muscle proteins derived from muscles contracted by stimulation, and as described by DUBUISSON, appear to be identical, both in qualitative and in quantitative respect, whatever the kind of contraction may be (LUNDSGAARD's contraction, *Rigor mortis*).

The state of shortening of the contractile apparatus determines these modifications by establishing (in case of myosins) or weakening (in case of contractine) certain binding forces.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die Änderungen in der Dehnbarkeit der Muskelproteine in durch Erregung kontrahierten Muskeln, die von DUBUISSON beschrieben werden, bleiben qualitativ und quantitativ dieselben, welches auch die Art der Kontraktion sein mag (LUNDSGAARD'sche Kontraktion, *Rigor mortis*). Es ist der verkürzte Zustand des Kontraktionsmechanismus, der diese Veränderung bedingt und zwar bei den Myosinen durch Herstellung, beim Kontrakthin durch Abschwächung von gewissen bindenden Kräften.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 4 (1948) 437.
- <sup>2</sup> M. DUBUISSON, *Bull. ac. roy. sci. Belg.*, 33 (1948) 769.
- <sup>3</sup> M. DUBUISSON, *Arch. intern. physiol.*, 61 (1948) 93.
- <sup>4</sup> M. DUBUISSON, *Les Protéines musculaires. Exposés annuels de Biochimie Médicale*, Série IX, Paris, Masson 1948.
- <sup>5</sup> J. JACOB, *Experientia*, 3 (1947) 241.
- <sup>6</sup> I. BANGA ET A. SZENT-GYÖRGYI, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1941-1942) 5.
- <sup>7</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 3 (1947) 372.
- <sup>8</sup> M. DUBUISSON ET J. JACOB, *Bull. soc. roy. sci. Liège*, 3 (1945) 133.
- <sup>9</sup> J. JACOB, *Biochem. J.*, 141 (1946) 808.

Reçu le 11 février 1949