

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DE LA CONTRACTURE DE DÉCONGÉLATION

par

P. CREPAX ET A. HÉRION

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

HISTORIQUE

Les premières observations concernant l'action des très basses températures sur les muscles remontent au milieu du siècle dernier: E. DU BOIS-RAYMOND¹ et KÜHNE² étudièrent, avec des résultats d'ailleurs en partie contradictoires, les effets de la congélation sur l'excitabilité du muscle. HERMANN³ reprit plus tard ces expériences et observa des faits qui avaient échappé aux auteurs qui l'avaient précédé: "Jeder Muskel, welcher durch und durch völlig hart gefroren war, wobei das Aussehen weiss und trübe wird, verfällt nach dem Auftauen einer beschleunigten Erstarrung. Der aufgetaute, noch nicht erstarrte Muskel besitzt bereits ein vom gewöhnlichen verschiedenes Aussehen; er ist eigentümlich glasig durchscheinend. Die Starre unterscheidet sich von der gewöhnlichen durch eine ganz ungemein hochgradige Verkürzung und Verdickung und durch sehr reichliches Austreten eines stark sauren Serums; der Muskel schwimmt beinahe in seinem Saft" (*l.c.*³, p. 189).

Dans cette description de HERMANN, les éléments fondamentaux de ce phénomène, que nous appellerons *contracture de décongélation*, sont tous cités; des recherches ultérieures en ont seulement mieux précisé certains aspects.

FISCHER ET JENSEN^{4, 5, 6} trouvent que l'expulsion d'eau que l'on observe s'accompagne d'une diminution de l'eau libre du tissu par rapport à l'eau d'imbibition. BOTTAZZI⁷, en se basant sur les résultats de FLETCHER⁸ et de FORSTER ET MOYLE⁹, suggère que la formation d'acide lactique serait responsable d'un changement d'état des colloïdes tissulaires qui entraînerait cet exit d'eau.

BOTTAZZI, qui analyse d'une façon extrêmement complète* l'action de la température sur le muscle, précise ultérieurement les conditions du phénomène: tous les muscles striés d'animaux poecilothermes et homeothermes, ainsi que le myocarde des mêmes animaux, présentent la contracture de décongélation, à condition qu'ils soient vivants et excitables au moment de la congélation: les muscles morts ne donnent pas la contracture. Les muscles lisses ne la donnent jamais — la décongélation s'accompagne, au contraire, dans ce cas, d'un très fort relâchement — et la singularité de ce fait, remarque BOTTAZZI, est d'autant plus grande que ces muscles présentent tous les autres phénomènes muscu-

* Une bibliographie complète des travaux de cet auteur et de ses nombreux collaborateurs serait bien difficile à recueillir. Les articles dont on trouvera les indications aux références 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 et 18 contiennent les contributions les plus importantes au sujet qui nous occupe.

lares produits par la température (voir les différentes phases de contractures dues au chaud et au froid) en conditions rigoureusement identiques*.

Nous terminerons ce bref aperçu historique en soulignant encore les travaux de BRUNOW²¹ et de HEUBEL²². MANICK²³ s'est limité à l'étude des processus d'excitation produits sur le muscle par l'immersion dans l'air liquide.

INTRODUCTION

Les recherches sur les protéines musculaires qui, depuis 1943, ont été poursuivies dans ce laboratoire, ont conduit, à plusieurs reprises, à soumettre les muscles à l'action des basses températures: le refroidissement assure un ralentissement important des processus enzymatiques et représente, en fait, une phase utile au cours des manipulations qui précèdent l'extraction des tissus. Nous résumerons ici les faits les plus importants acquis dans ce domaine (voir DUBUISSON^{24, 25}).

Un muscle placé dans une enceinte suffisamment froide pour entraîner sa congélation, puis décongelé par abandon pendant quelque temps à la température du laboratoire, fournit un extrait protidique absolument identique à celui d'un muscle normal, au repos, extrait sans congélation préalable.

Cela démontre que la contracture de décongélation ne se traduit pas par des modifications d'extractibilité des protéines musculaires. Or, tous les autres types de contracture étudiés jusqu'ici fournissent, au contraire, des protéinogrammes tout à fait différents (contracture monobromacétique, *rigor mortis*, tétanos strychnique, CREPAX, JACOB ET SELDESLACHTS²⁶). La contracture de décongélation, dans ses conséquences protéiniques, serait donc une contracture d'un type particulier.

Or, récemment, SZENT-GYÖRGYI²⁷ a utilisé la contracture de décongélation pour vérifier certaines relations thermodynamiques établies tout d'abord par VARGA²⁸ sur des fils d'actomyosine. Voici comment SZENT-GYÖRGYI s'exprime au sujet de ce type de contracture:

"Relaxed state is the high energy metastable state, the contracted state the low energy stable state, contraction being a spontaneous process . . . Contraction should occur spontaneously wherever the ATP-actomyosin system is present in a suitable ionic milieu . . . In the intact resting muscle, however, we find ATP in an active form, linked to actomyosin, but still the system does not contract, contraction being inhibited by some unknown mechanism. If we want the muscle to go over into the contracted state, we have to abolish this inhibition. In the intact muscle, this can be achieved by an electric shock or a "wave of excitation". These actions are fleeting and depend of subtle qualities of muscle, of "excitability", which makes them unfit for our present purpose. In order to study equilibria of energy relations, the inhibition had to be removed permanently and uniformly throughout the whole mass of the muscle, and the whole contractile matter made to go over into and remain in the contracted state. Poisons like caffeine, quinine, moniodoacetic acid or chloroform known to produce contracture were found unsatisfactory because the tension developed is very small, showing that *only a small fraction* of the contractile substance is at any time in the contracted state. A satisfactory method of abolishing inhibitions is freezing with subsequent thawing. On thawing the frozen muscle, if containing the physiological amounts of ATP, contracts rapidly and develops maximal tension" (Ref. 27, pages 142 et 143).

Il est évident qu'il existe une certaine opposition entre les considérations que nous avons développées plus haut et la représentation que se fait SZENT-GYÖRGYI de la

* L'influence de la contracture de décongélation sur les constituants protéiniques du muscle a été envisagée par DEUTICKE¹⁹ et HENSLEY²⁰, qui trouvent, le premier, une diminution de la quantité des protéines extractibles, le second, une solubilisation de ces constituants, parfois accrue dans la zone acide du pH.

contracture de décongélation. Pour n'envisager qu'un aspect de la question, on peut par exemple se demander pourquoi, dans le cas des contractures produites par les poisons contracturants — contractures qui n'affecteraient "qu'une petite fraction* seulement de la substance contractile" — il existe des changements d'extractibilité des protéines, et pourquoi au contraire dans la contracture de décongélation où la totalité de la substance contractile entrerait en jeu, il n'y a pas de changement d'extractibilité des mêmes protéines?

Étant donné la position du problème telle qu'elle résulte de l'exposé que nous venons d'en faire, il nous a paru pertinent de reprendre l'étude de cette contracture de décongélation en envisageant certains de ses aspects: a. le métabolisme de l'ATP; b. l'extractibilité qualitative (recherches électrophorétiques) et quantitative (estimation des protéines totales) des protéines.

TECHNIQUE

Nos expériences ont porté sur les muscles de Lapin. Les observations concernant quelques aspects mécaniques de la contracture de décongélation ont été effectuées sur des muscles à fibres parallèles (psaos, grand dorsal).

La congélation du tissu est obtenue soit par simple séjour dans une enceinte froide (-20°C), soit par immersion dans l'air liquide: dans les deux cas, on a eu soin, avant la congélation, d'affaiblir considérablement — voire abolir — l'excitabilité du muscle, afin d'amoindrir les stimulations apportées par le froid. Dans ce but, l'animal aussitôt tué séjourne *trois heures* à une température de 2°C ; les muscles prélevés à ce moment se révèlent absolument inexcitables par stimulation électrique.

La pulpe musculaire, finement hâchée (machine à viande ou microtome automatique à congélation) est extraite pendant dix minutes avec 2 volumes de solution de WEBER-EDSALL (KCl 0.6 M ; Na_2CO_3 0.04 M). Pour obtenir à la centrifugation (10 minutes à 10 000 tours) une séparation satisfaisante du résidu insoluble, il faut parfois, à cause de la viscosité du produit d'extraction, avoir recours à une dilution ultérieure. Dans tous les cas d'expériences effectuées en vue d'une appréciation quantitative des protéines extractibles, cette dilution doit être identique. Nous avons donc ajouté systématiquement, avant centrifugation, 5 volumes de la solution d'extraction, ce qui assure une séparation satisfaisante, quelle que soit la viscosité du produit.

Les extraits destinés à l'analyse électrophorétique sont dialysés, en tubes de cellophane, pendant 48 heures, à 2°C , contre une solution de composition suivante: Na_2HPO_4 0.032 M ; NaH_2PO_4 0.004 M ; NaCl 0.25 M (pH 7.1, μ 0.35). La dialyse ne s'accompagne, en aucun cas, de la formation d'un précipité appréciable. Après centrifugation, les extraits sont analysés au moyen d'un appareillage du type TISELIUS-LONGSWORTH, dont les caractéristiques ont été décrites ailleurs^{30, 31}.

La détermination quantitative des protéines extractibles a été effectuée en dosant, au micro-Kjeldahl, la quantité d'N contenu dans 1 ml d'extrait (dialysé pendant 48 heures).

Pour nos déterminations d'ATP, nous avons essayé d'employer la méthode de BORBIRO ET SZENT-GYÖRGYI³² (estimation de la coloration jaune de l'acide phosphomolybdique dans l'alcool isobutylique). Nous avons dû l'abandonner, les contrôles ne nous ayant pas donné satisfaction. En effet, si une quantité connue d'ATP est ajoutée à un extrait musculaire trichloracétique dont on connaît la teneur en P libre et en P total, le dosage du mélange ne fournit des résultats conformes aux prévisions théoriques que si l'on utilise la méthode de LOHMANN³³-ALLEN³⁴ (voir Tableau I). Une recherche systématique du facteur perturbateur dans la méthode de BORBIRO ET SZENT-GYÖRGYI nous permet de croire que ces erreurs sont dues au fait que l'hydrolyse en milieu acide a lieu en présence de molybdate d'ammonium.

La méthode que nous avons finalement adoptée est la suivante:

Les morceaux de muscles (de poids variant entre 0.7 et 1.2 g) sont broyés au mortier dans 25 ml d'acide trichloracétique à 10%. Le mortier est préalablement réfrigéré entre -20 et -30°C ; l'acide trichloracétique se congèle et le broyage est très aisé. Après la décongélation de l'acide, on centrifuge et le liquide surnageant sert aux dosages de l'ATP. On détermine le P dans les échantillons avant et après hydrolyse en présence d' HCl 1 N (1 ml solution trichloracétique + 1 ml HCl 1.8 à 2 N) par la méthode d'ALLEN³⁴ dérivée de la méthode de FISKE ET SUBBAROW. Chaque échantillon est soumis

* Les recherches myographiques de GODEAUX²⁹ confirment, sur ce point, les observations de SZENT-GYÖRGYI: le raccourcissement qui se produit par suite de la décongélation est considérablement plus grand que celui que l'on observe dans n'importe quel type de contracture ou dans la contraction tétanique.

TABEAU I
DÉTERMINATION D'UNE QUANTITÉ CONNUE D'ATP AJOUTÉE À UN EXTRAIT
MUSCULAIRE TRICHLORACÉTIQUE (EN γ DE P)

	P libre	P total (libre + P _{7'})		P _{7'} (ATP)	
		exp.	théor.	exp.	théor.
a. Méthode de LOHMANN - ALLEN					
A. ATP 1 ml	2	16	—	14	
B. M 2 ml	6	14	—	8	
C. M 2 ml + ATP 1 ml	8	31	16 + 14 = 30	23	14 + 8 = 22
A. ATP 0.5 ml	2	9.5	—	7.5	—
B. M 2 ml	55	58	—	3	
C. M 2 ml + ATP 0.5 ml	57.5	66.5	58 + 9.5 = 67.5	9	7.5 + 3 = 10.5
b. Méthode de BORBIRO - SZENT-GYÖRGYI					
A. ATP 0.5 ml	0.75*	8*	—	7.25*	—
B. M 1 ml	5.5	14.25	—	8.75	
C. M 1 ml + ATP 0.5 ml	6.5	45	14.25 + 8 = 22.25	38.5	8.75 + 7.25 = 16
A. ATP 0.3 ml	0.45*	4.8*	—	4.35*	—
B. M 1 ml	6.75	10.25	—	3.5	—
C. M 1 ml + ATP 0.3 ml	7.5	31	10.25 + 4.8 = 15.05	23.5	3.5 + 4.35 = 7.85

M = extrait musculaire trichloracétique.

P_{7'} = P hydrolysé après 7 minutes.

* = déterminé par la méthode de LOHMANN-ALLEN.

à deux hydrolyses, l'une de 7 minutes, l'autre de 15 minutes. La première correspond à l'hydrolyse complète des 2 P labiles de l'ATP, la seconde permet de tenir compte de l'hydrolyse lente de substances telles que les hexoses mono- et di-phosphates. Les résultats, en ce qui concerne l'ATP peuvent être empiriquement corrigés en soustrayant du P hydrolysable en 7' le P hydrolysé entre 7 et 15 minutes. Le phosphagène, hydrolysé rapidement en présence de molybdate NH₃, n'interfère pas et est dosé comme phosphore libre. Nos résultats sont exprimés en mg ATP/g muscle.

RÉSULTATS

1. ATP et contracture de décongélation

La contracture de décongélation: a, se produit seulement si le muscle contient une assez grande quantité d'ATP et b, entraîne une hydrolyse totale de l'ATP présent dans le muscle.

a. La quantité d'ATP nécessaire, chez le Lapin, à l'établissement de la contracture est de l'ordre de 1 mg - 1.5 mg par gramme de muscle. Des muscles appauvris en ATP,

Bibliographie p. 65.

par suite d'un séjour à la température ordinaire avant la congélation, ne présentent une contracture lors de la décongélation que si les quantités d'ATP encore présentes sont de l'ordre de grandeur indiqué. Et ceci explique, d'une manière satisfaisante, certains faits connus depuis longtemps: les muscles lisses, d'après BOTTAZZI¹⁵ ne donnent pas la contracture de décongélation; or, d'après nos déterminations, qui ont porté sur l'utérus de Lapine (muscle également employé par BOTTAZZI dans une partie de ses recherches), le taux en ATP de ce tissu est très faible: de l'ordre de 0.5 mg par gramme; cette quantité d'ATP serait insuffisante pour assurer la contracture de décongélation.

BOTTAZZI¹⁵ observe aussi que la contracture de décongélation du myocarde se produit seulement si le tissu est congelé très peu de temps après la mort: l'intervalle doit être beaucoup plus petit que dans le cas des muscles squelettiques. Or: α . le taux en ATP du myocarde est beaucoup plus faible que celui du muscle squelettique (50% environ chez le Lapin, d'après nos déterminations); β . la chute du taux en ATP qui se produit après la mort de l'animal est indépendante de la valeur initiale et est également rapide quel que soit le niveau de départ (BORBIRO ET SZENT-GYÖRGYI³²). On conçoit ainsi que le comportement particulier du myocarde soit en relation avec la faible teneur en ATP de ce tissu.

Les muscles contracturés au monobromacétate présentent, à ce point de vue, un comportement un peu particulier: des muscles qui contiennent encore, après la contracture de LUNDSGAARD, des quantités d'ATP de l'ordre de 2-2.5 mg, ne donnent cependant pas la contracture de décongélation.

TABLEAU II
MODIFICATION DU TAUX EN ATP (mg/g DE MUSCLE) AU COURS
DE LA CONTRACTURE DE DÉCONGÉLATION

Muscle	Temps en minutes						
	0	30*	60	120	240	360	480
congelé	4.37	0.54	0	0			
congelé	4.24	1.55	0	—			
congelé	4.36	0	0	—			
congelé	3.91	1.45	0.65	—			
congelé	3.92	1.25	0.21	0			
congelé	5.22	1.7	0				
congelé	4.4	0	0				
normal	2.74	2.65	2.87	1.95	0.77	0.67	0.55
normal	3.84	3.80	3.54	2.70	1.20	0.88	0.65

* A ce moment, en employant des morceaux de muscles de dimensions moyennes (1.5 cm d'épaisseur environ), se produit la décongélation.

b. Dans le Tableau II, nous avons reproduit les résultats d'une série de déterminations qui montrent l'allure de la chute du taux en ATP dans un muscle normal non congelé et dans des muscles congelés.

Bibliographie p. 65.

On voit que la contracture de décongélation s'accompagne d'une hydrolyse très rapide et pratiquement totale de tout l'ATP présent dans le muscle. Trente minutes après la décongélation, cette hydrolyse est entièrement accomplie dans tous les muscles et dans toutes les parties d'un même muscle; mais au moment même de la décongélation, le comportement n'est pas aussi uniforme. On a trouvé, par exemple, au moment de la décongélation, dans trois morceaux différents d'un même muscle contenant initialement 4.64 mg d'ATP, des taux de 3.03, de 0.35 et de 0 mg d'ATP par g de muscle. Trente minutes après, l'ATP avait entièrement disparu partout. Cette différente répartition de l'ATP dans un même muscle rend compte de l'inconstance des résultats que l'on obtient (voir Tableau II) en examinant des muscles différents au même moment. Ces faits s'expliquent aisément. La décongélation du tissu est un processus assez lent qui ne se produit d'ailleurs pas simultanément dans toutes les régions du muscle choisi, si les dimensions de celui-ci ne sont pas minimes. En effet, il est normal d'observer, au cours des premières phases de décongélation, que les muscles s'incurvent considérablement, ce qui ne peut tenir qu'à une inégale progression de la décongélation dans les diverses parties du tissu et à des tensions différentes développées par la contracture qui l'accompagne.

BORBIRO ET SZENT-GYÖRGYI³³ ont signalé, et nous avons pu confirmer ce fait, que le taux en ATP des divers muscles de Lapin est en rapport avec leur situation plus ou moins superficielle. Cette différente répartition physiologique de l'ATP ne joue sûrement qu'un rôle accessoire dans les phénomènes que nous venons d'envisager. L'ordre de grandeur de ces différences n'est pas le même: dans le cas des muscles du dos du Lapin (ceux que nous avons le plus souvent employés au cours de nos observations sur les variations du taux en ATP dépendant de la contracture de décongélation), l'on peut trouver par exemple, comme différence maximum, dans les parties profondes, un taux de 3.8 mg contre 2.7 mg dans les parties superficielles.

2. Etude électrophorétique des extraits protidiques de muscles ayant subi la décongélation

Le protéinogramme électrophorétique reproduit dans la Fig. 2 correspond à un extrait musculaire obtenu dans les conditions suivantes: congélation lente et graduelle du tissu, hâchage au microtome automatique à congélation, extraction de la pulpe avec 2 volumes de solution de WEBER-EDSALL pendant dix minutes.

Ses caractères qualitatifs ne diffèrent pas notablement de ceux que présentent des extraits obtenus dans les mêmes conditions à partir d'un muscle non congelé, hâché au moulin à viande (Fig. 1).

Il en est autrement au point de vue quantitatif (voir Tableau III). La quantité de protéines extractibles que fournit un muscle lentement congelé, et ensuite hâché au microtome à congélation, est plus élevée que celle fournie par un muscle normal hâché au moulin à viande. Ce résultat est probablement lié au fait que l'accessibilité des protéines est meilleure dans le premier cas (voir DUBUSSION³⁵).

Lorsque l'extraction a lieu immédiatement, sans décongélation préalable, l'hydrolyse de l'ATP ne se produit pratiquement pas: l'on passe, par exemple, de 5.0 mg d'ATP à 4.6 mg au bout d'une extraction de dix minutes. La chute du taux en ATP, en prolongeant ultérieurement l'extraction, montre par contre une allure tout à fait comparable à celle que l'on observe au cours d'une extraction de longue durée d'un muscle normal non congelé. La décongélation ne manifeste donc pas, dans ce cas particulier, ses effets habituels sur l'ATP du tissu. Tout se passe comme s'il n'y avait pas de contracture de décongélation lorsque celle-ci s'effectue au contact du liquide d'extraction qui doit, assez rapidement, altérer l'intégrité des fibres musculaires.

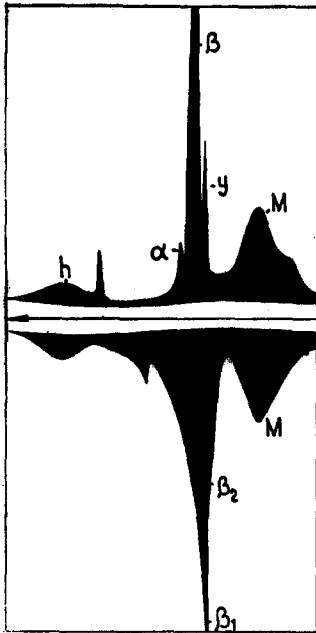


Fig. 1. Muscle normal, *non congelé*, hâché au moulin à viande; extraction de 10 minutes avec 2 volumes de solution de WEBER-EDSALL (exp. no 284: 1265 minutes d'électrophorèse à 2.0 V/cm; PH 7.1 - μ 0.35)

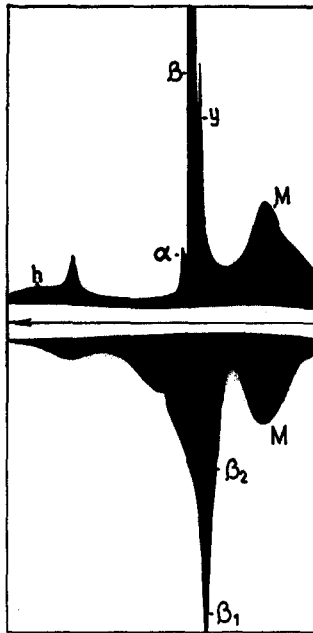


Fig. 2. Muscle lentement *congelé*, hâché au microtome à congélation; extraction dans les conditions indiquées dans la légende de la Fig. 1 (exp. no 283: 1685 minutes à 1.73 V/cm; PH 7.1 - μ 0.35)

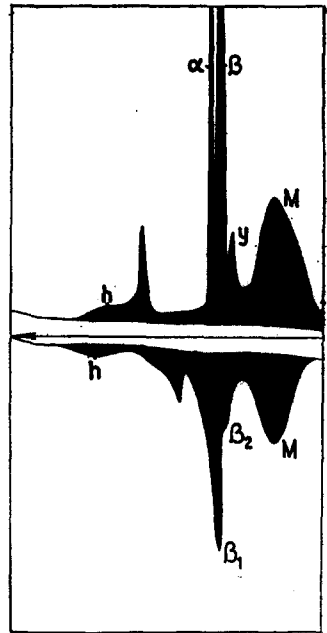


Fig. 3. Muscle lentement *congelé*, puis porté à la température ordinaire où on attend que la décongélation ait lieu (30 minutes). On recongèle et on effectue alors l'extraction dans les conditions indiquées dans la légende de la Fig. 2. ATP = 0 (exp. no 311: 1017 minutes d'électrophorèse à 1.84 V/cm; PH 7.1 - μ 0.35)

Un muscle congelé par immersion dans l'air liquide fournit des extraits un peu moins riches en protéines (surtout en myosine β) que le muscle témoin lentement congelé et traité de la même façon (hâchage au microtome) même s'il a préalablement séjourné en chambre froide pendant trois heures, temps au bout duquel toute stimulation électrique s'avère inefficace. Pour des séjours moins longs en chambre froide, l'action brusque du froid a pour effet de stimuler asynchroniquement les fibres du muscle et de conduire à l'obtention de protéinogrammes caractéristiques de *fatigue*.

Si on laisse dégeler le tissu et si l'on prépare des extraits avec des morceaux prélevés à des intervalles de temps variables après la décongélation, on observe les faits suivants:

Les produits d'extraction que l'on obtient *au cours de la première heure* qui suit la décongélation ne présentent aucune modification de leurs caractères extérieurs. L'analyse électrophorétique montre toutefois (Fig. 3 et 4) que la quantité d'actomyosine (myosine α de DUBUISSON) présente dans les extraits est accrue et que l'extrait obtenu une heure après décongélation (Fig. 4) contient une quantité de myosine β légèrement plus faible.

Les produits d'extraction que l'on obtient *à partir de la seconde heure* après décongélation présentent une augmentation progressive de leur turbidité, de leur viscosité et de leur biréfringence. L'importance de ces changements varie d'un cas à l'autre.

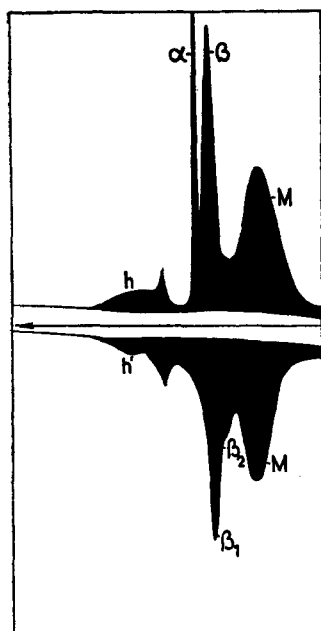


Fig. 4. Muscle lentement congelé, idem que Fig. 3, mais après 1 heure de décongélation. ATP = 0 (exp. no 295: 976 minutes d'électrophorèse à 1.77 V/cm; pH 7.1 - μ 0.35)

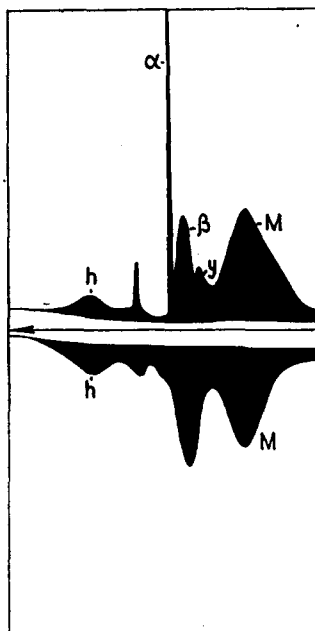


Fig. 5. Muscle lentement congelé. Idem que Fig. 3, mais après 1 heure et demie de décongélation (exp. no 294: 1136 minutes d'électrophorèse à 1.68 V/cm; pH 7.1 - μ 0.35)

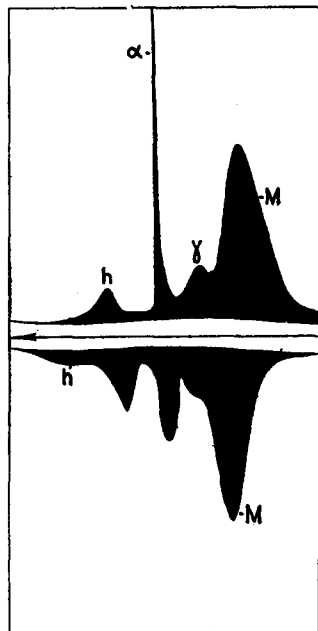


Fig. 6. Muscle lentement congelé. Idem que Fig. 3, mais après 2 heures de décongélation (exp. no 314: 1066 minutes d'électrophorèse à 1.66 V/cm; pH 7.1 - μ 0.35)

L'analyse électrophorétique appliquée aux différents cas permet de les faire rentrer tous dans un même ensemble. En effet, la succession des phénomènes est toujours la même. La myosine β , dont la quantité présente dans les extraits apparaissait déjà légèrement diminuée après une heure de décongélation (voir Fig. 4), diminue encore ultérieurement (Fig. 5 et 6). Le phénomène a plutôt un caractère critique que progressif et des images telles que celles reproduites dans la Fig. 5 sont en fait très difficiles à saisir, même si l'on effectue des prélèvements très rapprochés. (La disparition de la myosine β que l'on observe au cours de l'établissement du *rigor mortis* a, au contraire, un caractère *progressif*; il en est de même dans le cas de la contracture monobromacétique, compte tenu de la plus grande rapidité avec laquelle les phénomènes se succèdent dans ce cas, voir CREPAX³⁰). La composante γ diminue également. A ces phénomènes correspond, comme dans tout muscle contracturé, une augmentation de la myosine γ . Le comportement de l'actomyosine (myosine α) présente au contraire par rapport à ceux-ci, quelques particularités: le taux de cette protéine est, dans une première phase, légèrement augmenté; il diminue ensuite (l'on trouvera une analyse détaillée de ces phénomènes dans le travail cité³⁰). Une légère augmentation du taux d'actomyosine est, dans les muscles dégelés, très précoce: on l'observe dès que la décongélation a eu lieu et elle représente, à ce moment, l'unique particularité du protéinogramme.

3. Richesse en protéines totales des extraits de muscles ayant subi la décongélation

Des déterminations rassemblées dans le Tableau III, il résulte que: a. la quantité

de protéines extractibles d'un muscle normal congelé reste constante dans les premières heures qui suivent la décongélation; b. un muscle contracturé (*rigor mortis*, contracture monobromacétique) fournit après décongélation des quantités *progressivement croissantes* de protéines: l'on atteint finalement, au bout d'une douzaine d'heures, des valeurs comparables aux valeurs normales; ce phénomène se produit seulement si la congélation du tissu a été effectuée lentement.

TABLEAU III
MODIFICATIONS DU TAUX D'N PROTIDIQUE EXTRACTIBLE DANS LES HEURES
QUI SUIVENT LA DÉCONGÉLATION (mg/ml D'EXTRAIT)

Lapin No	Muscle	Heure à laquelle l'extraction a été effectuée					
		0	1e	3e	6e	12e	24e
56	normal*	2.1	—	—	1.9	1.5	1.4
61	normal*	2.0	—	—	2.1	—	1.3
61	normal*	1.5	—	—	1.4	—	—
62	normal*	1.6	—	—	—	—	—
56	congelé L**	2.7	1.9	1.9	2.0	1.9	1.8
58	congelé L	2.7	1.7	1.6	1.5	1.8	1.9
61	congelé L	2.1	1.9	1.6	1.7	1.7	1.7
61	congelé L	2.4	—	—	—	—	—
62	congelé L	2.0	—	—	—	—	—
58	congelé AL***	2.0	1.8	1.5	1.7	—	1.5
58	congelé AL	1.8	1.5	1.4	—	1.4	1.5
62	congelé AL	2.0	1.6	—	1.7	—	1.8
61	congelé AL	1.7	—	—	1.5	—	1.5
62	congelé AL	1.7	—	—	—	—	—
57	<i>rigor mortis</i> L	1.7	—	1.7	2.0	2.4	—
61	<i>rigor mortis</i> L	1.4	—	—	1.7	2.0	2.0
61	<i>rigor mortis</i> AL	1.3	—	—	1.3	—	1.1
57	contracture mono- bromacétique L	1.6	—	1.9	1.9	2.8	2.7
57	contracture mono- bromacétique AL	1.5	—	1.6	1.6	1.6	1.5

* hâchage au moulin à viande

** L = congélation lente et graduelle par simple emplacement dans une enceinte froide.

*** AL = congélation par immersion dans l'air liquide.

Le fait qu'un muscle contracturé (*rigor mortis*, monobromacétate) fournit, après décongélation, des quantités croissantes de protéines, pourrait tenir au fait bien connu que l'autolyse tissulaire est

Bibliographie p. 65.

grandement accélérée par la congélation et la décongélation successives (FEARON ET FORSTER³⁷; HAEHN³⁸). Le procédé employé pour la congélation a une importance déterminante et l'autolyse est grandement accélérée si la congélation a été effectuée graduellement, tandis qu'elle peut avoir un cours même plus lent qu'en conditions normales, si la congélation a été brusque (voir les courbes publiées par FEARON ET FORSTER³⁷).

DISCUSSION

Dans un muscle normal, la contracture de décongélation se produit seulement s'il existe dans le muscle une quantité suffisante d'ATP et elle entraîne une hydrolyse totale et rapide de cette substance: *les modifications qualitatives et quantitatives dans l'extractibilité des myosines, que l'on n'observe que dans les heures qui suivent la décongélation, ne sont donc pas une conséquence immédiate de la contracture de décongélation et sont sans rapport avec des variations du taux en ATP.*

Cette constatation est importante à deux points de vue:

- a. le rôle de l'ATP dans la combinaison actine-myosine;
- b. l'influence de l'ATP sur l'extractibilité des protéines musculaires.

a. L'actomyosine (myosine α de DUBUISSON) est présente dans les extraits de muscles normaux dans des proportions qui dépendent, dans une large mesure, du temps d'extraction. D'après SZENT-GYÖRGYI³⁹, l'hydrolyse spontanée de l'ATP, qui exerce une action empêchante sur la combinaison myosine-actine, permettrait progressivement la formation de ce complexe protéinique (la myosine proprement dite ou simplement myosine de SZENT-GYÖRGYI correspond à la myosine β de DUBUISSON).

DUBUISSON⁴⁰ fait remarquer que si l'hypothèse de SZENT-GYÖRGYI était exacte, l'actomyosine devrait se former plus rapidement et plus abondamment dans un muscle fatigué — qui a largement entamé ses réserves en ATP — ce qui n'est pas le cas, au contraire. Le cas des muscles contracturés (*rigor mortis*, contracture monobromacétique), qui ont eux aussi grandement réduit leurs réserves en ATP, n'apporte guère d'éléments définitifs dans cette discussion: la durée de l'extraction ne modifie pas dans ce cas les proportions des myosines que l'on extrait et à tout moment on n'obtient que de l'actomyosine; mais la quantité totale de celle-ci ne dépasse que de peu la quantité d'actomyosine présente dans l'extrait de courte durée d'un muscle normal (voir CREPAX³⁶). Il en est autrement dans le cas de muscles décongelés. L'évidence des faits nous semble dans ce cas tranchante. Une demi-heure après décongélation, tout l'ATP a entièrement disparu et nous trouvons cependant dans nos extraits *de la myosine libre et de l'actomyosine en quantités semblables à la normale: la myosine est donc extractible et soluble même en l'absence d'ATP et ce dernier facteur n'entraîne pas d'augmentation sensible de la quantité d'actomyosine* (la combinaison myosine-actine est un processus trop rapide pour penser qu'elle n'ait pas eu le temps de s'accomplir).

b. Nous avons montré²⁶ que les extraits de muscles contracturés se caractérisent par une faible teneur en actomyosine et l'absence de myosine proprement dite. Les diagrammes électrophorétiques décèlent en outre le développement considérable d'un gradient (contractine de DUBUISSON) qui est faiblement représenté dans les extraits de muscles normaux. (Ce gradient a été récemment identifié avec la myosine γ^{41} , décelable en petites quantités dans les préparations de myosine de WEBER-EDSALL).

La contracture de décongélation ne produit pas en elle-même ces altérations des protéinogrammes: celles-ci se manifestent avec un certain retard, pour des raisons encore inconnues, à moins d'admettre qu'il s'agisse ici d'un *rigor mortis* qui serait

singulièrement accéléré par les processus de congélation. En tous cas, le protéinogramme de contracture arrive beaucoup plus tard que la contracture de décongélation sans que, entretemps, le facteur ATP qui, d'après ERDÖS⁴² devrait être considéré comme responsable de son déterminisme, ait aucunement changé. Cette circonstance ne plaide pas en faveur de l'hypothèse de cet auteur pour qui la diminution de l'extractibilité des myosines des muscles contracturés serait due à un appauvrissement du muscle en ATP. A moins d'admettre qu'entre la cause apparente (hydrolyse de l'ATP) et l'effet (changements d'extractibilité de protéines), existe une série de réactions intermédiaires encore inconnues, si l'on ne veut pas tout simplement considérer que les rapports qui existent entre ces deux facteurs sont entièrement occasionnels.

Dans un muscle de Lapin intoxiqué au monobromacétate, la contracture de décongélation ne se produit jamais même lorsqu'il existe, dans ce muscle, des quantités d'ATP qui sont suffisantes, dans les conditions ordinaires, pour assurer la contracture de décongélation d'un muscle normal. Tout se passe, dans ce cas, comme si l'ATP présent était inutilisable pour le déclenchement de la contracture de décongélation. Ceci plaiderait en faveur d'une *origine métabolique* de cette contracture, puisque l'on sait que le point d'attaque du monobromacétate se situe dans le cycle anaérobie de la dégradation des hydrates de carbone, au cours duquel l'ATP, ou ses dérivés, interviennent à plusieurs reprises.

RÉSUMÉ

1. La contracture de décongélation ne produit pas en elle-même les modifications d'extractibilité des protéines musculaires qui caractérisent tout muscle contracturé. Des altérations identiques se manifestent cependant, mais avec un certain retard (2 heures environ) par rapport à l'établissement de la contracture. Il est possible qu'elles soient dues à l'établissement d'un *rigor mortis*, dont l'apparition serait plus précoce par suite de la congélation du tissu.

2. L'ATP du muscle est entièrement hydrolysé dès que la contracture de décongélation s'est produite; par conséquent, cette substance, dont l'hydrolyse a si souvent été invoquée pour expliquer l'inextractibilité des myosines des muscles contracturés, ne peut avoir aucun rôle direct dans le cas présent. L'importance de cette constatation est grande en vue de la connaissance des facteurs qui régissent, en conditions normales, la combinaison actine-myosine.

SUMMARY

1. The contraction of release from the frozen state does not in itself cause the changes in extractibility of muscle proteins which characterize each contracted muscle. Identical changes do occur, but with a certain delay (about 2 hours) as compared to the occurrence of the contraction. These changes may be due to the onset of a *rigor mortis* which might be accelerated by purging the tissue.

2. The ATP of muscle is hydrolyzed entirely as soon as the contraction of release from the frozen state has been established; so this substance, the hydrolysis of which has so often been mentioned to explain the inextractibility of the myosins from contracted muscle, cannot play a part in the present case. This fact is very important with regard to our knowledge of the factors which govern the combination actine-myosin under normal conditions.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Kontraktion durch Gefrierung bewirkt für sich allein nicht die Änderungen in der Extrahierbarkeit der Muskelproteine, welche für jeden kontrahierten Muskel charakteristisch sind. Es treten zwar dieselben Veränderungen auf, aber mit einem gewissen Verzug (etwa 2 Stunden) im Vergleich zur Kontraktion. Sie sind möglicherweise einer Totenstarre (*rigor mortis*) zuzuschreiben, welche in Folge der Gefrierung der Gewebe, früher auftritt, als gewöhnlich.

2. Das ATP des Muskels ist vollständig hydrolysiert, sobald der Muskel unter dem Einfluss der Kälte kontrahiert ist; daher kann diese Substanz, deren Hydrolyse so oft zur Erklärung der

Tatsache gedient hat, dass die Myosine kontrahierter Muskeln nicht extrahiert werden können, in diesem Falle keine direkte Rolle spielen. Diese Feststellung ist wichtig im Zusammenhang mit unserer Kenntnis der Faktoren welche, unter normalen Bedingungen, die Verbindung Actin-Myosin beherrschen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. DU BOIS-RAYMOND, *Untersuchungen über thierische Elektrizität*, 2 (1849) 181.
- ² W. KÜHNE, *Untersuchungen über Protoplasma und die Kontraktilität*, Leipzig, 1864.
- ³ L. HERMANN, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 4 (1871) 189.
- ⁴ H. W. FISCHER ET P. JENSEN, *Biochem. Z.*, 20 (1909) 162.
- ⁵ P. JENSEN ET H. W. FISCHER, *Z. allgem. Physiol.*, 11 (1910) 90.
- ⁶ P. JENSEN ET H. W. FISCHER, *Zentralbl. Physiol.*, 23 (1909) 297.
- ⁷ F. BOTTAZZI, *Ergeb. Physiol.*, 24 (1925) 308.
- ⁸ W. M. FLETCHER, *J. Physiol. (London)*, 47 (1913) 361.
- ⁹ D. L. FOSTER ET D. M. MOYLE, *Biochem. J.*, 15 (1921) 334.
- ¹⁰ F. BOTTAZZI, *Arch. Sci. biol. (Italy)*, 1 (1919) 37.
- ¹¹ F. BOTTAZZI, *Rend. reale accad. naz. Lincei*, 24 (1920) 105.
- ¹² F. BOTTAZZI, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 3 (1922) 313.
- ¹³ G. QUAGLIARIELLO, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 4 (1923) 139.
- ¹⁴ O. M. BERNARDI, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 8 (1926) 17.
- ¹⁵ F. BOTTAZZI, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 8 (1926) 347.
- ¹⁶ G. TESAURO, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 6 (1924) 191.
- ¹⁷ G. DE CRECCIO, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 3 (1922) 369.
- ¹⁸ G. BOSSA, *Arch. sci. biol. (Italy)*, 3 (1922) 335.
- ¹⁹ H. J. DEUTICKE, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 224 (1930) 1.
- ²⁰ J. HENSAY, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 224 (1930) 44.
- ²¹ H. BRUNOW, *Z. allgem. Physiol.*, 13 (1912) 367.
- ²² E. HEUBEL, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 45 (1889) 563.
- ²³ W. MANIGK, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 224 (1930) 722.
- ²⁴ M. DUBUISSON, *Arch. intern. physiol.*, 54 (1948) 93.
- ²⁵ M. DUBUISSON, *Experientia*, 4 (1948) 437.
- ²⁶ P. CREPAX, J. JACOB ET J. SELDESCHTS, *Biochim. Biophys. Acta*, 4 (1950) 410.
- ²⁷ A. SZENT-GYÖRGYI, *Biol. Bull.*, 96 (1949) 140.
- ²⁸ L. VARGA, *Hung. Acta Physiol.*, 1 (1946) 1.
- ²⁹ J. GODEAUX, *Arch. intern. Physiol.* (sous presse).
- ³⁰ M. DUBUISSON ET J. JACOB, *Rev. can. biol.*, 4 (1945) 426.
- ³¹ M. DUBUISSON, A. DISTÈCHE ET A. DEBOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 97.
- ³² M. BORBIRO ET A. SZENT-GYÖRGYI, *Biol. Bull.*, 96 (1949) 162.
- ³³ K. LOHMANN, *Hand. Bioch. Menschen u. Tiere (Ergänzungswerk)*, 3 (1936) 351.
- ³⁴ R. J. L. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.
- ³⁵ M. DUBUISSON, *Experientia*, 3 (1947) 372.
- ³⁶ P. CREPAX, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- ³⁷ W. R. FEARON ET D. L. FOSTER, *Biochem. J.*, 16 (1922) 564.
- ³⁸ H. HAEHN, *Ergeb. Enzymforsch.*, 5 (1936) 117.
- ³⁹ A. SZENT-GYÖRGYI, *Muscular contraction*, Acad. Press, New York, 1947.
- ⁴⁰ M. DUBUISSON, *Bull. acad. roy. sci. (Belgique)*, 34 (1948) 978.
- ⁴¹ M. DUBUISSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 489.
- ⁴² T. ERDÖS, *Studies Inst. Med. Chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 51.

Reçu le 17 mars 1950