

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA COMBINAISON ACTOMYOSINE — ATP

par

C. FABRY-HAMOIR

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

INTRODUCTION

BANGA ET SZENT-GYÖRGYI¹ ont montré que la myosine de WEBER-EDSALL² était un mélange d'actomyosine et de myosine proprement dite (10 à 20% d'actomyosine) et que l'on peut modifier très fortement les proportions relatives de ces deux protéines en faisant varier le temps d'extraction: après 20 minutes, on obtient de la myosine A très riche en myosine proprement dite; après 24 heures, de la myosine B, qui est pratiquement de l'actomyosine pure. Celle-ci résulte de la combinaison de la myosine et d'une protéine du stroma: l'actine, isolée par STRAUB³. L'actomyosine contiendrait, d'après cet auteur, 20% d'actine⁴.

L'existence d'interactions entre l'acide adénylpyrophosphorique (ATP) et l'actomyosine a été maintes fois établie: il est susceptible de diminuer la viscosité et la biréfringence d'orientation des solutions de cette protéine^{5, 6} en la scindant en actine et en myosine⁷, et de la superprécipiter. Par contre⁸, il ne modifie pas les propriétés physiques des solutions de myosine, ce qui n'exclut d'ailleurs pas qu'il puisse s'y combiner. Enfin il est hydrolysé par la myosine ainsi que par l'actomyosine en A.D.P. et H_3PO_4 ⁹⁻¹⁷.

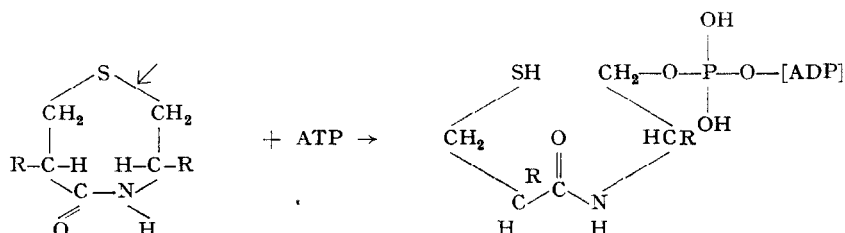
En ce qui concerne l'activité adénylpyrophosphatasique de la myosine — considérée isolément ou sous la forme d'actomyosine —, il n'est pas encore établi si cette propriété est celle de la molécule de myosine elle-même, ou celle d'un ferment qui y serait associé d'une façon si tenace qu'il n'a pas encore été possible de l'en séparer. Cette dernière hypothèse est cependant la plus vraisemblable; il serait difficile, s'il en était autrement, de comprendre que POLIS ET MEYERHOF¹⁸ aient pu, par précipitations aux sels de Lanthane, obtenir des myosines d'activité enzymatique trois fois plus grande que la préparation originale, et, d'autre part, d'admettre que 40 à 50% des protéines musculaires (c'est le taux de la myosine dans le muscle) soient constitués uniquement par un enzyme. D'ailleurs, la myosine possède encore d'autres activités fermentaires: FERDMANN¹⁹ lui reconnaît l'activité d'une désaminase et MENNE²⁰ a pu montrer que la myosine de WEBER-EDSALL agit comme l'apoferment d'un enzyme capable de transformer l'arginine et l'histidine en créatine. Cette complexité a amené SZENT-GYÖRGYI à considérer la myosine comme un squelette auquel seraient accrochées des enzymes-protéines qu'il appelle "protines"²¹.

D'autre part, il n'est pas certain que les diverses modifications physiques de l'actomyosine sous l'influence de l'ATP et son activité enzymatique puissent être rapportées à une seule cause, car s'il a été établi par BAILEY ET PERRY²² que le blocage des groupe-

ments -SH inhibe à la fois la formation d'actomyosine et l'activité enzymatique, MOMMAERTS⁷ a obtenu la chute de viscosité de solutions d'actomyosine dépourvues d'activité adénylpyrophosphatasique. En outre, les rapports myosine/ATP correspondant aux effets maxima sont très différents lorsqu'il s'agit de chute de biréfringence d'orientation (1500 g de myosine par mole d'ATP)⁶, de chute de viscosité (360 000 g de myosine par mole d'ATP)⁷, de saturation du ferment (500 g environ de myosine par mole d'ATP)¹⁷. On ne possède pas de données précises dans le cas de la superprécipitation.

Malgré toutes ces incertitudes, il ne peut faire de doute qu'il doit exister une liaison entre ATP et actomyosine. Les travaux de NEEDHAM et collaborateurs montrent, par l'utilisation de toute une série de substances de composition voisine de l'ATP, que cette réaction présente un haut degré de spécificité: la chute de biréfringence n'est provoquée que par l'inosinetriphosphate⁶. D'autre part, BUCHTHAL aurait observé, selon SZENT-GYÖRGYI²³, que le spectre d'adsorption dans l'ultraviolet du groupement nucléotide de l'ATP serait différent en présence d'actomyosine.

La nature exacte des forces qui interviennent reste toutefois mal connue. BAILEY ET PERRY suggèrent que cette association n'est pas due à des forces électrostatiques, mais montrent qu'il y intervient des groupements spécifiques, tels que les radicaux -SH de la myosine²². La possibilité d'une liaison de ce genre a d'ailleurs été proposée par BINKLEY²⁴. Selon cet auteur, l'ATP réagirait avec son ferment suivant le schéma:



La formation d'une semblable liaison ester, intéressant un groupement OH de l'ATP, doit nécessairement provoquer la libération d'une certaine quantité de base. *On pourrait donc, en principe, déterminer s'il se produit une liaison de ce type en suivant les variations de p_H qui résultent de la mise en présence de myosine ou d'actomyosine et l'ATP. Une technique de ce genre doit d'ailleurs permettre de déceler éventuellement d'autres liaisons ester pour autant qu'elles intéressent l'un ou l'autre groupe OH de l'ATP.*

Cette substance possède en effet trois groupements -OH de p_K 2.00 et un de p_K 6.8, tous quatre accessibles à l'expérience. Si seule la zone de p_H 6.00-8.00 peut être utilisée (car aux $p_H > 8.00$, il y aurait hydrolyse spontanée de l'ATP, et aux $p_H < 6.00$ la protéine n'est plus soluble), elle est suffisante pour permettre de déceler l'intervention de l'un quelconque de ces quatre groupements OH. Mais la mise en présence d'ATP et de myosine ou d'actomyosine entraîne l'hydrolyse enzymatique de l'ATP qui libère une fonction acide, de p_K 6.8. Comme la combinaison de l'ATP à l'actomyosine est un phénomène très rapide (la chute de biréfringence est instantanée, par exemple⁶), la formation d'une liaison ester devra décaler la courbe d'acidification tout au début de l'hydrolyse.

Tenant compte de ces considérations et des nécessités du problème, nous avons cherché à élaborer une technique permettant de mesurer, de façon aussi rapide que possible, les variations de p_H résultant de la mise en présence d'ATP et d'actomyosine.

Nous verrons qu'elle nous a permis de constater qu'il n'en résulte pas d'autres variations de p_H que celle attribuable au clivage enzymatique de l'ATP et que, par conséquent, la combinaison ATP — actomyosine ne semble pas dépendre d'une liaison ester, intéressant l'un quelconque des groupes $-OH$ de l'ATP.

TECHNIQUES ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Nos expériences se répartissent en deux groupes:

a. Nous avons d'abord cherché quelles étaient les variations de p_H accompagnant éventuellement les changements de biréfringence et de viscosité de l'actomyosine sous l'influence de l'ATP. Les concentrations relatives des deux réactifs sont celles à partir desquelles NEEDHAM et collaborateurs⁶ observent une variation maximum dans le cas de la myosine de WEBER-EDSALL (solution à 0.9% dans KCl 0.5 M, et concentration finale en ATP 0.004 M environ); dans ce cas, si la réaction n'est pas limitée à un équilibre, tout l'ATP réagit. Les variations observées étant dues à la scission de l'actomyosine en actine et en myosine, et la myosine de WEBER-EDSALL n'en contenant que 10 à 20%, tout l'ATP devra a fortiori réagir avec de l'actomyosine pratiquement pure.

b. Nous avons également suivi les variations de p_H lors de la superprécipitation de l'actomyosine, dans les conditions décrites par SZENT-GYÖRGYI⁸: suspension d'actomyosine dans KCl 0.12 M et concentration finale en ATP de 1%. La concentration en actomyosine est choisie en fonction de la quantité d'ATP, de façon à ce que l'hydrolyse enzymatique ne soit pas trop rapide et qu'éventuellement elle ne masque pas une modification préalable de p_H .

Afin d'assurer une stabilité suffisante du p_H , on est obligé de travailler en milieu tamponné. La concentration du tampon phosphatique utilisé est choisie de façon à amortir le moins possible les variations observables: elle est, dans le cas de l'actomyosine dissoute, de 0.02 M et dans celui de l'actomyosine précipitée, de 0.01 M, la superprécipitation n'ayant pas lieu à des concentrations supérieures en tampon phosphatique.

Toutes nos expériences sont faites à la température du laboratoire.

On prépare une solution (ou suspension) d'actomyosine et une solution d'ATP de concentration convenable en sels. On égalise ensuite leur p_H de façon précise, puis on les mélange l'une à l'autre très rapidement, sous une électrode de verre, et on mesure la variation de p_H produite.

L'actomyosine est préparée suivant la méthode habituelle de BANGA ET SZENT-GYÖRGYI¹. Elle est purifiée une fois par précipitation.

L'A.T.P. est préparé selon la méthode de LOHMANN²⁵ suivant NEEDHAM²⁶; une purification par redissolution dans l'eau acidulée (p_H 3-4) puis précipitation par l'alcool donne un produit pur, sans phosphate libre et dont le rapport du phosphore total au phosphore labile (7'P de LOHMANN) est 3 à 1. Le sel sodique est préparé selon BAILEY¹⁴.

On s'arrange pour que les solutions (ou suspension) des deux réactifs aient la même force ionique (concentration en KCl et en phosphates). On néglige cependant, dans ce calcul, la concentration en actomyosine et en ATP, ainsi que les variations résultant de l'effet Donnan, lors de la dialyse.

Si la concentration en KCl est 0.5 M, l'actomyosine est dialysée 48 heures à 0° C, dans des sacs en cellophane, contre une solution KCl 0.5 M et phosphates 0.02 M. La solution stock du sel sodique de l'ATP est diluée par le même volume d'une solution tampon KCl M et phosphates 0.04 M.

Si la concentration en KCl est 0.125 M, l'actomyosine est d'abord dialysée contre une solution KCl 0.5 M et phosphates 0.04 M, puis diluée 4 fois avec de l'eau distillée*. La solution stock du sel sodique de l'ATP est diluée par le même volume de tampon de dialyse, lui-même préalablement dilué deux fois.

* La concentration en protéine de la solution soumise à la dialyse est alors choisie en tenant compte de la dilution ultérieure.

Mesures de p_H : elles sont faites à l'électrode de verre du type MAC INNES, avec une électrode de référence au calomel, saturée en KCl. L'ensemble est placé dans une cage de Faraday. Nous avons utilisé l'électromètre à lampes décrit par DUBUISSON ET DEBOR²⁷, dont la stabilité permet d'atteindre une précision de 0.2 mV; la sensibilité est de 7.5 cm par mV. L'inertie de l'appareil a été mesurée par DUBUISSON²⁸: lors d'un brusque changement de p_H , il faut environ 4 secondes pour observer une variation correspondant à 95% de l'écart total entre les valeurs initiale et finale.

Appareillage: le mélange des deux solutions se fait à l'aide du dispositif schématisé dans la

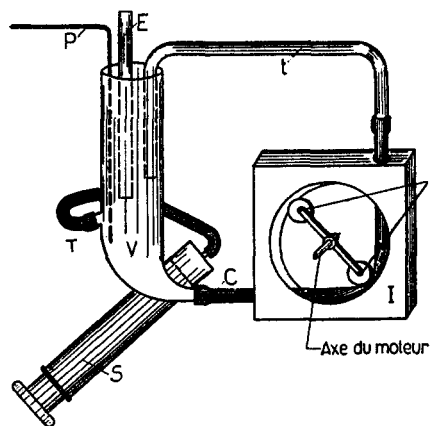


Fig. 1. Dispositif employé pour mélanger la solution d'ATP à la solution de myosine: V, vase où se fait le mélange; E, électrode de verre du type MAC INNES; P, pont de jonction saturé en KCl; C, tube en caoutchouc souple, écrasé par les deux roulements à billes R; I, support en matière isolante; S, seringue en verre servant à l'injection d'ATP.

Fig. 1. Le vase (V) contenant la solution protéinique (10 ml), est rattaché par sa partie inférieure à un tube de caoutchouc très souple (C), placé sur un support en matière isolante (I). Ce caoutchouc est écrasé périodiquement par deux roulements à billes (R) fixés à l'axe d'un moteur. La solution ainsi entraînée est ramenée dans la partie supérieure du vase par un tube en verre (t), dont la hauteur est réglable. La forme du vase a été choisie de façon à agiter uniformément toute la masse du liquide. Dans le récipient (V) plongent l'électrode de verre (E) et le pont de jonction en agar saturé de KCl (P). La solution d'ATP (10 ml) est introduite au moyen d'une seringue en verre (S) par la tubulure (T). Pour une vitesse de rotation convenable du moteur, l'homogénéisation du milieu ne demande que quelques secondes.

Afin d'éviter toute perturbation électrique, seuls le vase, le support (I) et la seringue sont placés dans la cage de Faraday. Le moteur et les roulements à billes sont mis à la terre. La seringue est commandée de l'extérieur par l'intermédiaire d'un poussoir en matière isolante. Les charges électrostatiques produites par le frottement des roulements à billes sur le caoutchouc sont supprimées en le recouvrant très soigneusement de talc avant chaque expérience. Les seules perturbations impossibles à éviter sont celles que provoquent les charges électrostatiques qui naissent du frottement des couches du liquide sur les parois et sur l'électrode au moment de l'injection. Elles durent en moyenne 15 secondes.

Nous sommes donc en possession d'un appareil qui nous permet, 15 secondes après la mise en présence des deux substances, de suivre l'évolution dans le temps de la concentration en H^+ avec une précision de 0.2 mV.

CALCUL DES VARIATIONS DE p_H ÉVENTUELLEMENT OBSERVABLES

On peut, en se basant sur les conditions expérimentales définies ci-dessus, calculer les modifications de p_H que la formation de liaisons ester entraînerait, en admettant que tout l'ATP de nos essais ait réagi.

Dans le cas où l'actomyosine est dissoute, la concentration en ATP utilisée est de $36 \cdot 10^{-4}$ M et le p_H des expériences compris entre 6.7 et 7.4. Au p_H 6.7, le groupement $-OH$ de l'ATP de p_K 6.8 est dissocié dans la proportion de 45%; sa combinaison avec la protéine libérerait donc $15 \cdot 10^{-4}$ mole de base par litre. Il y correspondrait, en milieu 0.02 M en tampon phosphatique, une alcalinisation de 0.12 unité p_H . Celle-ci serait évidemment plus élevée encore au p_H 7.4, ou si le groupement $-OH$ de p_K 2.0 intervenait.

Dans le cas de la superprécipitation de l'actomyosine, la concentration en ATP est de $13 \cdot 10^{-4}$ M. Un raisonnement analogue montre que dans l'éventualité la moins favorable ($-OH$ de p_K 6.8, expérience au p_H 6.9), on observerait une alcalinisation de 0.10 unité p_H .

Si, par contre, la réaction actomyosine -ATP est limitée par le nombre de groupes -SH de la protéine, et obéit donc au schéma de BINKLEY, la variation de p_H sera moindre. On calcule qu'elle reste pourtant mesurable. Les -SH conditionnant l'activité adénylpyrophosphatasique de la myosine évalués en cystéine correspondent, d'après SINGER ET BARRON²⁹, à 0.4% en poids de myosine*. Si la protéine est dissoute, la combinaison de ses -SH déterminerait, au p_H 7.3, un changement de p_H de 0.017 unité (-OH de p_K 6.8) ou de 0.025 unité (-OH de p_K 2.0). Dans le cas où elle est précipitée, la concentration en protéine étant plus faible, la variation ne serait que de 0.012 unité p_H pour l'OH de p_K 2.00.

RÉSULTATS

L'addition, à l'actomyosine, d'une solution tampon de même force ionique ne produit aucune variation de p_H . Si cette solution tampon contient de l'ATP, on observe l'ensemble des résultats suivants:

A. Actomyosine dissoute

Nos mesures sont effectuées aux p_H 7.35 et 6.7. Le détail des conditions expérimentales est donné dans le Tableau I. Nous avons contrôlé, dans chaque expérience, la diminution de biréfringence due à l'addition d'ATP. Les résultats sont représentés Fig. 2.

TABLEAU I

	KCl	Phosphates	p_H	Température	Quantité d'actomyosine	Stock dialysé	Concentration en ATP du mélange	Concentration en Mg^{++} du mélange
Tracé 1	0.5 M	0.02 M	7.31	22.5° C	85.5 mg	No. 1	?	—
Tracé 2	0.5 M	0.02 M	7.34	20.5° C	91 mg	No. 2	0.0035 M	—
Tracé 3	0.5 M	0.02 M	7.35	20.0° C	91 mg	No. 2†	0.0035 M	—
Tracé 4	0.5 M	0.02 M	6.72	20.0° C	114 mg	No. 3	0.0036 M	—
Tracé 5	0.5 M	0.02 M	6.68	21.5° C	85.75 mg	No. 4	0.0032 M	—
Tracé 6	0.5 M	0.02 M	6.66	21.0° C	85.75 mg	No. 4	0.0032 M	0.005 M

† Le stock d'actomyosine utilisé dans ce cas ayant été conservé plus longtemps en glacière avant l'expérience, il en est résulté une diminution de son activité adénylpyrophosphatasique.

* Comme l'actomyosine est constituée en majeure partie de myosine, on peut, en première approximation, ne pas tenir compte de la présence d'actine.

Bibliographie p. 453/454.

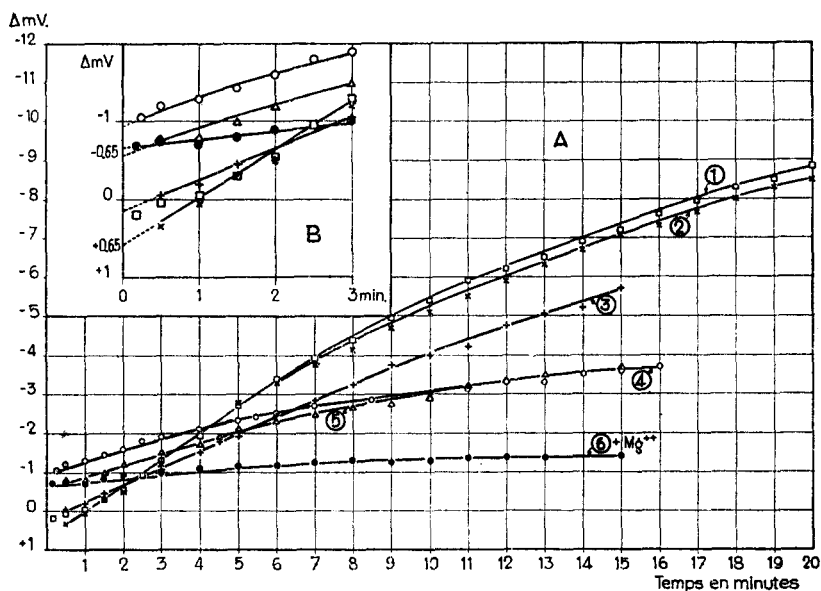


Fig. 2. Variation de pH (en mV) lors de l'addition d'ATP à l'actomyosine dissoute; les conditions expérimentales sont consignées dans le Tableau I.

B. Actomyosine superprécipitée

Le Tableau II et la Fig. 3 donnent les conditions expérimentales et les résultats obtenus (pH 7.5-7.6 et 6.9). Chaque expérience, comme nous l'avons contrôlé, donne très nettement lieu au phénomène de superprécipitation.

TABLEAU II

	KCl	Phos- phates	pH	Tempé- rature	Quantité d'actomyosine	Stock dialysé	Concentration en ATP du mélange
Tracé 7	0.12 M	0.01 M	7.41	20.5° C	28.3 mg	No. 5	0.0013 M
Tracé 8	0.125 M	0.01 M	7.57	23.5° C	38.7 mg	No. 6	0.0013 M
Tracé 9	0.125 M	0.01 M	7.59	23.5° C	19.35 mg	No. 6*	0.0013 M
Tracé 10	0.125 M	0.01 M	7.57	22.5° C	33.95 mg	No. 7	0.0012 M
Tracé 11	0.125 M	0.01 M	6.91	22.5° C	21.6 mg	No. 8	0.0013 M
Tracé 12	0.125 M	0.01 M	± 6.91	$\pm 22.5^\circ$ C	21.6 mg	No. 8	0.0013 M

* Même stock que pour le tracé No. 8, mais dilué une fois avec le tampon de dialyse.

Dans l'interprétation de ces résultats, il faut tenir compte de ce que :

a. l'activité adénylpyrophosphatase varie légèrement suivant le stock d'actomyosine;

b) le pouvoir tampon du milieu varie quelque peu d'une expérience à l'autre. Les solutions de protéine soumises à la dialyse sont toujours très concentrées: l'équilibre ionique n'est pas tout à fait établi après 48 heures et, de plus, ΔmV

l'effet Donnan est appréciable. La concentration en phosphates dépend donc de la concentration de la solution stock d'actomyosine. Ainsi s'expliquent les différences dans la variation totale de pH correspondant à l'hydrolyse complète du premier acide phosphorique.

DISCUSSION

Un premier examen de nos courbes indique immédiatement qu'il ne semble pas exister d'alcalinisation appréciable au moment du mélange. Cependant la variation pourrait être très faible et n'être décelable qu'après avoir déterminé la valeur exacte de l'erreur expérimentale au départ.

1. Tout d'abord, l'acidification observée correspond bien qualitativement et quantitativement à l'hydrolyse enzymatique du premier acide phosphorique de l'ATP.

a. Dans le cas de l'actomyosine précipitée, l'hydrolyse enzymatique suffisamment rapide permet de déterminer la variation totale de pH due à la libération d'un acide phosphorique. La courbe d'électrotitration de l'ATP (LOHMANN³⁰)* avant et après hydrolyse, permet de calculer la valeur théorique de cette variation dans nos expériences, en tenant compte de la concentration en ATP et du pouvoir tampon du milieu**. Il y a concordance avec la valeur expérimentale. Les valeurs calculée et expérimentale (Courbes 11 et 12, Fig. 3) sont, au pH 6.9, de 0.1 unité pH ; au pH 7.5, la valeur calculée est de 0.3 unité pH et la valeur expérimentale de 0.26 (moyenne des valeurs finales des courbes 7, 8, 9, 10, Fig. 3).

b. Le pH influence la *vitesse initiale* d'hydrolyse dans le sens prévu par les travaux enzymologiques de ENGELHARDT³¹ (Courbes 2 et 4, Courbes 10 et 11).

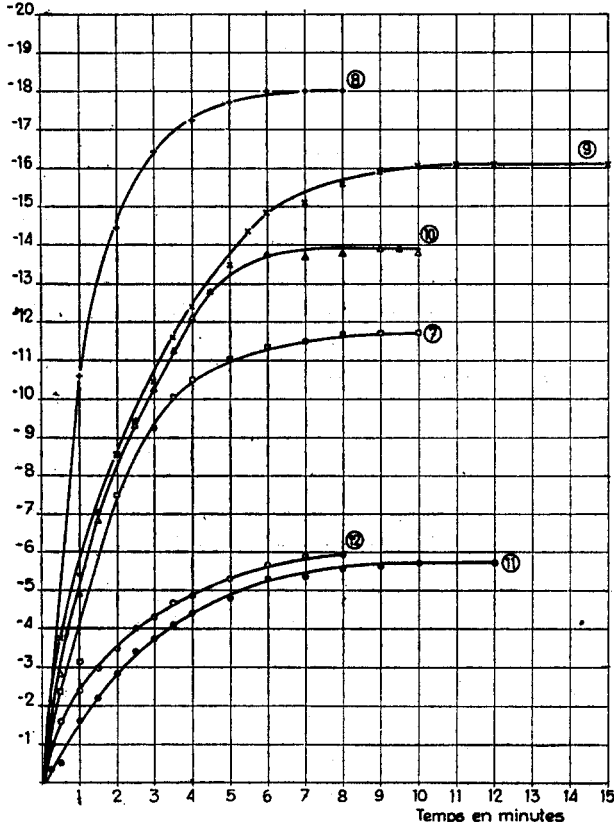


Fig. 3. Variation de pH (en mV) lors de l'addition d'ATP à l'actomyosine précipitée; les conditions expérimentales sont consignées dans le Tableau II.

* La différence entre les courbes d'électrotitration de l'ATP avant et après hydrolyse étant due à la libération de deux fonctions acides de pK 6.8, c'est évidemment à la moitié de cette valeur que correspond l'hydrolyse enzymatique.

** Le pouvoir tampon de l'actomyosine est négligeable.

c. Conformément aux résultats de MEHL ET SEXTON¹⁵, une augmentation de la force ionique du milieu diminue l'activité enzymatique. La comparaison des courbes 2 et 10, et des courbes 4 et 11, ne peut toutefois avoir qu'une signification qualitative, car la quantité d'ATP n'est pas la même dans ces différents cas, et nous ne sommes pas dans la zone de saturation de l'enzyme par son substrat*.

d. Les courbes 8 et 9 montrent que, si les conditions expérimentales restent rigoureusement les mêmes, une concentration deux fois moindre en ferment (protéine) réduit de moitié la vitesse initiale d'hydrolyse.

e. Si l'on ajoute au système un inhibiteur de la réaction enzymatique: MgCl_2 0.005 M (BANGA ET SZENT-GYÖRGYI¹²) (courbe 6), l'acidification est réduite de 80 à 85 %, par rapport à celle que l'on observe dans les mêmes conditions, sans magnésium (courbe 5).

2. La concentration minima en liaisons ester décelables est limitée par l'erreur expérimentale au départ. Celle-ci est nettement supérieure à la sensibilité de l'appareil (0.2 mV), car, malgré les plus grands soins, il est impossible de réaliser l'égalité parfaite des p_H des deux solutions initiales.

L'actomyosine est tout d'abord placée dans l'appareil et agitée environ 20 minutes, jusqu'à ce que son p_H soit parfaitement stable. On mesure ensuite le p_H de la solution d'ATP et on l'amène à la valeur déterminée pour la protéine. On replace ensuite l'actomyosine sous l'électrode. Généralement, par suite, par exemple, d'une légère dénaturation (on travaille à 20° C) ou de variations de la teneur en CO_2 , son p_H a légèrement varié dans une mesure qu'il est impossible de prévoir. C'est cette nouvelle valeur qui sert de mesure au temps zéro.

Le plus grand écart que nous ayons toléré entre les deux réactifs est de 0.5 mV (soit moins de 0.001 unité p_H); il n'est souvent que de 0.3 mV. De nombreux témoins effectués à partir de solutions d'actomyosine et de tampon exempt d'ATP nous ont donné des valeurs qui se répartissent également de part et d'autre du potentiel de la solution d'actomyosine, dans une zone de ± 0.5 mV.

L'extrapolation au temps zéro des courbes de la Fig. 2** donne des valeurs initiales variant de -0.65 à +0.65 mV (si l'on exclut la courbe 4, aberrante). Elles se répartissent donc pratiquement dans la zone d'erreur expérimentale. Leur moyenne est de -0.05 mV. Ceci montre que la valeur initiale moyenne coïncide pratiquement avec le p_H de la solution d'actomyosine, pris comme mesure au temps zéro.

La formation de liaison ester à partir des -SH de la myosine selon BINKLEY entraînerait une variation de p_H de 0.017 unité (1 mV), deux fois plus élevée que l'erreur expérimentale au départ, et 20 fois plus élevée que l'erreur moyenne. Nous pouvons donc exclure cette hypothèse. Mais, parmi les groupements susceptibles de participer à une liaison ester, les -SH réactionnels sont le moins représentés: exprimés en cystéine, ils équivalent à 0.4 % en poids de myosine²⁹, la quantité totale de cystéine étant de 1.2 %²⁹, alors que les groupes hydroxyles sont beaucoup plus nombreux: 100 g de myosine contiennent 5.17 g de thréonine³², 4.37 g de sérine³³, 3.38 g de tyrosine³³.

Nous pouvons donc conclure que la réaction actomyosine + ATP n'entraîne pas la formation de liaisons ester aux dépens, d'une part, des groupements -SH (suivant le schéma

* Ces conditions sont incompatibles avec celles pour lesquelles on observe le maximum de chute de biréfringence, ou la superprécipitation.

** Les courbes de la Fig. 3 ne peuvent être extrapolées avec une précision suffisante par suite de la trop grande rapidité de l'hydrolyse enzymatique.

de BINKLEY) ou de groupements hydroxyles de la protéine et, d'autre part, des groupements -OH acides de l'ATP, qu'ils soient de p_K 2.0 ou de p_K 6.8. La nature des forces déterminant la combinaison actomyosine -ATP reste donc encore à trouver.

Qu'il nous soit permis d'exprimer ici notre profonde gratitude au Professeur DUBUISSON qui sut, avec tant de bienveillance, nous encourager au cours de ce travail.

RÉSUMÉ

L'étude des variations de p_H , lors de la mise en présence d'actomyosine et d'ATP, réalisée au moyen d'une technique spécialement sensible, montre que la combinaison a lieu sans modification de p_H autre que l'acidification due à l'hydrolyse enzymatique. Ces résultats excluent la possibilité de formation de liaisons ester aux dépens de groupements -OH acides de l'ATP et de groupements polaires de l'actomyosine, particulièrement de ses groupes -SH comme l'avait suggéré BINKLEY.

SUMMARY

The p_H variations occurring when actomyosin and ATP are mixed together are determined with a very sensitive method. There does not occur any p_H change, except the acidification due to the enzymatic hydrolysis. We can therefore conclude that the reaction actomyosin + ATP is not depending on the formation of ester bounds between the -OH acid groups of ATP and polar groups of actomyosin, especially of its -SH groups as suggested by BINKLEY.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Änderungen die das p_H erfährt, wenn Aktomyosin und ATP zusammen gebracht werden, wurden mit Hilfe einer besonders empfindlichen Arbeitstechnik untersucht. Mit Ausnahme der Säurebildung durch enzymatische Hydrolyse konnte keine Änderung des p_H festgestellt werden. Diese Ergebnisse schliessen die Bildung von Esterbindungen zwischen den sauren OH-Gruppen des ATP und den polaren Gruppen des Aktomyosins, insbesondere dessen SH-Gruppen (wie BINKLEY vorschlug) aus.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ I. BANGA AND A. SZENT-GYÖRGI, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 1 (1941-1942) 5.
- ² J. P. GREENSTEIN AND J. T. EDSALL, *J. Biol. Chem.*, 123 (1940) 397.
- ³ F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3.
- ⁴ F. B. STRAUB, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 23.
- ⁵ J. NEEDHAM, S. S. SHEN, D. M. NEEDHAM, AND A. S. C. LAUWRENCE, *Nature*, 147 (1941) 766.
- ⁶ M. DAINTY, A. KLEINZELLER, A. S. C. LAUWRENCE, M. MIALL, J. NEEDHAM, D. NEEDHAM, AND S. S. SHEN, *J. Gen. Physiol.*, 27 (1944) 355.
- ⁷ W. F. MOMMAERTS, *J. Gen. Physiol.*, 31 (1948) 361.
- ⁸ A. SZENT-GYÖRGI, *Chemistry of muscular contraction*, Academic Press, New York (1947) p. 30-36.
- ⁹ W. A. ENGELHARDT AND M. N. LJUBIMOVA, *Nature*, 144 (1939) 668.
- ¹⁰ W. A. ENGELHARDT ET M. N. LJUBIMOVA, *Biochimica*, 7 (1942) 205.
- ¹¹ I. BANGA, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 64.
- ¹² I. BANGA AND A. SZENT-GYÖRGI, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 72.
- ¹³ D. M. NEEDHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 113.
- ¹⁴ K. BAILEY, *Biochem. J.*, 36 (1942) 121.
- ¹⁵ J. W. MEHL AND E. SEXTON, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 52 (1943) 38.
- ¹⁶ H. O. SINGHER AND A. MEISTER, *J. Biol. Chem.*, 159 (1945) 491.
- ¹⁷ W. F. MOMMAERTS AND K. SERAIDARIAN, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1947) 401.
- ¹⁸ B. D. POLIS AND O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 339.
- ¹⁹ FERDMANN, *Ukrain. Biochem. J.*, 18 (1946) 110.
- ²⁰ F. MENNE, *Z. physiol. Chem.*, 279 (1943) 105.
- ²¹ I. BANGA, F. GUBA, AND A. SZENT-GYÖRGI, *Nature*, 139 (1947) 194.
- ²² K. BAILEY AND S. V. PERRY, *Biochim. Biophys. Acta*, 1 (1947) 506.

- ²³ F. BUCHTHAL, cité par A. SZENT-GYÖRGYI, *Nature of life*, Academic Press, New-York (1948), p. 82.
- ²⁴ F. BINKLEY, *Science*, 102 (1945) 477.
- ²⁵ K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 233 (1931) 460.
- ²⁶ D. M. NEEDHAM, *Biochem. J.*, 36 (1942) 113.
- ²⁷ M. DUBUISSON ET A. DEBOT, *Arch. intern. physiol.*, 50 (1940) 54.
- ²⁸ M. DUBUISSON, *J. Physiol.*, 94 (1939) 461.
- ²⁹ T. P. SINGER AND E. S. G. BARRON, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 56 (1944) 120.
- ³⁰ K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 254 (1932) 381.
- ³¹ W. A. ENGELHARDT, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 147.
- ³² M. W. REES, *Biochem. J.*, 40 (1946) 632.
- ³³ K. BAILEY, *Biochem. J.*, 21 (1937) 1406.

Reçu le 3 février 1949