

## ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE D'EXTRAITS DE MUSCLES DOUÉS DE DIFFÉRENTES PROPRIÉTÉS MORPHOLOGIQUES ET FONCTIONNELLES

par

P. CREPAX

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

### INTRODUCTION

L'analyse de la composition protéinique d'extraits musculaires par électrophorèse a été poursuivie depuis 1942 par DUBUISSON et ses collaborateurs au moyen de cellules d'électrophorèse spécialement adaptées à l'étude d'extraits visqueux (DUBUISSON<sup>1,2</sup>; DUBUISSON ET JACOB<sup>3</sup>; DUBUISSON, DISTÈCHE ET DEBOT<sup>4</sup>). En variant les conditions d'extraction et en étudiant les produits de fractionnement, une correspondance a pu être établie entre les différents gradients électrophorétiques observés dans les extraits totaux et les protéines musculaires définies par des recherches antérieures. Ces recherches ont porté principalement sur les muscles squelettiques du Lapin.

Le nombre de travaux relatifs à d'autres muscles est relativement limité. Dans le laboratoire de DUBUISSON, des recherches ont été effectuées sur des muscles de Grenouille (DUBUISSON ET JACOB<sup>3</sup>), de carpe (HAMOIR<sup>5</sup>) et d'un mollusque marin (DUBUISSON ET ROUBERT<sup>6</sup>). Citons également les recherches de MEHL ET SEXTON<sup>7</sup>, relatives à des extraits musculaires de Rat et d'Octopus, et celles d'AMBERSON *et coll.*<sup>8</sup> comparant la composition protéinique des muscles blancs et rouges de Lapin.

Nous nous sommes proposé d'étudier, par électrophorèse, des extraits de muscles doués de propriétés morphologiques et fonctionnelles très différentes: les muscles squelettiques blancs et rouges de Lapin, les muscles de Lapin de garenne, le myocarde de Lapin et de Cheval, l'utérus de Lapine et de génisse, la vessie de Veau, les muscles squelettiques de fœtus de Lapin.

Nous avons effectué, dans chaque cas, un nombre d'électrophorèses suffisant pour que les diagrammes obtenus soient bien caractéristiques des muscles considérés dans les conditions d'extraction utilisées\*.

### TECHNIQUE

Une analyse détaillée des différents facteurs à envisager lors de la préparation d'extraits musculaires a été faite récemment par DUBUISSON<sup>2</sup>. Nous nous bornerons donc à exposer sommairement le mode opératoire suivi ici.

\* Lorsque les gradients observés présentent les mêmes propriétés de solubilité, la même mobilité électrophorétique et le même aspect que ceux décrits par JACOB<sup>23</sup> dans le cas d'extraits musculaires de Lapin, nous avons utilisé les symboles proposés par cet auteur pour les représenter. L'examen d'autres critères d'identification n'a pas été envisagé dans ce travail.

Après prélèvement, les muscles sont lentement refroidis en glacière pendant une demi-heure. Lorsque le matériel utilisé est fourni par l'abattoir (cœur de cheval, utérus et vessie de génisse), le temps compris entre la sacrifice de l'animal et la mise en glacière ne dépasse pas deux heures. Toutes les manipulations sont effectuées en chambre froide.

Les tissus sont hâchés, au moyen d'un microtome automatique à congélation à large surface, en tranches d'environ  $40\ \mu$  d'épaisseur (DUBUISSON<sup>9</sup>). Le tissu est ensuite additionné d'un et demi à deux volumes de solution d'extraction et soumis à une agitation mécanique lente.

Le passage en solution des protéines solubles aux faibles forces ioniques (myogène, globuline X) est obtenu par extraction à l'eau pendant des temps variant de 1 à 6 heures. L'extraction des protéines de structure est réalisée par les solutions salines suivantes, rangées par ordre d'efficacité croissante:

- a.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.048 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.006 M; NaCl 0.20 M ( $\mu = 0.35$ , pH 7.4).
- b.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.048 M;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.006 M; NaCl 0.35 M ( $\mu = 0.50$ , pH 7.4).
- c.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01 M;  $\text{NaHCO}_3$  0.04 M; NaCl 0.5 M ( $\mu = 0.57$ , pH 8.7)  
(solution de WEBER-EDSALL).
- d.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.01 M;  $\text{NaHCO}_3$  0.04 M; KI 0.6 M ( $\mu = 0.67$ , pH 8.7).

Les solutions de force ionique 0.35 sont laissées en présence du tissu généralement pendant une heure; des extractions de courte (10 minutes à  $0^\circ\text{C}$ ) ou de longue durée (24 h à la température ordinaire) ont toutefois également été effectuées dans certains cas.

Les extraits sont centrifugés 10 minutes à 6000 t/min et dialysés en tubes de cellophane pendant au moins 35 heures. Dans le cas des extraits effectués à faible force ionique, la solution de dialyse est constituée par des mélanges de phosphates mono- et disodiques, de force ionique constante 0.10 et de pH compris entre 6.7 et 7.65; lorsque les extraits sont préparés à force ionique élevée, ils sont toujours dialysés contre une solution de composition:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.032 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.004 M, NaCl 0.25 M ( $\mu = 0.35$ , pH 7.1). Après centrifugation, les extraits sont analysés au moyen d'un appareillage du type TISELIUS-LONGSWORTH<sup>4</sup>. Le taux d'N protidique des extraits est évalué au micro-Kjeldahl. Les mesures de pH sont faites à l'électrode de verre, au moyen de l'électromètre à lampes de DUBUISSON ET DEBOT<sup>10</sup>.

## RÉSULTATS

### 1. Les protéines des muscles squelettiques blancs et rouges du Lapin

Les différences de propriétés fonctionnelles, morphologiques et biochimiques des muscles blancs et rouges ont été exposées antérieurement dans une revue critique de NEEDHAM<sup>11</sup>. L'étude comparative de leur constitution protéinique a fait l'objet des recherches de QUAGLIARIELLO<sup>12</sup>, de WEBER ET MAYER<sup>13</sup>, et d'AMBERSON *et coll.*<sup>8</sup>

Les analyses de WEBER ET MEYER ont révélé des variations quantitatives notables dans les diverses protéines de muscle de Lapin. Dans le cas de muscles blancs, les teneurs en stroma, myosine, globuline X et myogène, exprimées en % d'azote total, sont respectivement de 14.7, 33.3, 19.2 et 19.1%; dans le cas des muscles rouges, elles sont de 24.2, 35.3, 15.2 et 14.9%. L'analyse électrophorétique d'AMBERSON *et coll.*<sup>8</sup> a confirmé ces résultats en montrant que les diagrammes électrophorétiques diffèrent en outre par la présence de myoglobine dans les muscles rouges.

Les muscles rouges que nous avons employés sont le masséter et le fessier moyen: il s'agit de deux muscles qui sont entièrement rouges, la tonalité étant très foncée dans le premier cas, assez claire dans le second. Nous avons préféré limiter de la sorte notre choix pour assurer à notre matériel une certaine homogénéité. Les muscles blancs étaient au contraire choisis indifféremment parmi ceux du dos et du membre postérieur. Cette circonstance peut être en partie responsable du fait que les valeurs moyennes se référant à ces derniers présentent, comme on le verra, une déviation standard assez bien plus élevée que dans le premier cas.

*Teneur en eau et en azote total des extraits.* Le résidu sec obtenu par séchage à poids constant est de 22.8% ( $\pm 1.1$ ) dans le cas des muscles blancs, de 22.5% ( $\pm 0.2$ ) dans les muscles rouges. Le taux d'N total, déterminé au micro-Kjeldahl dans des morceaux de tissu frais est plus élevé dans les muscles blancs que dans les muscles rouges:

36.9  $\pm$  1.1 mg d'N par g de muscle et 33.6  $\pm$  0.8 dans le second (moyenne de 12 déterminations). WEBER ET MEYER avaient trouvé des valeurs de 28.6 et 25.3 mg d'N par g de muscle. Nos valeurs, systématiquement plus élevées, peuvent être dues au fait que nous n'avons pas — comme dans les expériences des autres auteurs — perfusé les muscles au préalable avec une solution de Ringer, ce qui provoque un certain degré d'œdème des tissus. Nous n'avons pas tenu compte de l'âge de l'animal qui, d'après MEYER ET WEBER, influence également cette teneur.

*Teneur en protéines des extraits de faible force ionique.* Nous avons retrouvé les différences décrites par WEBER ET MEYER après extraction par 2 volumes de solution saline pendant 1 heure: à faible force ionique et à la force ionique de 0.35, les teneurs trouvées après élimination de l'azote dialysable sont, pour les muscles rouges, de 2.81  $\pm$  0.11 mg N/ml et 3.70  $\pm$  0.18 mg d'N/ml d'extrait; pour les muscles blancs, on obtient des valeurs plus élevées: 3.59  $\pm$  0.61 mg et 4.38  $\pm$  0.77.

TABLEAU I  
POURCENTAGES DES PROTÉINES SOLUBLES AUX FAIBLES FORCES IONIQUES DANS LES EXTRAITS  
DE MUSCLES BLANCS ET ROUGES DU LAPIN DOMESTIQUE

Exp. No.	Muscles	pH des extraits	N/ml mg	Gradients					
				n	m + h	m	l	k <sub>1</sub>	h
				en % de N total					
134	blancs	7.65	3.9		48		30	16	6
124	blancs	7.62	3.7		48		29	14	9
136	blancs	7.59	3.7		47		28	16	9
21	blancs	7.35	3.5		47		26	19	8
137	blancs	6.71	4.7	26		30	27	11	6
132	blancs	6.80	3.9	24		29	25	16	6
123	rouges	7.60	3.1		37		28	22	13
104	rouges	7.53	2.5		29.5		28.5	27	15
19	rouges	7.37	2.2		36.5		27.5	20	16
20	rouges	7.35	2.6		39.5		26.5	20	14
30	rouges	7.31	?		40.5		28.5	20	11
127	rouges	6.8	3.0		34.0		31	22	13
102	rouges	6.7	2.5		25.5		32.5	27	15

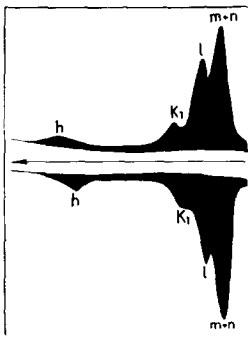


Fig. 1

Fig. 1. Protéinogramme électrophorétique d'un extrait de muscles blancs de Lapin obtenu et dialysé à  $\mu$  0.10. (Exp. 134: 383 minutes d'électrophorèse à 3.15 V/cm; pH 7.65; N: 3.9 mg/ml)

Fig. 2. Protéinogramme électrophorétique d'un extrait de muscles rouges de Lapin obtenu et dialysé à  $\mu$  0.10. (Exp. 123: 588 minutes d'électrophorèse à 2.08 V/cm; pH 7.60;  $\mu$  0.10; N: 3.1 mg/ml)

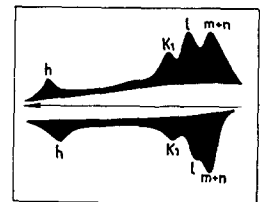


Fig. 2

Les différences portent principalement sur les constituants extractibles aux faibles forces ioniques: les pourcentages de ces constituants, dans les extraits des muscles blancs et rouges, sont consignés dans le Tableau I, tandis que les Figs. 1 et 2 représentent deux clichés électrophorétiques typiques. Ces résultats montrent que les extraits des

muscles rouges sont plus pauvres que ceux des muscles blancs en composants correspondant aux gradients l, m et n et plus riches en ceux correspondant aux gradients  $k_1$  et h; des clichés obtenus à partir de solutions de même teneur en azote au même stade de séparation électrophorétique donnent pour les différents gradients les rapports

$\frac{\text{surface muscles rouges}}{\text{surface muscles blancs}}$  suivants: m + n, 51%; l: 61%; k: 114% et h: 165%. L'importance accrue du gradient  $k_1$  tient, d'après AMBERSON *et coll.*, à la présence de myoglobine.

*Teneur en protéines des extraits de forte force ionique.* Dès que la force ionique de la solution d'extraction atteint la valeur de 0.35, l'on voit apparaître, dans les tracés électrophorétiques, outre les constituants présents dans les extraits obtenus aux faibles forces ioniques, deux gradients supplémentaires au niveau de  $k_1$ : le gradient  $\alpha$  de DUBUISSON, qui correspond à l'actomyosine de SZENT-GYÖRGYI, et le gradient  $\beta$  de DUBUISSON, qui correspond à la myosine proprement dite de SZENT-GYÖRGYI.

Les tracés électrophorétiques d'extraits de muscles blancs et rouges obtenus après 1 heure d'extraction par une solution phosphatique de  $\mu = 0.35$  et pH 7.1 sont reproduits dans la Fig. 3. Le rapport des quantités de myosine  $\alpha$  et  $\beta$  est plus faible dans le cas des muscles blancs que dans celui des muscles rouges.

L'influence bien connue de l'ATP sur le complexe actomyosine nous a incité à déterminer les teneurs en ATP de ces deux muscles et à suivre l'apparition d'actomyosine dans nos extraits en fonction du temps. L'ATP a été dosé par la méthode de LOHMANN-ALLEN, suivant le mode opératoire décrit par CRÉPAX et HÉRION<sup>14</sup>. Voici une série de déterminations se rapportant aux muscles du même Lapin. Muscles blancs: 5.4, 5.1, 5.0, 4.9 mg ATP/g muscle; muscles rouges: 2.9, 2.6, 2.5 mg ATP/g muscle. Le taux

en ATP des muscles rouges est donc nettement plus faible que celui des muscles blancs. Ceci permet de prévoir que la vitesse de formation d'actomyosine, en fonction du temps d'extraction, sera plus grande dans le cas des muscles rouges. C'est effectivement ce qu'on observe. Les muscles sont extraits par 3 volumes de solution d'extraction de WEBER-EDSALL, à la température de 2° C.

Le taux d'actomyosine de nos extraits a été évalué par la méthode de STRAUB<sup>15</sup>, basée sur la diminution plus ou moins importante de la viscosité que l'on observe par l'action de l'ATP. Le taux de la protéine a été calculé d'après les courbes établies par MOMMAERTS<sup>16</sup>: la valeur 100 correspond à une chute de viscosité maximale de l'ordre de celle que l'on observe quand la protéine en solution est de l'actomyosine pure. Les valeurs supérieures à 100 tiennent au fait que l'actomyosine est un complexe de composition et de propriétés variables, pouvant s'écarter considérablement des valeurs "moyennes" d'après lesquelles on a dressé les courbes.

Les résultats du Tableau II montrent que la formation d'actomyosine est plus

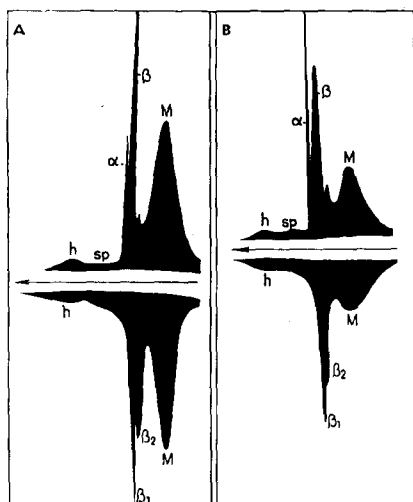


Fig. 3. Protéinogrammes d'extraits de muscles blancs (A) et rouges (B) obtenus (1 heure d'extraction) et dialysés à  $\mu$  0.35. A (exp. 92): 880 minutes d'électrophorèse à 1.5 V/cm; pH 7.0 —  $\mu$  0.35, N: 4.26 mg/ml. B (exp. 72): 733 minutes d'électrophorèse à 1.63 V/cm; pH 7.06 —  $\mu$  0.35, N: 2.7 mg/ml

rapide dans les extraits de muscles rouges: pour des temps d'extraction de 10 et de 20 minutes, le taux d'actomyosine des extraits est plus important pour les muscles rouges que pour les muscles blancs. Tandis qu'il est approximativement le même dans les deux cas pour un temps d'extraction de 30 minutes.

TABLEAU II  
VARIATION DU TAUX D'ACTOMYOSINE EN FONCTION DU TEMPS D'EXTRACTION  
DANS LES EXTRAITS DE MUSCLES BLANCS ET ROUGES

Lapin No.	Muscles	Temps d'extraction								
		10 min	20 min	30 min	1 h	2 h	3 h	6 h	12 h	24 h
27	blancs	0	7	21	28	52	74	100	123	145
28	blancs	5	12	17	65	78	100	149	—	—
29	blancs	0	3	12	40	33	98	113	—	—
27	rouges	8	16	18	30	34	37	51	108	—
28	rouges	10	20	20	33	39	74	—	104	—
29	rouges	10	29	31	41	41	94	—	118	—

## 2. Les protéines musculaires du Lapin de garenne

Tous les muscles squelettiques de cet animal ont une couleur rougeâtre, d'une tonalité comparable à celle du fessier moyen du Lapin domestique. Les muscles qui, chez ce dernier, sont rouges, présentent chez le Lapin de garenne une couleur plus foncée. Nos expériences ont porté sur des muscles choisis parmi ceux qui, dans l'espèce domestique, sont blancs.

Les extraits obtenus dans des conditions identiques à celles décrites précédemment pour les muscles blancs et rouges présentent un taux de protéines particulièrement élevé: 5.0 mg d'N protéinique par ml (faibles forces ioniques) et 5.35 (force ionique 0.35).

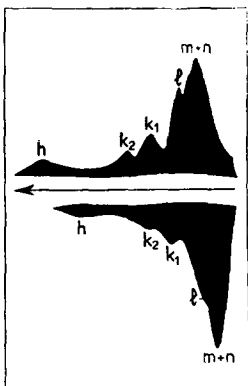


Fig. 4

Fig. 4. Protéinogramme électrophorétique d'un extrait de muscles squelettiques de Lapin de Garenne obtenu et dialysé à  $\mu$  0.10 (Exp. 128: 1155 minutes d'électrophorèse à 1.6 V/cm; pH 7.6)

Fig. 5. Protéinogramme électrophorétique d'un extrait de muscles squelettiques de Lapin de Garenne obtenu en extrayant le tissu pendant 1 heure avec une solution d'extraction (2 ml/g) de force ionique 0.35. (Exp. 135: 942 minutes d'électrophorèse à 1.7 V/cm; pH 7.0 —  $\mu$  0.35)

Il correspond, à cette teneur plus élevée en composants solubles aux faibles forces ioniques, une augmentation des gradients h, m et l et, dans une mesure moindre, du gradient  $k_1$  (Figs. 4 et 5).

L'augmentation de  $k_1$  est vraisemblablement due à la richesse particulière en myoglobine des muscles des espèces sauvages (NEEDHAM<sup>11</sup>; MILLIKAN<sup>17</sup>). L'importance du gradient h est de l'ordre de celle que l'on observe dans les protéinogrammes de muscles blancs et les proportions relatives de n, m et l sont également celles de ces muscles.

Bibliographie p. 398.

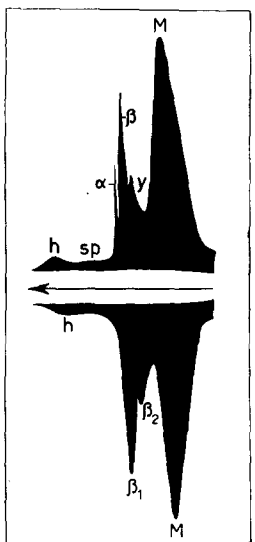


Fig. 5

Parmi les constituants solubles aux forces ioniques élevées, seule la protéine Y (DUBUISSON<sup>18</sup>) semble présenter un comportement particulier: nous avons trouvé cette protéine en assez grande quantité dans des extraits obtenus à une force ionique de 0.35 (Fig. 5), alors que, dans le cas des muscles squelettiques du Lapin domestique, elle ne passe en solution que si la force ionique de la solution d'extraction dépasse  $\mu$  0.50 (DUBUISSON<sup>18</sup>).

### 3. Les protéines du myocarde

#### A. Myocarde de Lapin

La composition protéinique du myocarde est encore mal connue. Quelques analyses électrophorétiques effectuées par AMBERSON *et coll.*<sup>8</sup> ont révélé la présence d'un composant rapide, identifié par ces auteurs avec le gradient h, d'un composant intermédiaire formé par les myosines et d'un composant lent correspondant au myogène.

L'actomyosine du muscle cardiaque a été étudiée par KOVATS<sup>19</sup>, tandis que sa vitesse de formation en fonction du temps a été étudiée par GUBA<sup>20</sup>. La teneur élevée de ce tissu en myoglobine est également bien connue (LEHMANN<sup>21</sup>; BJORCK<sup>22</sup>).

Les extraits de myocarde présentent une forte coloration rouge (LEHMANN<sup>21</sup>; BJORCK<sup>22</sup>). Nous avons cherché à éliminer aussi complètement que possible l'hémoglobine. La perfusion de l'organe avec du sérum physiologique ne nous a pas donné de résultats aussi constants que la simple compression mécanique. Après prélèvement de l'organe, les oreillettes sont détachées d'un coup de ciseaux; le tissu est comprimé doucement avec les doigts et débarrassé ainsi de la majeure partie du sang que l'on absorbe avec du papier filtre, au fur et à mesure de son expulsion. Plusieurs coeurs sont utilisés pour une extraction.

a. *Taux de protéines totales dans les extraits.* Le rendement de l'extraction dépend déjà nettement de la durée de celle-ci aux faibles forces ioniques, contrairement à ce que l'on observe dans le cas des muscles squelettiques: lorsqu'on utilise 1.5 ml de solution d'extraction/g muscle, on obtient 2.9 mg N protéinique par ml pour des temps d'extraction inférieurs à 2 h, et 3.4 mg N/ml pour des temps de 4 à 6 h.

Lorsqu'on augmente la force ionique, le taux de protéines extraites croît. Une extraction d'une heure par 2 volumes de solution (2 ml/g muscle) de  $\mu = 0.35$  et pH 7.4

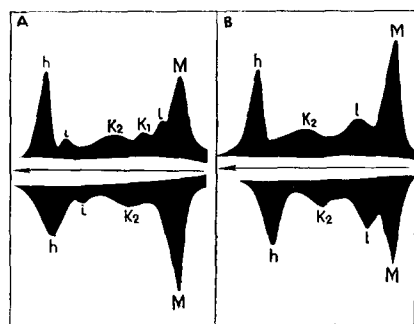


Fig. 6. Protéinogrammes d'extraits de myocarde de Lapin obtenus à  $\mu$  0.10 et dialysés à des pH  $> 7$  (A) ou  $< 7$  (B). A (exp. 160): 326 minutes d'électrophorèse à 3.18 V/cm; pH 7.56 —  $\mu$  0.10, N: 3.66 mg/ml. B (exp. 161): 260 minutes d'électrophorèse à 3.95 V/cm; pH 6.78 —  $\mu$  0.10, N: 3.57 mg/ml

Bibliographie p. 398.

donne un extrait contenant 3.6 mg N protéinique/ml. La pulpe musculaire abandonnée de façon prolongée en présence de solutions salines de force ionique 0.5 ou plus ne donne toutefois pas lieu à la formation d'extraits visqueux riches en actomyosine. De plus, le résidu d'extraction obtenu après 4 extractions consécutives au moyen de la solution de WEBER-EDSALL, la première de 24 h, les trois suivantes de 30 minutes, est environ double de celui obtenu dans le cas des muscles blancs.

b. *Analyse électrophorétique des extraits.*  
*Faibles forces ioniques.* Dans la Fig. 6A, se trouve reproduit le tracé électrophorétique d'un extrait dialysé au pH 7.6. Le protéinogramme du même extrait analysé à un pH de 6.8 est reproduit dans la Fig. 6B. Le gradient M se

maintient longtemps unique au cours de la migration électrophorétique, mais si l'on pousse celle-ci très loin, à un pH d'environ 6.3, l'on obtient sa séparation en deux gradients dont le plus rapide a une vitesse correspondante à la vitesse du gradient  $m$  des protéinogrammes de muscles squelettiques; le plus lent migre avec la vitesse d'une protéine qui a un point isoélectrique de 7.0.

Les vitesses électrocinétiques des gradients  $l$ ,  $k_1$  et  $k_2$  sont identiques à celles des gradients de même appellation décrits dans les protéinogrammes de muscles squelettiques. La coloration rouge des extraits (myoglobine) migre au niveau de  $k_1$ ; ce gradient, bien apparent aux pH  $> 7.0$ , se fusionne avec  $l$  aux pH moindres.

Les tracés obtenus à des valeurs de pH 7.0 montrent la présence constante d'un gradient dont la vitesse, compte tenu de la force ionique différente à laquelle cet auteur travaillait, semble correspondre à celle du gradient  $i$  de JACOB<sup>23</sup>. Nous l'avons indiqué avec cette lettre dans la Fig. 6. Ce gradient manque dans les tracés obtenus à un pH  $< 7.0$ , ce qui constitue un autre élément d'analogie avec le gradient décrit par JACOB.

*Forces ioniques élevées* ( $\mu$  0.35). Les gradients correspondant aux myosines  $\alpha$  et  $\beta$  sont bien développés et possèdent les vitesses électrocinétiques de ces composés. La quantité de ces constituants augmente lorsque la force ionique du liquide d'extraction croît, tout en demeurant faible en valeur absolue par rapport aux muscles squelettiques.

Au point de vue qualitatif, il faut signaler la présence, assez inconstante, dans les tracés électrophorétiques, d'un gradient, peu développé, dont les propriétés électrocinétiques ( $2.2 \cdot 10^{-5}$  volt/cm à pH 7.1 —  $\mu$  0.35) sont semblables à celles de la protéine Y de DUBUISSON. Toutefois, les solutions de KI, qui sont particulièrement efficaces vis-à-vis de la protéine Y, ne modifient aucunement le comportement de ce gradient.

L'influence du temps d'extraction sur la composition des extraits est montrée par les tracés reproduits dans les Figs. 7A et B. Dans les extraits de courte durée (20 minutes, Fig. 7A), le rapport en quantité de myosine  $\alpha$  et myosine  $\beta$  est d'environ 1:2 (en conditions analogues, dans le cas du muscle squelettique, ce rapport est de 1:8 à 1:10). Cette valeur ne change pas au cours des heures qui suivent. Dans les extraits de longue durée (24 h, Fig. 7B), le gradient correspondant à la myosine  $\beta$  a disparu. Ces résultats sont en accord avec ceux de GUBA, qui a signalé la formation particulièrement rapide d'actomyosine dans les extraits de myocarde de Lapin. Il convient sans doute de rapprocher ce fait de certaines déterminations que nous avons faites montrant que le contenu en ATP du myocarde est d'environ la moitié de celui des muscles blancs.

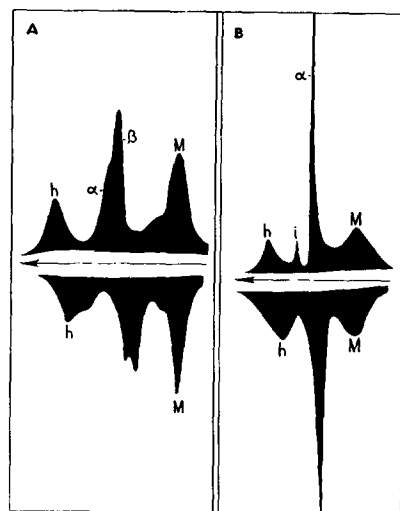


Fig. 7. Protéinogrammes d'extraits de myocarde de Lapin obtenus au moyen de la solution de WEBER-EDSALL; extraction de courte (A, 20 minutes) et de longue durée (B, 24 heures). A (exp. 163): 713 minutes d'électrophorèse à 1.95 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35). B (exp. 166): 640 minutes d'électrophorèse à 1.89 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35)

### B. Myocarde de Cheval

a. *Taux de protéines totales dans les extraits.* Les extraits obtenus aux faibles forces ioniques sont sensiblement plus pauvres que ceux du myocarde de Lapin obtenus en conditions analogues: 2.6 mg d'N protidique par ml d'extrait contre 3.4 mg chez le Lapin. La force ionique de la solution d'extraction doit atteindre une valeur minimum de 0.50 pour que l'on observe une augmentation significative des protéines qui passent en solution. La quantité totale en protéines extractibles (quatre extractions successives avec la solution de WEBER-EDSALL) est plus faible que dans le cas du myocarde de Lapin.

b. *Analyse électrophorétique des extraits. Faibles forces ioniques.* Le diagramme obtenu (Fig. 8) ressemble plus au diagramme correspondant des muscles rouges de Lapin qu'à celui du myocarde du même animal.

*Forces ioniques élevées.* Les gradients correspondant aux myosines ne font leur apparition que si la force ionique de la solution d'extraction atteint la valeur minimum de 0.50. La formation d'actomyosine est rapide et peut être complète au bout de deux heures d'extraction: le taux de cette protéine est remarquablement élevé, même dans les produits de courte extraction (voir Fig. 9).

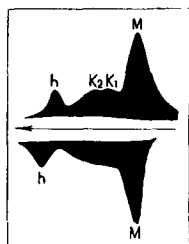
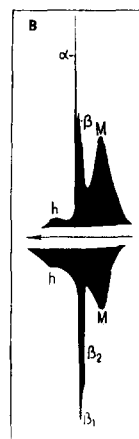


Fig. 8. Protéinogramme d'un extrait de myocarde de Cheval obtenu à  $\mu$  0.10. Exp. 38: 211 minutes d'électrophorèse à 3.1 V/cm; pH 7.3 —  $\mu$  0.10

Fig. 9. Protéinogramme de myocarde de Cheval obtenu par extraction avec 2 volumes de solution de WEBER-EDSALL pendant 20 min. (Exp. 70: 319 minutes d'électrophorèse à 1.9 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35)



*En résumé, les extraits de myocarde de Lapin et de Cheval diffèrent des muscles squelettiques par leur richesse en myoalbumine, leur pauvreté en myogènes et en myosines. Le taux en protéines extractibles de ces tissus est faible par rapport aux protéines du stroma.*

### 4. Les protéines des muscles lisses

Nos connaissances relatives aux protéines du muscle lisse sont encore très limitées. MEHL<sup>24</sup> a isolé des protéines présentant des propriétés de solubilité et de biréfringence d'écoulement des myosines à partir de mollusques. CSAPO<sup>25, 26</sup> a consacré à cette question une série de recherches qui ont porté sur des utérus de différentes origines (femme, Lapine, Rate, Vache) normaux ou en période de grossesse. Des extraits ont été obtenus par broyage du tissu dans une solution 0.5 M en KCl contenant 0.25% d'ATP. La viscosité de ces extraits décroît réversiblement en présence d'ATP. Si l'extrait est précipité par de l'eau, on obtient un gel qui "superprécipite" plus ou moins nettement en présence d'ATP. Les quantités d'actomyosine extraites de l'utérus normal sont beaucoup plus faibles que dans le cas du muscle strié; elles augmentent fortement au cours de la grossesse. Les quelques clichés d'ultracentrifugation publiés confirment ces résultats: la proportion de composants sédimentant rapidement croît au cours de la grossesse et ceux-ci disparaissent au profit de composants plus lents sous l'influence de



l'ATP. Mais le matériel protidique de ces diagrammes paraît très hétérogène et diffère fortement des extraits correspondants de muscles squelettiques. Une meilleure caractérisation des différentes protéines de l'utérus est indispensable.

Nos expériences ont porté sur l'utérus de Lapine, l'utérus de Génisse et la vessie de Veau. L'utérus de Lapine a été étudié dans différents états anatomo-physiologiques: utérus de Lapine vierge, utérus en différentes phases de grossesse, utérus post-partum. Les exemplaires d'utérus de Génisse appartenaient à des animaux jeunes (1 an environ). Les parties non musculaires des organes étaient soigneusement disséquées et écartées.

à. *Taux de protéines totales des extraits.* La quantité de protéines extractibles est, dans tous les cas étudiés, plus faible encore que dans le cas du myocarde: le taux des extraits obtenus aux faibles forces ioniques est légèrement inférieur, tandis que celui des extraits aux forces ioniques élevées est nettement moindre.

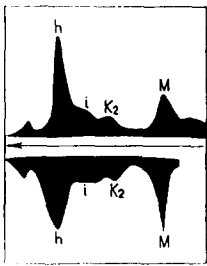


Fig. 10. Protéinogramme d'un extrait d'utérus de Lapine obtenu à  $\mu$  0.10. Exp. 107: 354 minutes d'électrophorèse à 2.3 V/cm; pH 7.6 —  $\mu$  0.10

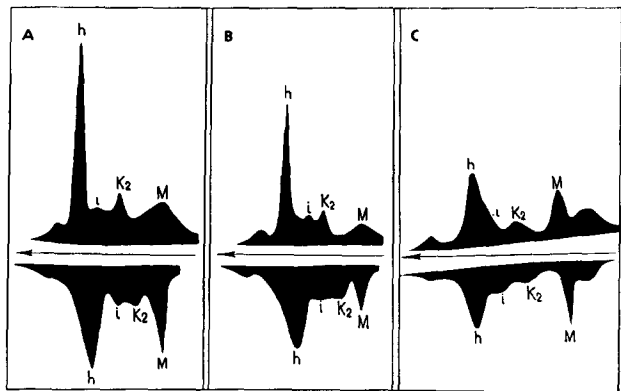


Fig. 11. Protéinogrammes d'extraits d'utérus de Lapines obtenus à  $\mu$  0.10, à partir d'un utérus vierge (A), peu gravide (B) et très gravide (C). A (exp. 145): 165 minutes d'électrophorèse à 3.9 V/cm; pH 7.6 —  $\mu$  0.10; B (exp. 155): 159 minutes d'électrophorèse à 3.5 V/cm; pH 7.6 —  $\mu$  0.10; C (exp. 106): 316 minutes d'électrophorèse à 2.6 V/cm; pH 7.2 —  $\mu$  0.10. L'importance du gradient correspondant à l'hémoglobine s'explique par la très forte hypérémie du tissu.

b. *Analyse électrophorétique des extraits. Utérus de Lapine.* Le tracé électrophorétique d'un extrait obtenu et dialysé aux faibles forces ioniques est reproduit dans la Fig. 10. L'aspect général des tracés n'apparaît pas sensiblement modifié dans la zone de pH comprise entre 6.7 et 7.6.

Les propriétés électrocinétiques permettent d'identifier les deux gradients principaux avec h et M. La correspondance est moins bonne dans le cas des deux gradients moins importants: les vitesses de migration obtenues sont légèrement plus fortes que celle de  $k_2$  et plus faibles que celle de i. L'importance de M est assez variable quelles que soient les conditions de pH et de force ionique auxquelles on effectue l'extraction. Le développement de h dépend très fortement des conditions anatomo-physiologiques de l'organe comme le montre la Fig. 11 où sont reproduits les protéinogrammes d'extraits obtenus à partir d'un utérus vierge (A), en début de gravidité (B) et en gravidité très avancée (C). On observe également un gradient de faible surface plus rapide que h

( $-9.0 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/sec à pH 7.6 et  $\mu = 0.10$  et  $-8 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/voltage/sec à pH 6.8 et  $\mu = 0.10$ ), qui n'a jamais été signalé jusqu'à présent dans le cas d'autres muscles.

*Forces ioniques élevées.* L'emploi de solutions d'extraction de force ionique 0.35 ou plus fait apparaître deux nouveaux gradients situés entre M et h, de mobilité anodique ( $\mu$  0.35; pH 7.1):  $-2.5 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/sec et  $-3.5 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/sec, que nous avons représentés par les lettres v et z. La Fig. 12 correspond à un extrait de ce type obtenu dans les conditions utilisées par CSAPO (voir p. 392). Les conditions anatomo-physiologiques de l'organe influencent grandement l'extractibilité de ces constituants: une solution de force ionique 0.35 est efficace dans le cas d'un utérus en gravidité avancée (Fig. 13 B); par contre, si l'utérus est vide ou bien si la gravidité est récente (Fig. 13 A), des solutions de force ionique élevée et constituées d'ions particulièrement actifs, n'extraient que de faibles quantités

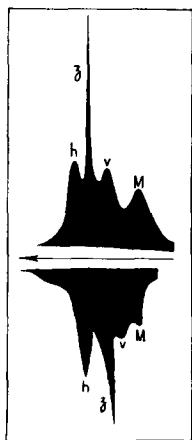


Fig. 12. Protéinogramme d'un extrait d'utérus de Lapine en gravidité moyenne obtenu en extrayant le tissu avec 1.5 vol. KCl 0.5 M + 4.0 mg ATP/g de pulpe pendant 20 minutes. (Exp. 180: 401 minutes d'électrophorèse à 1.9 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35)

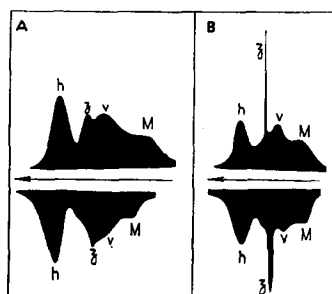


Fig. 13. Protéinogrammes d'extraits d'utérus de Lapines à peine gravide (A) et très gravide (B). A (exp. 156): extraction avec 2 vol. de solution de WEBER-EDSALL pendant 1 h; électrophorèse: 593 minutes à 1.8 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35. B (exp. 54): extraction avec 2 vol. de solution saline de force ionique 0.35 pendant 1 heure; électrophorèse: 442 minutes à 1.5 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35)

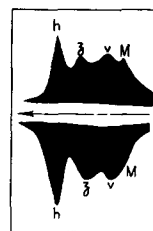


Fig. 14. Protéinogramme d'un extrait d'utérus de Génisse obtenu en extrayant le tissu avec 2 vol. de solution de WEBER-EDSALL pendant 1 heure (Exp. 82: 710 min d'électrophorèse à 1.45 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35)

de ces constituants. Le comportement de ceux-ci est donc inverse de celui de la myoalbumine (voir Fig. 11).

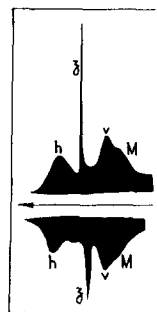
Quand l'extraction de ces protéines est possible, l'augmentation de la force ionique, du temps d'extraction (entre 1 et 24 heures), l'emploi de certains ions (KI) ou encore l'addition d'ATP (3-4 mg par g de pulpe) ne modifient pas qualitativement les résultats. Les extraits ne sont ni turbides ni visqueux et ne présentent pas de biréfringence d'orientation. L'analyse électrophorétique ne révèle aucun changement des proportions relatives entre v et z, lorsqu'on modifie le temps d'extraction.

*Utérus de génisse.* Les résultats obtenus à partir d'extraits d'utérus de génisse à faibles et à fortes forces ioniques sont très semblables à ceux décrits dans le paragraphe précédent. Les seules différences observées consistent dans une vitesse nettement plus faible du gradient v ( $2.1 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/sec à  $\mu = 0.35$  et au pH 7.1) et dans une importance moindre des gradients v et z (Fig. 14).

*Vessie de génisse.* Les clichés obtenus dans ce cas (Fig. 15) sont très semblables à ceux présentés par l'utérus du même animal. Les composants v et z sont plus aisément extractibles: lorsque la force ionique de la solution d'extraction passe de  $\mu = 0.35$  à des valeurs plus élevées, ces gradients ne s'accroissent pas. Des expériences préliminaires ayant pour but d'isoler les composés passant en solution aux forces ioniques élevées ont été faites: par dilution des extraits à l'eau distillée froide, on obtient un précipité mais celui-ci n'a pu être remis en solution.

*Les composants des muscles lisses passant en solution aux forces ioniques élevées diffèrent fortement des myosines des muscles striés. Ils s'en distinguent par leur faible viscosité, leur transparence, une biréfringence d'orientation faible ou nulle, leur instabilité et leurs mobilités électrophorétiques. Il ne nous semble pas, dans ces conditions, que l'on puisse identifier l'un ou l'autre des gradients v et z avec l'actomyosine du muscle strié ainsi que l'a fait CSAPO.*

Fig. 15. Protéinogramme d'un extrait de muscle lisse de vessie de Génisse obtenu et dialysé à une force ionique de 0.35 (1 heure d'extraction). Exp. 77: 799 minutes d'électrophorèse à 1.1 V/cm; pH 7.1



### 5. Les protéines des muscles squelettiques au cours du développement embryonnaire

La constitution protéinique du muscle squelettique du Rat, au cours du développement embryonnaire et post-foetal, a fait récemment l'objet d'une étude de HERRMANN ET NICHOLAS<sup>27</sup>. Ces auteurs trouvent que la quantité de myosine reste faible jusqu'au second jour de vie et croît ensuite fortement; la teneur en protéines solubles à faible force ionique ne présente par contre qu'une très légère augmentation après la naissance.

Nos expériences ont porté sur des foetus de Lapin à terme ou presque. La dissection des muscles squelettiques ne présente aucune difficulté à cette phase de développement.

a. *Taux de protéines totales dans les extraits.* Ce taux est généralement faible; il faut tenir compte cependant de la teneur en eau particulièrement élevée des muscles foetaux. Les myosines passent déjà notablement en solution à la force ionique de 0.35.

#### b. Analyse électrophorétique des extraits.

*Faibles forces ioniques.* M correspond aux gradients m et n de JACOB, mais sa concentration relativement faible détermine un étalement trop rapide du gradient qui ne permet pas de distinguer ces deux composants. Le gradient l se sépare de M dès le début de l'électrophorèse et ses propriétés électrocinétiques de même que celles de  $k_2$  et h sont normales; le matériel protidique sp est toujours nettement représenté (Fig. 16).

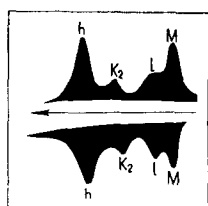


Fig. 16. Protéinogramme d'un extrait de muscles squelettiques de foetus de Lapin obtenu à  $\mu$  0.10. Exp. 111: 360 minutes d'électrophorèse à 1.95 V/cm; pH 6.7 —  $\mu$  0.10.

propriétés électrocinétiques de même que celles de  $k_2$  et h sont normales; le matériel protidique sp est toujours nettement représenté (Fig. 16).

*Forces ioniques élevées ( $\mu > 0.35$ ).* Le tracé électrophorétique d'un extrait obtenu et dialysé à 0.35 est reproduit dans la Fig. 17: les nouveaux gradients apparus semblent bien correspondre aux myosines  $\alpha$  et  $\beta$ , car, lorsqu'on augmente le temps d'extraction, la proportion du composant  $\alpha$  croît (Fig. 18) et les extraits présentent une augmentation nette de turbidité, de viscosité, de biréfringence. Ces myosines présentent toutefois des propriétés électrocinétiques anormales: la vitesse du gradient correspondant à la myosine  $\alpha$  est systématiquement plus grande ( $-3.2 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/sec contre  $-2.95 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/V/sec à la force ionique de 0.35 et au pH 7.1) que dans le cas des muscles squelet-

tiques adultes; celle du gradient correspondant à la myosine  $\beta$  est, au contraire, systématiquement plus faible ( $-2.3 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$  contre  $-2.5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{V}/\text{sec}$  à la force ionique de 0.35 et au pH 7.1).

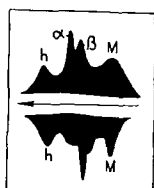


Fig. 17. Protéinogramme d'un extrait de muscles squelettiques de foetus de Lapin obtenu et dialysé à une force ionique de 0.35; 1 h d'extraction. Exp. 46: 585 minutes d'électrophorèse à 1.56 V/cm; pH 7.1

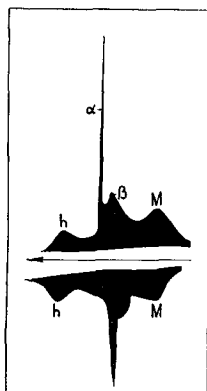


Fig. 18. Protéinogramme d'un extrait de muscle squelettique de foetus de Lapin. (Exp. 109: extraction avec 1.5 vol. de solution de WEBER-EDSALL pendant 2 h. 468 minutes d'électrophorèse à 1.1 V/cm, pH 7.1 —  $\mu$  0.35)

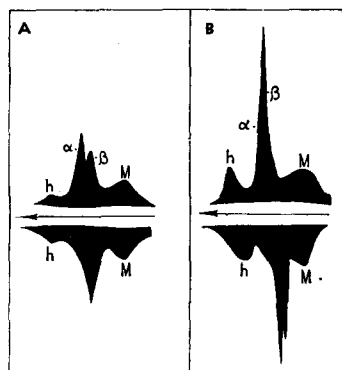


Fig. 19. Protéinogrammes d'extraits de myocarde de foetus de Lapin (A) et de Lapin adulte (B) obtenus à  $\mu$  0.50; 1 h d'extraction. A (exp. 168): 696 minutes d'électrophorèse à 1.4 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35. B (exp. 18): 600 minutes d'électrophorèse à 1.5 V/cm; pH 7.1 —  $\mu$  0.35

Les particularités que présente la constitution protidique des muscles squelettiques de foetus apparaissent intéressantes si on les compare à celles du myocarde de foetus du même âge (Fig. 19). Les figures A et B reproduisent les tracés électrophorétiques d'un extrait de myocarde de foetus à terme (A) et d'individus adultes (B) obtenus en conditions identiques: il est singulier de constater que le gradient h (myoalbumine), dont le développement important est si caractéristique du muscle squelettique foetal, présente dans ce cas, au contraire, un développement plus faible que dans le myocarde adulte.

La teneur en myoalbumine du muscle squelettique varie donc considérablement au cours du développement de ce tissu, alors que le taux de protéines solubles dans l'eau change peu.

#### CONCLUSION GÉNÉRALE

La comparaison des différents diagrammes d'électrophorèse obtenus aux faibles forces ioniques permet d'observer une modification progressive de la composition des extraits qui évolue parallèlement à la vitesse de contraction et de relâchement des muscles considérés. La teneur en myogène décroît alors que la myoalbumine augmente dans l'ordre: muscles blancs  $\rightarrow$  muscles rouges  $\rightarrow$  myocarde  $\rightarrow$  muscles lisses. Le cas de l'utérus et des muscles foetaux rentre bien dans ce cadre général. *La myoalbumine semble représenter un matériel protidique de réserve de la machine musculaire qui diminue progressivement au fur et à mesure de l'adaptation fonctionnelle du tissu tandis que se constituent les myogènes et les protéines de structure.* L'évolution inverse observée dans le cas de muscles éternés (CREPAX<sup>28</sup>) — processus de dédifférenciation — est conforme à cette interprétation.

Les résultats obtenus dans le cas des constituants solubles aux forces ioniques élevées sont plus divers. Les quantités de protéines extractibles aux forces ioniques élevées décroissent également dans le même ordre: muscles blancs  $\rightarrow$  muscles rouges  $\rightarrow$  myocarde  $\rightarrow$  muscles lisses. Les globulines extraites dans ces conditions présentent un comportement électrocinétique différent suivant qu'elles proviennent a) de muscles squelettiques adultes (rouges ou blancs) et de myocarde, b) de muscles de fœtus et c) de muscles lisses.

En ce qui concerne le premier groupe, nos recherches confirment les résultats antérieurs de DUBUISSON<sup>3</sup> et JACOB<sup>23</sup> et montrent que ces muscles ne présentent entre eux que des différences secondaires portant sur la quantité de protéines extractibles, leurs proportions relatives et sur la vitesse de formation d'actomyosine. L'analyse électrophorétique de muscles de fœtus montre également la présence de deux myosines dont les proportions relatives dépendent de la durée d'extraction, mais leurs mobilités aberrantes ne permettent pas de les identifier avec les myosines  $\alpha$  et  $\beta$  du groupe précédent. Dans le cas des muscles lisses, les différences révélées par l'électrophorèse sont tellement marquées qu'il semble prématuré de parler d'actomyosine ou de myosine. Le composant z semble d'ailleurs seul correspondre à un constituant bien défini du muscle lisse: son gradient ne s'étale pas de façon excessive au cours de l'électrophorèse et sa mobilité ne varie pas d'un animal à l'autre contrairement à ce que l'on observe dans le cas du gradient v.

Certaines corrélations entre la composition protéinique de ces différents muscles et leurs propriétés physiologiques se dégagent déjà de cette première étude. Il n'est pas douteux que de nouvelles recherches dans cette voie permettront d'éclairer d'un jour nouveau le problème des relations existant entre la structure et la fonction des tissus musculaires.

Les résultats préliminaires concernant le travail ci-dessus ont été publiés dans *Boll. Soc. Ital. Biol. sper.*, 1950, 26, 722, 1485, 1487, 1490, 1492, 1557; 1951, 27, 7 et 10; et dans *Atti della Accad. Naz. dei Lincei*, 1951, 10, 169.

#### REMERCIEMENTS

Je remercie bien vivement le Prof. M. DUBUISSON pour les facilités qu'il m'a accordées et le Dr HAMOIR, chef de travaux, qui a bien voulu me faire part de ses critiques au cours de la rédaction de ce travail.

Ma gratitude va également au personnel du Laboratoire de Biologie générale qui a contribué aux expériences par une aide technique inappréciable.

#### RÉSUMÉ

Nous avons étudié, par l'électrophorèse, les extraits totaux obtenus aux différentes forces ioniques des muscles suivants: muscles squelettiques de Lapin, blancs et rouges, muscles de Lapin de garenne, myocarde de Lapin et de Cheval, utérus de Lapine et de Génisse, vessie de veau, muscles squelettiques de fœtus de Lapin.

Il existe des liens étroits entre certains aspects de la composition protéinique des divers muscles et leurs propriétés fonctionnelles particulières. En passant des muscles à contraction rapide aux muscles à contraction lente, il s'accomplit une modification très progressive des rapports quantitatifs entre les constituants du groupe du myogène, qui diminuent, et la myoalbumine, qui augmente. Les globulines des muscles lisses diffèrent fortement de celles des muscles striés; celles des muscles squelettiques de fœtus, quoique apparemment très semblables aux myosines  $\alpha$  et  $\beta$  des muscles striés, en diffèrent nettement par leurs mobilités.

*Bibliographie p. 398.*

## SUMMARY

The total extracts obtained by different ionic forces from the following have been studied by means of electrophoresis: white and red skeletal muscles of rabbits, muscles of domestically bred rabbits, myocardia of rabbits and dogs, uterus of female rabbits and heifers, calfs' bladders, and skeletal muscles of foetus of rabbits.

There is a close connection between certain aspects of the proteinic composition of different muscles and their particular functioning properties. In passing from quickly contracting muscles to slowly contracting muscles, a very progressive modification occurs in the quantitative yield between the constituents of the myogen group, which diminish, and the myoalbumin, which increases. The globulins of smooth muscles differ very much from those of striated muscles; those of skeletal muscle of foetus, although apparently very similar to the  $\alpha$ - and  $\beta$ -myosines of striated muscles, differ distinctly in their mobilities.

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Verfasser hat die bei verschiedener Ionenstärke erhaltenen Gesamtextrakte aus den folgenden Muskeln elektrophoretisch untersucht: weisser und roter Skelettmuskel vom Kaninchen, Muskel vom gehegten Kaninchen, Myocard vom Kaninchen und vom Pferd, Uterus vom weiblichen Kaninchen und von der jungen Kuh, Kalbsblase, Skelettmuskel vom Kaninchen-Foetus.

Die verschiedenen Aspekte der Eiweisszusammensetzung und die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen Muskeln hängen nahe zusammen. Wenn man von Muskeln mit rascher Kontraktion zu solchen mit langsamer Kontraktion übergeht, so bemerkt man eine allmähliche Änderung des quantitativen Verhältnisses zwischen den Bestandteilen der Myogengruppe einerseits und dem Myoalbumin andererseits; erstere nehmen ab, letzteres nimmt zu. Die Globuline der glatten Muskeln; diejenigen der Skelettmuskeln vom Foetus ähneln zwar scheinbar stark den  $\alpha$  und  $\beta$ -Myosinen der Skelettmuskeln, unterscheiden sich aber deutlich durch ihre Mobilitäten.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. DUBUISSON, *Les protéines musculaires*. Exposés annuels de Biochimie Médicale, 9ième Série, Paris (1948).
- <sup>2</sup> M. DUBUISSON, *Biol. Reviews*, 25 (1950).
- <sup>3</sup> M. DUBUISSON ET J. JACOB, *Experientia*, 1 (1945) 272; *Bull. Soc. Roy. Sci. Liège*, 14 (1945) 145; *Revue Canadienne de Biol.*, 4 (1945) 426.
- <sup>4</sup> M. DUBUISSON, A. DISTÈCHE, ET A. DEBOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 97.
- <sup>5</sup> G. HAMOIR, *Bull. soc. chim. biol.*, 31 (1949) 118; *Biochem. J.*, 48 (1951) 146.
- <sup>6</sup> M. DUBUISSON ET L. ROUBERT, *Compt. rend. soc. biol.*, 141 (1947) 802.
- <sup>7</sup> J. W. MEHL ET E. L. SEXTON, *Federation Proc.*, 1 (1942) 125.
- <sup>8</sup> W. R. AMBERSON, T. ERDÖS, B. CHINN, ET H. LUDS, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 405.
- <sup>9</sup> M. DUBUISSON, *Experientia*, 3 (1947) 372.
- <sup>10</sup> M. DUBUISSON ET A. DEBOT, *Arch. internat. Physiol.*, 50 (1940) 54.
- <sup>11</sup> D. NEEDHAM MOYLE, *Physiol. Rev.*, 6 (1926) 1.
- <sup>12</sup> G. QUAGLIARIELLO, *Arch. Fisiol.*, 13 (1915) 73.
- <sup>13</sup> H. H. WEBER ET K. H. MAYER, *Biochem. Z.*, 266 (1933) 137.
- <sup>14</sup> P. CREPAX ET A. HÉRION, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 54.
- <sup>15</sup> F. B. STRAUB, *Stud. Inst. Med. chem. Univ. Szeged*, 2 (1942) 3.
- <sup>16</sup> W. F. M. MOMMAERTS, *Arkiv Kemi, Mineral., Geol.*, 19A (1945) 17.
- <sup>17</sup> G. A. MILLIKAN, *Physiol. Rev.*, 19 (1939) 503.
- <sup>18</sup> M. DUBUISSON, *Nature*, 166 (1950) 1116.
- <sup>19</sup> J. KOVÁTS, *Nature*, 163 (1949) 606.
- <sup>20</sup> F. GUBA, *Stud. Inst. Med. chem. Univ. Szeged*, 3 (1943) 40.
- <sup>21</sup> K. B. LEHMANN, *Z. Biol.*, 45 (1904) 324.
- <sup>22</sup> G. BJÖRK, *On myoglobin and its occurrence in man*. Stockholm 1949.
- <sup>23</sup> J. JACOB, *Biochem. J.*, 41 (1946) 83.
- <sup>24</sup> J. W. MEHL, *Biol. Bull.*, 79 (1940) 488; *Proc. Am. Soc. Biol. Chem.*, 32 (1938) LXXXIII.
- <sup>25</sup> A. CSAPO, *Nature*, 162 (1948) 218 et 164 (1949) 702; *Am. J. Physiol.*, 160 (1950) 46; *Acta Physiol. Scand.*, 19 (1950) 100.
- <sup>26</sup> A. CSAPO, T. ERDÖS, ET O. SNELLMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 53.
- <sup>27</sup> H. HERRMANN ET J. S. NICHOLAS, *J. Exptl. Zool.*, 107 (1948) 165.
- <sup>28</sup> P. CREPAX, *Experientia*, 5 (1949) 167.

Reçu le 7 décembre 1951