

50 376
1 978
69-1

Numéro d'ordre : 404

50376
1978
69-1

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

THÈSE

présentée à l'Université de Lille I
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES
OPTION BIOLOGIE CELLULAIRE

par

Hartmut F. HILDEBRAND

**RHABDOMYOSARCOMES ET LEIOMYOSAR-
COMES CHIMIO-INDUITS PAR LE Ni_3S_2
CHEZ LE RAT ET LE LAPIN ET RHABDO-
MYOSARCOME SPONTANÉ HUMAIN**

**Études morphologiques
Études des propriétés ultrastructurales, bio-
chimiques et enzymologiques de la myosine
et de l'actine**



présentée le 27 Janvier 1978 devant la Commission d'Examen

Président : M. M. DURCHON
Rapporteurs : MM. G. BISERTE
R. COUTEAUX
N. VAN THOAI
E. VIVIER
Membres invités : MM. A. DEMAILLE
K.E. WOHLFARTH-BOTTERMANN



D 030 093611 8

Meinen Eltern,

*in liebevoller und dankbarer Achtung für ihre
Aufopferung.*

A ma Femme,

*je lui témoigne ma plus vive affection et lui
suis profondément reconnaissant pour les sacrifices
consentis.*

A toute ma Famille.

A tous mes Amis.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur G. BISERTE dans les services de Biologie Cellulaire et de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille-Institut Jules DRIESSENS.

Il a pu être mené à bien grâce à l'aide financière :

- de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Unité 124 et ATP 30.76.70).
- de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.
- de la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer (opération Espoir).

auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur G. BISERTE nous a fait l'honneur de nous accueillir dans son Institut et de corriger ce travail. Il nous a donné la chance de bénéficier de sa haute compétence scientifique. La confiance qu'il nous a accordée et la gentillesse avec laquelle il nous a dirigé nous ont constamment encouragé dans la réalisation de ce travail. Nous sommes heureux de lui exprimer aujourd'hui notre profonde reconnaissance et notre respectueux et sincère attachement.

Monsieur le Professeur M. DURCHON a bien voulu accepter de présider le Jury de cette thèse. Nous avons toujours bénéficié auprès de lui d'un excellent accueil, de conseils avisés et de la chaleur des contacts humains qu'il rend possible autour de lui. Nous le prions d'accepter le témoignage de notre très vive gratitude.

Monsieur le Professeur R. COUTEAUX nous a fait l'honneur de s'intéresser à ce travail et de juger ce mémoire. Nous le prions d'accepter l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur N. VAN THOAI nous a ouvert les portes de son laboratoire. Nous le remercions vivement des conseils qu'il nous a prodigués et des nombreuses discussions enrichissantes. Nous le prions d'accepter l'expression de notre profonde et respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur E. VIVIER, notre ancien Maître, nous a fait le grand honneur de juger notre thèse. Nous lui sommes reconnaissant de l'excellent accueil et des encouragements qu'il nous a toujours réservés. Nous lui exprimons nos sentiments de très vive gratitude.

Monsieur le Professeur A. DEMAILLE nous a fait le grand honneur de s'intéresser à ce travail. Nous lui sommes reconnaissant pour son encouragement et son soutien dans le choix et le maintien de ce sujet. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur K.E. WOHLFARTH-BOTTERMANN nous a initié à l'étude des mouvements cellulaires et nous a permis d'effectuer dans son laboratoire nos premiers travaux concernant la contraction musculaire. Nous sommes heureux de lui exprimer ici notre profond et respectueux attachement.

Ce travail n'aurait pu être entrepris sans le concours de Monsieur D. DEWALLY qui nous a fourni continuellement le sulfure de nickel, produit selon une méthode mise au point par lui-même. Qu'il veuille accepter nos remerciements les plus sincères.

Ce mémoire est, en partie, le fruit d'un travail mené en équipe. Nous adressons, à cet égard, nos plus vifs remerciements à Messieurs J.P.KERCKAERT, D.TETAERT et X.GRANDIER-VAZEILLE.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées au laboratoire de Biochimie Cellulaire du Collège de France (Laboratoire du Professeur N.VAN THOAI), où nous étions accueilli avec beaucoup de gentillesse. Nous sommes heureux d'exprimer notre reconnaissance à Madame C.ORIOL et à Mademoiselle M.F.LANDON pour leur collaboration étroite et leurs nombreux conseils.

La tumeur humaine a été mise à notre disposition par le Service de Pédiatrie de l'Hôpital Calmette à Lille, que nous remercions vivement, ainsi que le Docteur I.KRIVOSIC dont nous estimons beaucoup ses connaissances en Anatomie Pathologique et dont nous avons apprécié sa collaboration.

Nous adressons nos plus vifs remerciements au Docteur F.BEGUERI de l'Hôpital de Tourcoing, qui a mis à notre disposition le foetus humain.

Enfin, c'est pour nous un plaisir d'associer en une même pensée de reconnaissance Mesdames J.HERNO, D.HETUIN, D.LANTOINE, V.LE COMTE, O.MOREAU, M.TULLIER et S.QUIEF et Monsieur R.DHENNIN pour leur aide technique précieuse et efficace et à Madame M.T.GARET qui s'est chargée de la partie photographique de ce mémoire.

Le tirage et la reliure de cette thèse ont été assurés et entièrement pris en charge par les Laboratoires SUBSTANTIA à Courbevoie. Messieurs C.SOIX et JC DEVE ont sacrifié un temps précieux pour l'achèvement correct et rapide de ce mémoire. Nous les prions d'accepter notre profonde reconnaissance.

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER
DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE
KAMPE DE FERIET, KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT,
MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARO, WATERLOT, WIEMAN,
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. M. MIGEON.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Jean	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie

Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
Mme DACHARRY Monique	Géographie
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale

MAITRES DE CONFERENCES (Et Chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie

M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BOSCO Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie
M.	CARREZ Christian	Informatique
M.	COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	COUTURIER Daniel	Chimie Organique
M.	CRAMPON Norbert	Géologie
M.	CROSNIER Yves	Electronique
M.	DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M.	DEGAUQUE Pierre	Electronique
M.	DELORME Pierre	Physiologie Animale
M.	DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M.	DHAINAUT André	Biologie Animale
M.	DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M.	DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M.	DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M.	DUBOIS Henri	Physique
M.	DUEE Gérard	Géologie
M.	DYMENT Arthur	Mécanique
M.	ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M.	FAKIR Sabah	Algèbre
M.	FLAMME Jean-Marie	Technologie de Construction
M.	FOCT Jacques	Génie Mécanique
M.	FONTAINE Hubert	Physique
M.	FONTAINE Jacques	Electronique
M.	FOURNET Bernard	Biochimie
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GERVAIS Michel	Gestion des Entreprises
M.	GOBLOT Rémi	Algèbre
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	JACOB Gérard	Informatique
M.	JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
M ^{le}	LEGRAND Denise	Algèbre
M ^{le}	LEGRAND Solange	Algèbre
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF René	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M.	MACKE Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MIGNOT Fulbert	Analyse Numérique
M.	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	NOTELET Francis	Electrotechnique
M.	NUSSEMBAUM Maurice	Sciences Economiques
M.	PARSY Fernand	Mécanique
M.	PAUPARDIN Colette	Biologie Physiologie Végétales
M.	PECQUE Marcel	Chimie Physique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PETIT Francis	Chimie Organique
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie

M^{lle} SPIK Geneviève
M. STANKIEWICZ François
M. STERBOUL François
M. TAILLEZ Roger
M. THERY Pierre
M. TOP Gérard
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILLETTE Michel
M. WALLART Francis
M. WERNER Georges
M^{me} ZIN-JUSTIN Nicole

Biochimie
Sciences Economiques
Informatique
Biologie
Electronique
Sciences Economiques
Automatique
Sociologie
Chimie Minérale
Mécanique
Chimie
Informatique
Algèbre

ABBREVIATIONS.

A	Actine.
ADP	Adénosine-diphosphate.
A•M	Actomyosine.
A•M*	Conformation énergétisée de l'actomyosine.
AS	Activité spécifique.
ATP	Adénosine-triphosphate.
ATPase	Adénosine-triphosphatase.
DEAE	Diéthylaminoéthyl.
DNA	Acide desoxyribonucléique.
D.O.	Densité optique.
DTNB	Acide 5,5'dithio-bis-(2-nitrobenzoïque).
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique.
EGTA	Acide éthylène glycol tétraacétique.
HC	Chaînes lourdes de la myosine.
H.E.	Hémalun-Eosine.
HMM	Méromyosine lourde.
HMM-S ₁	Sous-fragment globulaire de la HMM.
HMM-S ₂	Sous-fragment hélicoïdal de la HMM.
I	Force ionique.
LC(L)	Chaînes légères de la myosine.
LC(P)	Phosphorylase des chaînes légères de la myosine.
LMM	Méromyosine légère.
M	Myosine
M*	Conformation énergétisée de la myosine.
M•ATP	Complexe Myosine-ATP.
min	minute.
mM	10 ⁻³ moles par litre.
µm	micromètre = 10 ⁻⁶ mètre.
nm	nanomètre = 10 ⁻⁹ mètre.
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide.
P.A.S.	Réaction de l'acide periodique de Schiff.
P _i	Phosphore inorganique.
P.M.	Poids moléculaire.
RNA	Acide ribonucléique.
SDS	Dodecyl sulfate de sodium.

TM Tropomyosine.
TN-C Facteur de la troponine liant le Ca^{2+} .
TN-I Facteur inhibiteur de la troponine.
TN-I (P) Phosphorylase de la TN-I.
TN-T Facteur de la troponine fixé sur la tropomyosine.
Tris Tris hydroxy méthyl amino méthane.
U.V. Lumière ultra-violette.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
<u>I. LA CANCEROGENESE CHIMIQUE</u>	6
A. LA CANCEROGENESE PAR LES AGENTS CHIMIQUES ORGANIQUES	7
1. Les dérivés du goudron.	7
2. Les hormones et stéroïdes.	8
3. Les agents alcoylants.	8
4. Substances organiques diverses.	9
B. LA CANCEROGENESE PAR AGENTS CHIMIQUES MINERAUX	9
1. Les agents chimiquement inertes.	9
2. Les silicates.	10
3. Substances métalliques.	10
a. <i>L'arsenic.</i>	10
b. <i>L'aluminium.</i>	10
c. <i>Le béryllium.</i>	11
d. <i>Le cadmium.</i>	11
e. <i>Le chrome.</i>	11
f. <i>Le cobalt.</i>	11
g. <i>Le fer.</i>	15
h. <i>Le plomb.</i>	15
i. <i>Le zinc et l'étain.</i>	15
j. <i>Autres métaux cancérogènes.</i>	16
k. <i>Les dérivés métalliques co-cancérogènes.</i>	16

C. LA CANCEROGENESE PAR LE NICKEL	16
1. Le nickel métallique.	17
2. Les sulfures de nickel.	17
3. Les autres dérivés minéraux du nickel.	18
4. Remarques.	19
II. <u>LE MUSCLE</u>	22
A. LA MORPHOLOGIE DU MUSCLE NORMAL	22
1. Le muscle strié squelettique.	22
2. Le muscle strié cardiaque.	25
3. Le muscle lisse.	27
4. Le système contractile non-musculaire.	29
B. LA MORPHOLOGIE DU MUSCLE PATHOLOGIQUE	33
1. Les myopathies humaines.	33
2. Les myopathies animales.	35
3. Le muscle cancéreux.	35
C. LES PROTEINES CONTRACTILES DU MUSCLE	39
1. Les protéines du filament épais.	39
a. <i>La myosine.</i>	39
b. <i>La C-protéine.</i>	41
c. <i>Les M-protéines.</i>	42
2. Les protéines du filament fin.	42
a. <i>L'actine.</i>	42
b. <i>La tropomyosine.</i>	42
c. <i>La troponine.</i>	44
3. Les autres protéines contractiles.	44

4. Les activités ATPasiques de la myosine.	45
a. <i>L'activité ATPasique Ca^{2+} dépendante.</i>	46
b. <i>L'activité ATPasique Mg^{2+} dépendante.</i>	47
c. <i>L'activité ATPasique dépendante des ions monovalents.</i>	47
5. Les modifications des protéines contractiles.	47
a. <i>Les modifications selon les organes.</i>	47
b. <i>Les modifications d'ordre spécifique.</i>	48
c. <i>Les modifications physiologiques.</i>	48
D. LA CONTRACTION MUSCULAIRE	50
1. Le processus mécanique.	50
2. Le processus biochimique.	52
a. <i>Mécanisme de l'activité ATPasique de la myosine.</i>	52
b. <i>Régulation de la contraction par le Ca^{2+}.</i>	56
III. <u>PROBLEMES POSES</u>	59
MATERIEL ET METHODES	61
I. <u>MATERIEL</u>	62
II. <u>METHODES</u>	64
A. OBTENTION DES TUMEURS	64
1. Caractérisation du sous-sulfure de nickel, Ni_3S_2 .	64
2. Induction des tumeurs.	64

B. ETUDES MORPHOLOGIQUES	65
1. Microscopie photonique.	65
2. Microscopie électronique.	65
a. <i>Fixation et inclusion.</i>	65
b. <i>Contraste négatif.</i>	66
C. ETUDE DE LA CONTRACTION DES MYOBLASTES TUMORAUX	66
D. ETUDES DES PROTEINES CONTRACTILES	67
1. Préparations et purifications de la myosine et de l'actine.	67
a. <i>Préparation de la myosine.</i>	67
α Myosines adulte et foetale.	67
β Myosine tumorale.	68
γ Purification par chromatographie d'échanges d'ions sur DEAE-Séphadex A.50.	68
b. <i>Préparation de la HMM.</i>	70
c. <i>Préparation de l'actine.</i>	71
α Préparation de la "poudre" acétonique.	71
β Extraction de l'actine.	71
γ Purification par cycle de dépolymérisation-repolymérisation.	72
2. Spectrophotométrie ultraviolette.	72
3. Etude ultrastructurale des filaments.	72
a. <i>Les myosines.</i>	75
b. <i>Les actines.</i>	75
c. <i>Actine-HMM.</i>	75
4. Etude électrophorétique sur gel de polyacrylamide.	76
a. <i>En présence de SDS.</i>	76
b. <i>En présence d'urée à pH alcalin.</i>	77
5. Détermination de la concentration en protéine.	77
6. Les activités ATPasiques.	78
a. <i>Activité de la Ca²⁺ATPase.</i>	78
b. <i>Activité de la Mg²⁺ATPase.</i>	79
c. <i>Dosages du phosphore inorganique.</i>	79
7. Dichroïsme circulaire.	80

RESULTATS

82

I. <u>LE RHABDOMYOSARCOME CHIMIO-INDUIT PAR LE Ni₃S₂ CHEZ LE RAT WISTAR</u>	83
A. ETUDE MACROSCOPIQUE	83
B. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	83
C. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	84
1. Les rhabdomyoblastes immatures.	85
2. Le premier stade de différenciation.	85
3. Le deuxième stade de différenciation.	85
4. Les fibres musculaires.	86
5. Les stries Z.	87
6. Le système T et le réticulum sarcoplasmique.	88
7. Les mitochondries.	89
8. Les noyaux.	90
9. La formation de cils.	90
10. Autres éléments particuliers.	92
D. LA TUMEUR GREFFEE	93
E. DISCUSSION	94
II. <u>LE RHABDOMYOSARCOME CHEZ LE LAPIN.</u>	103
A. ETUDE MACROSCOPIQUE	103
B. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE	103
C. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	104
1. Aspect général.	104
2. Les structures paracrystallines.	106
D. DISCUSSION	106

III. <u>LE LEIOMYOSARCOME CHEZ LE LAPIN</u>	108
A. ETUDE MACROSCOPIQUE	108
B. ETUDE HISTOLOGIQUE	109
1. La tumeur.	109
2. La coque d'inclusion du Ni ₃ S ₂ .	109
C. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	109
1. Les petites cellules fusiformes.	109
2. Les cellules allongées du muscle lisse.	110
3. Les structures fibrillaires.	110
4. Les noyaux.	110
5. Les mitochondries.	111
6. Le réticulum endoplasmique.	111
7. Les jonctions cellulaires.	111
8. L'appareil de Golgi et les vésicules dentelées.	112
9. La coque d'inclusion du Ni ₃ S ₂ .	112
D. DISCUSSION	114
IV. <u>ETUDES RELATIVES A LA CONTRACTION DES RHABDOMYOBLASTES.</u>	119
A. EXPERIENCES D'EXTRACTION GLYCERINIQUE	119
B. EXPERIENCES DE CONTRACTION	120
C. DISCUSSION	120
V. <u>ETUDE COMPARATIVE DES MYOSINES NORMALES, FOETALES ET TUMORALES DU RAT ET DU LAPIN</u>	122
A. EXTRACTION ET PURIFICATION	122

1. Myosine précipitable à pH 6,8.	122
2. Fraction précipitable à pH 5,0.	123
3. Purification par chromatographie sur DEAE-Séphadex A.50.	123
 B. ASPECT ULTRASTRUCTURAL DES FILAMENTS SYNTHETIQUES DES DIFFERENTES MYOSINES	 124
1. Les myosines normales.	124
2. Les myosines foetales.	126
3. Les myosines tumorales.	126
<i>a. Les myosines précipitables à pH 6,8.</i>	126
<i>b. La fraction précipitable à pH 5,0.</i>	127
 C. ETUDE DE LA COMPOSITION EN CHAINES LEGERES DES DIFFERENTES MYOSINES	 127
1. Electrophorèse en présence de SDS.	128
2. Electrophorèse en présence d'urée à pH alcalin.	130
 D. LES ACTIVITES ATPasiques.	 131
1. L'activité de la Ca ²⁺ ATPase.	132
2. L'activité de la Mg ²⁺ ATPase.	137
 E. DISCUSSION	 139
 VI. <u>ETUDES DES ACTINES NORMALES ET TUMORALES DU RAT</u>	 147
 A. EXTRACTION ET PURIFICATION	 147
 B. ETUDES PHYSICOCHEMIQUES	 147
1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.	147
<i>a. L'actine.</i>	147
<i>b. Les autres protéines du filament fin.</i>	148
2. Etudes physicochimiques par dichroïsme circulaire.	150

C. ASPECT ULTRASTRUCTURAL DES FILAMENTS D'ACTINE	152
1. Les actines purifiées.	152
2. Comportement des actines en présence de HMM.	152
D. DISCUSSION	153
VII. <u>LE RHABDOMYOSARCOME HUMAIN</u>	156
A. OBSERVATIONS CLINIQUES ET MACROSCOPIQUES	157
B. ETUDES HISTOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DE LA TUMEUR PRIMITIVE	157
1. Etudes histologiques.	157
2. Etudes en microscopie électronique.	158
C. ETUDES HISTOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DE LA RECIDIVE TUMORALE	158
1. Etudes histologiques.	158
2. Etudes en microscopie électronique.	159
a. <i>Les structures fibrillaires.</i>	159
b. <i>Les noyaux.</i>	160
c. <i>Le réticulum sarcoplasmique.</i>	160
D. ETUDES DES MYOSINES TUMORALE ET FOETALE HUMAINES	160
1. Etude ultrastructurale des filaments synthé- tiques.	161
2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.	161
3. L'activité de la Ca ²⁺ ATPase.	162
E. DISCUSSION	163
CONCLUSIONS GENERALES	165
BIBLIOGRAPHIE	170

I N T R O D U C T I O N

Le rhabdomyosarcome a été reconnu comme une tumeur très maligne et relativement fréquente du muscle strié et peut apparaître chez l'Homme spontanément à n'importe quel âge. Mais la plupart des cas ont été observés chez des enfants (Dito et Batsakis, 1962; Mahour *et al.*, 1967; Bale et Reye, 1975; Weichert *et al.*, 1976).

Les premières études du rhabdomyosarcome ont été limitées à des descriptions cliniques et histologiques de la tumeur. Depuis que l'on sait que plusieurs agents peuvent induire le rhabdomyosarcome, des études ultrastructurales ont été entreprises dans le but d'analyser les similitudes et les différences entre la multiplication et la différenciation du muscle pathologique et du muscle normal (muscle foetal, muscle en régénération, cellules musculaires *in vitro*) (Friedman et Bird, 1969; Reznik *et al.*, 1970; Bruni et Rust, 1975).

Chez les animaux, le rhabdomyosarcome peut apparaître spontanément ou après induction avec le "Moloney Sarcoma Virus" (Moloney, 1966; Lasneret, 1967; Perk *et al.*, 1968), après une infection avec des microsporidies (Petri, 1968) ou après implantations de substances organiques (Saxen, 1953; Schlumberger et Zack, 1959; Allen *et al.*, 1975). Mais les morphologistes et biochimistes préfèrent aux modèles indiqués ci-dessus l'induction par injection intramusculaire de métaux purs comme le Nickel, le Cuivre, le Zinc et le Cadmium et différents sels de ces métaux (Gilman, 1965; Friedman et Bird, 1969; Basrur *et al.*, 1970; Sunderman *et al.*, 1974; Bruni et Rust, 1975). D'après Gilman (1965), le sous-sulfure de Nickel, Ni_3S_2 , est l'agent le plus spécifique qui provoque au bout de 170 à 200 jours des rhabdomyosarcomes chez 75 à 80 % des animaux (Rats) soumis à l'expérimentation.

La majeure partie des études effectuées sur les rhabdomyosarcomes concerne la morphologie et l'ultrastructure de ces tumeurs. Les travaux s'intéressant à la cytochimie et à l'aspect biochimique de ces tumeurs sont encore très peu importants.

Nos recherches sur le rhabdomyosarcome chimio-induit par le Ni_3S_2 s'inscrivent, dans un premier temps, en prenant le Rat Wistar comme animal d'expérimentation. Par la suite, nous avons effectué l'induction des tumeurs musculaires chez le Lapin parce que les études chimiques et biophysiques actuellement menées sur les protéines contractiles, prennent comme référence le muscle blanc du Lapin, qui est un muscle très homogène. Le muscle du Rat, par contre, est hétérogène et constitué de muscles rouge et blanc.

Mises à part les différences morphologiques entre le rhabdomyosarcome et le muscle normal, un des caractères les plus remarquables de la tumeur est son "immobilité". En effet, bien que les rhabdomyoblastes mis en culture se différencient et développent une striation transversale, ils ne montrent pratiquement aucune mobilité, ni contraction. Celles-ci sont, par contre, bien observées pour les myoblastes du muscle embryonnaire ou néo-natal différencié *in vitro* (Gilman, 1965).

L'étude des problèmes de structure et d'organisation macromoléculaire des protéines contractiles, apparaît donc essentielle pour une meilleure compréhension de l'absence des fonctions métaboliques de la contraction dans les tumeurs musculaires. Dans cette perspective nous avons cherché, après une étude morphologique, à définir par des techniques ultrastructurales et physico-chimiques la nature des protéines contractiles tumorales. Nous avons tenté d'apporter quelques précisions sur leur participation au phénomène de la contraction. Dans notre thèse nous avons consacré un chapitre aux connaissances actuelles de la cancérogénèse chimique, à la morphologie générale du muscle normal et pathologique, aux définitions des protéines contractiles et aux hypothèses concernant la contraction musculaire.

Les résultats que nous avons obtenus et que nous exposons dans ce travail, ont fait en partie l'objet des publications suivantes :

- M.F.LANDON, H.F.HILDEBRAND et C.ORIOL (1975).
Poster : Native Conformation of M-Protein.
10th Meeting of Federation of European Biochemical Societies.
(FEBS) Paris.

- H.F.HILDEBRAND et G.BISERTE (1976).
Etudes ultrastructurales et biochimiques du rhabdomyosarcome chimio-induit chez le Rat et le Lapin.
Journées du Muscle, Montpellier, 16-17 Septembre 1976.

- C.ORIOL, M.F.LANDON et H.F.HILDEBRAND (1977).
Physico-chemical studies of Straub- and KI-Actin.
Cytobiologie, 14, 350-361.

- H.F.HILDEBRAND et G.BISERTE (1977).
Ultrastructural investigations of Ni₃S₂-induced rhabdomyosarcoma in Wistar-Rat.
Comparative study with emphasis on myofibrillar differentiation and cilial formation.
Cancer, sous presse.

- H.F.HILDEBRAND et G.BISERTE .
Nickel-sulfid-induced leiomyosarcoma in Rabbit white skeletal muscle.
A light micorscopolical and ultrastructural study.
Cancer, soumis pour publication.

- H.F.HILDEBRAND, J.P.KERCKAERT, G.BISERTE, D.TETAERT et X.GRANDIER-VAZEILLE. (1977).
Poster : Comparative ultrastructural and biochemical studies of adult, foetal and tumoral myosins of Rat and Rabbit skeletal muscle.
6th Meeting of the European Muscle Club, Saclay, 29-30 Septembre 1977.

Nous avons, en outre, collaboré à d'autres travaux qui ne s'inscrivent pas directement dans le cadre de ce mémoire, mais s'adressent à l'étude des myosines :

- H.F.HILDEBRAND et D.TETAERT (1976).
Etude du filament épais du muscle lisse ABRM et PBRM de la Moule *Mytilus edulis*.
Journées du Muscle, Montpellier, 16-17 Septembre 1976.

- D.TETAERT, O.MOREAU, K.K.HAN, H.F.HILDEBRAND et G.BISERTE (1977).
Isolement et caractérisation de la chaîne légère "L₁₇" de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache.
Biochimie, 59, 337-339.

GENERALITES

I LA CANCEROGENESE CHIMIQUE

La cancérogénèse par substances chimiques présente un double intérêt : clinique et biologique.

Par des observations cliniques, on a depuis longtemps constaté que certains agents chimiques peuvent provoquer des cancers. En effet, on connaît de nombreux cas de cancers propres à certaines professions ou industries comme en particulier les cancers des mineurs, les cancers des industries arsénicales et des minerais, et les cancers des ouvriers en contact avec le goudron et ses dérivés. Mais depuis qu'on a formulé des réglementations professionnelles, leur fréquence est sensiblement réduite. Cependant, nous connaissons la " cancérogénèse d'environnement" (Hueper, 1963); les cliniciens ont fait connaître également les dangers non seulement de l'alcool et du tabac, mais aussi des gaz d'échappement des voitures, et des insecticides dans l'apparition des tumeurs.

L'utilisation des agents chimiques cancérogènes est fondamentale en cancérologie expérimentale. Les avantages sont importants car les agents chimiques permettent d'obtenir facilement des cancers portant sur un organe, un tissu ou un type cellulaire précis choisis à l'avance, et dont on a des équivalents normaux. Enfin, ces agents chimiques permettent non seulement de provoquer l'apparition et le développement d'une tumeur et d'en suivre l'évolution naturelle, mais aussi de préciser son action sur les constituants cellulaires *in vitro*. C'est donc à partir de l'utilisation des agents cancérogènes que se sont édifiées la plupart des grandes théories de la cancérogénèse.

En fait, sous le titre de cancérogénèse chimique, il semble bien que l'on soit amené à étudier des faits très disparates. En effet, le premier point qui frappe au cours de cette analyse est le nombre et surtout la diversité des agents cancérogènes chimiques. Nous allons donc, dans un premier temps, citer brièvement les agents cancérogènes chimiques et essayer de les classer par groupes.

A. LA CANCEROGENESE PAR LES AGENTS CHIMIQUES ORGANIQUES.

Les dérivés organiques sont, de très loin, les agents chimiques cancérogènes les plus nombreux et généralement considérés aussi comme les plus intéressants.

1. Les dérivés du goudron.

L'histoire de la cancérogénèse chimio-induite commence par des constatations tant cliniques qu'expérimentales et, dans tous les cas, les dérivés du goudron méritent bien d'être placés en tête de liste des agents cancérogènes. Les substances cancérogènes contenues dans le goudron sont tellement multiples que nous n'en citerons seulement que quelques unes parmi les principales familles qui ont été étudiées (Gelboin, 1967).

Les premières substances isolées ont été les dérivés du *1,2-benzanthracène*, lui-même faiblement cancérogène. Mais nous connaissons en particulier l'activité puissante du *3,4-benzopyrène*. D'autres hydrocarbures polycycliques ont été isolés, dont les propriétés cancérogéniques varient selon leur formule. Ainsi, le *5,9,10-triméthyl-1,2-benzanthracène* est plus actif que le dérivé *9,10-diméthylé*. Le *20-méthyl-cholanthrène*, un benzanthracène trisubstitué en 5,6,10 est un des cancérogènes les plus puissants et les plus rapides dans son action.

D'autres hydrocarbures polycycliques sont des dérivés du *3,4-benzophénanthrène*. Parmi les cancérogènes les plus puissants de cette famille, il faut citer le *1,2-diméthyl-3,4-benzophénanthrène*, le *1,2,3,4-dibenzophénanthrène*, le *5,6-diméthylchrysène* et le *1,2,3,4-tetra-méthylphénanthrène*.

Parmi les homologues contenant de l'azote ou du soufre, il faut surtout citer le 1,2,5,6-dibenzachridine, le 1,2,5,6-dibenzocarbazole et la 2-naphtylamide, cette dernière provoquant les cancers de la vessie chez les travailleurs de l'industrie des colorants. D'autres colorants se classant dans la famille des dérivés azotiques, sont des agents cancérigènes connus depuis longtemps. Parmi ceux-ci, le 3-méthyl-4-diméthyl-amino-azobenzène ou "jaune de beurre" permet d'obtenir des hépatomes malins avec une grande fréquence et une grande reproductibilité chez le Rat et chez la Souris (Jervell *et al.* 1965).

Il faut mentionner aussi la famille des fluorènes, dont le N-2-acétyle-aminofluorène, le N-acétoxy-N-2-acétyle-aminofluorène et leurs dérivés fluorés et iodés sur le carbone 7, ont été reconnus comme des cancérigènes puissants (Cramer *et al.* 1960). L'action de ces agents sur le DNA a été particulièrement bien étudiée ces dernières années par Fuchs *et al.* (1976).

2. Les hormones et stéroïdes.

L'action cancérigène de cette famille d'hydrocarbures polycycliques a été mise en évidence par Conney et Klutsch (1963) qui provoquent des hépatomes chez le Rat par administration d'oestrogènes et de testostérone. De même les oestrogènes synthétiques comme le diéthyl-stilboestrol sont reconnus généralement comme agents chimiques cancérigènes.

3. Les agents alcoylants.

Il s'agit là d'agents cancérigènes particulièrement intéressants, puisque les agents alcoylants sont aussi des anti-mitotiques fort utilisés dans le traitement des tumeurs malignes et surtout des leucémies (Mathé et Amiel, 1963). Il semble en effet que la plupart d'entre eux, comme les moutardes à l'azote, les esters sulfoniques etc. puissent être cancérigènes.

4. Substances organiques diverses.

Nous en arrivons à un paragraphe, où des substances de formules très diverses se trouvent rassemblées artificiellement. Il n'a pas encore été trouvé de fil conducteur satisfaisant permettant de les classer, soit par leur parenté chimique, soit par leurs modes d'action. Parmi elles, il faut citer les dérivés du 4-amino-stilbène, qui peuvent soit inhiber la croissance de certaines tumeurs, soit en induire à leur point d'injection. L'uréthane peut provoquer des cancers du poumon chez la Souris. Le bleu trypan et le triphényléthylène sont aussi cancérogènes. Certains dérivés du cholestérol et le cholestérol lui-même se sont, eux aussi, révélés cancérogènes.

B. LA CANCEROGENESE PAR AGENTS CHIMIQUES MINERAUX.

De nombreuses substances inorganiques peuvent être citées pour leur action cancérogène lorsqu'elles sont administrées par voie parentérale. Nous ne parlerons pas des substances radioactives dont l'action cancérogène se rattache à une émission de rayonnements corpusculaires, et nous ne citerons que quelques exemples des principaux cancérogènes inorganiques reconnus.

1. Les agents chimiquement inertes.

Parmi les substances cancérogènes existent certains composés qui méritent à peine d'être rangés parmi les corps chimiques cancérogènes, car il semble que leur action relève beaucoup plus de propriétés physiques que d'un mécanisme chimique (Seyle *et al.* 1962). L'implantation sous-cutanée de corps chimiquement inertes de nature très variée : tissu, poudre, éponge, plastique, ivoire ou métaux nobles, peut entraîner la formation de sarcomes chez le Rat. Parmi ces produits, il faut également citer l'amiante dont l'action est plutôt physique que chimique dans la gène de mésothéliomes après injection intrapéritonéale ou de tumeurs pulmonaires après inhalation. On sait également que les fibres d'amiante ont un plus grand pouvoir cancérogène que la poudre

(Harrington *et al.*, 1967; Engelbrecht et Burger, 1973; Shabad *et al.*, 1974; Stanton, 1974). Il reste certainement beaucoup de recherches à faire pour élucider le mécanisme de la génèse des tumeurs de ce type, mais il est déjà évident que la taille et la forme des corps implantés interviennent de façon précise.

2. Les silicates.

Depuis *peu* de temps on sait que certains silicates comme le talc peuvent être cancérogènes (Pelfrene et Shubik, 1975) et de nombreux cas de cancers gastriques ont été observés au Japon parmi des gens ayant consommé des quantités considérables de riz contaminé par le talc (Matsudo *et al.* 1974).

3. Substances métalliques.

De nombreux métaux, leurs oxydes et leurs sels, sont reconnus comme étant des cancérogènes souvent puissants. (Tabl.I.)

a) *L'arsenic.*

L'arsenic a été la première substance chimique pure identifiée comme possédant un pouvoir cancérogène (Truhaut, 1949). L'arsenic, et en particulier ses dérivés comme l'arsénate de sodium et de plomb provoquent des carcinomes multiples (Minkovitz, 1964), des tumeurs du poumon (Hueper, 1967), de la peau (Roe et Lancaster, 1964) ou du foie (Rengelsson *et al.*, 1968).

b) *L'aluminium.*

L'aluminium est un métal peu cancérogène, néanmoins expérimentalement, on a pu induire des sarcomes par implantations sous-cutanées d'aluminium métallique (O'Gora et Brown, 1967) ou par injections du complexe dextran-aluminium (Haddow et Horning, 1960).

c) *Le béryllium.*

Reeves et ses collaborateurs (1966, 1967 a et b) ont présenté une revue générale de la cancérogénèse pulmonaire par le béryllium. Ces cancers du poumon ont été induits chez beaucoup d'animaux, y compris les Singes, par l'administration de différents sels de béryllium par des voies très diverses. D'autres auteurs signalent l'apparition d'ostéosarcomes après injections intraveineuses de ces différents sels (Komitowski, 1968; Matsuura, 1974).

d) *Le cadmium.*

Le cadmium et ses sels sont des cancérogènes redoutables (Haddow *et al.*, 1964; Roe *et al.*, 1964; Lucis *et al.*, 1972). Ils provoquent des néoplasmes des cellules interstitielles des testicules (Guthrie, 1964; Kar *et al.*, 1964; Roe *et al.*, 1964; Lucis *et al.*, 1972; Reddy *et al.*, 1973) et des rhabdomyosarcomes (Daniel *et al.*, 1967; Heath et Webb, 1967; Webb *et al.*, 1972). Le pouvoir cancérogène du cadmium a été également démontré sur des cellules (Daniel *et al.*, 1974) et des tissus (Weinzierl et Webb, 1972) *in vitro*.

e) *Le chrome.*

L'action cancérogène du chrome porte essentiellement sur le poumon et l'oxyde de chrome, Cr_2O_3 , provoque des sarcomes pulmonaires par injections intrapleurales ou intrapéritonéales ou par simple inhalation (Dvizhkov et Federova, 1967). Hueper (1955) a démontré après des expériences répétées sur des Rats, des Souris, des Cobayes, des Lapins et des Chiens que les composés hexavalents et trivalents du chrome possèdent un pouvoir cancérogène considérable.

f) *Le cobalt.*

Le cobalt provoque en général des tumeurs malignes à l'endroit de l'injection ou de l'implantation. Ainsi on obtient des ostéosarcomes après implantation dans le fémur du Lapin

Tableau I : Apparition de tumeurs induites par des substances chimiques minérales.

Substance	Administration	Sujets	Tumeurs induites	Auteurs
ALUMINIUM				
-métallique	sous-cutanée	Rat	sarcomes de tous les tissus et organes	O'Gora et Brown,1967
-dextran	inhalation	Hamster	fibromes pulmonaires	Stenbäck <u>et al.</u> ,1973a
ARSENIC	injections	Souris	sarcomes aux sites d'injection	Haddow et Horning,1960
-solution de Fowler	orale	Homme	kératoses, néoplasmes	Minkovitz,1964
-arsénite de potassium	orale	Homme	sarcome hémangoendothélial du foie	Rengelson,1968
-métallique	inhalation	Homme	tumeurs pulmonaires	Hueper,1963,1967
-arsénate de sodium	inhalation	Homme	tumeurs de la peau, du poumon	Hueper,1967
-arsénate de plomb	orale	Homme	tumeurs de la peau, du poumon	Roe et Lancaster,1964
BERYLLIUM				
-métallique	inhalation	Homme	tumeurs pulmonaires	Reeves,1966
-oxyde	intraveineuse	Lapin	ostéosarcomes	Komitowski,1968
-sulfate	inhalation	Rat	adénocarcinomes	Reeves et Vorwald,1967
-carbonate	intraveineuse	Lapin	ostéosarcomes	Reeves <u>et al.</u> ,1967
-acétate	"	"	"	Matsuura,1974
-acétylacétonate	"	"	"	"
-laurate	"	"	"	"
-stéarate	"	"	"	"
-silicate	intramédullaire	Lapin	ostéosarcomes du tibia	Tapp,1966
CADMIUM				
-métallique	intramusculaire	Rat	rhabdomyosarcomes (RMS)	Heath et Webb,1967;Webb <u>et al.</u> , 1972
-sulfate	sous-cutanée	Rat	néoplasmes testiculaires	Haddow <u>et al.</u> ,1964
-chlorure	sous-cutanée	Rat	néoplasmes testiculaires	Lucis <u>et al.</u> ,1972
	intratesticulaire	Coquelet	néoplasmes testiculaires	Guthrie,1964



Substance	Administration	Sujets	Tumeurs induites	Auteurs
CHROME -métallique -oxyde Cr ₂ O ₃	inhalation	Homme	tumeurs pulmonaires	Roe et Lancaster, 1964
	inhalation	Rat	sarcomes pulmonaires	Dvizhkov et Federova, 1967
	intrapleurale	"	"	"
	intrapéritonéale	"	"	"
-composés trivalents et hexavalents	parentérale	Rat, Souris, Cobaye, Lapin, Chien	sarcomes de tous les tissus	Hueper, 1955
COBALT -métallique	intramusculaire	Rat	rhabdomyosarcomes (RMS)	Webb <u>et al.</u> , 1964; Heath <u>et al.</u> , 1967
	intrathoracique	Rat	RMS, fibrosarcomes, sarcomes pulmonaires	Heath <u>et al.</u> , 1967
	intrafémurale	Lapin	ostéosarcomes	Heath, 1960
	inhalation	Rat	sarcomes pulmonaires, RMS	Gilman et Ruckerbauer, 1962
-oxyde	intramusculaire	Rat	RMS	"
FER -dextran -oxyde Fe ₂ O ₃	intramusculaire	Rat, Lapin	sarcomes aux points d'injection	Haddow et Horning, 1960
	intramusculaire	Homme, Rat, Lapin	"	"
NICKEL -métallique	inhalation	Homme	sarcomes : poumon, sinus, larynx RMS	Hueper, 1963; Pedersen <u>et al.</u> , 1973
	parentérale	Rat, Souris Lapin	RMS, sarcomes : poumon, sinus, larynx; fibrosarcomes, ostéo- sarcomes.	Hueper, 1955, 1963; Heath et Daniel, 1964; Webb <u>et al.</u> , 1964; Daniel <u>et al.</u> , 1967; Heath et Webb, 1967; Heath <u>et al.</u> , 1967; Gilman, 1965; Furst <u>et al.</u> , 1972; Webb <u>et al.</u> , 1972.
	inhalation	Rat	sarcomes pulmonaires, RMS, fibrosarcomes.	Ottolenghi <u>et al.</u> , 1974
-sous-sulfure, Ni ₃ S ₂	intramusculaire	Rat, Souris Lapin	RMS, fibrosarcomes, tumeurs mésenchymales	Hueper, 1955; Gilman, 1965; Daniel, 1966.
	intrapéritonéale	Rat	granulomes	Gilman, 1965.



Substance	Administration	Sujets'	Tumeurs induites	Auteurs
-oxyde, NiO	intramusculaire	Rat, Souris	RMS, fibrosarcomes (FS), tumeurs mésenchymales (TM)	Gilman, 1965
-sulfate	"	"	"	"
-fluorure	"	"	RMS, FS, TM.	"
-monosulfure	"	"	"	"
-acétate	"	Souris	RMS, FS, TM.	"
-carbonate	"	Rat, Souris	"	"
-hydroxyde	"	"	"	"
-disulfure	"	"	"	"
-carbonyle	intraveineuse	Rat	sarcomes de tous les tissus	Lau et al., 1972
	inhalation	Rat	sarcomes du poumon et du sinus	Sunderman et Donnelly, 1965
PLOMB				
-métallique	inhalation	Rat, Singe	Tumeurs pulmonaires	Griffin et al., 1975
-oxyde	intratrachéale	Hamster	Adénomes, adénocarcinomes pul- monaires.	Kobayashi et Okamoto, 1974
-acétate	orale (régime)	Rat	Tumeurs malignes dans divers organes	Zawirska et Medras, 1968
-nitrate	intubation	Grenouille	Tumeurs malignes dans divers organes	Duryce, 1969
ZINC				
-chlorure	orale (eau)	Souris	Tumeurs malignes dans tous les tissus	Halme et Halme, 1969; Halme, 1969
	intraveineuse	Poulet	Dégénérescence maligne des tes- ticules	Maskar, 1972.
	intratesticulaire	Coquelet	Tératomes testiculaires	Guthrie, 1964
HAFNIUM				
-oxychlorure	intradermale	Souris	dysplasies du cartilage	Shelley, 1973
ZIRCONIUM				
-chlorure	intradermale	Souris	dysplasies du cartilage	Shelley, 1973
AMIANTE	inhalation	Rat	mésoteliomes	Harrington et al., 1967; Engel- brecht et Burger, 1973; Shabad et al., 1974; Stanton, 1974.
	intrapéritonéale	"	"	"
	intrapleurale	"	"	"



(Heath, 1960), des rhabdomyosarcomes après injections intramusculaires (Heath, 1960; Gilman, 1962; Gilman et Ruckerbauer, 1962; Heath *et al.*, 1969) et des sarcomes pulmonaires et rhabdomyosarcomes après inhalation d'oxyde de cobalt (Gilman et Ruckerbauer, 1962). Le cobalt possède aussi une action cancérogène *in vitro* (Weinzierl et Webb, 1972; Daniel *et al.*, 1974).

g) *Le fer.*

Des études menées chez le Rat ont montré que des injections intramusculaires répétées de fer et surtout du complexe dextran-fer ou "imféron" provoquaient des sarcomes *in situ*. On sait que c'est à la suite de ces travaux (Haddow et Horning, 1960) que l'on a renoncé en pharmacologie humaine à l'utilisation des solutions injectables de fer. L'administration orale de solutions de fer ne montre aucune action cancérogène.

h) *Le plomb.*

Bien que le plomb métallique administré par voie parentérale ne semble pas donner naissance à des tumeurs cancéreuses, l'oxyde de plomb et des sels tels que l'acétate et le nitrate sont reconnus comme ayant une action cancérogène (Zawirska et Medras, 1968; Duryce, 1969; Kobayashi et Okamoto, 1974; Griffin *et al.*, 1975). Ces composés ont également une action cancérogène lorsqu'ils sont administrés par voie orale, et c'est un fait connu, que l'eau dite potable contenant des dérivés du plomb peut être maligne dans le développement du cancer gastrique chez l'homme.

i) *Le zinc et l'étain.*

Le zinc, antagoniste du cadmium, est un cancérogène assez puissant qui provoque, à cause de son affinité pour les groupes sulfhydriles, des carcinomes, s'il est administré à une concentration cent fois plus forte que le cadmium (Halme et Halme, 1969). Le chlorure et le sulfate de zinc peuvent induire des

tératomes assez volumineux dans les testicules (Guthrie, 1964; Maskar, 1972). Bien que Walters et Roe (1965) nient l'effet cancérogène du zinc se trouvant dans l'eau potable, Halme (1969) évoque la possibilité d'une action cancérogène du zinc et de l'étain contenus dans celle-ci.

j) *Autres métaux cancérogènes.*

A côté des métaux et de leurs dérivés cités il faut insister sur le *nickel* que nous allons traiter dans un chapitre à part. Parmi les métaux, dont la cancérogénicité est de moindre importance, il faut compter, en particulier, le hafnium et le zirconium. Ceux-ci induisent des dysplasies du cartilage de l'oreille externe après administration intradermale (Shelley, 1973).

k) *Les dérivés métalliques co-cancérogènes.*

Beaucoup de dérivés métalliques ont une si faible action cancérogène que de nombreux auteurs la considèrent comme discutable ou même contestable. Il a été démontré néanmoins une *action co-cancérogène* de ces produits. Parmi ces substances nous devons citer en premier lieu l'oxyde de fer, Fe_2O_3 , qui augmente considérablement la cancérogénèse induite par le 3,4-benzopyrène (Sellakumar *et al.*, 1973), par le diéthylnitrosamine (Feron *et al.*, 1972; Stenbäck *et al.*, 1973a) et par le diméthylnitrosamine (Feron *et al.*, 1972; Stenbäck *et al.*, 1973b). L'impléron a un effet identique (Langvad, 1964; Roe et Lancaster, 1964). De même le magnésium et ses sels doivent être considérés comme des agents co-cancérogènes qui stimulent par exemple le développement d'adénomes provoqués par l'uréthane (Labkovsky, 1967).

C. LA CANCEROGENESE PAR LE NICKEL.

Les cancers "professionnels" comportent entre autres ceux qui sont induits par le Nickel et ses dérivés.

Pedersen *et al.* (1973) ont fait une étude approfondie sur le cancer des voies respiratoires parmi les ouvriers d'une raffinerie de nickel en Norvège depuis sa création. Pour la période de 1953 à 1971 ils ont enregistré 48 cas de cancers pulmonaires, 14 cas de cancers des sinus et 5 cas de cancers du larynx. Encore faut-il ajouter que, depuis l'existence de l'usine (1910), les conditions de travail ont été remarquablement améliorées. Les cas de cancers cités étaient donc beaucoup plus fréquents avant cette période et on a pu constater également d'autres cancers tels que des ostéosarcomes, des fibrosarcomes et des rhabdomyosarcomes.

En ce qui concerne la cancérogénèse expérimentale, le nickel et ses dérivés ont été essayés depuis longtemps et nous tenons particulièrement à rappeler les travaux importants qui ont été effectués par Hueper (1955) et par Gilman (1965).

1. Le nickel métallique.

Le nickel métallique administré par inhalation -comme dans les cas des cancers professionnels- induit essentiellement des tumeurs du poumon, du sinus et du larynx (Hueper, 1963). Les implantations ou injections intrafémorales, intrapleurales, intramusculaires, intrapéritonéales, sous-cutanées (et intraveineuses) provoquent des tumeurs locales avec une fréquence plus élevée pour les tumeurs pulmonaires, les rhabdomyosarcomes, les fibrosarcomes et les ostéosarcomes (Hueper, 1963; Heath et Daniel, 1964; Daniel *et al.*, 1967; Heath et Webb, 1967; Furst *et al.*, 1972; Webb *et al.*, 1972).

2. Les sulfures de nickel.

Les sulfures de nickel sont les dérivés les plus cancérogènes et les plus spécifiques pour les rhabdomyosarcomes (Gilman, 1965). Peu importe le site d'injection, la tumeur qui apparaît le plus fréquemment est le *rhabdomyosarcome*, surtout chez le Rat Wistar (Gilman, 1965). L'implantation intramusculaire du sous-sulfure (Ni_3S_2), le plus cancérogène parmi tous les

sulfures de nickel, induit à 80% des rhabdomyosarcomes chez le Rat Wistar (Tabl. II.). Même les tumeurs pulmonaires induites par inhalation du Ni_3S_2 laissent apparaître un pourcentage élevé de tumeurs rhabdopoïétiques (Ottolenghi *et al.*, 1974).

Comme les sulfures de nickel, l'oxyde de nickel a une action cancérogène très puissante. En effet, le NiO peut provoquer -après inhalation- des tumeurs pulmonaires. Mais il est encore très spécifique pour induire, tout au moins chez le Rat Wistar, des rhabdomyosarcomes après implantation intramusculaire (Gilman, 1965) (Tabl. II.).

Tableau II. Apparitions chez différentes espèces de rhabdomyosarcomes et fibrosarcomes après implantations intramusculaires de Ni_3S_2 et NiO. RMS : rhabdomyosarcomes, FS : fibrosarcomes, * : non établi (d'après Gilman, 1965).

Espèces	Ni_3S_2		NiO	
	RMS (%)	FS (%)	RMS (%)	FS (%)
Rat Wistar	80	2	65	5
Rat Fisher	70	*	10	*
Rat Bethesda	75	*	8	*
Souris Swiss	2	60	4	60

3. Les autres dérivés minéraux du nickel.

Les autres dérivés minéraux du nickel sont également cancérogènes après injections intramusculaires, en particulier l'hydroxyde et le carbonate. Les moins cancérogènes sont le sulfate et le monosulfure de nickel (Gilman, 1965) (Tabl. III.). Un dérivé particulièrement nocif est le *carbonyle de nickel*, le $Ni(CO)_4$, qui provoque pratiquement à 100% des cancers du poumon et de la cavité frontale après inhalation (Sunderman et Donnelly, 1965). Par injection intraveineuse, le pouvoir cancérogène n'est nullement abaissé, et le $Ni(CO)_4$ induit de cette

façon des tumeurs malignes dans tous les organes et tissus (Lau *et al.*, 1972).

Tableau III. Apparitions de rhabdomyosarcomes (RMS) après implantations intramusculaires de différents dérivés du nickel chez le Rat Wistar (d'après Gilman, 1965).

Dérivés du nickel		RMS (%)
Noms	Formules	
monosulfure	NiS	0
disulfure	NiS ₂	55
sous-sulfure	Ni ₃ S ₂	80
oxyde	NiO	65
hydroxyde	Ni(OH) ₂	47
fluorure	NiF ₂	9
sulfate	NiSO ₄	0
acétate	Ni(CH ₃ COO) ₂	0
carbonate	NiCO ₃	20
métallique	Ni	50

4. Remarques.

Lorsqu'on parle de cancérogènes minéraux, on y place souvent le cadmium, le cobalt et le nickel dans un même groupe. En effet, ces trois métaux et leurs dérivés semblent avoir les mêmes propriétés cancérogènes. Ils provoquent après inhalation et après administration parentérale, des cancers pulmonaires et ont une plus ou moins grande spécificité pour produire des rhabdomyosarcomes. De plus, ces trois métaux sont ionisés dans le sérum de cheval et encore mieux dans un homogénat de muscle de Rat lorsqu'ils sont incubés à 37°C (Weinzierl et Webb, 1972).

On sait également qu'ils peuvent transformer *in vitro* des myoblastes de Poulet en cours de différenciation (Daniel *et al.*, 1974). Par contre, administrés oralement, ces métaux et d'autres comme le chrome, le plomb, le titane et le fer ne semblent n'avoir aucune activité cancérigène. Bien qu'on observe une augmentation de la concentration de ces métaux dans les tissus ils peuvent parfois provoquer une diminution du nombre des tumeurs (Schroeder *et al.*, 1964).

Jusqu'à présent, l'action cancérigène de ces métaux est encore mal connue. Néanmoins on sait déjà que le nickel, le cobalt et le cadmium s'accumulent dans le noyau de la cellule tumorale, particulièrement au niveau du nucléole (Webb *et al.*, 1972; Sunderman *et al.*, 1974) et que le nickel inhibe l'activité de la RNA-polymérase nucléaire dans les rhabdomyocytes (Sunderman *et al.*, 1974). Le manganèse est un antagoniste de cette action. Il active l'activité de la RNA-polymérase dans les noyaux des cellules hépatiques (Sunderman *et al.*, 1974). Mais ceci n'explique pas la "transformation" d'une cellule normale en une cellule tumorale.

Comme le manganèse, nous connaissons d'autres métaux ou dérivés qui peuvent "*inhiber*" la cancérogénèse. Ceci est en particulier le cas de l'acétate de cuivre, qui inhibe le pouvoir cancérogène de l'éthionine en formant un complexe avec cette dernière. Le même effet est observé pour des cancérogènes tels que le 3-méthoxy-4-aminoazobenzène et le 4-diméthylaminoazobenzène. L'acétate de cuivre diminue également le pouvoir cancérogène des diméthyl-1,2-benzanthracènes, alors que l'oxyacétate cuivreux augmente l'effet de ces derniers (Fare, 1964 a et b). Le zinc (Poswillo et Cohen, 1971) et le sélénium (Shamberger, 1970) peuvent avoir aussi, dans certaines conditions, des effets inhibiteurs sur la cancérogénèse.

Pour nos études histologiques du rhabdomyosarcome et nos recherches biochimiques sur les protéines contractiles des tumeurs musculaires, nous avons choisi le sous-sulfure de nickel, le Ni_3S_2 , qui semble avoir la plus grande spécificité pour induire

ces tumeurs. Pour mieux définir l'orientation biologique et biochimique de ce sujet de recherches, nous tenons à rappeler quelques éléments fondamentaux de la morphologie des différents types de muscle normal et pathologique, d'une part, et de la structure moléculaire des protéines contractiles, d'autre part.

II. LE MUSCLE.

Le muscle compte parmi les tissus les plus organisés de l'organisme animal, aussi bien en ce qui concerne sa structure morphologique que sa fonction biologique spécialisée pour la contractilité. On distingue, en général, *trois* types de tissus musculaires. Ils sont tous les trois composés de fibres musculaires mais se distinguent par leur structure microscopique, par leur distribution dans l'organisme, par leur innervation et surtout par leur fonction. Le plus typique et le plus largement étudié est le *muscle strié squelettique*. Le second type est le *muscle strié cardiaque* que l'on trouve dans le myocarde et les parois des veines pulmonaires. Ces deux types contiennent des structures fibrillaires pratiquement identiques dont les composés protéiques ont été largement étudiés. Le troisième type, appelé *muscle lisse*, est par contre, assez différent des autres. Il se trouve en particulier dans les parois des vaisseaux sanguins, de l'estomac, de l'intestin et de l'utérus.

Enfin, il existe des systèmes contractiles non musculaires que l'on trouve dans d'autres types cellulaires tels que les cellules myoépithéliales et les plaquettes sanguines, mais aussi chez certains protozoaires comme les Amibes et même chez des Myxomycètes.

A. LA MORPHOLOGIE DU MUSCLE NORMAL.

1. Le muscle strié squelettique.

Le muscle strié squelettique se distingue de tous les autres types musculaires par le fait qu'il peut être contracté volontairement. Les fibres musculaires sont formées, pour l'essentiel, de faisceaux de fibrilles ou *myofibrilles* disposés parallèlement

au grand axe de la cellule. Les myofibrilles ont 1 à 2 μm de diamètre et s'étendent sur toute la longueur de la fibre musculaire. Entre les myofibrilles, le hyaloplasme montre de nombreuses particules de glycogène. D'autre part, la fibre musculaire renferme un grand nombre de mitochondries, et les cavités du réticulum endoplasmique sont étroitement accolées aux myofibrilles. Les membranes cellulaires possèdent des invaginations profondes : le système transversal ou *système T* qui forme par accollement étroit des diades ou triades avec le réticulum endoplasmique appelé *réticulum sarcoplasmique* dans la cellule musculaire. Notons enfin que les fibres musculaires sont des cellules géantes contenant chacune une centaine de noyaux disposés dans le cytoplasme périphérique. Les fibres musculaires sont issues de la fusion de nombreux myoblastes et représentent donc un *syncytium*.

Au microscope optique, les myofibrilles apparaissent formées d'une succession périodique de bandes claires et sombres; ces bandes sont situées au même niveau dans l'ensemble des myofibrilles d'une même fibre, si bien que la cellule a un aspect strié caractéristique (Fig.1.). En lumière polarisée, les bandes sombres sont fortement biréfringentes d'où leur nom de bandes anisotropes ou *bandes A*. Les bandes claires ne sont que très faiblement biréfringentes, ce sont les bandes isotropes ou *bandes I*. La bande A présente en son milieu une région plus claire, la bande de Hensen ou *bande H*, laquelle possède une fine bande sombre en son milieu : la *ligne M*. Près de la limite entre la bande I et la bande A, on peut parfois observer une fine ligne légèrement plus sombre que les auteurs appellent la *ligne N*. Une autre ligne plus sombre partage la bande I en son milieu, c'est la *strie Z*. La portion de myofibrille comprise entre deux stries Z est l'unité contractile du muscle et est appelée *sarcomère*. La myofibrille peut donc être considérée comme une succession de sarcomères identiques (Fig.1.).

Au microscope électronique, les coupes longitudinales permettent de reconnaître les diverses bandes sombres et claires qui s'étendent le long des myofibrilles. A plus fort grossissement, on voit que les myofibrilles sont constituées de filaments

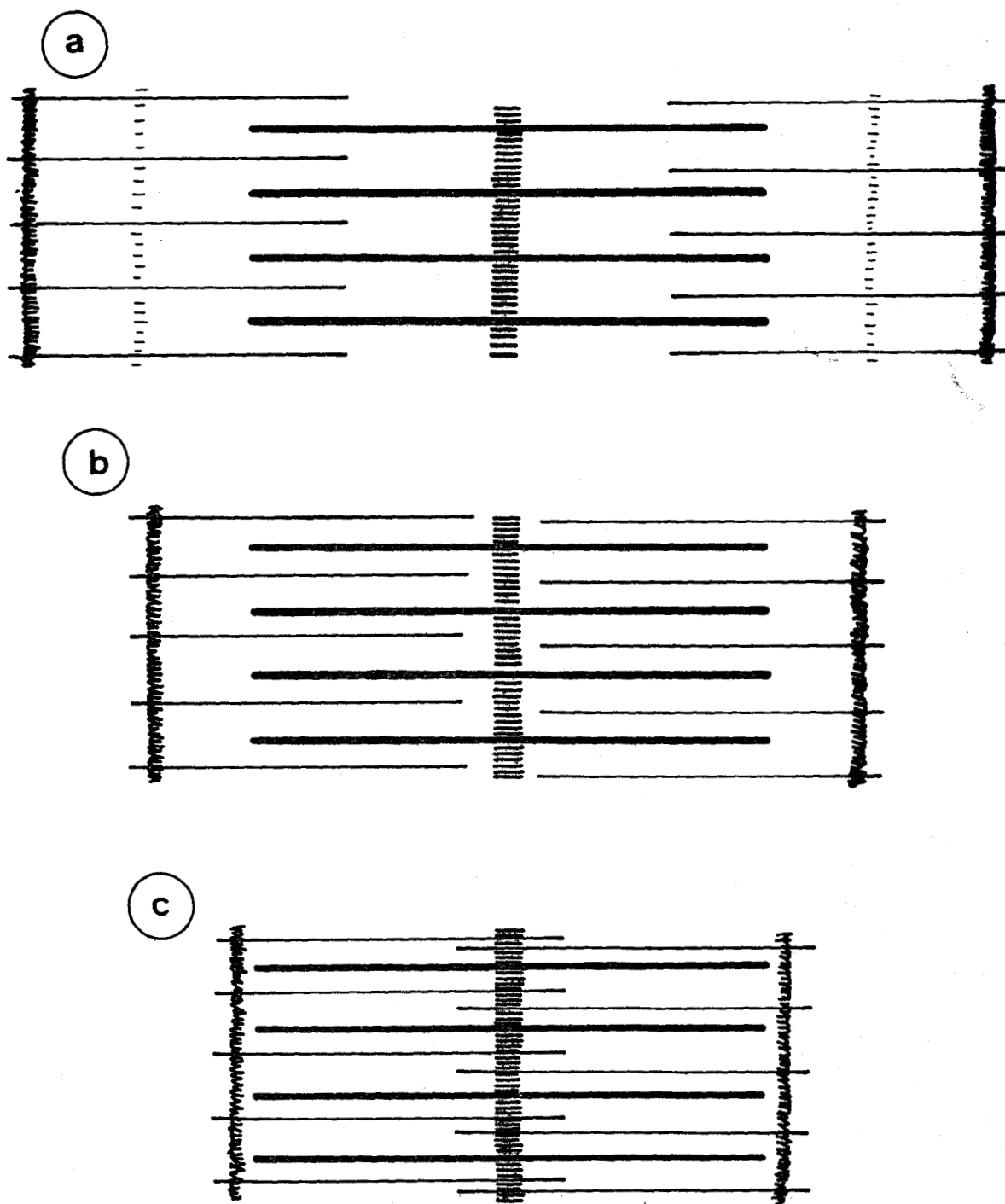


Fig.1. Interpénétration des filaments du sarcomère au cours de la contraction musculaire.

a. Sarcomère au repos.

b. Sarcomère contracté.

c. Sarcomère supercontracté. (contraction maximale).

longitudinaux de deux espèces différentes : les *myofilaments*. Une première série de myofilaments est composée d'éléments d'environ 13 nm de diamètre qui s'étendent sur toute la longueur de la bande A : ce sont les *filaments épais*. Une seconde série est constituée d'éléments d'environ 7 nm de diamètre, les *filaments fins*, qui s'étendent de part et d'autre de la strie Z jusqu'entre les filaments épais. La strie Z correspond à une zone où les filaments fins des sarcomères voisins s'anastomosent entre eux (Fig.1.). L'arrangement des myofilaments fins et épais est en général très régulier. Dans les fibres musculaires striées des Vertébrés et en particulier des Insectes, filaments fins et filaments épais forment des arrangements hexagonaux donnant à ces édifices fibrillaires une structure "paracristalline" (Fig.2.) (Ham, 1974a).

2. Le muscle strié cardiaque.

Les fibres musculaires du myocarde sont moins serrées que les fibres du muscle squelettique, et on observe ainsi qu'elles bifurquent et s'anastomosent. Les espaces intercellulaires contiennent du tissu conjonctif et comportent des vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des nerfs.

Dans le cytoplasme du myocarde, on retrouve en général les mêmes organites cellulaires que ceux décrits pour le muscle strié squelettique : myofibrilles composées de sarcomères, mitochondries, réticulum sarcoplasmique et système T. La plus grande différence qui existe entre les deux types de muscle strié est que le muscle cardiaque n'est pas composé de fibres musculaires en forme de syncytium, mais d'une multitude de cellules mononucléées. Ce fait semblait perturber les auteurs qui n'avaient étudié le muscle cardiaque que par la microscopie photonique. En effet, les membranes cellulaires étaient considérées comme un obstacle énorme pour la continuité des myofibrilles, elles seules pouvant assurer le rythme régulier des contractions du coeur dans son ensemble. Mais bientôt, on a observé des épaisissements au niveau des membranes cellulaires que l'on a appelés les *disques intercalaires*.

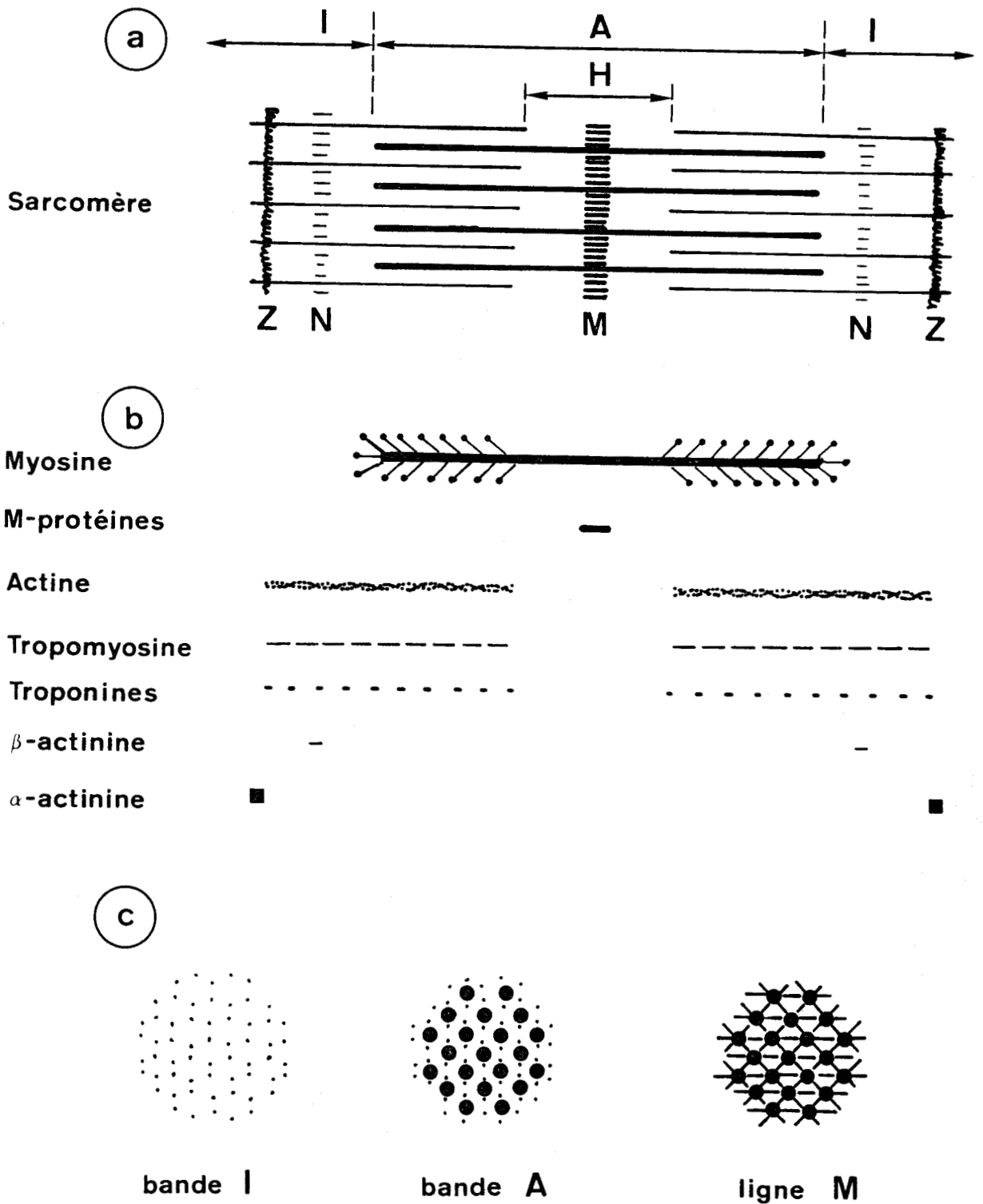


Fig.2. Schéma du sarcomère.

a. Coupe longitudinale.

b. Les protéines myofibrillaires essentielles.

c. Coupes transversales aux niveaux de la bande I, de la bande A et de la ligne M.



La microscopie électronique a mis fin à toutes les hypothèses émises et a démontré que les disques intercalaires traversent pour ainsi dire les myofibrilles, et ce toujours au niveau des stries Z. Toutefois ils ne traversent pas les myofibrilles directement, mais d'une façon "décalée" afin d'assurer tous les sites de contact possibles entre deux cellules voisines. La partie qui traverse les myofibrilles à angle droit est nommée *partie transversale*; celle qui est parallèle aux myofibrilles est la *partie latérale*. C'est la partie transversale qui nous intéresse le plus car c'est à ce niveau que s'insèrent de part et d'autre les myofibrilles. En effet, sur chaque face interne de la cellule se trouve une couche dense contenant du matériel de la strie Z. De cette façon, ceci permet de bien réunir les cellules. De même, les parties latérales contribuent à assurer l'attachement cellulaire et des jonctions desmosomales de différents types ont été décrites (Ham, 1974a).

3. Le muscle lisse.

Le muscle lisse est également appelé muscle "involontaire". Il est en effet sous le contrôle du système nerveux autonome. La contraction de la plupart des muscles lisses est très lente par rapport à celle des muscles striés. En général le muscle lisse se compose de plusieurs couches de fibres musculaires qui ont la plupart du temps une orientation perpendiculaire d'une couche à l'autre. Ces couches se constituent de faisceaux entourés par du tissu conjonctif. Dans beaucoup de cas les faisceaux d'une même couche s'anastomosent les uns avec les autres.

Le muscle lisse peut exister dans un état de contraction partielle ou maintenue, qu'on appelle le *tonus*. Ceci est très important dans les artères et c'est bien ce tonus qui empêche donc le sang de couler à reflux. Le tonus est également un facteur important dans la paroi de l'intestin, où la couche longitudinale maintient ce tonus. C'est la *couche circulaire* finalement qui exécute des contractions rythmiques pour faire progresser le contenu intestinal. On appelle ces vagues de contraction des ondes péristaltiques.

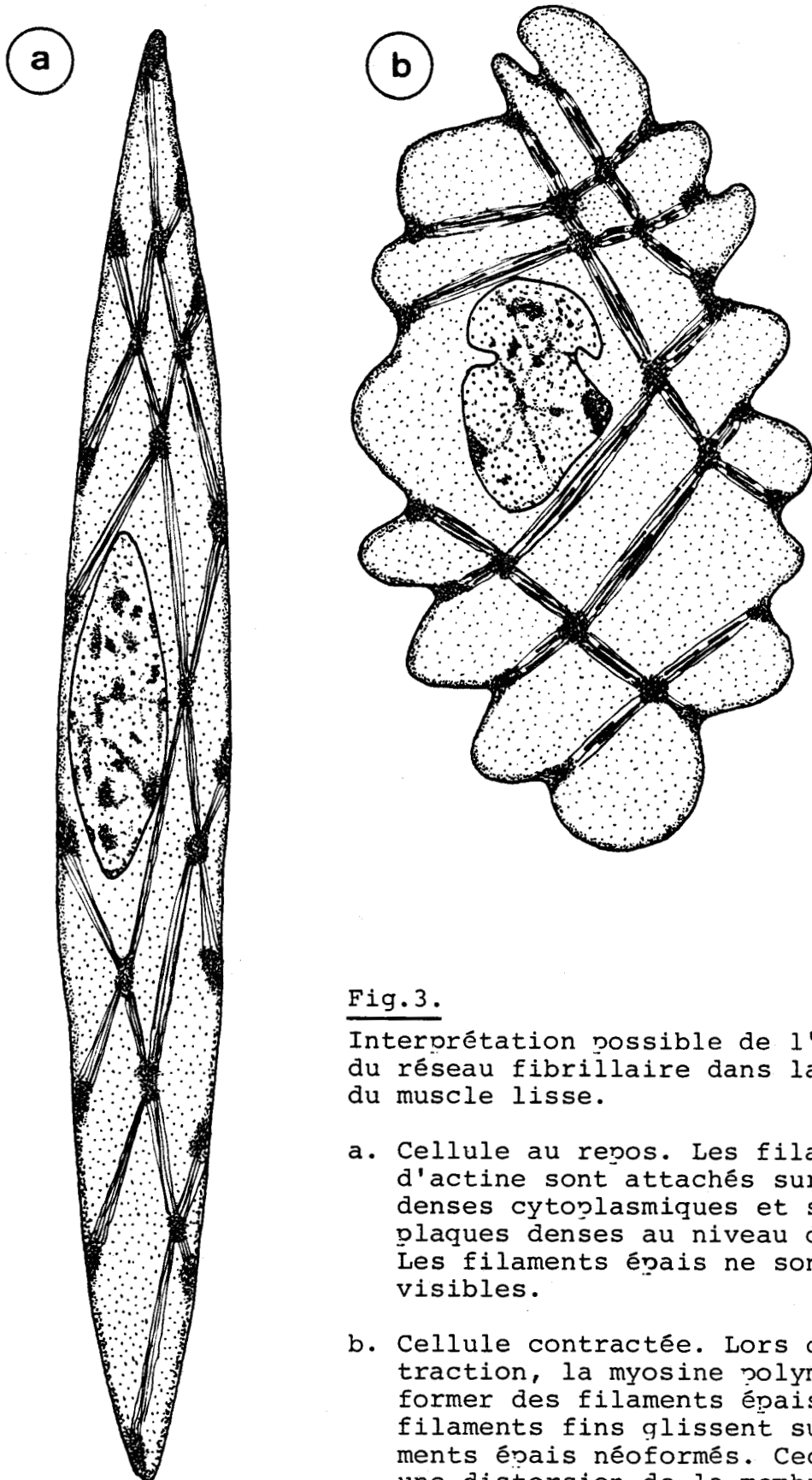


Fig. 3.

Interprétation possible de l'arrangement du réseau fibrillaire dans la cellule du muscle lisse.

- a. Cellule au repos. Les filaments fins d'actine sont attachés sur les corps denses cytoplasmiques et sur les plaques denses au niveau des membranes. Les filaments épais ne sont pas visibles.
- b. Cellule contractée. Lors de la contraction, la myosine polymérise pour former des filaments épais, et les filaments fins glissent sur les filaments épais néoformés. Ceci mène à une distorsion de la membrane cellulaire et de l'enveloppe nucléaire. La cellule se raccourcit. (d'après Ham, 1974 a et Heumann, 1971).

La longueur des fibres du muscle lisse varie énormément selon leur localisation. Les plus petites -autour des capillaires sanguins- n'atteignent que 20 μm ; les plus longues -dans la paroi de l'utérus- peuvent facilement atteindre 0,5 mm. La longueur moyenne est cependant de 0,2 mm. Comme le muscle strié cardiaque, le muscle lisse est un muscle constitué de cellules mononucléées. A l'état relaxé, la cellule est fusiforme avec un noyau central également fusiforme. A l'état contracté, la cellule et son noyau deviennent ovoïdes avec des contours plus ou moins découpés (Fig.3.). Entre les cellules, il existe un espace de 50 à 80 nm dans lequel on trouve la *lame basale* -qui entoure la cellule- et des fibres de collagène et d'élastine. Il est maintenant bien connu, que la cellule du muscle lisse peut produire du collagène et de l'élastine comme les fibroblastes se trouvant entre les faisceaux formés par les fibres.

Le cytoplasme de la cellule du muscle lisse est composé d'un noyau, de mitochondries, de glycogène, de dictyosomes et de réticulum endoplasmique. Les éléments les plus caractéristiques correspondent cependant à deux sortes de filaments principaux et à un troisième type moins fréquent. Les filaments les plus importants sont les *filaments fins* d'un diamètre qui varie entre 3 et 8 nm, qui se rejoignent dans des *corps denses*. Ceux-ci correspondent aux stries Z du muscle strié et les filaments fins eux-mêmes se composent essentiellement d'actine (Fig.3.). Le deuxième type, les *filaments épais*, possèdent un diamètre variant entre 10 et 35 nm. Ces filaments n'apparaissent en microscopie électronique généralement que lorsque le muscle est légèrement contracté. Ils ne sont pas attachés aux corps denses et sont composés essentiellement de myosine. Enfin, on connaît un *troisième type* beaucoup moins fréquent d'un diamètre constant de 10 nm, que l'on reconnaît aussi bien dans les cellules contractées que relaxées (Heumann, 1971).

4. Le système contractile non-musculaire.

La plupart des cellules animales possèdent des protéines contractiles telles que les cellules du muscle strié ou du muscle

lisse, mais sans organisation précise. On peut distinguer deux groupes de cellules, les unes fixées, contractiles mais sans déplacement visible, sauf lorsqu'elles sont mises en culture, et les autres libres, qui montrent des mouvements et déplacements nets, parfois lents.

Parmi le premier groupe on doit citer en particulier les cellules endothéliales (Becker et Nachman, 1973), les cellules myoépithéliales (Tannenbaum *et al.*, 1969) et surtout les fibroblastes (Adelstein *et al.*, 1972; Ostlund *et al.*, 1974). Les cellules libres exécutent des *mouvements amoéboïdes*, appelés ainsi d'après les mouvements effectués par l'Amibe, l'organisme le plus étudié. Ces mouvements amoéboïdes sont à l'origine du déplacement de certaines cellules comme en particulier celui des Amibes (Wohlfarth-Bottermann, 1964; Schäfer-Dannéel, 1967; Pollard et Ito, 1970; Komnick *et al.*, 1973), des plaquettes (Adelstein *et al.*, 1971), et des leucocytes du sang (Stossel et Pollard, 1973), des macrophages (Hartwig et Stossel, 1975) ou d'organismes inférieurs tels que les Myxomycètes (Wohlfarth-Bottermann, 1964; Nagai et Kamiya, 1966).

Chez l'Amibe, on constate que le hyaloplasme superficiel a la consistance d'un gel, alors que dans la région sous-jacente le hyaloplasme est beaucoup plus fluide et possède la consistance d'un sol. Quand l'Amibe se déplace, on voit s'écouler vers l'avant le hyaloplasme interne qui s'étale alors latéralement, tout comme un jet d'eau s'épanouit à son sommet. Le hyaloplasme qui s'est étalé sur les côtés reprend alors la consistance d'un gel, tandis qu'à l'arrière le gel cortical devient fluide et se dirige vers l'avant. Les mouvements hyaloplasmiques se font donc à l'intérieur d'une sorte de tunnel cortical, qui se reconstitue sans cesse à l'avant, alors qu'il se détruit à l'arrière. Le courant hyaloplasmique qui coule dans le gel cortical est à l'origine du pseudopode (Fig.4.) (Wohlfarth-Bottermann, 1964).

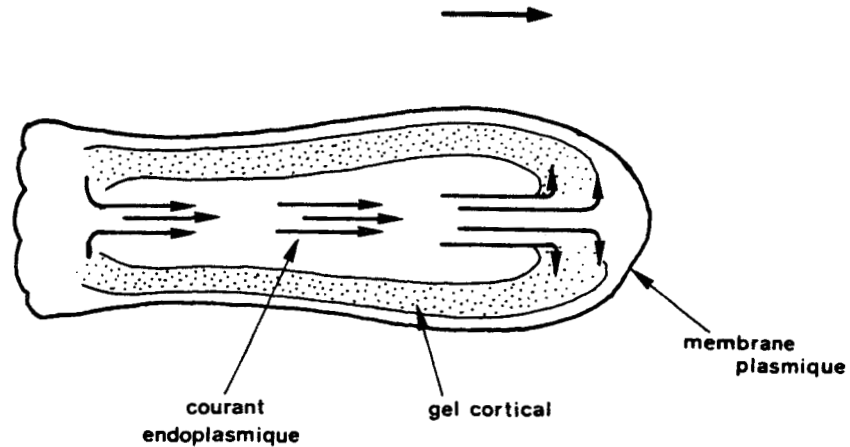


Fig.4. Mouvements amoéboïdes. Schéma montrant le courant endoplasmique qui se déplace sous un gel de hyaloplasme cortical au cours du déplacement d'une Amibe à un seul pseudopode. (d'après Wohlfarth-Bottermann, 1964).

D'autre part, on a pu mettre en évidence et même extraire chez les Amibes et les Myxomycètes un complexe protéique dont les propriétés sont comparables à celles de l'*actomyosine* (Wohlfarth-Bottermann, 1964). Ce complexe a une activité ATPasique et se contracte en présence d'ATP (Beck *et al.*, 1969, 1970). Le cytoplasme des Amibes (Schäfer-Dannéel, 1967; Komnick *et al.*, 1973) et des Myxomycètes (Wohlfarth-Bottermann, 1964; Beck *et al.*, 1969, 1970) renferme des faisceaux de filaments de 7 nm et de 13 nm de diamètre qui ont pu être isolés et identifiés comme composés d'actine et de myosine (Hinsen, 1970, 1972; Alléra *et al.*, 1971; Alléra et Wohlfarth-Bottermann, 1972). Comme dans le muscle lisse, les filaments épais (ou myosine) n'apparaissent que lorsque les cellules sont contractées (Alléra et Wohlfarth-Bottermann, 1972). La nature "éphémère" des filaments épais est vraisemblablement due à la dynamique de la transformation "sol-gel". Il y a donc une transformation parallèle des filaments épais (myosine polymère) en une forme oligomère de transport. Les filaments fins ne subissent pas cette transformation. (Fig.5.)

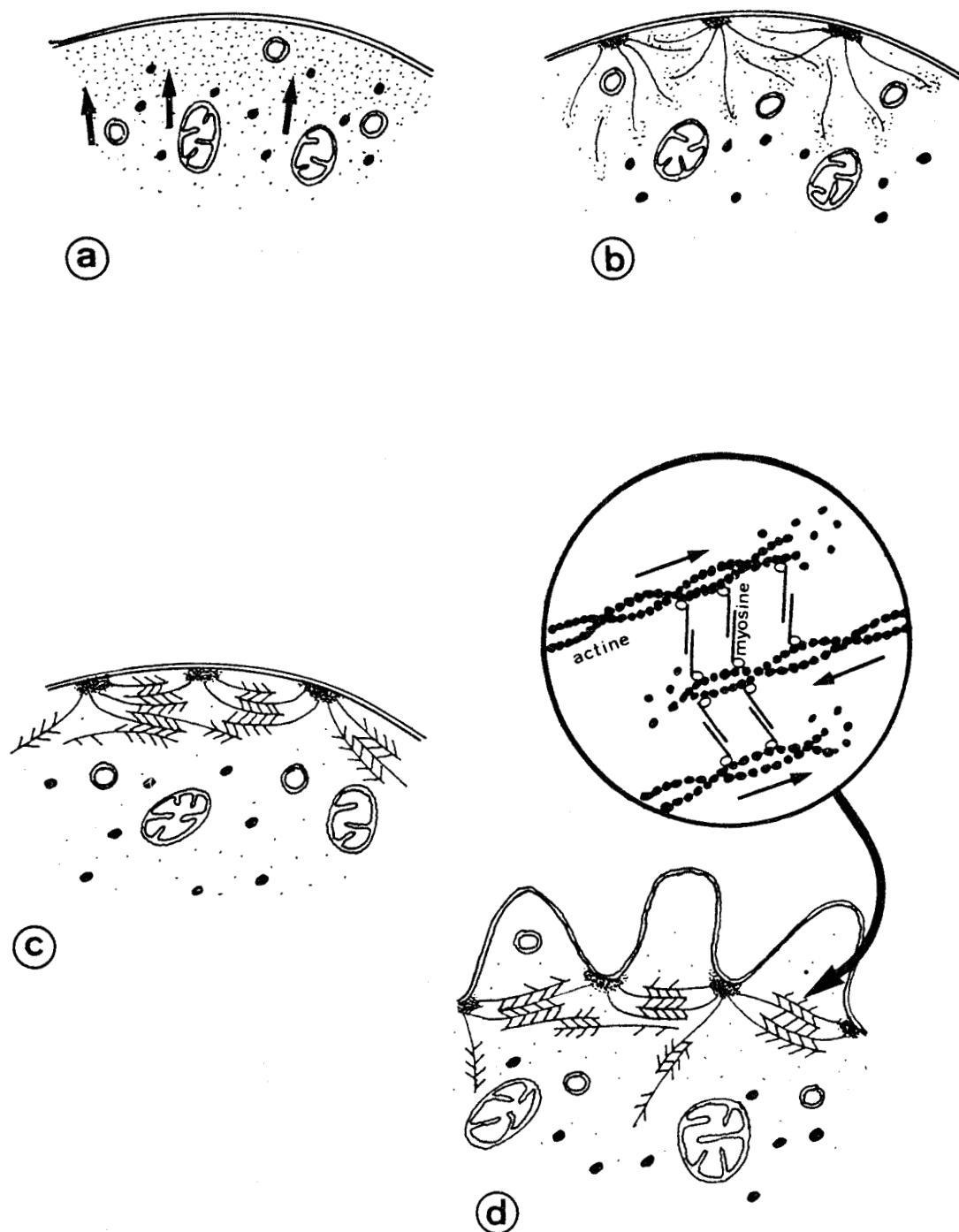


Fig.5.

Cette figure représente les différentes étapes possibles de la formation et de l'alignement des microfilaments, de la contraction, et de la dissociation éventuelle des filaments lors de la contraction non musculaire. (a) Les sous-unités des microfilaments (petits points, flèches) se trouvent près de la membrane cellulaire. (b) Les sous-unités des microfilaments polymérisent dans le cytoplasme et sur la membrane cellulaire, où ils sont attachés sur des plaques denses. Les inclusions et les organites cellulaires sont poussés davantage vers le centre de la cellule. (c) Les microfilaments à polarité opposée interagissent par intermédiaire d'oligomères de myosine formant des ponts.

(d) La contraction se fait par glissement des filaments et la membrane cellulaire est plissée. Le cercle montre des dimères bipolaires de myosine formant des ponts entre trois filaments d'actine. Les microfilaments dépolymérisent aussitôt après la contraction (d'après T.E. Schroeder, in : "Molecules and Cell Movement" *Soc.Gen.Physiol.Ser.* Raven Press, New York, Vol.30, 305-334, 1975).

B. LA MORPHOLOGIE DU MUSCLE PATHOLOGIQUE.

En ce qui concerne la pathologie du muscle, beaucoup reste encore à apprendre. Bien que nous connaissions quelques maladies musculaires parmi les plus courantes, il est malheureusement difficile de proposer des thérapeutiques efficaces, sauf pour une ou deux affections. La polymyosite, maladie inflammatoire du muscle, peut être traitée actuellement d'une façon satisfaisante grâce à l'emploi des corticostéroïdes et/ou des agents immunosuppresseurs. Par contre, la compréhension de l'étiologie de beaucoup d'autres myopathies nous échappe encore, notamment celle des dystrophies musculaires.

1. Les myopathies humaines.

Beaucoup de myopathies sont actuellement connues chez l'Homme. Elles sont particulièrement bien étudiées, tout au moins en ce qui concerne leur histologie et leur morphologie ultrastructurale. Parmi les myopathies les plus fréquentes, nous voulons citer les dystrophies musculaires (W.K.Engel, 1973), les atrophies musculaires (Dorman, 1973), les myopathies vacuolaires telles que la chloroquinose, les glycogénoses, les lipidoses (A.G.Engel, 1973) et surtout les paralysies périodiques (Pearson, 1973). De plus, nous connaissons une série étendue de "myopathies congénitales" (Munsat, 1973). Enfin, il ne faut pas oublier que la polymyosite serait due à un désordre immunitaire. Ceci est d'autant plus évident qu'elle est souvent accompagnée de carcinomes de différents organes (Kakulas, 1973).

La microscopie électronique a pu mettre en évidence des différences ultrastructurales fondamentales entre le muscle normal et le muscle "pathologique". Ces différences se rencontrent non seulement au niveau des structures contractiles, mais avec une importance aussi grande au niveau des organites cellulaires. Comme la plupart des caractéristiques ne sont pas spécifiques de telle ou telle myopathie, nous pouvons donc donner un aperçu général des anomalies ultrastructurales (Price, 1973).

Généralement, les *myofibrilles* comme les fibres musculaires elles-mêmes, ont perdu leur orientation parallèle. Souvent elles bifurquent et s'anastomosent. Cependant, la différence la plus importante s'observe au niveau des stries Z, qui peuvent s'élargir énormément et même prendre une structure paracristalline. Les myofibrilles dégénèrent facilement, et cette dégénérescence commence généralement par les myofilaments et les stries Z disparaissent en dernier lieu.

Le système T et le réticulum sarcoplasmique sont toujours présents dans les cellules musculaires pathologiques, mais leur aspect diffère souvent complètement. C'est ainsi qu'on observe parfois du réticulum sarcoplasmique "fenestré" et un système T sous forme de treillage. Les diades ou triades entre le réticulum sarcoplasmique et le système T sont généralement peu fréquentes.

L'appareil de Golgi peu important dans les myoblastes normaux, est généralement bien développé dans les myoblastes pathologiques.

Différents types de *mitochondries anormales* ont été décrits. Leur nombre peut être augmenté ou réduit par rapport à celui du muscle normal. Les changements les plus évidents sont notables souvent au niveau des crêtes, dont la densité est parfois supérieure, parfois inférieure, à celle des crêtes des mitochondries normales. Des inclusions intramitochondriales, dont l'aspect peut aller de simples amas jusqu'aux formes paracristallines, sont également très fréquentes.

Les lipides sont généralement plus abondants au cours des myopathies. Ceci est aussi le cas pour le *glycogène* en particulier dans les muscles affectés par des myopathies vacuolaires et par des glycogénoses.

Les noyaux perdent souvent leur emplacement périphérique. Le matériel chromatinien est plus dense et se trouve la plupart du temps directement associé à l'enveloppe nucléaire. La surface nucléaire possède parfois des plissements et les noyaux montrent ainsi des invaginations assez complexes.

Les cellules satellites : ce sont des cellules mononucléées, ressemblant aux myoblastes, et situées entre la lame basale et la fibre musculaire. Ces cellules subissent peu de changement dans les muscles pathologiques, mais on observe une augmentation de leur nombre dans le muscle en régénération (Reznik, 1973).

2. Les myopathies animales.

Contrairement aux myopathies humaines, celles qui apparaissent chez les animaux et en particulier chez les Vertébrés, ont attiré beaucoup moins l'intérêt des chercheurs. Pourtant, elles ne sont ni moins rares, ni moins importantes. La plupart des myopathies sont semblables à celles décrites chez l'Homme. A côté des myopathies congénitales et des dystrophies musculaires que l'on connaît surtout chez les animaux domestiques de ferme et de basse-cour, Hadlow (1973) a décrit un nombre important de myopathies provoquées par malnutrition (généralement due à un manque de vitamine E) ou par intoxication (consommation de certains fruits toxiques).

Peu de travaux ont été effectués en microscopie électronique, et l'ensemble des résultats ne permet donc pas d'établir une conception générale des différences ultrastructurales entre les myopathies humaines et animales. Et pourtant, c'est bien l'animal qui peut nous permettre de réaliser des études approfondies sur les myopathies afin d'envisager éventuellement des thérapeutiques humaines.

3. Le muscle cancéreux.

En ce qui concerne le muscle strié squelettique on décrit les rhabdomyomes (tumeurs bénignes) et les rhabdomyosarcomes (tumeurs malignes) (Enzinger *et al.*, 1970; Clay, 1972). Parmi les rhabdomyosarcomes, on distingue plusieurs formes : les sarcomes rhabdolytiques qui sont des affections de l'adulte, et les sarcomes rhabdopoïétiques qui s'observent surtout chez le jeune enfant ou l'adolescent (Clay, 1972; Masson, 1956).

Mais il nous faut surtout citer la définition et la classification de l'*Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.)* proposées en 1970 par Enzinger *et al.* qui distinguent quatre différents types :

" Tumeur extrêmement maligne, formée de rhabdomyoblastes à divers stades de différenciation, avec ou sans myofibrilles intracellulaires et avec ou sans double striation. De constitution cytologique et d'architecture cellulaire très variables, les rhabdomyosarcomes peuvent être répartis en trois types suivant qu'ils sont essentiellement : embryonnaires (type botryoïde compris), alvéolaires, polymorphes. Les deux premiers types sont surtout fréquents chez les enfants et les adolescents. Il existe aussi des formes mixtes. Les types embryonnaires et alvéolaires peuvent apparaître en des localisations normalement dépourvues de muscle squelettique."

Le rhabdomyosarcome embryonnaire décrit par Stobbe et Dargeon (1950) est de loin le type le moins différencié et cause parfois de grandes difficultés de diagnostic. Alors que le rhabdomyosarcome embryonnaire est très riche en cellules, le *type botryoïde* -assez fréquent dans le tractus urogénital- contient très peu de cellules, séparées les unes des autres par une matrice myxomateuse très lâche et très importante. Les cellules sont fusiformes ou étoilées et sont arrangées de façon très irrégulière, rarement parallèles. Les noyaux -très variables par leur forme et leur taille- sont riches en chromatine. Des formes géantes sont rares et des mitoses sont peu abondantes. Ce type tumoral est rencontré le plus souvent chez les enfants.

Le rhabdomyosarcome alvéolaire (Riopelle et Thériault, 1956) tient son originalité à l'architecture tumorale : les cellules apparaissent groupées en alvéoles, limitées par des travées conjonctives fines ou plus épaisses, sans doute suivant leur âge. Les cellules sont assez uniformes et possèdent des noyaux sphériques ou ovales et très peu de cytoplasme. De temps à autre, on peut observer quelques cellules fusiformes, mais des rhabdomyoblastes présentant une striation évidente sont extrêmement rares dans ce type tumoral. Cette tumeur apparaît le plus souvent sur les membres.

Le rhabdomyosarcome polymorphe (Stout, 1946) est très rare chez les enfants et apparaît généralement au niveau des muscles striés. Il est caractérisé par sa cellularité et son polymorphisme. Il diffère des autres types par une majorité de cellules à cytoplasme abondant, cellules volumineuses, allongées, aux noyaux souvent multiples. Les cellules sont habituellement arrangées de façon irrégulière, mais dans certains cas, elles sont alignées en groupes parallèles et présentent souvent une striation transversale évidente.

Tous les auteurs ayant travaillé sur le rhabdomyosarcome ont décrit trois différents types de cellules : des cellules sphériques, des cellules fusiformes (toutes les deux en général mononucléées) et des cellules allongées (Clay, 1972).

Les cellules sphériques et mononucléées sont relativement petites (10 à 15 μm) toujours capables de se diviser avec une synthèse de DNA très élevée. Ces cellules ne possèdent pas de myofibrilles ni de microfilaments.

Les cellules fusiformes, très effilées, parfois bifurquées, sont longues de 50 à 100 μm . Leur protoplasme contient parfois de très petites vacuoles et souvent de fines fibrilles plus ou moins longitudinales. Ces cellules possèdent parfois plusieurs noyaux, riches en chromatine et montrent des figures de mitoses pluripolaires.

Les cellules allongées sont caractérisées par une multitude de noyaux, diploïdes, qui ne synthétisent plus de DNA. Les observations en microscopie électronique ont montré une déformation considérable de ces noyaux que l'on n'observe pas au niveau des noyaux des cellules mononucléées ou des noyaux du muscle normal. Contrairement aux cellules sphériques et fusiformes, les cellules allongées possèdent la striation caractéristique du muscle squelettique normal.

Cette distinction n'implique nullement une différence de nature ou d'origine de ces cellules. Au contraire, elle représente plutôt les différents stades parcourus lors de la différenciation (Gilman, 1965).

De nombreux auteurs ont examiné un nombre important de tumeurs en microscopies optique et électronique, et on peut constater certaines analogies de la tumeur avec différents muscles pathologiques et avec des rhabdomyomes (Cornog et Gonatas, 1967). Ces analogies concernent essentiellement les aspects du réticulum sarcoplasmique et des stries Z, qui semblent être assez spécifiques pour des myopathies particulières. Quant aux mitochondries anormales, il n'y a aucune spécificité pour une tumeur ou une myopathie. Leur aspect peut varier d'un cas à l'autre (Basrur *et al.*, 1970; Price, 1973). En outre, il y a de nombreuses variations entre les tumeurs elles-mêmes qui semblent être dues à la différence d'induction, à l'animal soumis à l'expérience ou au fait que la tumeur soit maligne ou bénigne.

Au niveau du muscle cardiaque, on connaît l'existence de lésions d'apparence tumorale, faites de volumineuses cellules musculaires, dites "cellules araignées", en continuité avec les fibres normales. Beaucoup d'auteurs ne les considèrent pas comme de véritables tumeurs. Par contre, les *leiomyosarcomes* observés par Bearman (1974) dans le coeur humain, représentent des tumeurs malignes de muscle lisse.

Le muscle lisse peut aussi présenter des tumeurs bénignes (leiomyomes) ou malignes (leiomyosarcomes). Ces tumeurs apparaissent en particulier dans l'estomac, dans le larynx et dans l'utérus. On parle aussi de *leiomyoblastomes*, mais les auteurs ne sont pas d'accord, car il peut s'agir soit de leiomyomes, soit de leiomyosarcomes, ou même d'une "troisième forme" de tumeurs du muscle lisse (Kay et Still, 1969; Appelman et Helwig, 1976).

Dans les tumeurs du muscle lisse, on distingue deux types différents de cellules : des cellules irrégulières et des cellules fusiformes (Appelman et Helwig, 1976).

Les cellules irrégulières forment des zones assez vastes dans la tumeur. Elles ont un aspect épithéloïde, sont relativement petites (environ 10 μm) et toujours capables de se diviser. Elles possèdent un noyau pléiomorphe qui est souvent entouré par un espace clair.

Les cellules fusiformes forment des réseaux de fibres dans les zones des petites cellules. Elles sont très effilées et longues de 50 à 100 μm . Leur protoplasme contient souvent des fines fibrilles plus ou moins longitudinales. Les cellules possèdent en général un seul noyau allongé.

L'aspect ultrastructural de ces cellules est assez semblable à celui des cellules du muscle lisse. On reconnaît des faisceaux de fines fibrilles se rejoignant dans des corps plus denses, identiques aux stries Z du muscle strié. Les filaments épais sont très rares. Par contre, on observe une augmentation de microtubules et de filaments de 10 nm d'épaisseur. Les noyaux sont généralement lobés et contiennent fréquemment des corps nucléaires fibrillaires. Les mitochondries montrent les mêmes anomalies que celles du muscle strié cancéreux et l'appareil de Golgi est souvent bien développé.

C. LES PROTEINES CONTRACTILES DU MUSCLE.

Le sarcomère, la plus petite *unité contractile* du muscle strié consiste en un complexe hautement organisé de protéines contractiles, représentées essentiellement par la myosine et par l'actine. En plus, on y trouve de nombreuses autres protéines, qui jouent un rôle régulateur ou interviennent dans la structuration.

1. Les protéines du filament épais.

a) *La myosine.*

La protéine la plus importante du filament épais est la myosine (55 % des protéines myofibrillaires). La myosine a un poids moléculaire de 480 000. Elle est une molécule asymétrique allongée (environ 160 nm) et de 2,5 nm de diamètre, contenant une tête globulaire. La plus grande partie de la molécule de la myosine est arrangée en hélice α et les deux chaînes s'enroulent l'une autour de l'autre pour adopter une structure en double hélice (Fig.6.). Les têtes de myosine se trouvent disposées en

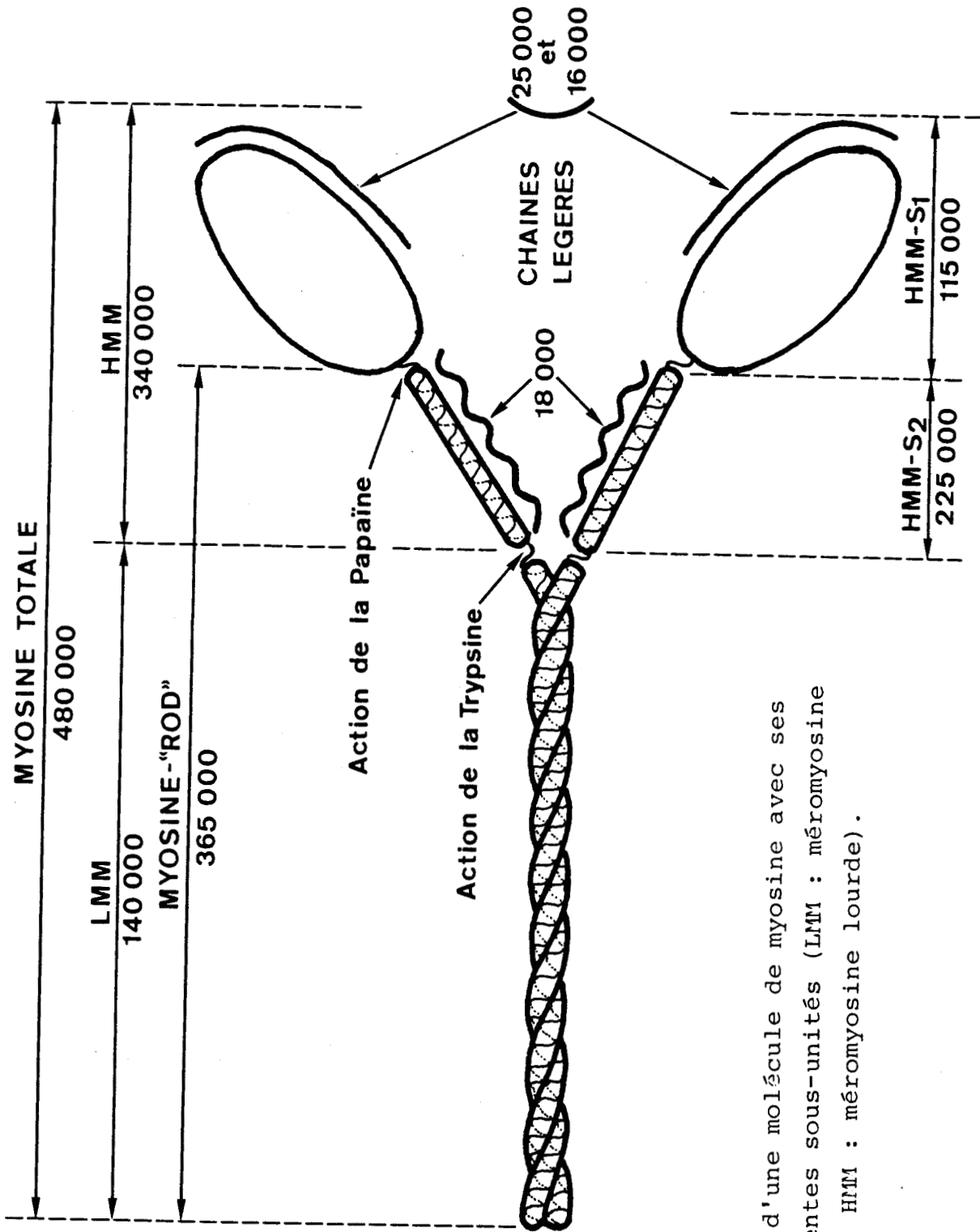


Fig. 6. Schéma d'une molécule de myosine avec ses différentes sous-unités (LMM : méromyosine légère; HMM : méromyosine lourde).

un arrangement régulier autour et le long du filament. De ce fait les têtes des molécules de myosine se trouvent détachées du corps du filament épais (Fig.8.).

Sous l'action de la trypsine, la molécule peut être scindée en deux *méromyosines* (méromyosine légère ou LMM, P.M. 140 000, et méromyosine lourde ou HMM, P.M. 340 000). Sous l'action de la papaïne elle peut être coupée en "Myosine Rod" (P.M. 365 000) et en un sous-fragment (S_1) de la HMM. Le dimère de la myosine du muscle strié squelettique du Lapin peut être dissocié en deux chaînes lourdes identiques (P.M. 200 000) et en trois chaînes légères. Les chaînes légères peuvent être isolées, l'une par un traitement avec le DTNB (chaîne dite "DTNB-LC") et les deux autres par un traitement alcalin (chaînes dites "Alcali-LC"). La "DTNB-LC" a un poids moléculaire de 18 000 et se trouve sur le sous-fragment S_2 de la HMM (voir Fig.6.). Le sous-fragment S_1 -la tête globulaire de la myosine- a la capacité de lier l'actine et porte les deux "Alcali-LC" de P.M. 25 000 et 16 000 (voir Figs. 6. et 8.).

b) *La C-protéine.*

Le filament épais est formé de molécules accolées, disposées "tête-bêche" et décalées les unes par rapport aux autres de 60° . La distance entre les HMM- S_1 de deux molécules est de 14,3 nm, ce qui donne au filament une périodicité de 42,9 nm. Le responsable de cette périodicité est une protéine de fonction structurale, la C-protéine dont on trouve deux molécules toutes les trois paires de molécules de myosine (Offer et Moos, 1973). Son poids moléculaire est de 140 000 (Fig.7.).

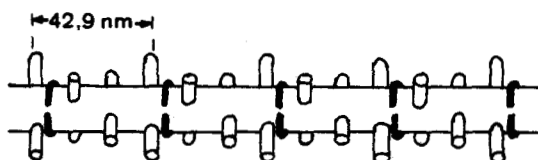


Fig.7. Arrangement possible des molécules de la C-protéine sur le filament épais. A chaque troisième paire de molécules de myosine sont associées deux molécules de C-protéine (d'après Offer et Moos, 1973).

c) *Les M-protéines.*

Alors que la C-protéine se trouve sur la plus grande partie du filament épais pour en déterminer l'arrangement moléculaire, un autre complexe protéique existe *au milieu des filaments* pour les associer et leur donner ainsi une localisation précise et stable dans le sarcomère (Knappes et Carlsen, 1968) (Fig.2.). Ce rôle est joué par deux protéines que l'on appelle la M_{α} -protéine et la M_{β} -protéine et dont les poids moléculaires restent encore fortement discutés : 165 000 et 94 000 selon Masaki et Takaiti (1974) et 195 000 et 180 000 suivant Porzio et Pearson (1977).

2. Les protéines du filament fin.

a) *L'actine.*

La protéine la plus importante du filament fin est l'*actine* qui constitue 25 % des protéines myofibrillaires (Porzio et Pearson, 1977). L'actine se présente sous deux formes : actine G (actine globulaire, avec un diamètre de 4 nm) et actine F (actine fibrillaire, avec un diamètre de 7 nm) qui est un polymère d'actine G. La molécule monomère d'actine est formée d'une seule chaîne polypeptidique (P.M. 45 000) dont la séquence en acides aminés a été déterminée. Chaque molécule d'actine G fixe étroitement un ion Ca^{2+} . Elle fixe également avec beaucoup d'affinité une molécule d'ATP (ou d'ADP). La liaison de l'ATP à l'actine G est suivie de sa polymérisation en actine F. Le filament fin est sous forme de double hélice et possède une périodicité de sept molécules d'actine G, donc de 30 nm environ (Fig.8.) (Spudich, 1973).

b) *La tropomyosine.*

Le filament fin contient aussi une protéine structurale, la *tropomyosine*. Cette molécule a une longueur de 40 nm et un diamètre d'environ 2 nm. Elle a un poids moléculaire d'environ 70 000 et forme deux sous-unités de 34 000 et 36 000 en présence de SDS (Cohen *et al.*, 1973). Dans le filament fin, la tropomyosine

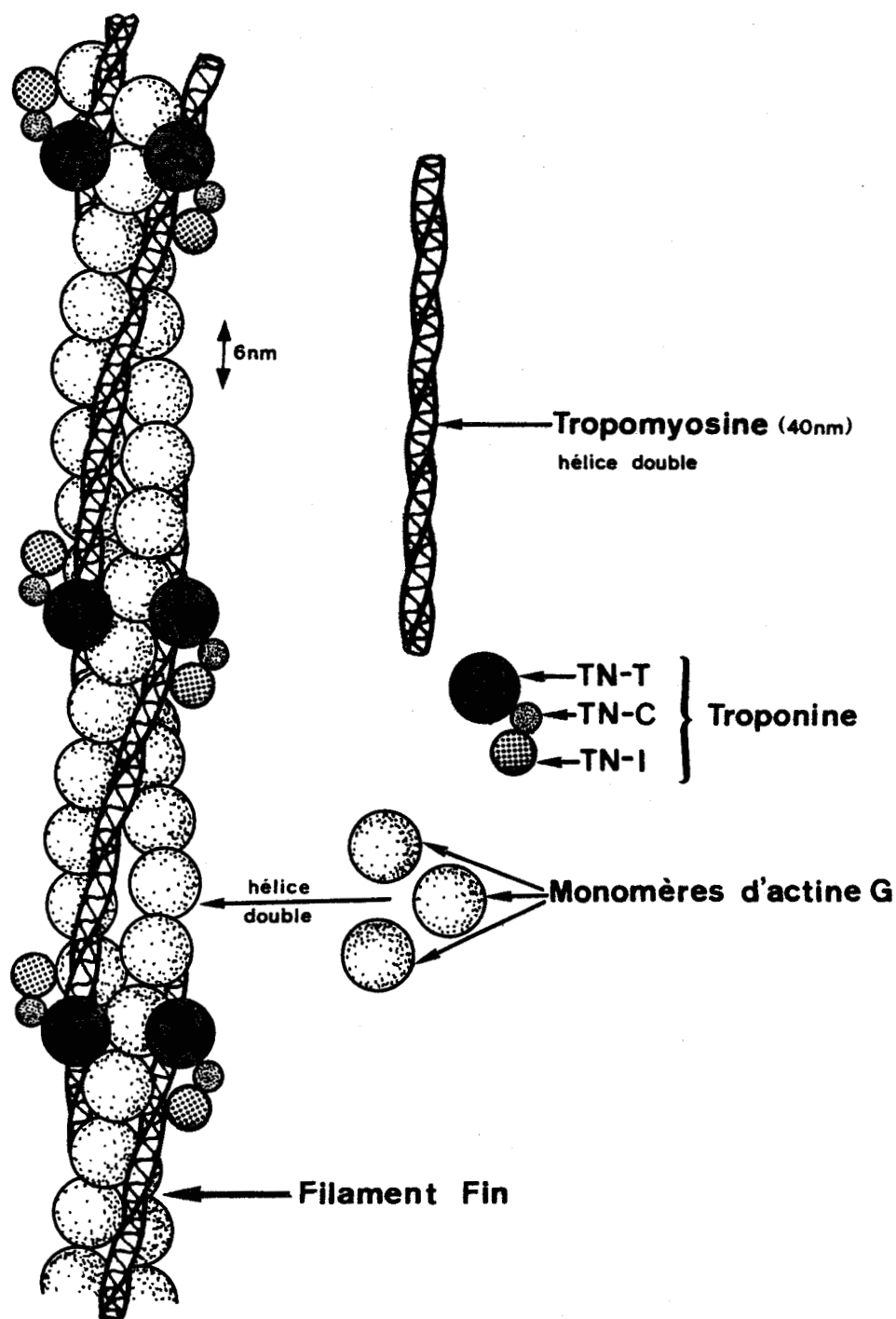


Fig.8. Le filament fin contient plusieurs protéines :

- La F-actine (en double hélice) composée de monomères de G-actine.
- La tropomyosine (en double hélice).
- Les trois constituants de la troponine
 - le facteur fixé sur la tropomyosine (TN-T).
 - le facteur liant le Calcium (TN-C).
 - le facteur inhibiteur de la contraction (TN-I).

(d'après Gillis, 1975 et Gillis, 1977, 6th Meeting of the European Muscle Club, Saclay, 1977).

suit l'hélice formée par les G-actines et ses molécules sont situées l'une après l'autre en associant les molécules de troponine entre elles (Fig.8.). Il est important de savoir que, *in vitro*, les G-actines peuvent former le filament fin en absence de la tropomyosine et de la troponine.

c) *La troponine.*

La troponine du Lapin est constituée de trois composants majeurs de P.M. 39 000, 24 000 et 18 000 que l'on appelle respectivement TN-T, TN-I et TN-C. La TN-T est le constituant qui permet l'association avec la tropomyosine; la TN-I est le facteur inhibiteur et la TN-C le composant liant le Ca^{2+} . La troponine est le complexe "régulateur" de la contraction (Cohen *et al.*, 1973; Gillis, 1975) (Fig.8.)

3. Les autres protéines contractiles.

En dehors des protéines contractiles situées sur les filaments épais et fin, il existe d'autres protéines faisant partie des myofibrilles du muscle strié.

L' α -actinine de P.M. 95 000 à 100 000 est localisée dans la strie Z (Ebashi *et al.*, 1973). Le rôle de la β -actinine (P.M. 70 000) est encore inconnu. Maruyama (1966) la considère comme un facteur régulateur de la polymérisation de l'actine. D'autres auteurs (Ebashi *et al.*, 1973) lui donnent une fonction structurale comparable à celle des M-protéines, mais au niveau de l'actine, et elle serait située au niveau de la bande N.

Enfin dernièrement, on a parlé d'une nouvelle protéine existant dans le muscle lisse et dans les cellules non musculaires, la *filamine* (Wang *et al.*, 1975). Cette protéine a un poids moléculaire de 250 000 et a été identifiée comme une protéine contractile régulatrice qui inhibe l'activation de la Mg^{2+} ATPase de la myosine par l'actine (Davies *et al.*, 1977).

Dans le *muscle lisse* des Invertébrés, on a décrit depuis longtemps la *paramyosine* (Levine *et al.*, 1976). Elle a un poids moléculaire de 105 000. Autrefois, la *paramyosine* a été considérée comme une protéine structurale contenant de la myosine, mais depuis les travaux récents d'Epstein *et al.* (1976), on sait qu'elle interagit avec la myosine. Elle est compétitive avec la F-actine en ce qui concerne son effet sur la myosine, et l'affinité apparente de la myosine pour la F-actine est remarquablement réduite lorsque la myosine et la *paramyosine* sont associées.

Depuis peu de temps on a reconnu l'importance de la parvalbumine. Cette protéine n'existe que dans le muscle (on ne connaît pas encore sa localisation précise), et en particulier dans le muscle rapide. Elle est considérée comme ayant une fonction analogue à celle de la TN-C, mais son rôle activateur est dix fois plus fort que celui de cette dernière. La parvalbumine joue un rôle de transporteur du Ca^{2+} dans la cellule musculaire. Son poids moléculaire est de 11 500 (Pechère *et al.*, 1975, 1977).

Mis à part le système contractile musculaire, il existe un autre système : celui des cils et des flagelles. Cependant ce système semble avoir le même principe de contraction que le muscle, c'est-à-dire par glissement des différents éléments l'un sur l'autre (Warner, 1976). Ainsi on connaît deux protéines essentielles participant à la motilité des cils et flagelles : la *tubuline* et la *dynéine* d'un poids moléculaire de 55 000 et 700 000 respectivement (Gibbons *et al.*, 1976).

4. Les activités ATPasiques de la myosine.

La myosine est considérée comme une enzyme capable d'hydrolyser l'ATP en ADP et en phosphore inorganique dans le but de libérer l'énergie nécessaire pour la contraction musculaire. Plusieurs activités ATPasiques ont été décrites. Dans la myosine, l'activité ATPasique est localisée dans la tête de la molécule. Il existe deux sites catalytiques, un site pour chaque fragment HMM-S₁. Chaque site contient un groupe thiol catalytique

et un groupe thiol inhibiteur. On a pu isoler de la tête de la myosine, un octapeptide capable de fixer l'ATP. La séquence de ce peptide, qui peut représenter le site actif de l'ATPase, contient notamment un résidu de cystéine, nécessaire à l'activité ATPasique (Barany et Merrifield, 1973). (Fig.9.)

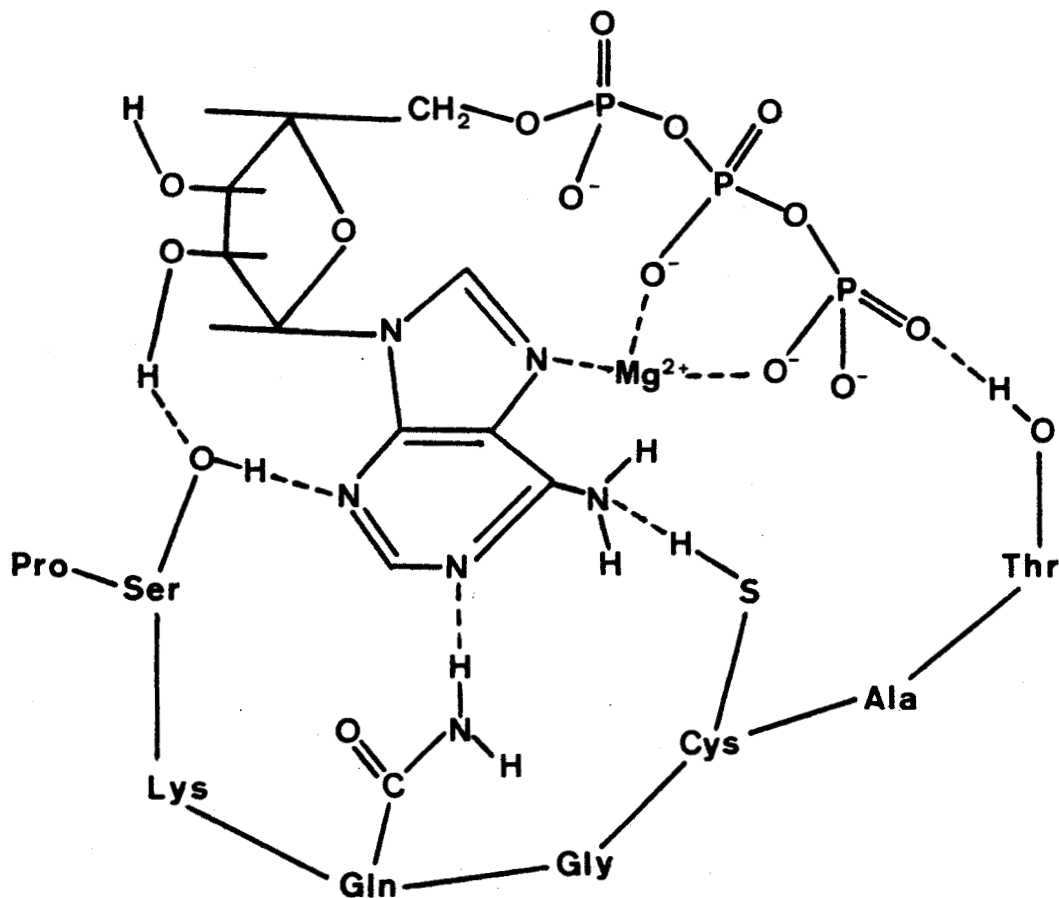


Fig.9. : Modèle d'association de l'ATP au peptide isolé de la myosine (Fixation du Mg-ATP). (D'après Barany et Merrifield, 1973).

a) L'activité ATPasique Ca^{2+} dépendante.

L'activité ATPasique dépendante du Ca^{2+} est l'activité propre à la myosine. Elle est facilement mesurable *in vitro* sur la myosine extraite et est d'autant plus élevée que la myosine est pure et obtenue dans les délais les plus brefs. Elle est

dépendante du Ca^{2+} , car elle augmente en fonction de la concentration du Ca^{2+} que l'on met en sa présence lors du dosage (Green et Mommaerts, 1953).

b) *L'activité ATPasique Mg^{2+} dépendante.*

L'activité ATPasique dépendante du Mg^{2+} est comme la Ca^{2+} ATPase mesurable *in vitro*. Bien qu'elle soit située sur la myosine, cette activité diminue en fonction de la pureté de la myosine. Comme elle est activée en présence d'actine et en fonction de sa concentration, elle est appelée l'activité ATPasique propre à l'actomyosine (Spudich et Watt, 1971).

c) *L'activité ATPasique dépendante des ions monovalents.*

Les activités ATPasiques dépendantes de Na^+ ou K^+ sont des activités *non spécifiques* des protéines myofibrillaires. Ce sont les activités de différentes particules cellulaires, en particulier des microsomes et des mitochondries. Sur les membranes, on trouve en plus une activité ATPasique dépendante du Mg^{2+} (Swynghedauw *et al.*, 1973).

5. Les modifications des protéines contractiles.

Les protéines contractiles ne sont pas toujours identiques dans les différents muscles et encore moins chez les différentes espèces animales, sans parler des modifications au niveau de leur structure primaire.

a) *Les modifications selon les organes.*

Les modifications les plus connues sont celles de la *myosine*. La myosine du muscle strié squelettique a *trois chaînes légères*, mais il existe dans une même espèce des différences entre le muscle squelettique blanc et le muscle squelettique rouge justement au niveau des chaînes légères dont les poids moléculaires changent (Dreizen et Richards, 1973). Cette différence est encore plus évidente entre le muscle strié squelettique et le muscle strié

cardiaque. La myosine du muscle cardiaque ne possède que deux chaînes légères de 27 000 et 18 000 de P.M. (Weeds et Frank, 1973). De même, la myosine du muscle lisse ne possède que deux chaînes légères, mais de 20 000 et 17 000 de P.M. seulement (Léger et Focant, 1973). La myosine des fibroblastes et des thrombocytes ne montre également que deux chaînes légères, mais de 20 000 et 15 000 de P.M. (Adelstein et Conti, 1973 et 1976). On connaît maintenant aussi des hétérogénéités au niveau de l'actine et on distingue trois formes : α -, β - et γ -actine. L' α actine est le facteur majeur du muscle strié et la γ -actine celui du muscle lisse. Les trois formes sont présentes d'une façon pratiquement identique dans les fibroblastes (Rubenstein et Spudich, 1977).

b) *Les modifications d'ordre spécifique.*

C'est encore au niveau des chaînes légères de la myosine, en particulier de la myosine du muscle lisse, que l'on trouve des modifications importantes. Alors que la myosine du muscle lisse des Vertébrés possède deux chaînes légères de différents poids moléculaires, celle du muscle lisse des Invertébrés possède deux chaînes légères de même poids moléculaire, mais dont les fonctions sont différentes (Kendrick-Jones *et al.*, 1976).

Des modifications sensibles sont également connues au niveau du filament fin, où un, deux ou même les trois facteurs du complexe régulateur de la troponine sont absents chez certains Arthropodes et Mollusques (Lehman *et al.*, 1973).

c) *Les modifications physiologiques.*

Une des modifications physiologiques les plus connues est celle de la myosine foetale, qui ne possède que deux chaînes légères, celles de P.M. 25 000 et 18 000, alors que le muscle adulte possède une troisième de P.M. 16 000 en plus (Dow et Stracher, 1971).

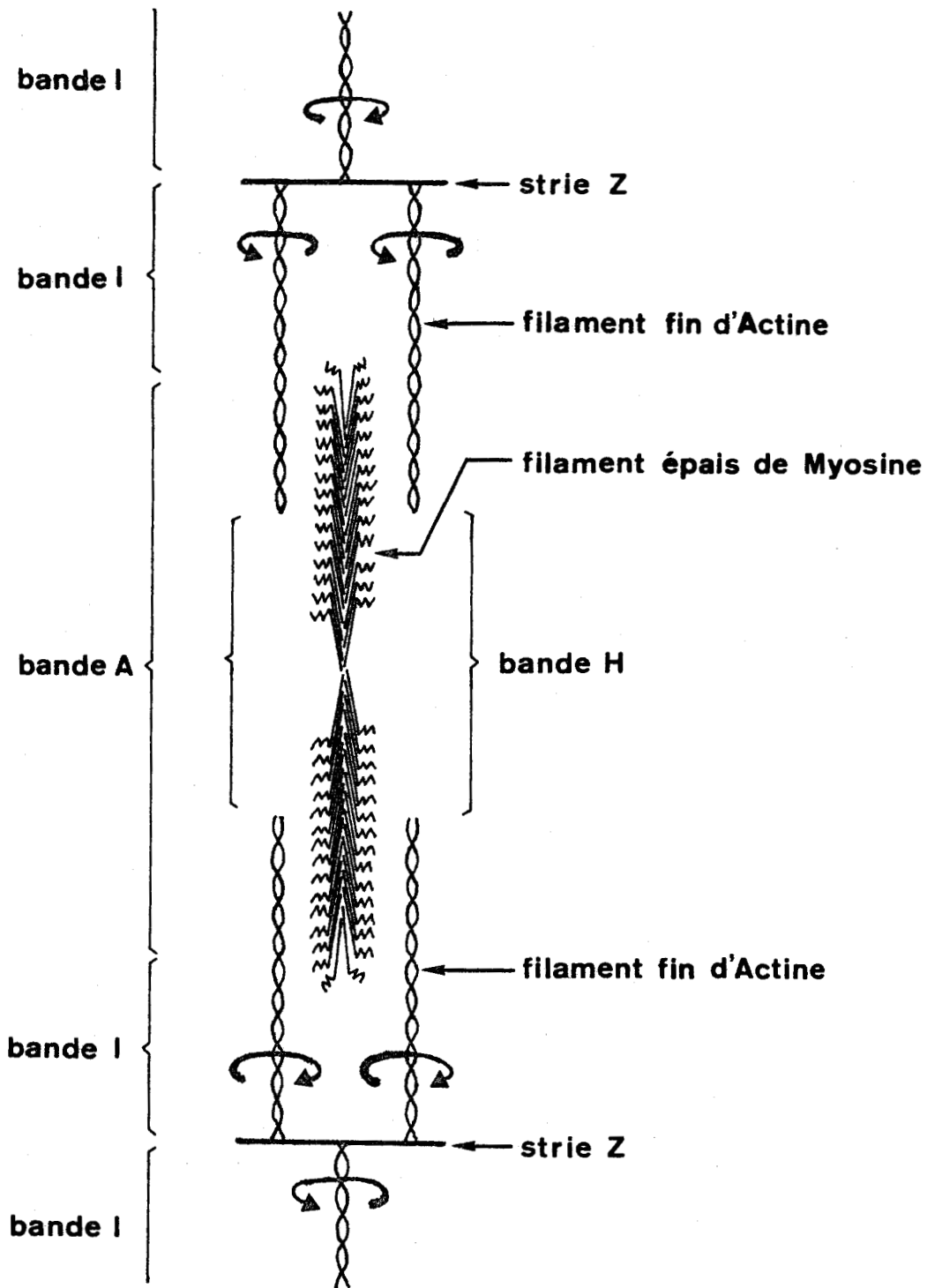


Fig.10. Disposition des filaments d'actine et de myosine dans les sarcomères. De part et d'autre de la strie Z, les filaments d'actine sont enroulés en sens contraire. Les filaments de myosine sont disposés symétriquement par rapport au centre du sarcomère. Les filaments de myosine sont faits de molécules assemblées tête-bêche. (d'après H.E. Huxley, 1965).

La myosine du *muscle dystrophie* (dystrophie provoquée expérimentalement chez la Souris, souche : ReJ 129 dy/dy), par contre, perd ses chaînes légères et il ne reste que celle de 25 000 de poids moléculaire (John, 1974; Petryshyn et Nicholls, 1976). Un changement important a été constaté également après reinnervations croisées entre le muscle rouge et le blanc, où l'on observe la présence des chaînes légères des deux types de myosines à la fois. Après dénervation, la chaîne légère de 25 000 de P.M. disparaît en général (Weeds *et al.*, 1974).

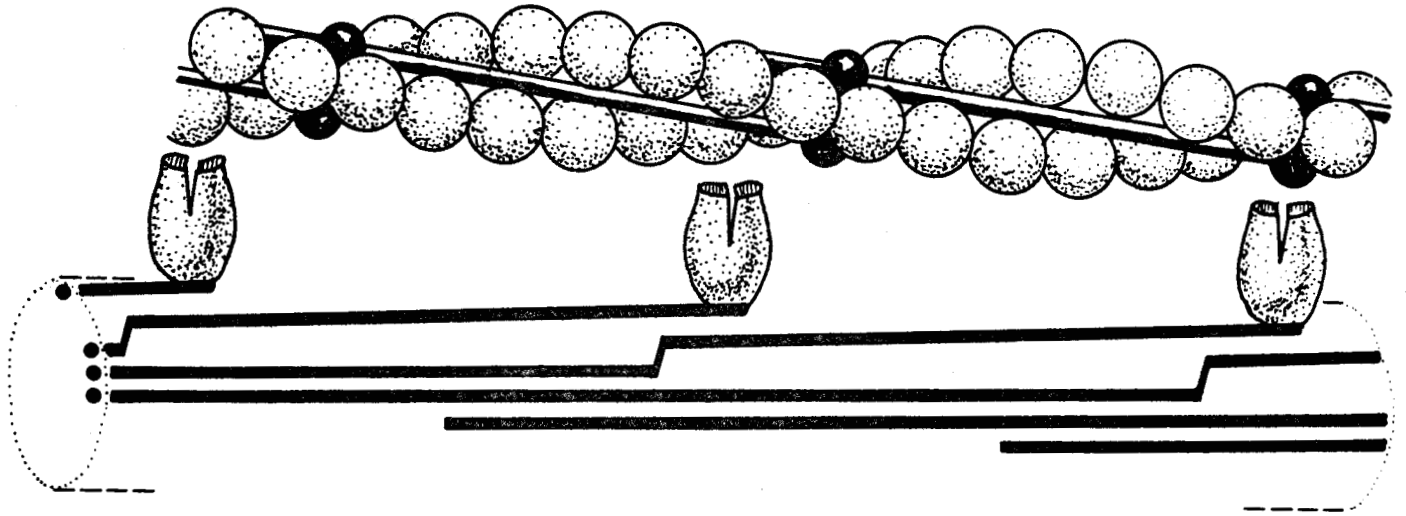
D. LA CONTRACTION MUSCULAIRE.

La contraction musculaire a été l'objet de nombreux travaux et c'est H.E. Huxley (1965) qui le premier a donné une explication du mécanisme de la contraction.

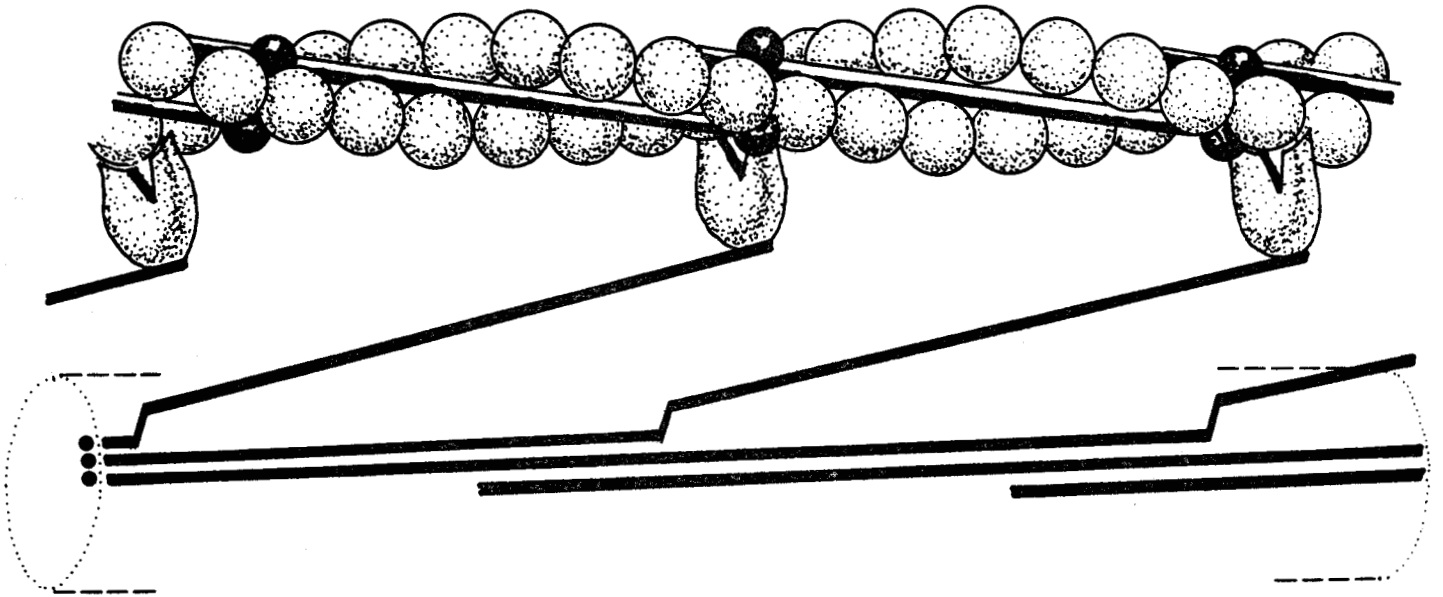
1. Le processus mécanique.

Au cours de la contraction, les filaments d'actine et de myosine ne changent pas de longueur: ce sont les filaments fins qui glissent entre les filaments épais (Fig.1.) et pénètrent plus avant dans la bande A jusqu'à la ligne M (Huxley, 1964, 1965). La bande I devient plus étroite, en même temps que la bande H disparaît. Lors de la relaxation les filaments fins ressortent d'entre les filaments épais, la bande I s'élargit tandis que réapparaît la bande H. Ainsi les mouvements de contraction et de relaxation des myofibrilles correspondent à des glissements des deux catégories de myofilaments les uns par rapport aux autres.

Il faut donc se demander pourquoi les mouvements se font toujours dans le même sens lors de la contraction, c'est-à-dire dans le sens qui correspond à l'intercalation des filaments fins entre les filaments épais. Ceci est lié à l'architecture moléculaire des myofilaments, les molécules qui les constituent étant disposées selon des arrangements symétriques par rapport au milieu du sarcomère (ligne M). Les filaments fins sont formés



Relaché



Contracté

Fig.11. Formation de liaison entre filaments fins (actine) et filaments épais (myosine). (d'après Ham, 1974a).

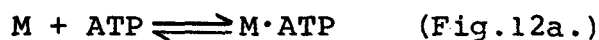
par l'enroulement en double hélice de molécules globulaires d'actine (Fig.8. et 10.), de tropomyosine et de troponine. Si l'on observe l'enroulement des filaments situés de part et d'autre d'une strie Z, on constate qu'ils sont de sens contraire (Fig.10.). D'autre part, les filaments de myosine sont formés de molécules accolées, disposées tête-bêche ("end-to-end") et légèrement décalées les unes par rapport aux autres (Fig.10.). Il est remarquable de constater en microscopie électronique, après coloration négative, que les filaments de myosine reconstitués *in vitro* par précipitation à partir d'une solution de myosine, ont les mêmes caractères morphologiques que les filaments épais isolés à partir des myofibrilles (Huxley, 1963).

2. Le processus biochimique.

L'ATP est la seule source d'énergie utilisable de la cellule. L'énergie chimique qui se transforme en énergie mécanique dans le muscle provient de l'hydrolyse de l'ATP qui s'effectue au niveau de la tête globulaire de la myosine. L'énergie ainsi libérée provoque un pivotement de la tête globulaire. Cette modification conformationnelle de la tête de myosine est utilisée pour faire glisser les filaments fins d'actine le long des filaments épais de myosine (Fig.8. et 11).

a) *Mécanisme de l'activité ATPasique de la myosine.*

Plusieurs complexes enzyme-substrat différents se forment au cours de l'activité ATPasique. Il y a d'abord un premier complexe avec l'ADP et le phosphore inorganique (P_i) qui correspond à la conformation "énergétisée" de la molécule de myosine (Fig.12.).



Lorsque des quantités équimoléculaires d'ATP et de myosine sont mélangées, il apparaît rapidement un H^+ libre dans le milieu, puis plus lentement de l'ADP et un phosphate libre. L'ADP et le

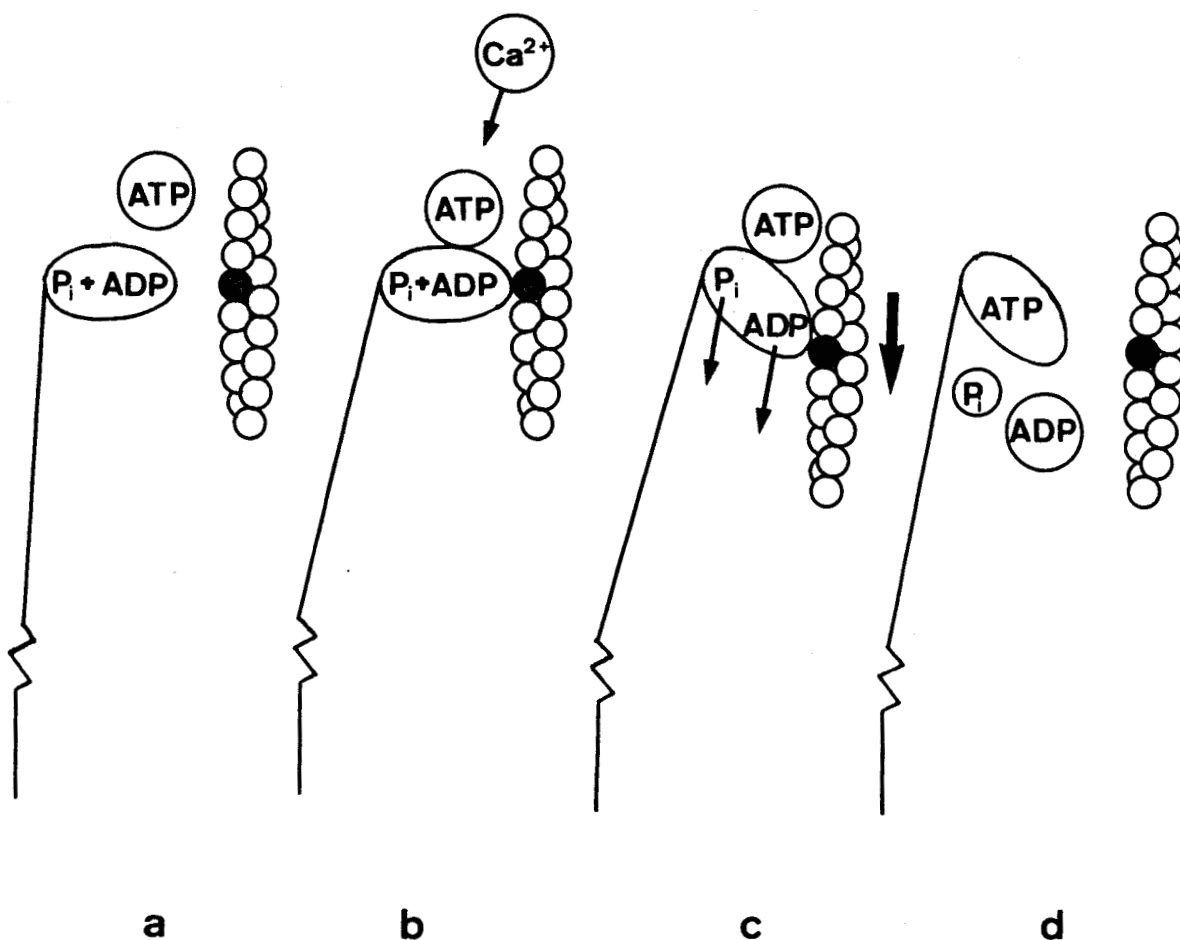
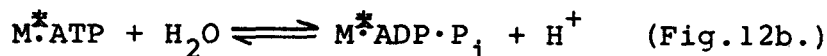


Fig.12. Contraction musculaire montrée comme un cycle à quatre phases. La tête de la myosine "énergétisée" (Phase a) réagit avec un monomère d'actine après activation de la troponine par le calcium (Phase b). Il en résulte une modification conformationnelle telle, que la "tête" de la myosine forme un angle de 45° avec sa "queue" (Phase c). L'ADP et le phosphore inorganique quittent le site de fixation de la myosine et sont remplacés par l'ATP (Phase d). Le clivage de l'ATP conduit de nouveau à la formation du complexe $ADP + P_i$: ceci modifie la position angulaire de la tête de la myosine qui forme maintenant un angle de 90° . Dans ce cas, elle peut réagir à nouveau avec un monomère d'actine. (d'après Mannherz *et al.*, *Nature, New Biology*, 241, 226-229 (1973)).

phosphate inorganique n'apparaissant pas dans le milieu en même temps que H^+ , on a pensé à l'existence d'un complexe myosine + ADP + P_i



(M^* = conformation énergétisée de la myosine). Le complexe $M^*ADP \cdot P_i$ est riche en énergie parce qu'il a conservé l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP.

Dans une troisième étape,



Il y a libération de l'énergie du complexe énergétisé pour former le complexe à bas niveau énergétique $M \cdot ADP \cdot P_i$. Cette réaction "lente" est limitante.

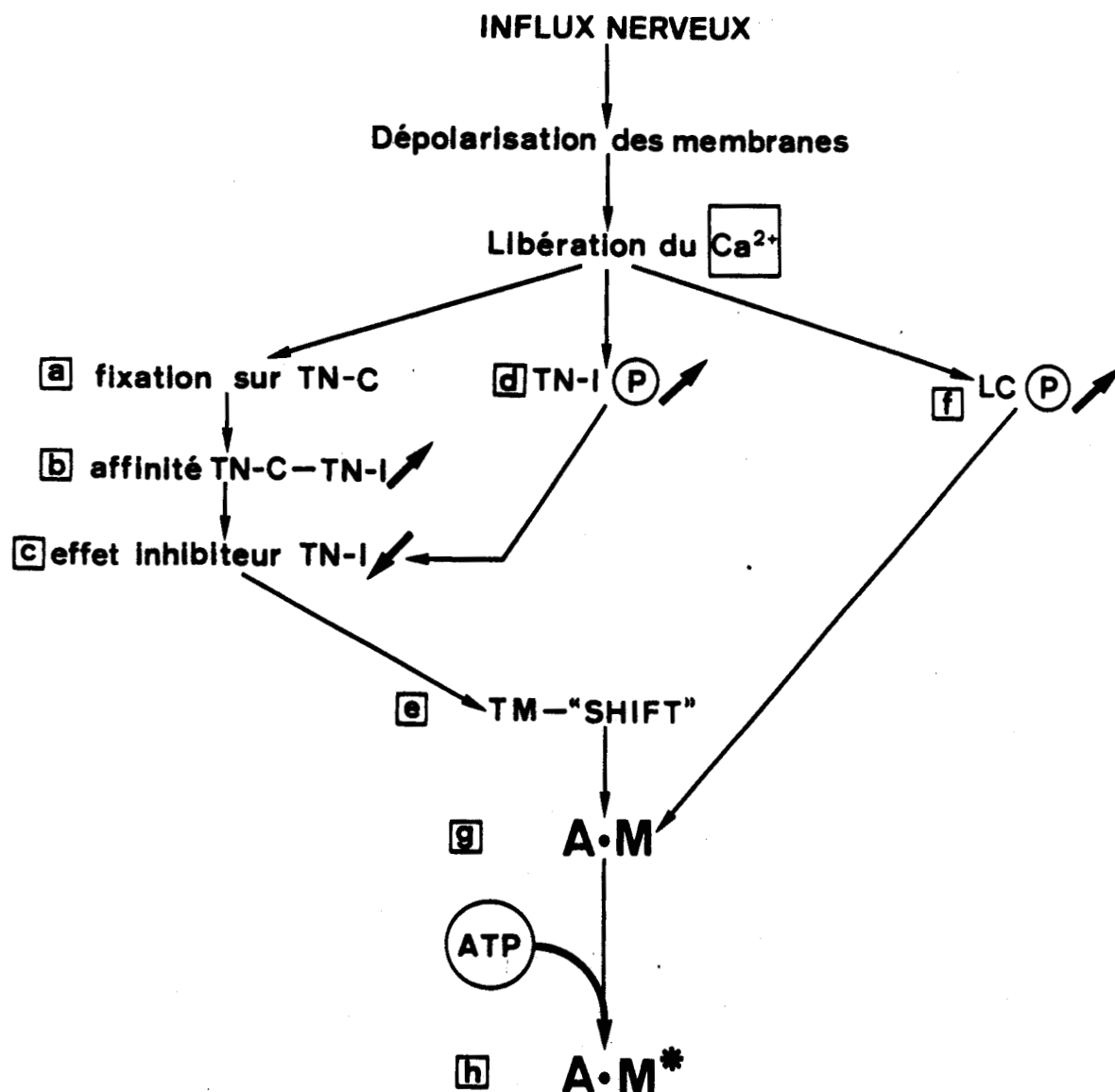
Le complexe à bas niveau d'énergie se dissocie rapidement en myosine libre qui se trouve dans sa conformation de repos:



La réaction (Fig.12c.) qui libère de l'énergie est concomitante de la modification de la conformation de la tête de la myosine qui permet le glissement des filaments fins d'actine le long des filaments épais de myosine. Cette nouvelle actine-myosine-ATP se dissocie rapidement en donnant une molécule libre d'actine et une myosine-ATP "non-chargée" mais énergétisée (phase 1: Fig.12a.).

Ainsi sont formés deux complexes myosine-actine au cours de l'hydrolyse de l'ATP, l'un à haute énergie, l'autre à basse énergie. Celui à haute énergie est le complexe actif et est formé lorsque la myosine-ATP intermédiaire "chargée" s'associe avec une molécule d'actine. Sa vie est très courte et en un centième de seconde l'ATP est hydrolysé, l'énergie est libérée et le complexe atteint le stade à basse énergie. Ce complexe reste à basse énergie jusqu'à ce qu'une nouvelle molécule d'ATP

Fig.13. Schéma du rôle régulateur du Calcium.



Dans un muscle au repos, le calcium extracellulaire est concentré dans la région périmembranaire et dans ses invaginations (système T). Le calcium intracellulaire est cantonné dans le réticulum sarcoplasmique. L'influx nerveux provoque un changement de polarité des membranes, et il se produit une entrée de Na^+ et Ca^{2+} dans la cellule. Le Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique va alors agir sur les protéines contractiles pour déclencher la contraction. Le processus inverse se produit lors de la relaxation.

↗ : augmentation, ↘ : diminution, (P) : phosphorylase.
 A·M : actomyosine; A·M* : actomyosine énergétisée.
 (Description plus détaillée dans le texte).

arrive. Ces phénomènes vont très vite dans le muscle sain. Mais lorsqu'il manque de l'ATP, ce complexe est très stable. La stabilité de ce complexe à basse énergie en l'absence d'ATP est appelée "complexe rigide" dont l'extrême rigidité se développe dans le muscle après la mort (*rigor mortis*) lors de la disparition de l'ATP par consommation graduelle. Mais le complexe rigide existe également *in vivo* dans le muscle lisse intestinal et utérin et dans l'actomyosine thrombocytaire au cours de la formation du caillot de sang. Dans ce dernier cas, il est irréversible.

b) *Régulation de la contraction par le Ca^{2+} .*

Comment s'effectue le contrôle par le calcium dont l'absence stoppe la totalité de la série de réactions? La réaction qui est sensible au calcium est l'association de la myosine-ATP chargée avec l'actine pour donner le complexe actif. La tropomyosine et la troponine sont indispensables pour que le calcium puisse jouer son rôle régulateur de la contraction.

Si l'on considère la proportion relative des protéines qui participent à la formation du filament fin, on doit se poser la question suivante : Comment une seule molécule de tropomyosine et une seule molécule de troponine peuvent-elles contrôler le comportement de sept molécules d'actine?

C'est l'emplacement de la tropomyosine sur le filament fin qui suggère un mécanisme possible du blocage ou de la formation du complexe actif. Le calcium se fixe sur la troponine C (TN-C) (Fig.13a, 14a), ce qui augmente l'affinité entre la troponine I (TN-I) et la TN-C (Fig.13a.), et diminue l'effet inhibiteur de la TN-I (Fig.13c.). En plus, le calcium active la TN-I phosphorylase (Fig.13d.) (TN-I(P)), ce qui réduit également l'effet inhibiteur de la TN-I. En présence du calcium, la TN-I s'écarte et pousse la tropomyosine dans le sillon de la double hélice du filament fin (TM-"shift") (Fig.13e., 14b.) et la myosine peut se fixer sur l'actine (Fig.14c.). Lorsque le calcium est enlevé, la TN-I se déplace à nouveau, mais dans l'autre sens, et tire la

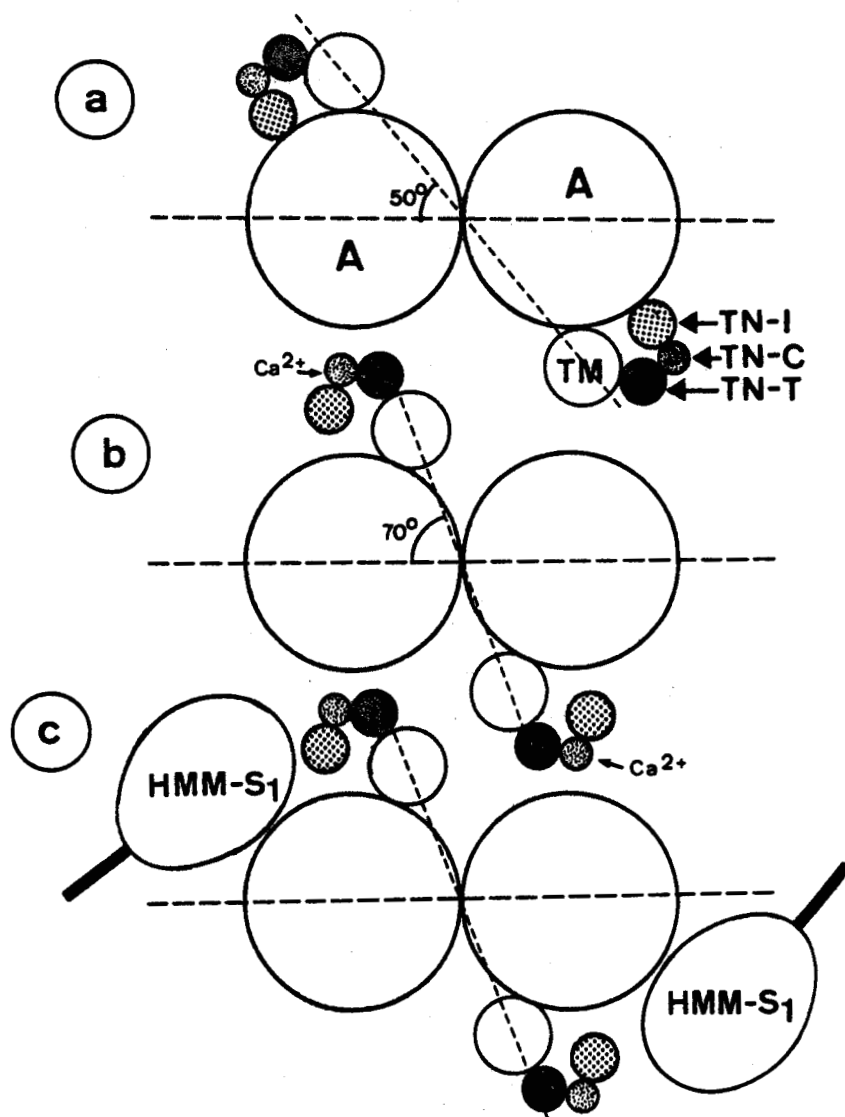


Fig.14. TM-"Shift". Le complexe troponine-tropomyosine se trouve à la périphérie du filament (a). Lors de l'arrivée du calcium sur la TN-C, le complexe se déplace vers le sillon des deux hélices d'actine (b), et la place est ainsi libérée permettant à la tête de la myosine HMM-S₁ de venir se lier à l'actine (c). (d'après Huxley, 1973; Gillis, 1975, et Gillis 1977: 6th Meeting of the European Muscle Club, Saclay, 1977).

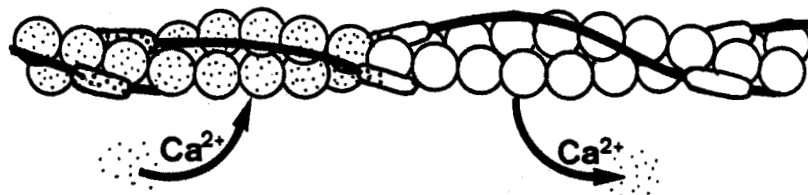


Fig.15. TM-"Shift" tel qu'il faut l'imaginer sur le filament fin. (d'après Murray et Weber, 1974).

tropomyosine davantage vers la périphérie du filament fin (Fig.15). Ce mouvement provoque ainsi un empêchement physique de l'approche de la myosine-ATP chargée aux molécules d'actine. La tropomyosine ne joue donc pas seulement un rôle purement structural, mais également informateur pour les molécules d'actine (Huxley, 1973).

Le calcium active également la phosphorylase des chaînes légères (LC-(P)), ce qui provoque un changement conformationnel des chaînes légères protégeant le site actif de la myosine et facilite la fixation de l'ATP sur la tête globulaire de la myosine (Fig.13f.). La phosphorylation des chaînes légères et le TM-"shift" permettent finalement l'association du complexe acto-myosine non chargé (A.M) (Fig.13g.) qui se transforme en une acto-myosine chargée (A.M^{*}) en présence d'ATP (Fig.13h.).

L'association de la myosine avec l'actine est non seulement régulée par le calcium, mais aussi par la concentration en ATP. A basse concentration d'ATP et en absence de calcium, les deux molécules peuvent s'associer, mais ne peuvent former que le complexe rigide. Dans ces conditions, la myosine-ATP -chimiquement différente de la myosine-ATP chargée- a la possibilité de repousser la tropomyosine dans le sillon de la double hélice du filament fin. Ce phénomène est observé dans les muscles lisses où la troponine est absente. L'introduction d'un supplément d'ATP ou de calcium transforme ensuite le complexe rigide en complexe actif. Un des meilleurs exemples de ce phénomène, est ce qu'on appelle le *catch* chez les Mollusques bivalves lors de la contraction du muscle rétracteur byssal antérieur (Johnson et Kahn, 1959).

III. PROBLEMES POSES.

Cette revue des principaux éléments de la cancérogénèse chimique d'une part, et de la biologie et biochimie du muscle d'autre part, nous permet d'établir clairement les problèmes que nous avons envisagés de résoudre.

Parmi les nombreux auteurs ayant étudié les différentes formes du cancer musculaire, certains ont entrepris des études sur l'effet du nickel lors de la cancérisation, mais aucun n'a envisagé jusqu'à présent l'étude du phénomène de la contraction dans les tumeurs. Pourtant, depuis Gilman (1965), on sait que les rhabdomyoblastes mis en culture se différencient apparemment comme les cellules musculaires normales, mais ne montrent pratiquement plus aucune mobilité ni contraction par rapport aux myoblastes normaux dans les mêmes conditions.

Le problème de blocage de la contraction nous semble très important. Nous avons pensé que cette question pourrait être abordée en étudiant particulièrement la myosine du muscle tumoral et de la comparer avec celle du muscle normal et surtout celle du muscle foetal. Ceci nous semble indispensable, non seulement parce qu'on a trouvé des ressemblances de nombreuses protéines foetales avec des protéines d'origine cancéreuse, mais surtout parce qu'on sait que la myosine du muscle foetal est différente de celle du muscle adulte qui possède trois chaînes légères de différents poids moléculaires, alors que la myosine foetale n'en possède que deux.

La question qui se pose est de savoir à quel type de myosine ressemble la myosine tumorale, surtout que l'on a observé des modifications assez importantes au niveau des chaînes légères chez d'autres myosines extraites de différents *muscles pathologiques*.

Enfin, sur le plan morphologique, aucune étude n'a été effectuée concernant la structure des filaments de myosine pathologique reprécipitée *in vitro*.

Parallèlement, de nombreux travaux ont été menés concernant les activités ATPasiques de la myosine et de l'actomyosine. Ces études ont permis de définir le phénomène de la contraction. C'est donc avec des travaux de même nature, que nous avons pensé aborder le problème du blocage de la contraction.

Comme la définition exacte de la contraction ou de son blocage ne peut pas être uniquement fondée sur une étude de la myosine et de son activité ATPasique, nous avons également entrepris une étude du filament fin et de l'actine en particulier.

Nos études ultrastructurales portent donc essentiellement sur les aspects moléculaires de ces macromolécules normales et tumorales, et les recherches biochimiques et physico-chimiques visent à définir les différences de conformation et les modifications des interactions qui sont fondamentales dans les phénomènes de contraction.

M A T E R I E L E T M E T H O D E S

I. MATERIEL

Nos expériences ont été effectuées en premier lieu sur des Rats Wistar adultes, mâles ou femelles, âgés de trois mois, pesant entre 250 et 300 g et soumis à une alimentation classique. Nous nous sommes d'abord servis de Rats sains comme témoins pour toutes les études morphologiques ainsi que pour nos expériences biochimiques. Les mêmes travaux ont été ensuite entrepris sur des tumeurs induites par le Ni_3S_2 et sur des foetus âgés de 14 jours. Les foetus ont été prélevés à cet âge - donc au 2/3 de la gestation de la femelle - car c'est à ce moment que la concentration des α -Foetoprotéines dans le liquide amniotique est la plus élevée.

L'induction des tumeurs chez le Lapin a été réalisée parce que les études chimiques et biophysiques actuellement menées sur les protéines contractiles prennent comme référence le muscle blanc du Lapin. Nous avons utilisé des Lapins blancs adultes, mâles ou femelles, âgés de six mois et pesant en moyenne 2700 g. Nous avons travaillé parallèlement sur le muscle blanc du Lapin sain, sur les tumeurs induites et sur des foetus âgés de 20 jours, donc prélevés au 2/3 de la gestation de la Lapine.

Enfin, certaines études ont pu être complétées par des travaux sur un sarcome rhabdomyosarcomateux humain et un foetus humain.

Il s'agit d'une tumeur de localisation périnéale d'un nouveau-né opéré pour des raisons d'hémostase (hémorragie incoercible) provoquée par rupture des veines sous-cutanées. Cette tumeur a été excisée au quatrième jour de la vie du nourrisson, mais nous n'avons pu faire que des études histologiques sur cette tumeur. Deux mois plus tard, au même endroit, réapparaissait une récurrence tumorale de même importance (environ 10 cm de diamètre). Immédiatement après la mort, cette tumeur a été prélevée et nous avons pu effectuer des examens morphologiques et biochimiques.

Le foetus humain était âgé de 5 mois. Les raisons de l'avortement étaient une grossesse difficile (un cerclage a été effectué en début de grossesse) et un voyage excessif.

II. METHODES.

A. OBTENTION DES TUMEURS.

1. Caractéristiques du sous-sulfure de nickel, Ni_3S_2 .

L'agent chimio-inducteur est le sous-sulfure de nickel, Ni_3S_2 , un produit minéral avec deux charges positives libres. Il est préparé par M. D.Dewailly (Laboratoire de Chimie Minérale Appliquée, Université de Lille I) selon une méthode originale qui consiste à produire une poudre pure de Ni_3S_2 dont 1 g possède une surface totale de plus de 40 m^2 (la poudre de Ni_3S_2 préparée selon les méthodes classiques possède une surface de $1\text{ m}^2/\text{g}$).

2. Induction des tumeurs.

La poudre de Ni_3S_2 est mise en suspension à une concentration de 50 mg/ml dans une solution d'agar à 2%. La suspension est séchée à 60°C et le mélange sec est coupé ensuite en morceaux d'environ 20 mg et 80 mg. Ce mélange contient 71,43 % de Ni_3S_2 . Ces morceaux sont implantés dans le muscle d'une patte arrière de Rat Wistar (20 mg) ou des deux pattes arrières de Lapin (80 mg). Avec cette méthode d'implantation, on obtient chez le Rat des tumeurs musculaires au bout de 120 à 150 jours. Les tumeurs sont prélevées 3 à 4 semaines après leur première apparition et pèsent chez le Rat 20 à 30 g. Chez le Lapin, le développement d'une tumeur est plus lent. Il faut quatre à six mois pour produire une tumeur de la taille d'une noix. Puis la tumeur entre dans une période de stagnation d'une durée de 2 à 20 mois. Pendant la deuxième période de croissance, la tumeur évolue très vite et elle atteint au bout de 4 à 5 semaines une taille importante : le diamètre pouvant aller jusqu'à 10 cm et le poids jusqu'à 300 g.

B. ETUDES MORPHOLOGIQUES.

1. Microscopie photonique.

Pour l'histologie, des fragments de différentes régions des tumeurs sont fixés par le formaldéhyde pendant quelques jours puis par le Dubosc-Brasil pendant 24 à 48 heures. Les prélèvements sont inclus suivant des méthodes classiques dans la paraffine et sont débités en coupes d'une épaisseur de 4 à 6 μm .

Pour l'observation de certaines coupes la microscopie en contraste de phase a été employée.

Les microphotographies sont réalisées au flash électronique (Microscope Zeiss).

Pour l'examen histologique, différentes colorations sont utilisées : Azan, Clark, Hémalun-Eosine et Trichrome de Masson. Comme réactif cytochimique est employé le P.A.S. avant et après digestion à l'amylase.

2. Microscopie électronique.

a) *Fixation et Inclusion.*

Les divers prélèvements sont immergés pendant 1 heure dans le glutaraldéhyde à 5 % dans du tampon phosphate 0,1 M (pH 7,2), puis 1 heure dans du tétroxyde d'osmium à 2 % dans le même tampon. Après déshydratation alcoolique, les inclusions sont réalisées dans le styrène-méthacrylate selon la technique de Kushida (1961) et Stockem et Komnick (1970). Les blocs sont coupés sur ultramicrotome LKB. En général, les coupes sont recueillies sur grilles recouvertes d'une membrane de Pioloform F (Stockem 1968). Elles sont contrastées par l'acétate d'uranyle à 1 % dans l'alcool à 50°, suivi du citrate de plomb selon Reynolds (1963). Les préparations sont examinées au microscope électronique "Philips 300" à 80 KV.

b) *Contraste négatif.*

Des colorations négatives sont obtenues en déposant une goutte de la suspension protéinique sur une grille recouverte d'une membrane de Pioloform F (Stockem, 1968). Avant d'appliquer le contrastant, la grille est rincée avec environ 10 gouttes d'une solution de KCl 0,1 M, laquelle est éliminée ensuite avec du papier filtre. Une goutte d'acétate d'uranyle à 0,5 % dans l'alcool à 50° est immédiatement ajoutée. Après 5 à 10 secondes, le contrastant est éliminé et la grille est séchée pendant 1 à 2 minutes. Les préparations sont examinées au microscope électronique "Philips 300" à 80 KV et en utilisant un diaphragme d'objectif de 50 µm.

C. ETUDE DE LA CONTRACTION DES MYOBLASTES TUMORAUX.

Pour l'étude de la contraction des myoblastes tumoraux, nous avons suivi le principe de la *glycérination*, c'est-à-dire une extraction des protéines non contractiles des myoblastes tumoraux par la glycérine (Szent-Györgyi, 1949; Weber et Portzehl, 1952; Hoffmann-Berling, 1953) dans une solution saline. Sur les cellules extraites, dites "modèles", on fait agir ensuite l'ATP et les différents sels qui interviennent lors de la contraction.

La méthode employée se rapproche de celle proposée par Weber et Portzehl (1952). Nous avons utilisé les solutions suivantes (en concentration finale et à pH 7,2) :

- *Solution de base* : KCl 0,01 M, MgCl₂ 0,003 M, tampon Tris-maléate 0,01 M.

- *Solution d'extraction* : solution de base + EDTA 0,01 M + glycérine 40 %.

- *Solution de lavage* : solution de base + EDTA 0,01 M.

- *Solution de contraction* : solution de base + ATP 0,005 M.
10 ml de solution sont employés à chaque fois.

De petits morceaux de tumeurs sont immergés dans la solution d'extraction à 0°C pendant 24 heures puis conservés à -20°C pendant une période de 7 jours. Après l'extraction les échantil-

lons sont placés dans des bains de concentrations décroissantes en glycérine (20 %, 10 %, 5 %), puis rincés dans la solution de lavage avant de subir le test de contraction.

Toutes les expériences réalisées ont donné lieu à des examens au microscope électronique avant et après l'emploi de l'ATP.

D. ETUDES DES PROTEINES CONTRACTILES.

1. Préparations et purifications de la myosine et de l'actine.

a) Préparation de la myosine.

Les myosines sont préparées selon le protocole décrit par Perry (1955). Toutefois, comme l'extraction de la myosine foetale a dû être modifiée, nous avons appliqué cette même modification pour l'extraction de la myosine normale. Pour l'extraction de la myosine tumorale, la technique a été changée encore davantage. Toutes les opérations sont effectuées en chambre froide à 4°C.

α. Myosines adulte et foetale.

Le muscle est broyé et homogénéisé (Moulinex 320) et repris dans une solution de Guba-Straub (KCl 0,3 M, K_2HPO_4 0,05 M, KH_2PO_4 0,01 M, $MgCl_2$ 0,001 M, $K_4P_2O_7$ 0,01 M, β -mercaptoéthanol 0,01 M) à raison de 3 ml pour 1 g de broyat. Le pH de l'ensemble est amené à pH 6,8 par KOH 1 M et agité 10 minutes (muscle normal) ou 90 minutes (muscle foetal), puis filtré sur gaze; la pulpe servira à l'extraction de l'actine. Le filtrat est centrifugé à 5000 g et le surnageant est ensuite dilué avec 10 volumes d'eau. La myosine précipite et on effectue alors une nouvelle centrifugation à 5000 g. Les culots de myosine sont dissous dans du KCl 0,3 M et tampon phosphate de potassium 10 mM à pH 6,8. La solution est centrifugée pendant 1 heure à 40 000 g. Après deux cycles de dissolution-précipitation, la myosine précipitée est dissoute dans du KCl 0,3 M et tampon phosphate de potassium 10 mM à pH 6,8 et centrifugée pendant 3 heures à 105 000 g (Ultra-

centrifugeuse L2/L50, Beckman) afin d'éliminer le maximum d'actine (Ulbrecht *et al.*, 1960). Le surnageant est amené à une concentration protéinique de 2 mg/ml (lecture de la D.O. à 280 nm) et la myosine est précipitée par le sulfate d'ammonium selon la technique d'Offer *et al.* (1973) (Fig. 16.)

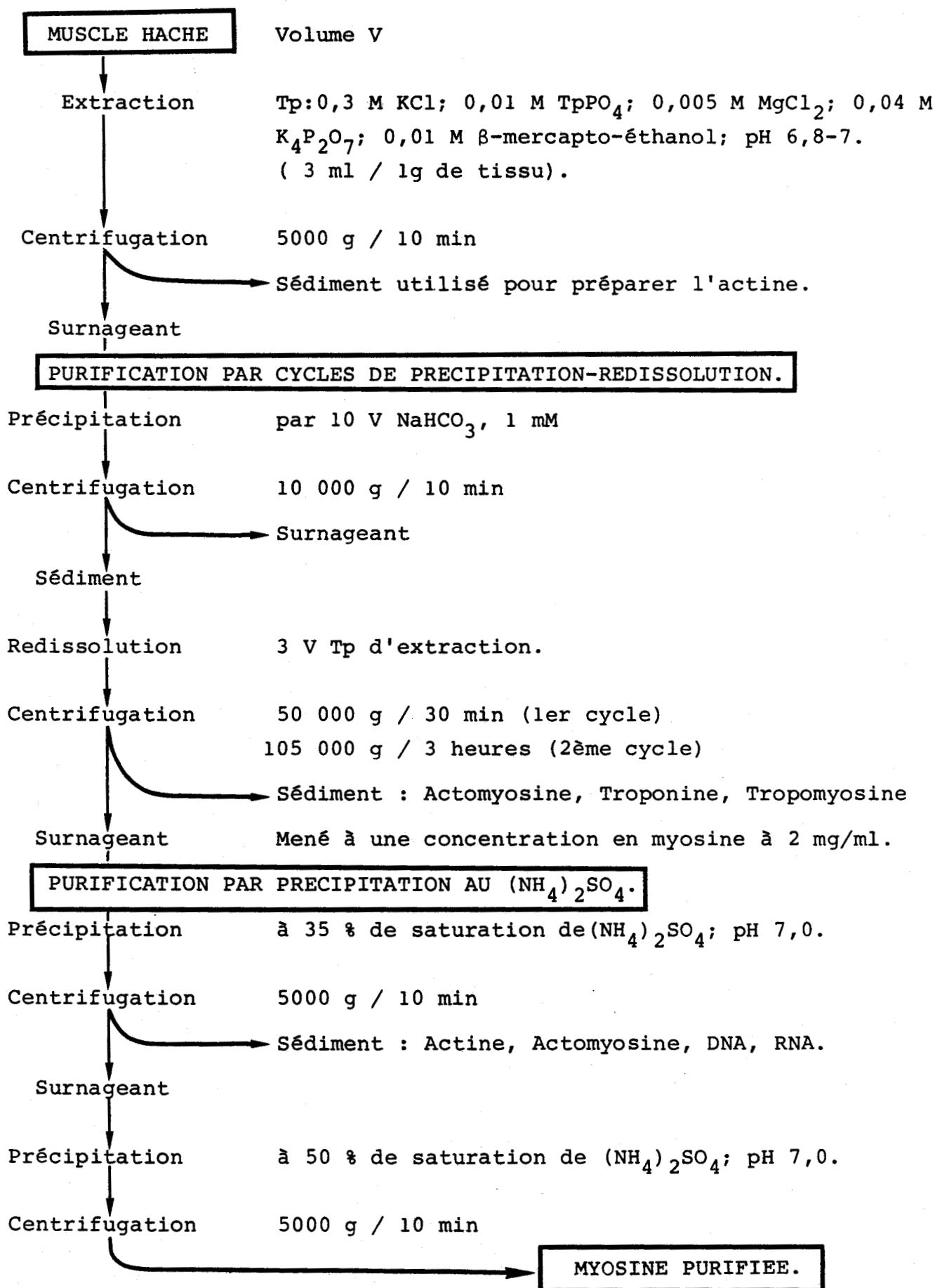
β. Myosine tumorale.

Par la méthode décrite dans le paragraphe précédent, il était pratiquement impossible d'extraire la myosine. Ainsi nous avons dû augmenter non seulement la concentration en KCl, mais aussi celle en $K_4P_2O_7$. La tumeur généralement très consistante, est homogénéisée avec un Waring-Blendor (1 minute à haute vitesse), et la myosine est extraite du broyat par une solution de phosphate de potassium 0,01 M, KCl 0,6 M, $MgCl_2$ 0,001 M et $K_4P_2O_7$ 0,04 M à pH 6,8, à raison de 6 ml pour 1 g de broyat. Du β-mercaptoéthanol 10 mM est ajouté à chaque solution utilisée. Le broyat en suspension est agité pendant 90 minutes. Après cette première extraction, la préparation de la myosine tumorale est poursuivie de la même façon que celle des myosines normales et foetales (Fig. 16.)

γ. Purification par chromatographie d'échanges d'ions sur DEAE-Séphadex A.50.

En raison des faibles rendements des myosines foetales et tumorales, seule la myosine normale a pu être purifiée sur colonne DEAE-Séphadex A.50 (Pharmacia). La préparation de cette colonne ainsi que la purification de la myosine par cette méthode sont effectuées comme indiqué par Offer *et al.* (1973) : 200 mg de myosine sont repris dans un tampon de K_2HPO_4 0,135 M, KH_2PO_4 0,0153 M, EDTA disodique 0,01 M et $K_4P_2O_7$ 0,04 M, pH 7,0, et déposés sur une colonne de 2,5 cm x 25 cm de DEAE-Séphadex A.50. Quand les fractions non retenues sont sorties de la colonne, on met en place une élution par un gradient composé de 750 ml du tampon phosphate-EDTA (comme indiqué ci-dessus) et de 750 ml du même tampon contenant du KCl 0,5 M. Le débit de la colonne est

Fig.16. Méthode de préparation de la myosine.



de 25 ml/h. Des fractions de 20 ml sont recueillies sur collecteur LKB. La figure 17 montre le profil d'élution ainsi obtenu.

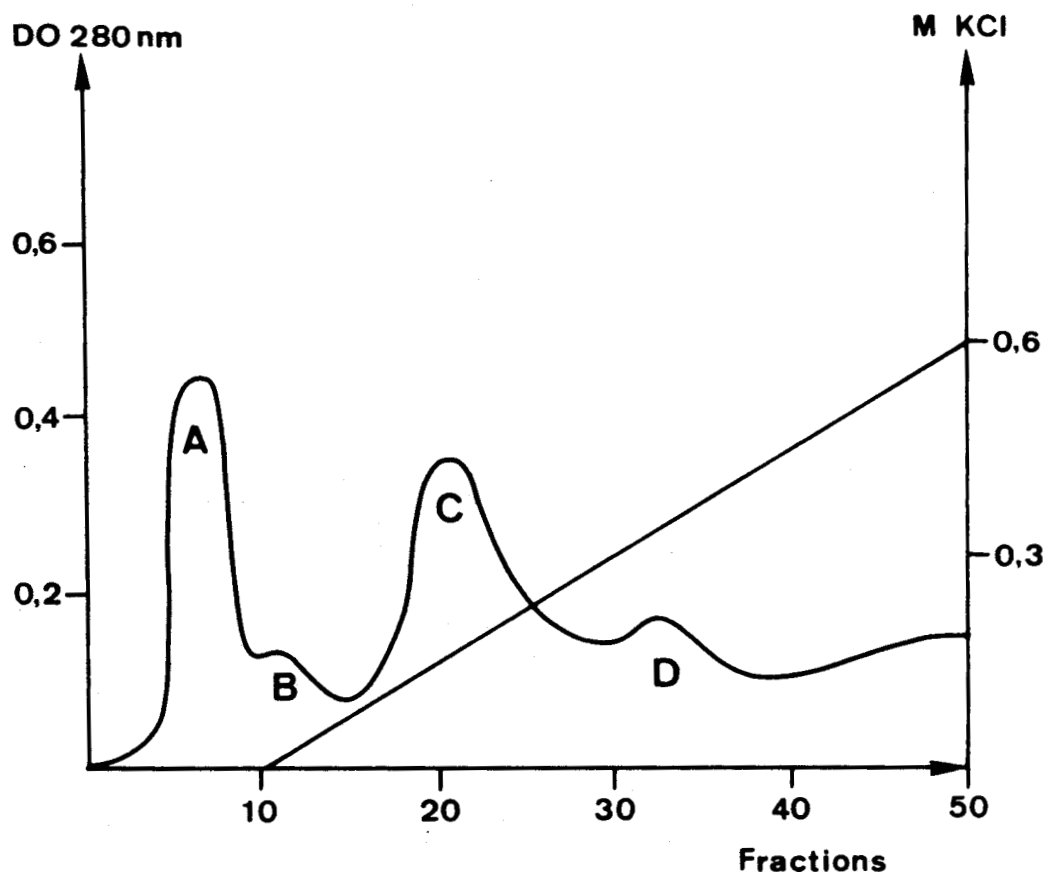


Fig. 17. Profil d'élution d'une chromatographie d'échanges d'ions sur colonne de DEAE-Séphadex A.50 de la myosine du muscle squelettique normal du Lapin.

A : fractions non retenues, B : C-protéine, C : myosine, D : actine.

b) *Préparation de la HMM.*



La HMM est préparée à partir de la myosine purifiée par précipitation par le sulfate d'ammonium (fraction 36-50 %). La myosine dialysée est reprise dans une solution KCl 0,6 M, tampon

phosphate de potassium 0,01 M pH 6,8. La HMM est obtenue par digestion trypsique : on ajoute 10 ml de trypsine (Sigma) à 0,05 % (0,5 mg/ml HCl 1mM) par 100 ml de solution de myosine. On interrompt la réaction avec 10 ml d'une solution d'inhibiteur de Soja (Sigma) à 0,1 % (1 mg/ml H₂O avec un peu de KOH 1M) par 100 ml de solution de myosine (Lowey et Cohen, 1962). Après centrifugation pendant 1 heure à 80 000 g, on élimine la LMM et la myosine non coupée. Bien que la LMM ait un poids moléculaire (140 000) moins élevé que la HMM (340 000), elle précipite très facilement en raison de l'affinité des molécules entre elles pour former des paracristsaux. La HMM est mise en dialyse contre le tampon KCl 0,1 M, Tris-HCl 0,005 M, MgCl₂ 0,001 M, pH 7,5.

c) *Préparation de l'actine.*

a. *Préparation de la "poudre" acétonique.*

L'actine est préparée par une méthode proche de celle de Young et Rees (1967). Le résidu obtenu après filtration de l'homogénat de muscle dans la solution de Guba-Straub, est traité deux fois par une solution de NaHCO₃ à 0,4 % (4 volumes) et addition d'une solution de CaCl₂ 5x10⁻⁵ M (10 volumes). Le résidu est lavé cinq fois à l'acétone et séché sur P₂O₅.

β. *Extraction de l'actine.*

L'actine est extraite de la poudre acétonique et purifiée selon le procédé de Spudich et Watt (1971), par un lavage dans du KCl 0,6 M. La solution est centrifugée à 105 000 g pendant 3 heures. Pour l'étude en dichroïsme circulaire de l'actine polymérisée, le culot est homogénéisé par agitation et dialysé pendant une nuit contre KCl 0,1 M, Tris-HCl 0,005 M, MgCl₂ 0,001 M, ATP 0,0001 M, pH 7,5. Cette solution est ensuite centrifugée à 40 000 g pendant 5 à 10 minutes.

En ce qui concerne l'étude de l'interaction actine-HMM, l'ATP n'est pas ajouté dans le tampon. Pour les comparaisons électrophorétiques, l'actine normale et l'actine tumorale sont extraites une première fois avec l'eau distillée pendant 1 heure à 4°C, et ensuite seulement, par la méthode décrite ci-dessus. Comme par ces deux procédés on n'extrait pas les mêmes protéines (en qualité et en quantité), nous pouvons ainsi mieux analyser par électrophorèse les protéines du filament fin des différents muscles.

γ. Purification par cycle de dépolymérisation-repolymérisation.

Afin de purifier l'actine davantage le culot de la F-actine est dépolymérisé par homogénéisation dans Tris-HCl 2 mM, CaCl₂ 0,2 mM, ATP 0,5 mM, β-mercaptoéthanol 0,5 mM, pH 7,5, et la suspension est dialysée pendant une nuit contre ce même tampon. Après centrifugation à 105 000 g pendant 3 heures, la G-actine est repolymérisée en ajoutant du KCl et du MgCl₂ pour obtenir des concentrations finales de 100 mM et 1 mM respectivement.

2. Spectrophotométrie ultraviolette.

La spectrophotométrie ultraviolette est utilisée comme un critère permettant de vérifier la pureté de nos préparations de myosine. Comme le maximum d'absorption des myosines pures se situe entre 280 et 282 nm sur le spectre U.V., toute contamination par les nucléotides sera révélée par un déplacement de ce pic vers 260 nm (Finck, 1965). Pour l'étude en spectrophotométrie, la myosine est dissoute dans une solution de KCl 0,3 M, tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,8. (Fig.18 et 19). Les spectres d'absorption sont réalisés sur un spectrophotomètre Cary 118 à double faisceau entre 350 et 230 nm, les solutions de KCl ne permettant pas de descendre en-dessous de 230 nm.

3. Etude ultrastructurale des filaments.

Les filaments synthétiques sont examinés en microscopie électronique par la technique du contraste négatif.

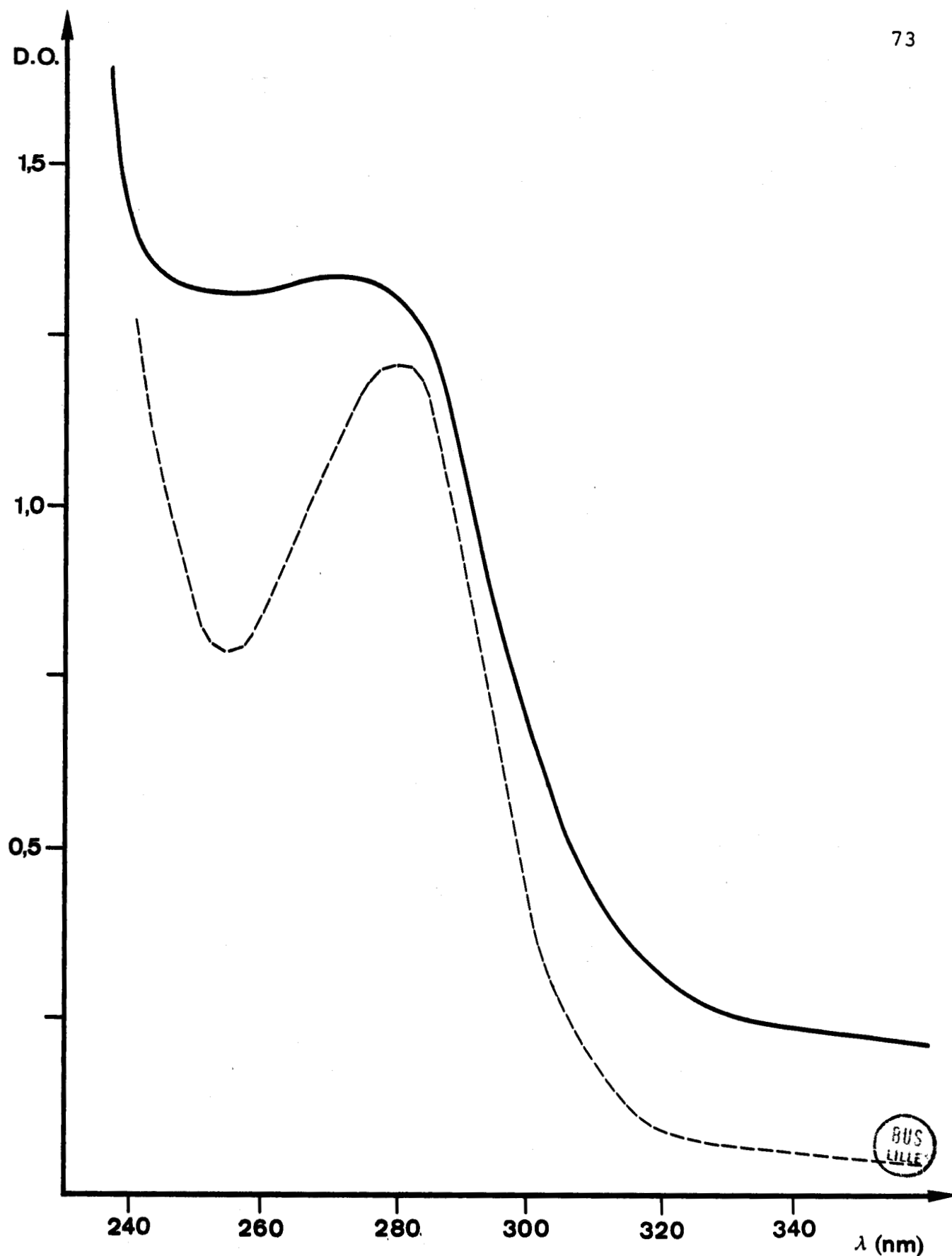


Fig.18. Spectre d'absorption en lumière ultraviolette de la myosine du muscle blanc normal du Lapin après deux cycles de précipitation-dissolution (—) et après précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fraction 37-50 % de saturation) (----). Myosines dans une solution de KCl 0,3 M, tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,8.

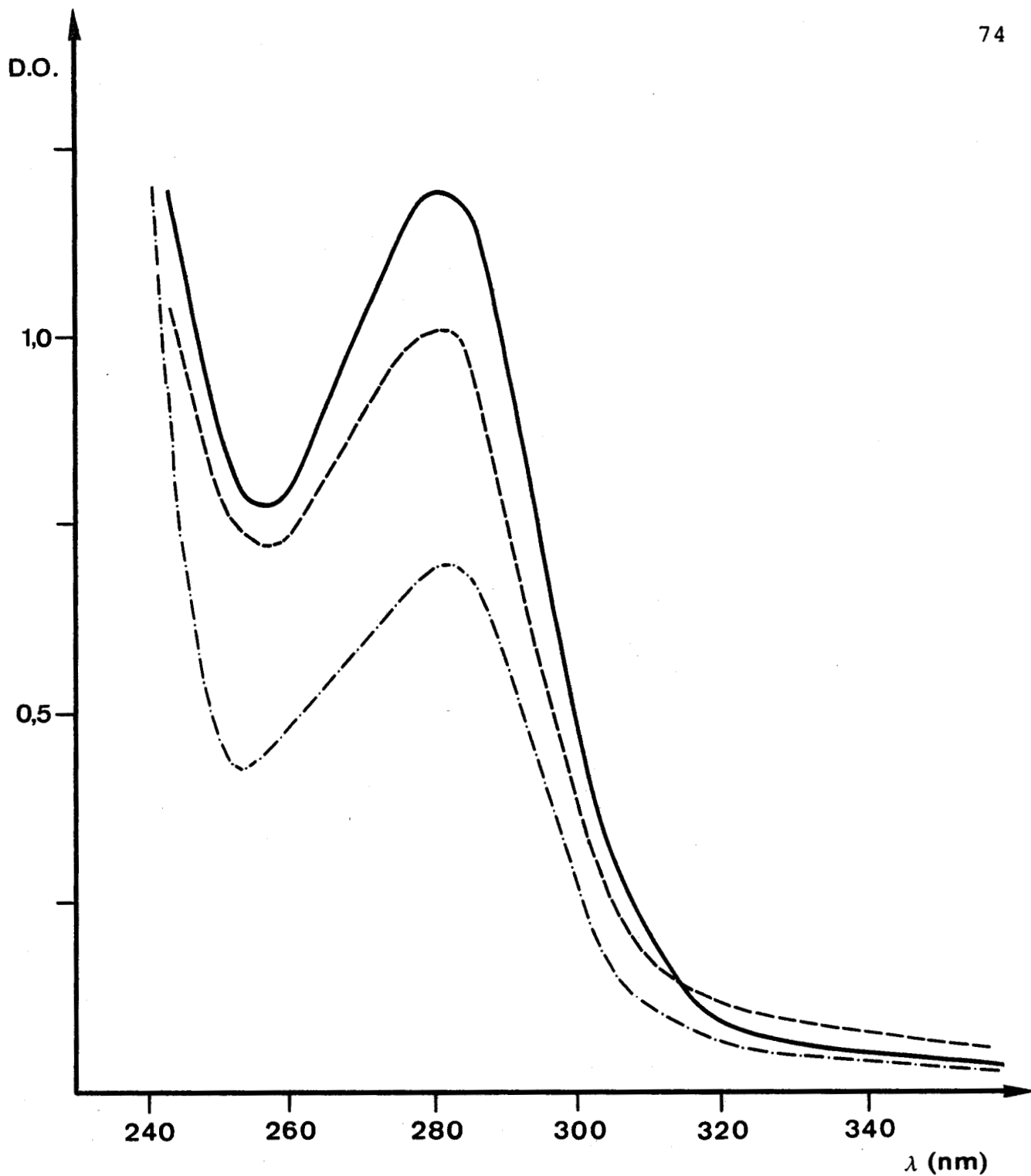


Fig.19. Spectre d'absorption en lumière ultraviolette de différentes myosines du Lapin après précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (fraction 37-50 % de saturation).

- Myosine du muscle blanc normal adulte.
- - - Myosine tumorale précipitable à pH 6,8.
- · - Myosine tumorale précipitable à pH 5,0.



Myosines dans une solution de KCl 0,3 M, tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,8 (et 5,0).

a) *Les myosines.*

Les filaments synthétiques des différentes myosines sont observés à divers stades de la préparation et de la purification. Afin de pouvoir réellement comparer les filaments synthétiques, toutes les myosines sont précipitées au même stade de purification (fraction 36-50 % de la précipitation par le sulfate d'ammonium) et dans les mêmes conditions : une solution de KCl 0,5 M, MgCl₂ 0,01 M et de tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,8, contenant 1 mg/ml de myosine, est amenée à une concentration de KCl 0,1 M en y ajoutant 4 volumes d'une solution de MgCl₂ 0,01 M, tampon phosphate de potassium 0,01 M, pH 6,8.

b) *Les actines.*

Les solutions d'actine sont ajustées à une concentration de 0,5 mg/ml et déposées sur une grille. Afin d'éviter une éventuelle dépolymérisation des filaments d'actine lors du lavage de la grille, celle-ci est rincée avec le même tampon qui contenait l'actine : KCl 0,1 M, Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, ATP 0,1 mM, pH 7,5.

c) *Actine-HMM.*

Une goutte de solution d'actine (0,5 mg/ml) est déposée sur une grille et l'excédent est éliminé par du papier filtre. Puis on ajoute une goutte de la solution de HMM (0,5 mg/ml) et on élimine aussitôt l'excédent de la même façon. La réaction entre l'actine et la HMM est immédiate. Après lavage avec du KCl 0,1 M, la technique de contraste négatif est poursuivie comme décrite précédemment.

4. Etude électrophorétique sur gel de polyacrylamide.

a) *En présence de SDS.*

Dans un premier temps, nous avons utilisé pour l'analyse des myosines, la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de SDS décrite par Klotz *et al.* (1973) : le tampon est le Tris-borate 0,16 M à pH 7,0 contenant 0,1 % de SDS (p/v). Les tampons au niveau des gels et des cuves sont les mêmes. La concentration en acrylamide du gel de séparation est 10 % (p/v).

Comme cette technique ne nous donnait pas entière satisfaction, nous avons réalisé les PAGE en présence de SDS sur plaques de 0,1 x 10 x 15 cm avec l'appareil mis au point par J.P.Kerckaert (Analyt. Biochem. 1978, in press), en utilisant le système discontinu décrit par Laemmli (1970) : tampon au niveau des électrodes : Tris-glycine pH 8,3, SDS 0,1 %; tampon au niveau du gel : Tris-HCl pH 8,9, SDS 0,1 %. La concentration en acrylamide des gels est un gradient linéaire de 10 à 25 % (de haut en bas). Le rapport entre acrylamide / bis-acrylamide est constant : 30/0,8.

Les échantillons sont dissous (2 mg/ml) dans le tampon Tris-glycine dilué 10 fois, SDS 5 % (p/v), β -mercaptoéthanol 5 % (v/v), glycérine 10 %, traces de bleu de bromophénol, pH 8,3. Ils sont ensuite déposés (10 à 20 μ l) dans le gel d'échantillons à 5 % d'acrylamide. L'électrophorèse est conduite pendant 3 heures à 200 V, puis les plaques sont colorées pendant 15 heures dans une solution à 0,25 % de bleu de Coomassie R 250 dans 45 % éthanol, 10 % acide acétique, 45 % eau. Elles sont enfin décolorées par diffusion dans le mélange éthanol (25 %), acide acétique (10 %), eau (65 %). Pour la détermination des poids moléculaires, nous avons établi une courbe étalon (log P.M. en fonction de la distance de migration) à partir des protéines de référence suivantes : sérum albumine bovine (68 000), IgG-chaîne lourde (50 500), ovalbumine (43 000), IgG-chaîne légère (25 500), myoglobine (15 500), insuline (5 700).

Dans le cas des actines, nous avons utilisé la technique de PAGE en présence de SDS décrite par Neville (1971). Les gels sont préparés dans des tubes (0,5 x 12 cm) et la concentration en acrylamide du gel de séparation est 15 %. Le pH de migration est 9,5.

b) *En présence d'urée à pH alcalin.*

Les PAGE en présence d'urée sont faites soit dans des tubes (0,5 x 12 cm), soit sur plaques (0,1 x 10 x 15 cm) avec l'appareil indiqué ci-dessus. La technique utilisée est celle décrite par Perrie et Perry (1970): le gel de séparation contient l'acrylamide à 10 % (bis-acrylamide à 0,26 %), urée 8 M et tampon Tris-glycine de pH 8,3. Le gel de concentration contient l'acrylamide à 2,5 % (bis-acrylamide à 0,625 %), urée 8 M et tampon Tris-H₂SO₄ pH 6,7. Le tampon de migration est le Tris-glycine de pH 8,3. Les protéines sont dissoutes dans un tampon Tris-glycine à pH 8,3, urée 8 M, 5 % (v/v) de β-mercaptoéthanol et des traces de bleu de bromophénol. L'électrophorèse est réalisée pendant 5 heures à 130 V. Les gels sont colorés et décolorés comme les gels en présence de SDS.

5. Détermination de la concentration en protéine.

La concentration de la myosine est déterminée par la méthode du microbiuret (Goa, 1953). Le standard utilisé pour cette méthode est la sérum albumine.

D'autre part, le dosage de la myosine est également effectué par spectrophotométrie en mesurant les densités optiques à 320, 280 et 260 nm. D'après la loi de Beer-Lambert

$$E_{1\%}^{280\text{nm}} = \epsilon c l.$$

Lorsque le rapport $\frac{E^{280}}{E^{260}}$ est supérieur à 1,4, ϵ_0 est égal à

0,56 (Shiverick *et al.*, 1976) et la concentration (mg/ml) est calculée :

$$[c] = \frac{E^{280} - E^{320}}{0,56}$$

Nous avons ainsi pu vérifier que lorsque le rapport $\frac{E^{280}}{E^{260}}$ est

supérieur à 1,4, les valeurs obtenues par ces deux méthodes sont identiques à 1 % près.

Les concentrations de la G-actine et de la F-actine sont déterminées en utilisant respectivement les coefficients d'extinction $E_{1\%}^{290}$ égal à 0,63 et 0,66 (Houk et Ue, 1974).

6. Les activités ATPasiques.

De très nombreux milieux ont été utilisés pour mesurer les activités ATPasiques. Pour nos travaux, nous avons adopté la technique de Green et Mommaerts (1953) pour la mesure de la Ca^{2+} -ATPase et celle de Spudich et Watt (1971) pour la mesure de la Mg^{2+} -ATPase.

a) *Activité de la Ca^{2+} -ATPase.*

L'activité spécifique de la Ca^{2+} -ATPase est mesurée en routine de la manière suivante :

- milieu d'incubation : KCl 0,5 M, $CaCl_2$ 10 mM, Tris-HCl 50 mM à pH 7,5 (concentration finale pour 2 ml de milieu de réaction).

- volume de milieu d'incubation : 1,9 ml.

- température de réaction : 25°C.

- agitation : horizontale, en tubes, assurée par un agitateur type G.F.L.

- préincubation : 2 minutes. La réaction de préincubation est déclenchée par l'addition de 100 μ l d'ATP 50 mM à pH 7,5 (2,5 mM en concentration finale).

- durée de réaction : 5 minutes. La réaction commence lorsqu'on ajoute la myosine (2 mg/ml). Deux essais sont effectués parallèlement avec 150 et 300 μg de myosine. La réaction est arrêtée par l'addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 15 %.

Pour l'étude cinétique en fonction de la concentration en CaCl_2 , le milieu d'incubation est identique à celui décrit ci-dessus. Seule la concentration en Ca^{2+} est modifiée. Nous avons utilisé le CaCl_2 à des concentrations croissantes allant de 0,01 mM à 10 mM.

b) *Activité de la Mg^{2+} -ATPase.*

L'activité de la Mg^{2+} -ATPase est mesurée en routine de la manière suivante :

- milieu d'incubation : KCl 5 mM, Tris-HCl 12,5 mM à pH 7,5, MgCl_2 2,5 mM (concentration finale pour 2 ml de milieu de réaction).

- volume du milieu d'incubation : 1,8 ml.

- température de réaction : 25°C.

- très forte agitation horizontale en tubes fermés.

- préincubation : 3 minutes, en présence d'ATP 2,5 mM à pH 7,5.

- durée de réaction : 5 minutes. La réaction commence lorsqu'on ajoute 100 μg de myosine (1 mg/ml) et arrête par l'addition de 1 ml d'acide trichloracétique à 15 %.

c) *Dosages du phosphore inorganique.*

Les dosages du phosphore inorganique (P_i) libéré lors de ces réactions sont réalisés selon la méthode de Fiske et Subbarow (1925). L'activité spécifique (AS) à 25°C est exprimée en $\text{AS} = \text{nmoles de } \text{P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$.

Comme les volumes de la solution de myosine ajoutés augmentent le volume de la prise d'essai (aliquot de Fiske, 2 ml au départ), l'activité spécifique est calculée ainsi :

$$AS = \frac{\text{nmoles de } P_i \text{ libéré} \times \text{volume total utilisé}}{\text{volume de l'aliquot de Fiske} \times \text{temps de réaction} \times \text{concentration de myosine}}$$

L'étalonnage se fait à partir d'une solution mère de KH_2PO_4 à 4,89 g/l contenant 1 mg/ml de phosphore. La courbe étalon est établie entre 0,5 et 2 $\mu\text{g/ml}$ de phosphore, car dans cette zone elle est parfaitement linéaire.

7. Dichroïsme circulaire.

Les mesures de dichroïsme circulaire ont été effectuées sur un dichrographe Jobin-Yvon R.J. Mark III entre 190 et 250 nm. Toutes les mesures ont été faites à la température de 5 à 6°C.

La formule permettant d'obtenir les ellipticités à partir du spectre expérimental est :

$$[\theta] = 3300 \times \frac{M}{Cd} \times \Delta \times s$$

$[\theta]$: ellipticité molaire en $\text{deg} \cdot \text{dmole}^{-1} \cdot \text{cm}^2$.

M : masse moyenne du résidu calculée à partir de la composition en acides aminés de l'actine : 112. (Elzinga *et al.*, 1973).

C : concentration en g/l : 0,2 à 0,8 g/l.

d : longueur de la cuve en cm.

Δ : nombre de mm mesurés.

s : sensibilité de l'appareil.

Les résultats présentés sont la moyenne de 5 à 10 enregistrements effectués sur 3 à 7 préparations d'actine différentes.

Le pourcentage d'hélicité est évalué à partir de $[\theta]_{208\text{nm}}$ en utilisant la formule des modèles polypeptidiques (Adler *et al.*, 1973) :

$$\% \text{ hélice } \alpha = \frac{[\theta]_{208\text{nm}} - [\theta]_{208\text{nm}}^{\text{R}}}{[\theta]_{208\text{nm}}^{\text{H}} - [\theta]_{208\text{nm}}^{\text{R}}}$$

$[\theta]_{208\text{nm}}$: ellipticité expérimentale.

$[\theta]_{208\text{nm}}^{\text{H}}$: ellipticité correspondant à 100 % d'hélice α pour l'acide poly-L-glutamique.

$[\theta]_{208\text{nm}}^{\text{R}}$: ellipticité correspondant à 0 % d'hélice α pour l'acide poly-L-glutamique.

La F-actine est étudiée dans une solution de KCl 100mM, Tris-HCl 5 mM, ATP 0,1 mM, pH 7,5. La concentration en ATP qui a été choisie permet d'une part des mesures précises, car cette faible molarité présente une absorption négligeable dans le domaine des mesures, et empêche d'autre part la dénaturation de l'actine.

R E S U L T A T S

I. LE RHABDOMYOSARCOME CHIMIO-INDUIT
PAR LE Ni_3S_2 CHEZ LE RAT WISTAR.

Comme nous l'avons déjà exposé dans un chapitre précédent, l'induction de rhabdomyosarcomes chez le Rat par le nickel (Hueper, 1963; Heath et Daniel, 1964; Daniel *et al.*, 1967; Heath et Webb, 1967; Furst *et al.*, 1972; Webb *et al.*, 1972) et spécialement par le Ni_3S_2 (Gilman, 1965; Friedman et Bird, 1969; Basrur *et al.*, 1970; Ottolenghi *et al.*, 1974; Sunderman *et al.*, 1974; Bruni et Rust, 1975) est un phénomène bien connu. La méthode que nous avons choisie nous permet d'obtenir au bout de cinq à six mois des tumeurs à l'endroit de l'implantation chez 90 % des Rats soumis à l'expérimentation. De la totalité des tumeurs induites, environ 85 % représentent des rhabdomyosarcomes et essentiellement du type polymorphe. En plus nous avons obtenu quelques fibrosarcomes, quelques mésenchymomes et un ostéosarcome.

A. ETUDE MACROSCOPIQUE.

Les rhabdomyosarcomes que nous avons examinés ressemblent généralement à ceux décrits par Friedman et Bird (1969). Dès que les tumeurs atteignent une taille de 3 à 4 cm, elles ont tendance à s'ulcérer (Planche 1, Fig a). En général elles sont lobées et entourées par une fine capsule bien définie (Pl.1, Fig b). Les portions centrales sont souvent dégénérées ou même nécrosées. Les tumeurs sont parcourues de veines importantes qui sont cause d'hémorragies lors de leur ablation.

B. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Le microscope photonique permet d'examiner des zones très larges d'une tumeur et de saisir ainsi sa variabilité structurale qui consiste en l'existence de deux types différents de zones (Pl.2, Fig a). Le premier type représente les parties immatures du

rhabdomyosarcome avec des cellules mononucléées rondes ou polygonales et avec de petites cellules fusiformes (Pl.2, Fig b). Le second type de zones est caractérisé par de très longues cellules dans lesquelles on peut parfois observer la striation transversale du muscle squelettique. Il est évident qu'il existe des zones intermédiaires avec de nombreux myoblastes et des myofibres immatures (Pl.2, Fig c).

Les myofibres différenciées montrent la striation musculaire caractéristique et un grand nombre de noyaux sans localisation définie (Pl.2, Fig d). Cette striation est moins régulière et moins évidente que dans les fibres musculaires normales (Pl.2, Fig e) et peut même être absente à certains endroits. C'est peut être à ce niveau que l'on observe des structures fibrillaires circulaires sur des coupes transversales d'une myofibre (Pl.2, Fig f).

La microscopie photonique révèle une perturbation complète de l'organisation des myofibres dans les rhabdomyosarcomes. Afin de confirmer les anomalies des myofibrilles au niveau cellulaire et de préciser le développement des myoblastes en myofibres, il est indispensable d'examiner la tumeur en microscopie électronique.

C. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les différents stades de l'évolution des rhabdomyoblastes, logés dans le stroma de la tumeur, deviennent évidents au cours de l'examen de la tumeur en microscopie électronique. L'espace intercellulaire contient de nombreuses fibres de collagène qui sont souvent arrangées en "gros paquets". Au cours de notre description, nous allons suivre la différenciation des cellules myogéniques vers la fibre musculaire mature.

1. Les rhabdomyoblastes immatures.

Les rhabdomyoblastes immatures sont assez petits et contiennent généralement un -parfois deux- noyau irrégulier (Pl.3, Fig a). Tous les éléments cytoplasmiques classiques sont présents (Pl.3, Fig b) : de petites mitochondries ovoïdes, des vésicules ou segments courts du réticulum endoplasmique, des ribosomes et quelques inclusions lipidiques. Le cytoplasme est caractérisé par un appareil de Golgi bien développé et un nombre considérable de petites vésicules. La présence d'un tel développement de l'appareil de Golgi indique une forte activité sécrétrice des rhabdomyoblastes. En effet, assez souvent, on observe au niveau de la membrane cellulaire des dictyosomes (Pl.4, Fig a) et un grand nombre de vésicules en contact avec la membrane (Pl.4, Fig a et b).

2. Le premier stade de différenciation.

L'apparition de nombreux microtubules indique le premier stade de différenciation du rhabdomyoblaste vers la fibre musculaire striée (Pl.4, Fig c). Alors que les filaments fins (7 nm) sont peu visibles sur des coupes longitudinales, ils deviennent plus facilement reconnaissables sur des coupes transversales des portions distales des rhabdomyoblastes. Ces filaments sont situés entre les microtubules et ne semblent pas former une structure ordonnée (Pl.5, Fig a). Les rhabdomyoblastes sont souvent entourés d'une lame basale (Pl.5, Fig b).

3. Le deuxième stade de différenciation.

En ce qui concerne le deuxième stade de différenciation, on peut distinguer *deux types* de rhabdomyoblastes. Les deux sont habituellement de forme polygonale ou allongée, contiennent de gros noyaux irréguliers et des filaments fins et épais. Dans le *premier type* (II/1), ces filaments sont arrangés d'abord en faisceaux laches sans direction définie. La plupart des microtubules ont disparu (Pl.5, Fig c). Les stries Z et les lignes M

n'existent pas encore, et il n'y a aucun autre signe d'une différenciation de myofibrilles. C'est seulement plus tard que les filaments s'arrangent pour former des myofibrilles avec une organisation sarcomérique. Bien que les bandes A et I ainsi que la bande H soient déjà reconnaissables, il n'existe encore aucune formation des stries Z et lignes M (Pl.6, Fig a).

Le *deuxième type* (II/2) de rhabdomyoblastes est caractérisé par une apparition précoce des stries Z, et les fragments myofibrillaires les plus simples se composent de touffes de filaments fins attachées aux deux côtés d'une strie Z. Les fragments se situent dans le cytoplasme sans aucune orientation précise (Pl.6, Fig b), et occasionnellement on reconnaît une ligne M.

Les deux types possèdent dans leur cytoplasme des ribosomes, des polysomes et des granules de glycogène. Le système de Golgi a perdu de son importance et les mitochondries sont maintenant moins nombreuses.

Les deux types de ce stade se développent ensuite pour donner de très grandes cellules allongées : les fibres musculaires (ou myofibres).

4. Les fibres musculaires.

Les fibres musculaires sont les seules cellules du rhabdomyosarcome qui montrent au microscope optique une striation transversale. Elles contiennent des filaments fins et épais organisés et arrangés sous forme de sarcomères. Mais on retrouve seulement dans les zones les plus organisées de la myofibre une succession de plusieurs unités sarcomériques pour former des myofibrilles, dont quelques unes sont parallèles (Pl.6, Fig c). Par contre, dans le muscle normal, l'organisation des myofilaments en sarcomères, et des sarcomères en myofibrilles, est extraordinairement précise.

Pour ce qui est de leur structure, ni les sarcomères, ni les myofibrilles ne sont strictement normaux. Les sarcomères varient beaucoup en ce qui concerne leur longueur et leur largeur et *montrent généralement un aspect "contracté"*. Parfois ils sont incomplets et il peut leur manquer une strie Z. De plus, les zones claires correspondant à la bande I sont rarement bien définies. Les bandes H et les lignes M n'apparaissent qu'occasionnellement, même dans les myofibrilles les mieux différenciées. Les sarcomères sans ligne M sont beaucoup plus larges dans leur partie centrale qu'au niveau de leurs extrémités où les filaments fins s'insèrent sur les stries Z (Pl.6, Fig c). *Lorsque la ligne M existe dans le sarcomère, les filaments fins (5 à 7 nm) la dépassent largement (Pl.8, Fig a). A fort grossissement, les ponts qui relient les filaments fins et épais deviennent bien visibles (Pl.8, Fig a).*

L'organisation myofibrillaire est très irrégulière. Comme la microscopie optique le laissait suggérer, les myofibrilles n'ont aucune orientation définie dans les fibres musculaires, et *des coupes longitudinales de myofibrilles sont observées directement à côté des coupes transversales (Pl.6, Fig c)*. Les myofibrilles constituées de 10 sarcomères (ou plus) sont exceptionnelles. Souvent, les myofibrilles présentent des "bifurcations". Les filaments qui prennent leur origine dans un sarcomère peuvent être déviés et se retrouvent partiellement (ou complètement) dans un sarcomère de la myofibrille adjacente. Ils peuvent même "se perdre" complètement dans le cytoplasme (Pl.8, Fig b).

5. Les stries Z.

Les stries Z observées dans les myofibrilles tumorales ne varient que légèrement en largeur et en épaisseur. Quelques unes d'entre elles montrent cependant des épaisseurs assez irrégulières (Pl.6, Fig c). Les stries Z sont très dominantes mais localisées dans les myofibrilles à différents niveaux. Aussi n'assurent-elles pas de continuité avec les stries Z des myofibrilles voisines, comme dans le muscle normal.

Sur des coupes transversales, le matériel formant les stries Z montre une structure *paracrystalline* avec des lignes sombres et claires alternantes (Pl.8, Fig c). Cette structure semble être identique à celle des stries Z du muscle normal (Pl.8 Fig d). Comme sur les coupes longitudinales, les coupes transversales montrent *l'état de contraction* des sarcomères tumoraux : sur une coupe transversale au niveau d'une strie Z d'un sarcomère non contracté d'un muscle normal, on n'observe de chaque côté de la strie Z que des coupes de filaments fins représentant la bande I (Pl.8, Fig d). Les coupes transversales effectuées au niveau d'une strie Z d'un muscle tumoral par contre, montrent que les zones voisines de la strie Z sont composées de filaments fins et de filaments épais à la fois (Pl.8, Fig c). Ceci indique donc que la bande I a disparu et que la bande A occupe la totalité du sarcomère en raison de son état de contraction.

Dans aucune tumeur, nous n'avons observé des stries Z hypertrophiées. En plus, il nous semble intéressant de signaler que dans les cellules en dégénérescence et en nécrose, ce sont les stries Z qui disparaissent les premières alors qu'elles apparaissent en dernier lieu lors de la différenciation des myofibrilles.

6. Le système T et le réticulum sarcoplasmique.

On peut observer dans le rhabdomyoblaste des tubules immatures ou bien organisés du système T, mais des dyades ou triades sont relativement rares. Néanmoins, elles existent à tous les stades de différenciation du myoblaste, même dans des cellules en division où l'on peut les trouver à côté des portions de chromosomes et des microtubules du fuseau mitotique (Pl.9, Fig a).

Dans quelques rhabdomyoblastes existent des invaginations très étroites de la membrane cellulaire qui pénètrent profondément dans la cellule sous forme de spirale (Pl.9, Fig b). Lorsque le centre de la spirale est particulièrement petit, il contient parfois du matériel cytoplasmique densifié (Pl.9, Figs b et c),

lorsqu'il est large, il ne montre aucune densification cytoplasmique (Pl.9, Fig d).

Aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique, on peut observer dans le rhabdomyosarcome des cellules fortement vacuolisées (Pl.10), contenant parfois des résidus assez denses (Pl.10, Fig a). La microscopie électronique révèle que ces vacuoles semblent dériver du réticulum sarcoplasmique et contiennent parfois un matériel homogène et finement granulaire (Pl.10, Fig b). Il est peu probable que ce soit un artéfact dû à la fixation, puisque toutes les cellules avoisinantes ont un aspect tout à fait normal.

Beaucoup de rhabdomyoblastes en cours de différenciation possèdent des vésicules de réticulum sarcoplasmique granulaire, qui sont fortement élargies et qui renferment un matériel amorphe opaque aux électrons (Pl.11, Fig a).

Enfin, dans les myofibres matures, on trouve de vastes zones de vacuoles contenant des microcristaux sphériques formés généralement de 1 à 4 couches concentriques d'un précipité dense (anneaux de Liesegang) (Pl.11, Fig b). Ces cristaux sont entourés d'une membrane plasmique et dans le cytoplasme on observe des structures microfibrillaires relativement denses (Pl.11, Fig c). Le contenu amorphe de quelques vésicules avoisinantes et existant également dans des myoblastes en cours de différenciation nous indique qu'il s'agit de formations issues du réticulum sarcoplasmique.

Du réticulum fenestré ou des structures sous forme de réseaux n'ont jamais été observés dans les rhabdomyosarcomes induits chez le Rat Wistar.

7. Les mitochondries.

Des mitochondries de toute taille et de toute forme se trouvent dispersées dans les cellules tumorales. Elles sont généralement moins nombreuses, et leurs crêtes apparaissent

moins développées que dans le muscle normal (Pl.3, Fig b). Elles n'ont aucune tendance à être groupées ni à proximité des stries Z, ni près du noyau. De nombreuses mitochondries renferment des structures pseudomyéliniques qui dérivent probablement d'invaginations de la membrane interne mitochondriale (Pl.5, Fig c).

8. Les noyaux.

Comme le montre la microscopie optique (Pl.2, Fig d), il n'existe aucune position préférentielle des noyaux dans les myofibres matures. Dans les rhabdomyoblastes immatures ou en cours de différenciation, les noyaux contiennent de la chromatine à gros grains avec des zones de condensation irrégulière. Un ou deux nucléoles de structure classique sont souvent visibles. *Dans les fibres musculaires matures, les noyaux prennent un aspect tout à fait anormal et sont souvent tellement déformés que la chromatine ne peut occuper qu'une mince bande de condensation périphérique* (Pl.12). Certaines cellules contiennent des noyaux allongés au contour tourmenté (Pl.12, Fig a). Les noyaux typiquement altérés des cellules musculaires tumorales possèdent d'énormes invaginations et évaginations de l'enveloppe nucléaire (Pl.12, Fig b et c). Les plus grosses invaginations peuvent contenir pratiquement tous les éléments cytoplasmiques : des vésicules golgiennes, du réticulum sarcoplasmique, des citernes du système T, des mitochondries, des ribosomes et même des fragments myofibrillaires (Pl.12, Fig b). Autour de certaines invaginations, l'enveloppe nucléaire est réduite de telle façon qu'elle apparaît par endroit comme une fine lamelle (Pl.12, Figs b et c). Parfois, on peut trouver dans le cytoplasme avoisinant de larges densifications opaques constituées probablement de matériel ribonucléoprotéinique (Pl.12, Fig c).

9. La formation de cils.

La formation de cils peut survenir à n'importe quel stade de la croissance de la tumeur, mais nous l'avons observée dans des rhabdomyoblastes à l'interphase et jamais dans des rhabdomyofibres différenciées ou dans d'autres cellules tumorales tels que des fibroblastes. Nous n'avons pas non plus observé de cils dans des

cellules en cours de division. Nous avons examiné en microscopie électronique une section avec environ 460 cellules, et nous y avons trouvé 358 coupes de noyaux et 14 formations de cils dans des rhabdomyoblastes à l'interphase. En raison de l'épaisseur d'une section par rapport à la taille de la cellule, il faudrait effectuer et observer environ 300 à 400 coupes successives pour retrouver tous les petits organites de tous les rhabdomyoblastes immatures afin de pouvoir établir la fréquence absolue de formations ciliaires. Ceci est pratiquement irréalisable et nous pouvons simplement affirmer que ces formations sont relativement fréquentes dans les tumeurs.

Les centrioles des rhabdomyoblastes à l'interphase ressemblent au point de vue structural à ceux décrits antérieurement chez d'autres cellules de Métazoaires (Robbins et Gonatas, 1964; Stubblefield et Brinkley, 1967; Brinley et Stubblefield, 1970). La paire de centrioles possède, dans une coupe longitudinale, l'orientation perpendiculaire habituelle et elle est entourée par des "satellites péricentriolaires" (Pl.13, Fig a). Les centrioles sont relativement courts avec une longueur moyenne de 0,3 μm . Leur diamètre de 0,2 μm est identique à celui des centrioles d'un tissu normal. On peut souvent observer des centrioles en cours de duplication, et la figure b (Pl.13) montre deux centrioles dont un possède un centriole-fils ou procentriole qui forme avec le centriole-père un angle droit.

Quelques rhabdomyoblastes à l'interphase contiennent un centriole qui se différencie en corps basal. La figure c (Pl.13) montre une coupe oblique d'un centriole avec la vésicule ciliaire primaire. De telles vésicules avec une surface lisse ressemblent à celles du complexe de Golgi avoisinant (Pl.13, Figs c et e). A ce stade, le "corps basal" s'étend dans la vésicule pour former la tige ciliaire. En même temps, la vésicule s'invagine afin de former le tube ciliaire (Pl.13, Figs d et e). Deux coupes successives, légèrement obliques, de la zone transitoire entre le corps basal et le cil, montrent nettement quelques triplets du corps basal et le cil, montrent nettement quelques triplets du corps basal et quelques doublets du cil (Pl.13, Fig d). De ces

deux coupes, la seconde met en évidence l'arrangement de doublets en "9+0" dans le cil (Pl.13, Fig e). Le tube ciliaire n'entoure pas encore complètement le cil comme le montre la figure g (Pl.13). Des coupes longitudinales sériées, dont nous n'en présentons qu'une, révèlent que le cil allongé ne possède pas de microtubules dans son centre (Pl.13, Fig f). Le tube ciliaire est bien développé et élargi à sa base. Il n'y a qu'un seul centriole qui subit la transformation, le deuxième existe toujours à côté du corps basal (Pl.13, Fig d). La transformation d'un centriole en corps basal ne semble pas être complète et une racine basale n'a jamais pu être observée. Les microtubules du cil sont souvent disposés de façon irrégulière et on observe parfois des arrangements aberrants tels que "7+2" (Pl.13, Fig g). Cette coupe ne permet pas de préciser si les fibres ciliaires sont des doublets ou des simplets, et on pourrait éventuellement penser à une dépolymérisation des microtubules. Les cils sortent rarement de la cellule et sont en général inclus dans le cytoplasme (Pl.13, Figs f et g).

10. Autres éléments particuliers.

Beaucoup de cellules tumorales contiennent de nombreux "*corps denses*" à gros grains (Pl.14, Fig a). Ces corps sont entourés par une membrane plasmique et possèdent parfois une structure en fines lamelles parallèles (Pl.14, Fig b).

Dans quelques rhabdomyoblastes, il existe des *granules très opaques* d'un diamètre d'environ 30 nm. Ces granules sont disposés seuls ou en petits groupes dans tout le cytoplasme (Pl.14, Fig c). A la périphérie de la cellule cependant, on trouve de gros agrégats de ces granules (Pl.14, Figs a et c). Les granules sont plus grands que les grains de glycogène généralement présents dans les myoblastes et myofibrilles tumoraux (Pls.5 et 6).

Les images mitotiques sont courantes dans les rhabdomyosarcomes. Mais dans les cellules contenant des myofilaments ou myofibrilles, elles sont exceptionnelles.

Des particules virales n'ont jamais été observées dans aucune cellule des tumeurs examinées en microscopie électronique.

D. LA TUMEUR GREFFÉE.

Selon Gilman (1965), il est possible de transplanter le rhabdomyosarcome induit par le Ni_3S_2 chez le Rat Wistar. Afin d'augmenter la production en tumeurs pour nos études biochimiques et biophysiques des protéines myofibrillaires, nous avons essayé de transplanter les rhabdomyosarcomes. Nous avons coupé des morceaux de quelques tumeurs excisées en blocs d'environ 10 mm^3 , lesquels ont été greffés sur des Rats Wistar sains, soit en sous-cutané, soit en intramusculaire. Environ 80 % des greffes ont repris et se sont développées en trois à quatre semaines pour donner des tumeurs d'une taille d'environ 4 cm de diamètre.

Bien que la reprise de ces tumeurs fût immédiate, elles avaient l'inconvénient de se nécroser très rapidement. De plus, l'examen histologique révélait que ces tumeurs gardaient toujours un aspect immature quel que fût l'endroit de l'implantation de la greffe (Pl.15, Fig a), et nous avons observé deux types cellulaires : de petites cellules rondes à grands noyaux (Pl.15, Fig b) et des cellules fusiformes avec des noyaux allongés (Pl.15, Fig c). Ces deux types cellulaires étaient généralement mononucléés.

L'examen en microscopie électronique confirmait l'aspect immature et indifférencié des rhabdomyoblastes (Pl.16, Fig a). Néanmoins l'origine musculaire des tumeurs greffées restait toujours reconnaissable et on observait dans certaines cellules fusiformes une ébauche de la différenciation myofibrillaire comparable à celle observée dans les cellules II/1 du rhabdomyosarcome primitif (Pl.16, Fig b). Nous n'avons jamais pu observer ni l'organisation des myofilaments en sarcomères, ni l'apparition de stries Z.

E. DISCUSSION.

L'étude ultrastructurale du rhabdomyosarcome induit par le Ni_3S_2 chez le Rat Wistar met en évidence les stades successifs du développement des myoblastes en cours de différenciation. Afin de définir davantage les caractéristiques ultrastructurales du rhabdomyosarcome, les données essentielles sont comparées avec le muscle embryonnaire, le muscle pathologique et les muscles en régénération et en différenciation *in vitro*.

Morphologie des myoblastes et des myofibres. Alors que de nombreux travaux sur les tumeurs musculaires ont été entrepris, l'origine des myoblastes tumoraux est toujours discutée. On ne sait pas encore, s'il s'agit de cellules mononucléées qui dérivent de cellules mésenchymales comme dans l'embryon (Fischman, 1967; Friedman et Bird, 1969) ou s'ils dérivent de myofibres multinucléées, altérées, mais préexistantes comme dans le muscle en régénération (Reznik, 1973). Quelques auteurs suggèrent l'origine des myoblastes dans la prolifération des cellules satellites préexistantes (Allbrook *et al.*, 1966; Church *et al.*, 1966; Shafiq *et al.*, 1968). Comme des cellules satellites ont été observées dans des rhabdomyomes humains par Cornog et Gonatas (1967), elles peuvent être à l'origine des rhabdomyoblastes. Dans les rhabdomyosarcomes expérimentaux que nous avons induits cependant, nous n'avons jamais pu observer une seule cellule satellite.

Si l'on ne connaît pas l'origine des rhabdomyoblastes, nous savons néanmoins que leur développement en myofibres passe par des stades coordonnés qui sont caractérisés par une augmentation du volume sarcoplasmique, par la formation de fibres multinucléées et par la synthèse de myofilaments et leur assemblage en myofibrilles. Dans le muscle normal embryonnaire, le muscle en régénération et le muscle en différenciation *in vitro*, la multinucléation se fait par la fusion de myoblastes mononucléés (Stockdale et Holtzer, 1961; Shimada *et al.*, 1967; Reznik, 1973). Les myofibres multinucléées des tumeurs musculaires se forment en général par le même processus (Nameroff *et al.*, 1970). Les divisions nucléaires que l'on observe dans quelques myofibres de ces tumeurs

et dans celles obtenues après infection par le virus polyome (Yaffe et Gershon, 1967), doivent être considérées comme des événements exceptionnels qui ne participent pas réellement à la formation des myofibres, mais qui augmentent seulement le nombre de leurs noyaux.

En accord avec tous les autres auteurs, quatre types cellulaires différents peuvent être distingués dans le rhabdomyosarcome. Bien que les mêmes éléments morphologiques soient présents dans les cellules musculaires normales et tumorales, ces éléments montrent des différences dans les cellules du rhabdomyosarcome. Les variations les plus importantes sont la distribution et la fréquence de ces éléments, ainsi que leur organisation anormale ou irrégulière. Le rhabdomyoblaste immature possède un appareil de Golgi bien développé nécessaire pour la synthèse du matériel membranaire chez les cellules en division (Boram *et al.*, 1972; Sarkar *et al.*, 1973). Néanmoins sa fonction sécrétrice est anormale chez les cellules différenciées et n'a jamais été décrite pour les cellules du muscle normal.

Les caractéristiques prédominantes des fibres musculaires se rencontrent en particulier lors de la différenciation des myofilaments et de l'assemblage et l'organisation des myofibrilles. L'apparition des myofilaments avant la formation des stries Z est observée lors de la différenciation du muscle embryonnaire (Fischman, 1967; Shimada *et al.*, 1967), et ce phénomène a été également constaté au cours d'études antérieures sur des rhabdomyosarcomes (Friedman et Bird, 1969; Boram *et al.*, 1972; Bruni et Rust, 1975). D'autres auteurs par contre, ont décrit la succession de la synthèse des éléments sarcomériques dans un ordre inversé (Cornog et Gonatas, 1967; Reznik *et al.*, 1970; Sarkar *et al.*, 1973). Dans les tumeurs que nous venons de décrire, nous avons observé les deux types de différenciation (II/1 et II/2) dans des conditions identiques d'obtention et également dans une même tumeur.

Dans les rhabdomyomes et rhabdomyosarcomes, les myofibrilles -contrairement au muscle normal- sont orientées dans n'importe quel sens dans le cytoplasme et un alignement régulier ne se produit qu'exceptionnellement. Ce désordre de l'organisation

myofibrillaire peut être dû à la disparition précoce des micro-tubules dont le rôle dans l'alignement des myofilaments et myofibrilles a été démontré pour le muscle normal en différenciation (Fischman, 1967; Shimada *et al.*, 1967; Beinbrech, 1970; Warren, 1974).

La tumeur greffée. Bien que l'on reconnait encore l'origine musculaire des tumeurs greffées, la différenciation myofibrillaire semble être fortement ralentie par rapport à celle dans les myoblastes de la tumeur primitive. Dans l'état actuel de nos connaissances sur la différenciation des myofilaments dans le muscle, nous pouvons difficilement expliquer ce phénomène. En raison de la dégénérescence -voir nécrose- très rapide de ces tumeurs et de la faible quantité de myofilaments contenus dans les rhabdomyoblastes, nous avons abandonné ce système expérimental.

Les stries Z sont anormales en ce qui concerne aussi bien leur forme que leur taille. Mais ce résultat obtenu chez les rhabdomyosarcomes est complètement en accord avec la structure des stries Z dans les fibres embryonnaires ou en régénération, et les coupes transversales démontrent aussi leur sous-structure cristalline normale. La seule différence importante avec le muscle normal semble être son apparition précoce -même avant celle des myofilaments- dans de nombreux myoblastes tumoraux. Dans des myofibres tumorales bien différenciées, l'aspect embryonnaire des stries Z est maintenu, alors que dans le muscle normal les stries Z s'arrangent afin de former une striation transversale bien définie. Le processus de dégénérescence des myofibrilles tumorales commence par la disparition des stries Z. Dans le muscle qui dégénère sous des conditions non tumorales, ce processus est inversé (Lockshin et Beaulaton, 1974).

La structure "rod" -structure fibrillaire paracristalline à périodicité transversale- des stries Z est une des caractéristiques les plus évidentes du rhabdomyome bénin et sert à le distinguer du rhabdomyosarcome malin (Cornog et Gonatas, 1967; Battifora *et al.*, 1969). Elle ne peut être significative cependant que

pour le rhabdomyome du muscle squelettique et ne peuvent pas être observées dans les cellules musculaires différenciées du rhabdomyome du vagin (Leone et Taylor, 1973).

La ligne M. Bien que les myofibrilles montrent des stries Z prédominantes, les bandes I, A, H et la ligne M sont rarement bien visibles. Ceci peut être dû à l'état supercontracté des sarcomères où les filaments fins dépassent largement la ligne M. Mais cela ne peut être la seule cause, car les sarcomères sans ligne M sont souvent dilatés. Ces résultats confirment que la fonction essentielle de la ligne M est de maintenir les filaments épais dans une position définie aussi bien dans le sens longitudinal que transversal (Knappéis et Carlsen, 1968) et l'extraction des protéines de la ligne M produit une dilatation importante de la bande A (Kundrat et Pepe, 1971). Ainsi on peut supposer que les M-protéines sont absentes dans un grand nombre de sarcomères.

Le système T est peu organisé dans le rhabdomyoblaste, et on ne trouve qu'occasionnellement des connections de tubules du système T avec le réticulum sarcoplasmique. L'existence de triades est encore moins évidente, même au niveau des myofibrilles les mieux organisées. Kelly (1971) et Schiaffino et Margreth (1969) ont étudié chez le Rat le développement foetal et postnatal des tubules du système T : ces tubules apparaissent par fusions répétées de vésicules lisses chez le foetus, puis ils s'allongent et forment des contacts avec le réticulum sarcoplasmique (dyades, triades) pendant le développement postnatal.

Dans le rhabdomyosarcome, nous observons assez souvent des invaginations du sarcolemme qui donnent naissance à des formations d'un système tubulaire en forme de spirale. Des réseaux réguliers et paracrystallins montrés par Cornog et Gonatas (1967) dans les rhabdomyomes et par Friedman et Bird (1969) dans les rhabdomyosarcomes n'ont pas été observés dans les tumeurs de nos expériences. Alors que les premiers auteurs voient l'origine de ces réseaux dans le système T, les derniers l'expliquent comme étant une forme particulière du réticulum sarcoplasmique fenestré. En tout cas, ce point devrait être étudié plus directement.

Le réticulum sarcoplasmique. Les cellules tumorales sont riches en réticulum sarcoplasmique irrégulier, lequel possède une surface granulaire dans les myoblastes immatures et une surface lisse dans les fibres musculaires différenciées. Beaucoup de cellules contiennent de nombreuses citernes sarcoplasmiques remplies d'une substance dense qui est probablement un précurseur des granules sphériques aux anneaux concentriques. Ces microcristaux ont été observés dans des cellules en régénération (Turbeck, 1974), dans des cellules musculaires normales avec une activité élevée de contraction (Ponsolle *et al.*, 1974) et particulièrement dans des myopathies vacuolaires telle que la paralysie périodique primaire hypokaliémique (A.G.Engel, 1973).

La fonction de ces structures sphériques pendant la vie cellulaire est peu étudiée. On pense qu'elles sont constituées de calcium sous forme de carbonate et de phosphate, et qu'elles représentent des réserves de composés utilisés plus tard pour la croissance cellulaire. Pour maintenir cette hypothèse, il est important de souligner le rôle essentiel que joue le calcium lors de la contraction musculaire. Dans le muscle pathologique, ces concentrations minérales doivent peut-être leur existence à un excès de précipitation consécutif à un métabolisme cellulaire perturbé.

En plus, la présence de ces cristaux dans le réticulum sarcoplasmique et l'absence d'un système T bien organisé peuvent être reliées à une déficience du transport du calcium lui-même indispensable pour la fonction contractile du muscle normal. En effet, Gilman (1965) a démontré que les myoblastes du rhabdomyosarcome induit par le Ni_3S_2 n'exécutent plus aucune contraction lorsqu'ils sont mis en culture.

Comment le calcium peut-il favoriser la prolifération de cellules néoplasiques? Ceci reste une question qui ne peut actuellement être résolue de façon satisfaisante. Néanmoins, Balk (1971) a montré que le calcium joue un rôle en déclenchant et en augmentant les divisions des cellules normales et néoplasiques et que ce fait doit être en relation avec le rôle du calcium lors de la transmission neuromyale et de la contraction. Selon les travaux de Balk (1971) sur les fibroblastes normaux et transformés, les

rhabdomyoblastes peuvent représenter un système très utile pour analyser le rôle du calcium dans le contrôle de la division et de la fusion cellulaire des myoblastes normaux et tumoraux.

L'origine et la fonction des corps laminés dans certaines cellules restent encore à mettre en évidence. En tout cas, ils ne semblent pas dériver du réticulum sarcoplasmique et devraient plutôt être considérés comme des lysosomes.

Les mitochondries. Des anomalies mitochondriales sont bien connues dans le muscle pathologique (Price, 1973). Différents types de mitochondries anormales ont été également décrits dans les rhabdomyomes (Cornog et Gonatas, 1967) et les rhabdomyosarcomes (Basrur *et al.*, 1970). Mais comme ces anomalies mitochondriales sont différentes d'une tumeur à l'autre, on ne peut pas les considérer comme étant caractéristiques des différentes tumeurs musculaires.

Les noyaux. Les déformations nucléaires peuvent permettre la distinction entre une tumeur bénigne et maligne. Les noyaux du rhabdomyosarcome possèdent des contours extrêmement irréguliers, notamment dans les myofibres bien différenciées (Battifora *et al.* 1969; Friedman et Bird, 1969; Reznik *et al.*, 1970; Boram *et al.*, 1972). De telles anomalies nucléaires ne sont mentionnées ni pour les rhabdomyomes (Cornog et Gonatas, 1967), ni pour les rhabdomyosarcomes induits par des virus chez la Souris (Dalton, 1966). Les vacuolisations ressemblent beaucoup à celles décrites pour la plupart des cellules tumorales et semblent être reliées aux anomalies de la différenciation myofibrillaire et du développement cellulaire. Les divisions nucléaires ainsi que la reconstitution de l'enveloppe nucléaire durant la télophase semblent être également perturbées et on trouve dans quelques cellules du matériel ribonucléoprotéinique à l'extérieur du noyau dans le cytoplasme.

Les noyaux n'ont aucune place préférentielle dans la fibre musculaire tumorale, bien que certains auteurs ne les observent qu'à la périphérie de la fibre et d'autres en position centrale.



La formation des cils. Cils ou flagelles sont très rares dans des tissus non-germinaux et en général ils ne se trouvent que dans les spermatozoïdes, les cellules sensorielles et dans l'épithélium cilié. Mais plusieurs auteurs ont décrit la formation de cils dans d'autres cellules, spécialement dans les fibroblastes et les cellules myogéniques du muscle strié et lisse (Sorokin, 1962; Stubblefield et Brinkley, 1966; Warren, 1974). En général ces cils inhabituels sont temporaires (Berry et Johnson, 1975; Sreng et Quennedy, 1976) et représentent des formations incomplètes (Sorokin, 1962; Warren, 1974) : les corps basaux sont plus petits que ceux des cils normaux, souvent les racines basales sont absentes et la composition en tubules du cil est même souvent irrégulière, déficitaire ou même absente. En 1961, Barnes a fait une étude des cils "solitaires non-mobiles" dans diverses cellules somatiques et a constaté l'absence de fibre centrale. Normalement les cils sont situés librement à la surface cellulaire, montrent le "9+2" arrangement des microtubules et ne possèdent qu'un corps basal. Les cils temporaires ne sont pas nécessairement localisés librement sur une surface cellulaire, montrent un "9+0" ou un autre ("7+2") arrangement des microtubules et leur système basal consiste en une paire de centrioles de la cellule et non en un corps basal unique. Barnes (1961) et d'autres auteurs (Munger, 1958; Inoue, 1959) donnaient à ces cils une fonction sensorielle; mais il faut admettre que la preuve d'une telle hypothèse est purement circonstancielle et que leur rôle physiologique -s'il existe- reste toujours inconnu. Un travail récent a montré le rôle de cils "temporaires" dans la morphogénèse des glandes tergaes d'Insectes où le conduit cuticulaire est formé autour du complexe ciliaire de telle façon que ce complexe serve de véritable moule pour le futur canal de la glande tergale (Sreng et Quennedy, 1976).

La formation de cils dans les fibroblastes, les cellules myogéniques et tumorales cependant, ne peut avoir une fonction de moule pendant l'organogénèse, surtout que la plupart de ces formations apparaissent dans des cultures cellulaires. Durant ces dernières années, il a été démontré qu'il existe une relation précise entre la présence d'un cil et la division cellulaire (Dingemans, 1969; Rash *et al.*, 1969; Brinkley et Stubblefield, 1970; Fonte *et al.*, 1971). On a émis l'hypothèse que les cellules avec

une activité mitotique élevée montrent moins de cils que les cellules qui ne se divisent pas (Dingemans, 1969). Dans ces conditions, on devrait s'attendre à trouver très peu de formations de cils dans des tumeurs avec une grande activité mitotique. D'autre part, Fonte *et al.* (1971) ont montré que des cellules mésenchymateuses qui se divisent rapidement, possèdent assez régulièrement des cils. Les observations de Dingemans (1969) n'excluent pas celles de Fonte *et al.* (1971). En effet, les deux obtenaient les résultats sur du tissu en division, mais les cellules étudiées ne se trouvaient pas dans la même phase du cycle mitotique. Ainsi ces observations ne sont pas contradictoires, ni en opposition avec nos résultats. Les rhabdomyosarcomes sont des tumeurs d'origine mésenchymateuse avec des divisions cellulaires fréquentes au cours desquelles des cils peuvent apparaître régulièrement. D'autre part, nous pouvons confirmer les observations de Dingemans (1969), car nous n'avons jamais trouvé de formations de cils dans des cellules qui se trouvaient dans la phase M du cycle de division.

Comme le contrôle mitotique est généralement supprimé dans les tissus cancéreux, nous ne devons pas nous étonner de trouver des formations ciliaires dans des cellules myogéniques tumorales - fait qui n'a été décrit que rarement. Il est possible que certains facteurs du contrôle mitotique font défaut, et c'est à cause de cette absence que les centrioles peuvent se transformer en corps basaux et par conséquent en cils. Stubblefield et Brinkley (1966) ont démontré que le colcémide inhibe à la fois le développement de cils et l'assemblage des protéines fusoriales en microtubules. Cette observation suggère une homologie entre les composés du tube ciliaire et les microtubules du fuseau mitotique. Evidemment il doit s'agir dans les deux cas de l' α - et de la β -tubuline.

Les cils peuvent ainsi apparaître dans les rhabdomyoblastes à l'interphase pour *deux* raisons : l'une peut être consécutive aux relations qui existent entre la formation ciliaire et la division cellulaire, la seconde peut être dépendante de la suppression de quelques facteurs du contrôle mitotique. Mais ces deux hypothèses ne s'excluent pas l'une l'autre.

Dans l'état actuel des recherches sur les myopathies, on reconnaît qu'il existe beaucoup de ressemblances entre le muscle tumoral ou pathologique et le muscle normal. Les différences les plus importantes ne concernent généralement pas la présence ou l'absence de diverses structures cellulaires, mais plutôt leur fréquence et intensité, leur orientation et distribution. Les caractères les plus prédominants de la myofibre tumorale sont les noyaux altérés, les myofibrilles irrégulières, les stries Z anormales et l'absence d'un système T bien organisé. De plus, il faut souligner que le muscle tumoral ne devrait pas être comparé au muscle normal adulte, mais plutôt au muscle embryonnaire et au muscle en régénération dont le développement est bien défini.

La présente étude montre également les différences ultra-structurales entre les divers types de muscle pathologique : il existe très peu de structures qui peuvent être considérées comme caractères spécifiques de telle ou telle tumeur. Les nombreuses différences de structure ou de développement ne dépendent pas seulement du fait qu'une tumeur soit bénigne ou maligne, qu'elle apparaisse spontanément ou qu'elle soit induite par des virus ou des agents chimiques, mais elles varient également d'un muscle à l'autre et sont plus ou moins évidentes selon les animaux.

II. LE RHABDOMYOSARCOME CHEZ LE LAPIN.

Des tumeurs musculaires chez le Lapin n'ont jamais été décrites et seul Hueper (1955) a essayé d'en induire avec du nickel. Mais il n'a provoqué que des fibrosarcomes et en a conclu que le Lapin est insensible à l'induction de rhabdomyosarcomes. Comme nous avons déjà envisagé d'entreprendre des études biochimiques et biophysiques sur les protéines contractiles tumorales, et comme on choisit habituellement pour ces études le muscle du Lapin comme référence, nous avons donc essayé -malgré les résultats négatifs de Hueper (1955)- d'induire des rhabdomyosarcomes chez le Lapin par implantation du Ni_3S_2 . Nous avons obtenu différentes tumeurs : quelques fibrosarcomes, des tumeurs du muscle lisse ou leiomyosarcomes que nous décrirons dans le chapitre suivant et essentiellement des rhabdomyosarcomes (Pl.17, Fig a).

A. ETUDE MACROSCOPIQUE.

Les rhabdomyosarcomes que nous avons obtenus ressemblent généralement à ceux décrits chez le Rat par Friedman et Bird (1969). Les tumeurs atteignent parfois une taille importante d'un diamètre de 8 cm et plus, et d'un poids allant jusqu'à 300 g. Elles sont entourées d'une capsule de tissu conjonctif et sont habituellement lobées (Pl.17, Fig b). Quand on les découpe, on retrouve en général l'implant de Ni_3S_2 , même si la tumeur est prélevée au bout de 20 mois (Pl.17, Fig c). Cet implant de Ni_3S_2 est toujours entouré par une fine capsule qui ressemble totalement à celle trouvée dans les leiomyosarcomes du Lapin et également à celle des rhabdomyosarcomes du Rat.

B. ETUDE EN MICROSCOPIE PHOTONIQUE.

Le stroma de la tumeur est constitué de quatre types cellulaires différents (Pl.18, Fig a). Nous y trouvons d'abord une quantité importante de petites cellules mononucléées, rondes ou

polygonales, au niveau desquelles on observe souvent les différentes phases de la mitose (Pl.18, Figs a à d). Puis on observe de *petites cellules mononucléées fusiformes* généralement sans figures de mitose (Pl.18, Figs a à d). Dans des zones bien différenciées de la tumeur, il existe de *grandes cellules multinucléées allongées* qui montrent -en coupe transversale- un réseau fibrillaire irrégulier (Pl.18, Figs b et c) et -en coupe longitudinale- la striation caractéristique du muscle squelettique, toutefois beaucoup moins organisée que dans le muscle normal (Pl.18, Fig d). En outre, on trouve assez fréquemment des cellules géantes avec un ou plusieurs noyaux qui montrent, elles-aussi, des figures typiques de mitose (Pl.18, Fig a).

C. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

1. Aspect général.

L'examen au microscope électronique ne révèle que très peu de différences entre les rhabdomyosarcomes induits chez le Rat et ceux induits chez le Lapin. Une vue d'ensemble (Pl.19, Fig a) permet de reconnaître les petites cellules polygonales et les cellules fusiformes avec des noyaux aux contours irréguliers, contenant de la chromatine condensée. L'espace intercellulaire est élargi et contient habituellement de nombreuses fibres de collagène.

Les cellules multinucléées, allongées possèdent des myofibrilles sans aucune orientation précise dont l'aspect est identique à celui décrit chez le rhabdomyosarcome du Rat (Pl.19, Fig b). En outre, les myofibres contiennent quelques mitochondries, du réticulum sarcoplasmique, des tubules du système T et du glycogène (Pl.19, Fig b).

Les cellules géantes sont caractérisées, comme les fibres musculaires par des myofilaments, mais une organisation en myofibrilles n'est jamais observée. *Les myofilaments sont arrangés en paquets dans le cytoplasme dans n'importe quel sens, mais ne montrent aucune strie Z.* A côté des éléments classiques, on observe des inclusions denses qui représentent probablement des lysosomes (Pl.20).

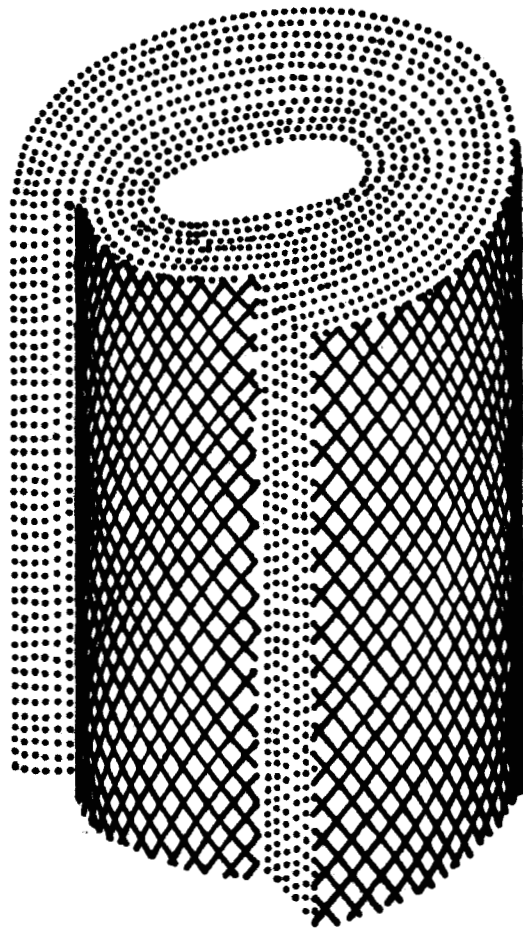


Fig.20. Représentation schématique des structures fibrillaires paracristallines dans le rhabdomyosarcome du Lapin.

Dans une seule tumeur, nous avons observé des inclusions de type viral, caractérisées par une paroi à deux membranes et d'un diamètre d'environ 165 nm (Pl.21, Figs a et b). Comme ces structures n'ont été remarquées qu'une seule fois, nous ne leur attachons qu'une importance secondaire dans l'établissement de cette tumeur.

2. Les structures paracrystallines.

Dans de nombreuses cellules -myoblastes immatures et myofibres différenciées- nous avons observé des *structures paracrystallines* (Pl.21, Fig c) constituées de fines fibrilles formant des lamelles concentriques (Pl.22, Fig a). Ces lamelles ne doivent pas obligatoirement se refermer sur elles-mêmes, et on aperçoit parfois quelques lamelles parallèles (Pl.22, Fig b). Les lamelles sont constituées de fines fibrilles et, à plus fort grossissement, on constate que ces fibrilles semblent être tubulaires (Pl.22, Fig c). Elles ont un diamètre d'environ 4 nm. Leur origine est complètement inconnue et elles apparaissent librement dans le cytoplasme sans être entourées par des membranes (Pl.22, Figs a, b et c), dans des mitochondries (Pl.22, Fig d) ou dans des noyaux, où elles existent avec ou sans membrane à leur périphérie (Pl.23, Fig a). Les structures cristallines sont des formations assez complexes et des coupes tangentiels révèlent une position croisée des fibrilles (Pl.23, Figs b et c; Fig. 20).

D. DISCUSSION.

Pour obtenir des rhabdomyosarcomes chez le Lapin, Hueper (1955) utilise le nickel métallique et il n'obtient que des fibrosarcomes. Nous n'avons employé ni la même méthode, ni le même produit, et c'est certainement grâce au Ni_3S_2 que nous obtenons des rhabdomyosarcomes chez le Lapin. Ces expériences confirment une fois de plus, que le Ni_3S_2 est un cancérigène plus puissant que le nickel métallique.

Il est difficile de donner une valeur exacte du rendement pour l'obtention des tumeurs. Comme nous avons toujours pratiqué des implantations bilatérales, et comme les Lapins ont toujours été

sacrifiés lors de l'ablation de la première tumeur apparue, nous avons obtenu au moins un rendement de 50 %. Néanmoins il nous semble important d'indiquer qu'il y avait souvent l'apparition d'une seconde tumeur sur l'autre patte, atteignant parfois la taille d'une noix.

En ce qui concerne l'histologie et la micromorphologie de la tumeur, nous n'avons constaté que très peu de différences avec les rhabdomyosarcomes induits chez le Rat. Les seules structures que nous n'avons pas observées chez le Rat, sont les *structures paracrystallines* dont nous ne connaissons ni l'origine, ni la fonction. L'interprétation -si elle est un jour possible- sera rendue encore plus difficile par la variabilité de la structure de ces formations, d'une part, et par la diversité de leur emplacement dans la cellule, d'autre part.

III. LE LEIOMYOSARCOME CHEZ LE LAPIN.

Leiomyosarcomes et leiomyomes sont des tumeurs fréquentes de l'estomac et de l'utérus (Cornog, 1969 et 1974; Kay et Still, 1969; Welsh et Meyer, 1969; Salazar et Totten, 1970; Appelman et Helwig, 1976). Les descriptions histologiques des tumeurs gastriques ont montré que ces tumeurs sont très variées du point de vue histologique et ressemblent rarement au muscle lisse normal. Les tumeurs utérines par contre, sont rarement confondues avec d'autres tumeurs mésenchymateuses.

Au cours de nos travaux sur les rhabdomyosarcomes du Lapin, nous avons obtenu plusieurs fois des leiomyosarcomes par implantation intramusculaire du Ni_3S_2 dans le muscle blanc squelettique du Lapin. Comme ce type de tumeurs chimio-induites n'a jamais été décrit, nous décrirons dans ce chapitre les particularités de l'ultrastructure du leiomyosarcome en le comparant avec le muscle lisse normal, avec des leiomyosarcomes spontanés et avec d'autres tumeurs possédant le caractère du muscle lisse.

A. ETUDE MACROSCOPIQUE.

Les trois leiomyosarcomes examinés lors de nos travaux apparaissaient tous à l'endroit de l'implantation dans une patte des Lapins. Les tumeurs ont un diamètre de 4 à 6 cm et une longueur de 5 à 10 cm. Elles ressemblent beaucoup à celles décrites par Salazar et Totten (1970) et sont généralement bien limitées, mais on ne trouve pas de capsules individualisées. A la périphérie, elles sont entourées par du tissu conjonctif et quelques fibres du muscle de la patte. L'apparition de lobes est assez fréquente. Une tumeur était composée de multiples nodules d'un diamètre moyen de 1 cm. Deux des trois tumeurs ont produit des métastases pulmonaires. Dans toutes les tumeurs, nous avons pu retrouver l'implant de Ni_3S_2 (Pl.24, Fig a). Ces implants sont entourés d'une capsule consistante qui a été examinée en microscopies optique et électronique.

B. ETUDE HISTOLOGIQUE.

1. La tumeur.

Les trois tumeurs avaient une morphologie identique (Pl.24, Fig b). On peut observer deux types différents de zones, dont un est caractérisé par des amas irréguliers de *petites cellules fusiformes* possédant un petit noyau pléomorphe (Pl.24, Fig c). Le second type de zone est constitué de faisceaux de *cellules de muscle lisse* montrant parfois des noyaux allongés (Pl.24, Fig d). Le cytoplasme de ces cellules est éosinophile et contient des structures fibrillaires. Une activité mitotique existe dans les deux types de cellules généralement mononucléées. Dans des zones intermédiaires, on observe parfois quelques cellules géantes contenant un ou plusieurs grands noyaux (Pl.25, Fig a).

2. La coque d'inclusion du Ni₃S₂.

La capsule renfermant l'implant de Ni₃S₂ est essentiellement composée de matériel fibreux (Pl.25, Fig b). Cette capsule contient un grand nombre de noyaux qui se détachent peu du stroma (Pl.25, Fig c) et des espaces "vides" relativement grands qui montrent à leur périphérie du matériel fibrillaire rouge après coloration avec le Trichrome de Masson (Pl.25, Fig d). La réaction P.A.S. est négative aussi bien dans la tumeur que dans la coque d'inclusion de l'implant de Ni₃S₂.

C. ETUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les deux types cellulaires observés au microscope photonique montrent moins de différences lorsqu'on examine leur ultrastructure.

1. Les petites cellules fusiformes.

Les cellules qui apparaissent en microscopie électronique le plus fréquemment sont de petites cellules fusiformes séparées les unes des autres par des fibres de collagène (Pl.26). Ces cellules contiennent des paquets denses de fines fibrilles d'une épaisseur moyenne de 7 nm et n'ayant dans le cytoplasme aucune

orientation. Ces fibrilles sont interrompues par une multitude de *corps denses*, "*dense bodies*", et on reconnaît parfois des plaques denses sur la face interne de la membrane plasmique. On observe rarement une lame basale sur la surface cellulaire, mais il existe un matériel fibrillaire dans l'espace intercellulaire qui pourrait correspondre à un rudiment de la lame basale (Pl.26). Ces cellules contiennent un noyau assez volumineux et le centre cellulaire est caractérisé par le complexe de Golgi à proximité des centrioles. On observe quelques mitochondries, des vésicules larges et de l'ergastoplasme (Pl.26; Pl.30, Fig d).

2. Les cellules allongées du muscle lisse.

Les cellules allongées de type muscle lisse contiennent généralement les mêmes éléments que les petites cellules fusiformes. Cependant elles sont caractérisées non seulement par leur taille, mais surtout par l'orientation plus ou moins parallèle et longitudinale des microfibrilles par rapport à la cellule (Pl.27, Fig a).

3. Les structures fibrillaires.

Le cytoplasme des cellules du muscle lisse contient un nombre considérable de microtubules orientés longitudinalement comme les microfibrilles et ayant un diamètre d'environ 18 nm (Pl.27, Fig b). Cette planche montre également que les fibrilles de 7nm sont pontées. Ces ponts par contre, manquent complètement sur d'autres fibrilles dont le diamètre atteint 10 nm et qui sont présentes dans la même cellule (Pl.27, Fig d).

4. Les noyaux.

Les noyaux sont en général irréguliers en ce qui concerne leur forme et leur taille (Pl.26) et contiennent un ou plusieurs grands nucléoles. Les nucléoles montrent habituellement un nucléolonème étendu qui forme un réseau irrégulier tridimensionnel (Pl.28, Fig a). Très souvent on peut observer dans le nucléoplasme un ou plusieurs corps nucléaires formés d'un matériel amorphe de faible densité et d'éléments fibrillaires d'un diamètre de 5 à 6 nm (Pl.28, Figs a et b). Les corps nucléaires sont souvent entourés

d'un espace clair. Ils sont ronds ou ovoïdes et ont un diamètre de 0,2 à 0,5 μm . Sur certaines coupes on observe du matériel chromatinien à l'extérieur du noyau (Pl.28, Fig c). Des figures mitotiques sont fréquentes dans les petites cellules fusiformes et les jeunes cellules de type muscle lisse (Pl.29, Fig a). De plus une paire de centrioles existe à chaque pôle du fuseau mitotique.

5. Les mitochondries.

Les mitochondries sont très variées en forme et taille et sont rencontrées partout dans le cytoplasme, mais elles ne sont pas très fréquentes. Beaucoup de mitochondries contiennent des inclusions d'un matériel dense qui peut occuper parfois la majeure partie de la matrice mitochondriale (Pl.29, Fig b).

6. Le réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique possède un aspect normal avec des citernes granulaires. Néanmoins, la plus grande partie de l'ergastoplasme contient une substance amorphe et opaque aux électrons (Pl.26; Pl.29, Fig c). Nous n'avons jamais observé en microscopie électronique du réticulum fenestré ou sous forme de réseaux paracrystallins.

7. Les jonctions cellulaires.

Dans des régions de la tumeur où les cellules sont très proches les unes des autres et où, par conséquent, l'espace intercellulaire est extrêmement réduit, on observe parfois des complexes de jonctions de différentes structures. Les complexes les plus courants sont des jonctions desmosomales avec ou sans couches intermédiaires (Pl.30, Figs a et b). Dans quelques espaces intercellulaires il existe parfois seulement un matériel de jonction très fin. Aux endroits où ce matériel manque, la lumière de l'espace intercellulaire s'élargit (Pl.30, Fig c). De tels complexes de jonction peuvent être considérés comme des "gap junctions".

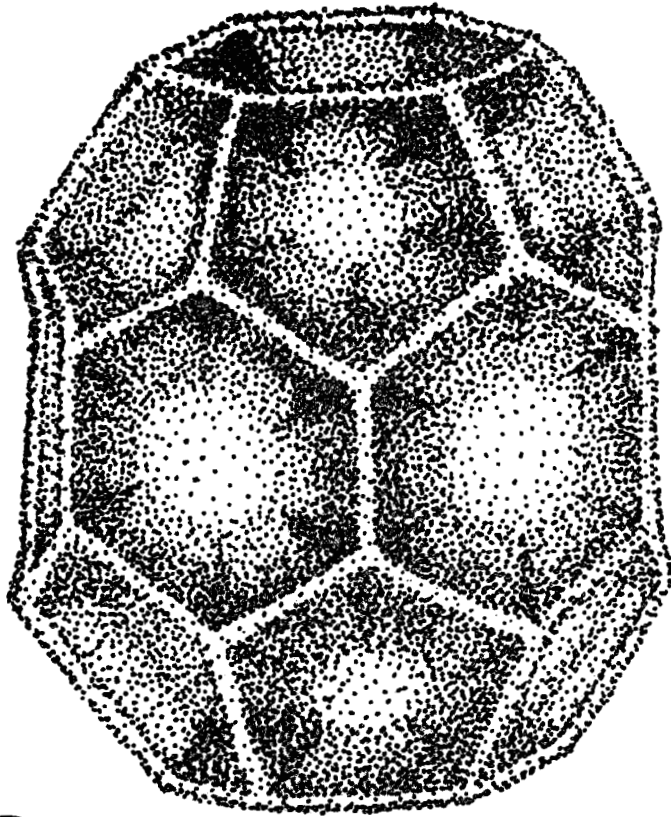
8. L'appareil de Golgi et les vésicules dentelées.

On peut observer dans la plupart des cellules un appareil de Golgi bien développé dont le centre est généralement situé près du noyau à proximité des centrioles (Pl.30, Fig d). Les dictyosomes sont entourés d'une multitude de vésicules dentelées (Pl.30, Fig d; Pl.31, Fig a) et il est indiscutable que ces vésicules prennent leur origine sur les sacules golgiens par bourgeonnement (Pl.31, Fig a). Les vésicules dentelées se rencontrent partout dans le cytoplasme des cellules tumorales et contiennent souvent un matériel dense aux électrons (Pl.31, Fig b), mais parfois on observe aussi des vésicules "vides" (Pl.31, Fig b). Il s'agit de vésicules pinocytotiques qui rejoignent la membrane cellulaire (Pl.31, Fig c) où elles abandonnent rapidement leur contenu dans l'espace intercellulaire (Pl.31, Fig d). Ce processus est appelé exocytose. En utilisant la technique de renforcement rotatif des micrographies (Markham, 1963), certaines sections tangentielles d'une vésicule montrent une nette sous-structure pentagonale (Pl.31, Fig e), d'autres une sous-structure hexagonale centrale (Pl.31, Fig f).

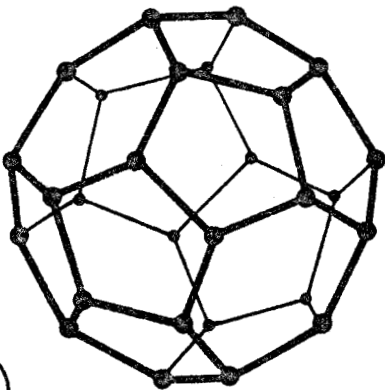
Une structure hexagonale est également trouvée sur des sections médianes, où l'on observe - après application de la même technique - plutôt six paires que douze spicules simples (Pl.31, Fig g). La figure 21 représente les structures possibles des vésicules dentelées proposées par Crowther *et al.* (1976). A titre de comparaison, nous présentons des vésicules identiques isolées à partir du cerveau de Porc, où l'on reconnaît - après la technique du contraste négatif - les sous-structures hexagonales (Pl.31, Figs h et i) et pentagonales (Pl.31, Figs h, j et k) des vésicules dentelées.

9. La coque d'inclusion du Ni_3S_2 .

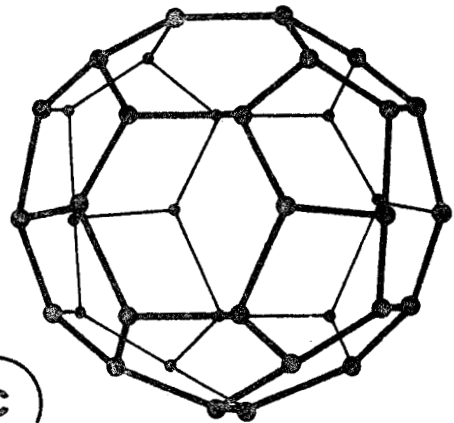
La coque d'inclusion du Ni_3S_2 est essentiellement composée de gros paquets de fibres de collagène. Quelques espaces contiennent des résidus cellulaires dont seulement les noyaux sont reconnaissables d'une manière satisfaisante (Pl.32, Fig a). Les espaces larges mentionnés lors de la description histologique renferment des paquets importants d'un matériel fibrillaire avec une sous-



a



b



c

Fig. 21. Schemas stéréoscopiques montrant les différentes possibilités de forme des vésicules dentelées.
 a. Forme ovoïde composée de 8 hexagones et 12 pentagones (type le plus fréquent).
 b. Forme sphérique composée de 4 hexagones et 12 pentagones.
 c. Forme sphérique composée de 8 hexagones et 12 pentagones.

(d'après Crowther *et al.*, 1976).

structure perpendiculaire à l'axe longitudinal d'une périodicité approximative de 16,5 nm (Pl.32, Fig b).

D. DISCUSSION.

L'histologie des leiomyosarcomes chimio-induits ressemble beaucoup à celle des leiomyosarcomes spontanés décrits par d'autres auteurs (Cornog, 1969 et 1974; Kay et Still, 1969; Salazar et Totten, 1970; Appelman et Helwig, 1976), et à certaines tumeurs leiomyomateuses (Silverman et Kay, 1976). Ils sont composés de masses solides de cellules épithéloïdes avec généralement des noyaux ronds ou ovoïdes et des faisceaux de fibres de muscle lisse avec parfois, une orientation irrégulière. La microscopie électronique par contre, révèle quelques caractères typiques pour ces tumeurs chimio-induites.

La lame basale. Bien que tous les auteurs affirment l'existence de la lame basale dans les leiomyosarcomes, nous n'avons jamais pu l'observer dans une forme bien définie. Cette lame basale existe aussi, d'une façon générale, à la surface des cellules d'autres tumeurs de type muscle lisse, tels que les glomangiomes (Toker, 1969; Venkatachalam et Greally, 1969) et les leiomyomes (Welsh et Meyer, 1969; Bearman, 1974).

La structure cellulaire. Les caractéristiques prédominantes des cellules tumorales du muscle lisse correspondent à l'assemblage et à l'organisation des *structures fibrillaires*. On reconnaît généralement deux types de fibrilles : les fibrilles à 7 nm et les fibrilles à 10 nm. Les paquets de fines fibrilles -interrompues par des corps denses- doivent être considérés comme le matériel myofibrillaire bien connu du muscle lisse (Heumann, 1971) : les fines fibrilles représentent les filaments d'actine, les corps denses sont constitués de matériel de la strie Z, et les ponts entre les fibrilles sont les têtes d'oligomères de myosine. Les filaments épais de myosine sont rarement observés et Heumann (1971) a démontré l'absence de filaments de myosine dans les fibres relâchées du muscle lisse. Ainsi on doit considérer les paquets myofibrillaires dans les cellules tumorales comme relâchés.

L'origine et la fonction des fibrilles à 10 nm restent encore mal définies. Il pourrait être intéressant cependant de rappeler que Wang *et al.* (1975) ont trouvé dans les cellules du muscle lisse et dans les cellules non musculaires, une nouvelle protéine à haut poids moléculaire, dénommée *filamine*. Cette protéine a été récemment identifiée comme une protéine formant un complexe avec l'actine (Hartwig et Stossel, 1975; Stossel et Hartwig, 1975; Shizuta *et al.*, 1976). L'activation de la Mg^{2+} -ATPase par l'actine ne peut plus avoir lieu dès que ce complexe actine-filamine s'est formé (Davies *et al.*, 1977). Les fibrilles à 10 nm pourraient correspondre à cette nouvelle protéine, laquelle n'a pas encore pu être précipitée *in vitro* sous forme de filaments, mais dont le réseau fibrillaire a été démontré par immunofluorescence (Weber et Groeschel-Stewart, 1974; Wang *et al.*, 1975). Si les fibrilles à 10 nm représentent vraiment la filamine, leur présence en quantité assez importante pourrait expliquer l'état de relaxation des paquets myofibrillaires, car l'existence du complexe actine-filamine empêcherait la formation de l'actomyosine.

D'autre part, Small et Sobieszek (1973, 1977) ont isolé des fibrilles à 10 nm à partir du muscle lisse constituées essentiellement d'une protéine dont ils ont déterminé le poids moléculaire comme étant de 55 000. Leur interprétation est que ces filaments ne sont point essentiels pour la contraction et qu'ils forment plutôt un cytosquelette intracellulaire spécialisé.

Contrairement aux cellules du muscle lisse normal, les myoblastes tumoraux possèdent un nombre important de *microtubules*, dont on a démontré qu'ils étaient nécessaires pour l'alignement des myofibrilles du muscle strié en cours de différenciation (Fischman, 1967; Shimada *et al.*, 1967; Beinbrech, 1970; Warren, 1974). Cette fonction des microtubules n'est pas confirmée pour les cellules du muscle lisse normal. Heumann (1971) mentionne l'existence de quelques microtubules dans les cellules du muscle lisse normal disposés de façon parallèle aux myofibrilles, mais avec une fréquence beaucoup moins importante que dans les cellules tumorales. La fonction de ces microtubules est encore peu connue.

Les noyaux. Les déformations et vacuolisations nucléaires ressemblent à celles décrites pour la plupart des cellules tumorales malignes et semblent être en relation avec les anomalies du développement cellulaire. Elles sont particulièrement évidentes dans les tumeurs induites par le Ni_3S_2 (Friedman et Bird, 1969; Bruni et Rust, 1975), où les noyaux ont complètement perdu leur comportement prolifératif normal, c'est-à-dire qu'ils peuvent "oublier" d'inclure une partie de matériel ribonucléoprotéinique lors de la division. Nous avons pu observer ce phénomène également chez le rhabdomyosarcome du Rat.

Les corps nucléaires ont été mentionnés pour la première fois par une école française (De Thé *et al.*, 1960; Hinglais-Guillaud *et al.*, 1961) et ont été maintes fois observés depuis dans le nucléoplasme de cellules normales et pathologiques à l'interphase (voir références Yasuzumi *et al.*, 1975). Leur structure est tellement variable que Bouteille *et al.* (1967) ont proposé une classification de cinq différents types. Les corps nucléaires décrits généralement dans les tumeurs du muscle lisse peuvent être attribués au type I de cette classification (Kay et Still, 1969; Welsh et Meyer, 1969; Salazar et Totten, 1970; Silverman et Kay, 1976). La plupart des auteurs suggèrent une relation entre les corps nucléaires et la synthèse protéique (voir Yasuzumi *et al.*, 1975).

Le réticulum endoplasmique. Les cellules tumorales sont riches en réticulum endoplasmique généralement granulaire, dont un nombre important de citernes sont remplies d'une substance finement granulaire. Nous avons observé ce précipité également dans les rhabdomyosarcomes chimio-induits chez le Rat et discuté son rôle lors de la description de ces tumeurs.

Les mitochondries. Les anomalies mitochondriales sont bien connues dans le muscle squelettique pathologique (Price, 1973). Différents types ont été décrits dans les rhabdomyosarcomes (Cornog et Gonatas, 1967) et spécialement dans ceux induits par le Ni_3S_2 (Basrur *et al.*, 1970). Nous les avons aussi observés.

Le complexe de Golgi et les vésicules dentelées. Les vésicules dentelées peuvent dériver de divers éléments cytoplasmiques tels que la membrane cellulaire, le réticulum endoplasmique, les vési-

cules sécrétrices et l'appareil de Golgi (Ham, 1974b). Dans le cas décrit dans ce travail, il est évident que les vésicules se forment directement par bourgeonnement à partir de dictyosomes de la même façon que les vésicules lisses. Leur structure est très semblable à celle décrite par Crowther *et al.* (1976) qui montrent trois types essentiels, dont le type le plus fréquent semble être celui de forme ovale qui est composé de 8 hexagones et de 12 pentagones. La surface de ces vésicules ne doit surtout pas être confondue avec le "cell-coat".

Le cell-coat se trouve à l'extérieur de la membrane cellulaire alors que le matériel sur les vésicules dentelées se trouve sur la face intérieure et fusionne avec la face intérieure de la membrane cellulaire lors de l'exocytose. La substance de la surface de ces vésicules a été dernièrement caractérisée par Pearse qui a identifié quelques phospholipides (1975) et une protéine majeure, la Clathrine (1976), tous associés au transfert intracellulaire des protéines constituant la membrane. Il faut donc supposer que ces vésicules décrites ne jouent pas seulement un rôle dans l'activité sécrétrice de la cellule en vidant leur contenu dans l'espace intercellulaire, mais également dans la construction de la membrane cellulaire pendant la croissance cellulaire en fournissant des phospholipides et des protéines.

La coque d'inclusion du Ni_3S_2 montre l'image typique d'un tissu en dégénérescence. Ceci se remarque aussi bien par la présence de noyaux de cellules dégénérantes, que par la quantité importante de fibres de collagène et de structures fibrillaires périodiques. Ces dernières doivent être considérées comme des inclusions rudimentaires de protéines contractiles. Généralement tous les auteurs ayant travaillé sur le muscle pathologique considèrent ces structures comme étant des stries Z hypertrophiées, et en effet, elles se classent parmi les éléments principaux des myopathies némalines et des rhabdomyomes (Cornog et Gonatas, 1967; Price, 1973). Les structures périodiques peuvent cependant contenir d'autres protéines que du matériel de stries Z. Small et Sobieszek (1973) ont mis en évidence que les structures périodiques obtenues à partir du muscle lisse des Vertébrés et possédant une périodicité transversale d'environ 14 nm contiennent de la tropomyosine comme composant

de support et de la myosine comme composant de surface. D'autre part, les sous-fragments de la myosine telles que la myosine-"rod" et la LMM peuvent former des paracristsaux avec une périodicité semblable (Offer et Moos, 1973).

L'obtention de leiomyosarcomes induits dans les muscles striés squelettiques peut nous donner quelques indications sur l'origine des rhabdomyoblastes. Diverses possibilités ont déjà été envisagées : quelques auteurs établissent l'origine des myoblastes tumoraux dans la prolifération des cellules satellites préexistantes (Allbrook *et al.*, 1966; Church *et al.*, 1966; Shafiq *et al.*, 1968); d'autres pensent plutôt aux myofibres multinucléées altérées comme c'est le cas lors de la régénération musculaire (Reznik, 1973), et enfin une troisième hypothèse considère leur origine au niveau des cellules mésenchymateuses comme dans l'embryon (Hay, 1963; Fischman, 1967). Cette dernière hypothèse nous semble être la plus valable. Le muscle squelettique, le muscle cardiaque, le muscle lisse ainsi que les cellules myoépithéliales se différencient tous - dans des conditions normales - à partir de cellules mésenchymateuses : dans ces conditions il est possible que des leiomyosarcomes puissent apparaître dans le coeur (Bearman, 1974) ou dans le muscle squelettique.

IV. ETUDES RELATIVES A LA CONTRACTION DES RHABDOMYOBLASTES.

L'étude morphologique étant insuffisante pour résoudre le problème de la contraction des rhabdomyoblastes, nous avons envisagé l'étude de l'extraction glycérolique des fibres musculaires tumorales.

Szent-Györgyi (1949), le premier, a eu l'idée d'extraire les fibres musculaires par la glycérine, à froid. Bien que les bases biochimiques de cette méthode semblent peu connues, on peut supposer que la glycérine extrait certaines macromolécules et des organites cellulaires, tout en préservant les protéines myofibrillaires. Après l'opération, les cellules extraites, appelées "modèles" peuvent encore se contracter en présence d'ATP. Cette méthode a été ensuite améliorée par de nombreux auteurs, notamment par Hoffmann-Berling (1953) sur les fibroblastes, par Weber et Portzehl (1952) sur le muscle squelettique, par Kamiya et Kuroda (1965) sur les Myxomycètes et par Schäfer-Dannél (1967) sur les Amibes.

A. EXPERIENCES D'EXTRACTION GLYCERINIQUE.

Les expériences d'extraction glycérolique sont effectuées sur des morceaux de tissu tumoral contenant en général des rhabdomyoblastes immatures et des myofibres tumorales différenciées. Nous avons prêté une attention particulière aux cellules se trouvant au début de la différenciation des myofilaments (Pl.33, Fig a) et aux myofibres matures (Pl.6, Fig c).

Déjà après une durée d'extraction de 5 à 6 jours, on observe une dénaturation importante des organites cellulaires. Dans le cytoplasme, il reste des résidus membranaires de tous les organites et de temps à autre on reconnaît encore quelques mitochondries (Pl.33, Fig c; Pl.34, Fig b). Les ribosomes ont complètement disparu, et il ne reste que quelques grains de glycogène (Pl.33, Figs b et c; Pl.34, Figs a et b).

Les structures filamenteuses par contre, et les myofibrilles sont très bien conservées (Pl.33, Fig b; Pl.34, Fig a). Dans les cellules se trouvant au début de la différenciation des myofilaments, on observe après extraction, une multitude de fines fibrilles d'une épaisseur d'environ 7 nm et qui ne possèdent (comme dans la cellule non glycérinée) aucune orientation précise (Pl.33, Fig b). Le réseau des fibrilles est d'ailleurs très lâche. On observe nulle part de microtubules après l'extraction.

Dans les myofibres matures, on reconnaît encore parfaitement les myofibrilles composées de sarcomères limités par des stries Z à leurs deux extrémités (Pl.34, Fig a). Après extraction, les sarcomères montrent le même aspect contracté que les sarcomères des myofibres non extraites.

B. EXPERIENCES DE CONTRACTION.

Après l'action de l'ATP, l'aspect des rhabdomyoblastes immatures n'est plus le même (Pl.33, Fig c). Bien que l'on reconnaisse encore le réseau de fines fibrilles, celui-ci est davantage "serré" et les fibrilles sont beaucoup plus parallèles entre elles. De plus, on observe parfois quelques filaments épais apparus lors de la contraction.

Le changement qu'on observe au niveau des cellules immatures n'existe pas dans les myofibres différenciées, et l'ATP ne semble avoir eu aucun effet sur les sarcomères qui possèdent toujours l'aspect de contraction (Pl.34, Fig b).

C. DISCUSSION.

Hoffmann-Berling (1954) a pu montrer que la contraction musculaire et cellulaire n'a pas besoin de l'énergie fournie par le métabolisme cellulaire si l'ATP est présent. Car la motilité de la cellule ou du muscle peut persister dans certaines conditions après leur mort apparente. Szent-Györgyi (1949) démontre qu'une extraction par la glycérine peut conserver les protéines myofibrillaires de l'organisme. Si l'on apporte donc de l'ATP à une cellule extraite par la glycérine -dite cellule "modèle"- celle-ci doit se contracter

à la condition qu'il y existe des protéines myofibrillaires. (Rappelons que nous sommes toujours dans l'ignorance des bases biochimiques de l'action de la glycérine). La glycérine ne préserve pas seulement les protéines myofibrillaires de la dénaturation, mais elle provoque également une relaxation des structures contractiles. C'est donc pour ces raisons que nous avons employé cette technique pour l'étude de la contractilité des rhabdomyoblastes, dont la motilité est pratiquement nulle - comme nous le savons déjà- lorsqu'on les met en culture (Gilman, 1965).

En effet, les structures fibrillaires des rhabdomyoblastes immatures ayant un aspect relâché, montrent une nette réaction en présence d'ATP. Lors de la contraction apparaissent même des filaments épais, ce qui montre que la myosine était déjà présente auparavant, mais sous forme d'oligomères. Comme dans le muscle lisse (Heumann, 1971) et dans les cellules non musculaires (Alléra et Wohlfarth-Bottermann, 1972), les filaments épais ne se forment donc qu'au moment de la contraction pour se dépolymériser aussitôt après. Dans une cellule "modèle", la dépolymérisation ne peut plus avoir lieu car la myosine se présente après l'épuisement de l'ATP sous forme de "rigor-complexe" et l'état filamenteux est maintenu.

En ce qui concerne les myofibres matures, les résultats sont assez surprenants, car la glycération ne montre plus son effet relaxant et les sarcomères restent en état contracté. Il nous semble donc logique de considérer que l'ATP ne peut provoquer aucune contraction. L'état contracté des sarcomères, où existent des filaments épais déjà formés, nous montre donc d'une part, que la myosine est dans un état de "rigor-complexe" très établi, et d'autre part, que l'activité ATPasique de la myosine est, soit absente, soit fortement inhibée. Afin d'élucider ce phénomène, nous avons envisagé l'étude des protéines myofibrillaires tumorales.

V. ETUDE COMPARATIVE DES MYOSINES NORMALES ,
FOETALES ET TUMORALES DU RAT ET DU LAPIN.

A. EXTRACTION ET PURIFICATION.

En employant les méthodes de Perry (1955) suivies de celles d'Offer *et al.* (1973), on arrive facilement à extraire (10 min) et à purifier la myosine normale adulte du Rat et du Lapin. En ce qui concerne la myosine foetale, nous obtenions avec les mêmes méthodes un rendement très faible que nous avons pu améliorer en augmentant le temps d'extraction (90 min). Ces myosines peuvent être extraites dans un tampon d'une force ionique élevée ($I=0,3$) et re-précipitées à basse force ionique ($I=0,03$).

La myosine tumorale par contre, ne peut être obtenue par cette méthode, et nous avons dû non seulement prolonger le temps d'extraction (90 min), mais aussi utiliser une solution d'extraction de force ionique plus élevée ($I=0,6$) contenant un agent relaxant puissant ($K_4P_2O_7$ à une concentration de 40 mM) pour obtenir un rendement convenable.

1. Myosine précipitable à pH 6,8.

Toutes les myosines précipitent à basse force ionique et à pH 6,8. Si l'on précipite la myosine normale par simple dilution, on obtient après le deuxième cycle de purification des filaments de myosine parfois bipolaires, parfois fusiformes et allongés, mais généralement enchevêtrés ou accolés les uns aux autres (Pl.35, Fig a).

Lorsqu'on fait un relargage par le $(NH_4)_2SO_4$, la précipitation commence à environ 20 % de saturation du $(NH_4)_2SO_4$ et on la poursuit jusqu'à 35 %. Cette première fraction est examinée en microscopie électronique, et on observe une multitude de filaments accolés, dont certains sont épais et lisses et d'autres chevronnés (Pl.35,

Figs b et c). Il s'agit du complexe actomyosine : les chevrons qui relient les filaments entre eux représentent les ponts que nous avons déjà mentionnés antérieurement. Parfois on observe aussi quelques filaments bipolaires (Pl.35, Fig c). La fraction 36-50 % de saturation de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ contient la myosine purifiée sous forme de filaments bipolaires et de longueur et épaisseur très homogènes (Pl.36).

Peu important l'origine des myosines ou la méthode de leur extraction, elles ont toutes été purifiées par précipitation par le sulfate d'ammonium.

2. Fraction précipitable à pH 5,0.

Toutes les myosines précipitent à basse force ionique à pH 6,8, mais lors de la précipitation de la myosine de certaines tumeurs, nous avons constaté qu'il existe une deuxième fraction qui ne précipite à basse force ionique que lorsqu'on ajuste la solution à pH 5,0. Après centrifugation, cette fraction est soluble dans les mêmes conditions que les myosines précipitables à pH 6,8, mais il faut toujours ajuster le pH à 5,0 pour la précipiter lors des différentes étapes de la purification, même au moment du relargage par le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3. Purification par chromatographie sur DEAE Sephadex A50.

Cette méthode n'a été employée que pour la purification de la myosine normale adulte du Rat et du Lapin, car les rendements en myosines foetale et tumorale sont généralement si faibles que l'on perdait pratiquement la totalité des myosines par cette méthode de purification. Néanmoins, cette technique permet d'obtenir une myosine très pure, qui élimine non seulement les contaminants comme les protéines du filament fin, mais aussi permet facilement de séparer la C-protéine de la myosine.

B. ASPECT ULTRASTRUCTURAL DES FILAMENTS SYNTHETIQUES DES DIFFERENTES MYOSINES.

Une première vérification de la pureté de la myosine est faite en microscopie électronique. Afin de pouvoir comparer correctement les filaments synthétiques des différentes myosines, les myosines ont toutes été précipitées dans les mêmes conditions : précipitation rapide par dilution. La myosine (environ 1 mg/ml) est en solution dans du KCl 0,5 M, tampon phosphate de potassium 10 mM, MgCl₂ 10 mM. Pour obtenir une concentration à 0,1 M en KCl, on dilue la solution de myosine avec du tampon phosphate de potassium (10 mM) contenant du MgCl₂ (10 mM). Le pH était toujours de 6,8, sauf pour la fraction précipitable à pH 5,0.

1. Les myosines normales.

Les myosines du muscle squelettique ont parfois été précipitées *in vitro* par dialyse contre l'eau, mais des résultats homogènes en ce qui concerne la taille des filaments ne sont obtenus qu'après une précipitation rapide par dilution (voir ci-dessus). Ainsi les myosines du muscle squelettique normal adulte du Rat et du Lapin, reprécipitées *in vitro*, donnent en général des *filaments bipolaires* d'une longueur d'environ 0,5 μ m et d'une épaisseur moyenne de 15 nm au milieu du filament, et de 50 nm à ses extrémités; ceci particulièrement en présence de MgCl₂ (Pl.37, Figs a et e). La taille des filaments est très homogène et correspond parfaitement aux résultats obtenus par Huxley (1963), et tous les auteurs, sans exception, les considèrent aujourd'hui comme classiques : la partie médiane est lisse et les deux extrémités s'élargissent en éventail. Cette bipolarité est due à l'arrangement moléculaire de la myosine dans le filament : les molécules sont assemblées tête-bêche et les extrémités renflées du filament représentent l'ensemble des têtes globulaires des molécules (HMM-S₁) dirigées dans le même sens (Fig.22a).

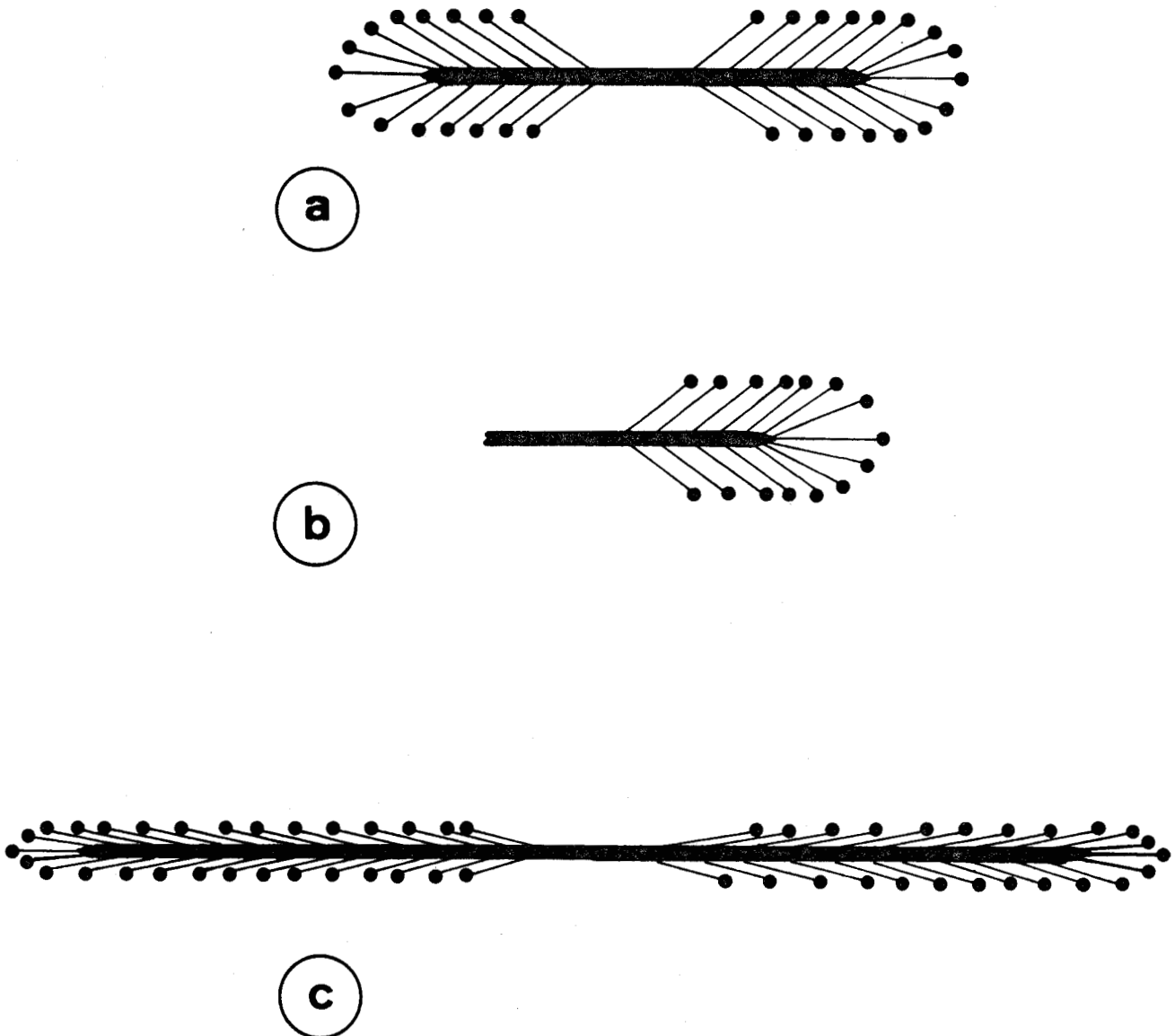


Fig.22. Schéma moléculaire de différentes formes de filaments synthétiques des myosines.

- a. Filament court bipolaire, constitué de molécules énergétisées (myosines normales du Rat et du Lapin, myosine tumorale du Lapin).
- b. Filament court monopolaire constitué de molécules énergétisées (myosine tumorale de certaines tumeurs du Rat).
- c. Long filament fusiforme constitué de molécules à l'état de basse énergie (myosines foetales et tumorales du Rat et du Lapin).

(Façon de présentation d'après Pollard, 1975).

2. Les myosines foetales.

Les myosines foetales du Rat et du Lapin, reprecipitees sous les memes conditions que les myosines normales, ne montrent plus du tout le meme aspect. Nous n'avons observe que de longs filaments fusiformes. Les filaments synthetiques du muscle foetal du Lapin ont une epaisseur d'environ 50 nm (Pl.37, Fig c), alors que ceux du Rat foetal ne montrent qu'une epaisseur de 25 nm environ (Pl.37, Fig g). La longueur des filaments des deux muscles foetaux est tres variable allant de 0,6 μm a 10 μm et plus, mais la majeure partie possede une longueur entre 1 et 2 μm . Ce type de configuration des filaments de myosines est bien connu et est appele *filaments compacts* (Pollard, 1975). La difference entre les filaments bipolaires et compacts n'est pas seulement provoquee par l'arrangement moins ordonne des molecules de myosine dans le filament meme, mais aussi par la position des tetes des molecules, qui sont plus accolées (Fig. 22c).

3. Les myosines tumorales.

Alors que nous avons observe une homogeneite lors de la precipitation des filaments des myosines normales et foetales, nous avons constate que les myosines tumorales peuvent precipiter sous differentes formes variant non seulement selon les conditions de precipitation mais parfois aussi d'une tumeur a l'autre. De plus, comme nous l'avons deja decrit, dans certaines tumeurs, on trouve deux fractions precipitables : l'une a pH 6,8 et l'autre a pH 5,0.

a) *Les myosines precipitables a pH 6,8.*

La myosine tumorale du Lapin precipite en presence du MgCl_2 -comme la myosine normale- sous forme de filaments bipolaires (Pl.37, Fig b). Neanmoins ces filaments, ayant approximativement la meme epaisseur que les filaments de la myosine normale (15nm), possedent de facon generale une longueur moins importante qui ne depasse pratiquement jamais 0,3 μm .

La myosine tumorale du Rat par contre, précipite en présence de $MgCl_2$ en longs filaments fusiformes ressemblant beaucoup à ceux de la myosine foetale (Pl.37, Fig h). Ils sont de longueur identique et là aussi, la plupart des filaments possèdent une longueur se situant entre 1 et 2 μm . L'épaisseur est parfois un peu plus importante au milieu du filament (environ 33 nm), ce qui lui donne un aspect encore plus allongé. Les filaments synthétiques prennent l'aspect bipolaire uniquement en absence de $MgCl_2$ contrairement à la myosine normale. Maintes fois nous avons observé des filaments monopolaires de myosine tumorale de Rat reprécipitée en absence de $MgCl_2$ (Pl.37, Fig f). (Fig.22b).

b) *La fraction précipitable à pH 5,0.*

Environ 20 % de toutes les tumeurs contiennent, en plus de la myosine précipitable à basse force ionique et à pH 6,8-7,2, une fraction qui ne précipite qu'à pH 5,0 et toujours en longs filaments fusiformes, que la précipitation soit faite en absence ou en présence de $MgCl_2$. Ces filaments sont d'une épaisseur irrégulière chez le Lapin (Pl.37, Fig d) et d'une épaisseur plus régulière et plus importante chez le Rat (Pl.37, Fig i). Ces derniers ne montrent cependant pas la même structure que les filaments de la myosine tumorale précipitable à pH 6,8. D'une épaisseur assez régulière d'environ 40 nm, ces filaments se rétrécissent seulement aux extrémités. Par endroit, une sous-structure fibrillaire est bien évidente, mais de plus nous trouvons des densifications le long du filament, qui se répètent environ tous les 100 nm. Au niveau de ces densifications, la largeur du filament augmente et atteint à peu près 50 nm. Ces filaments montrent donc une autre configuration que les filaments des myosines foetales et tumorales précipitables à pH 6,8.

C. ETUDE DE LA COMPOSITION EN CHAINES LEGERES DES DIFFERENTES MYOSINES.

Pour l'étude de la composition en chaînes légères des différentes myosines, nous avons utilisé l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) soit en présence de SDS, soit en présence d'urée 8 M à pH alcalin.

1. Electrophorèse en présence de SDS.

Au début de nos travaux, nous avons utilisé la technique en tampon Tris-borate, mais nous avons obtenu ensuite une meilleure résolution avec les PAGE en tampon Tris-glycine sur gel de gradient, qui ont beaucoup été utilisées par la suite.

Afin de mieux comprendre la signification des différentes bandes qui apparaissent sur un électrophorégramme, nous avons rassemblé dans le tableau IV les protéines myofibrillaires qui sont révélées lors d'une électrophorèse en présence de SDS.

Tableau IV. Identification des protéines myofibrillaires du muscle squelettique du Lapin par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Greaser *et al.*, 1973; Porzio et Pearson, 1977).

Protéines	Poids moléculaires
Chaînes lourdes de la myosine	200 000
M _α -protéine	195 000
M _β -protéine	180 000
C-protéine	140 000
α-actinine	102 000
β-actinine	70 000
Actine	45 000
Troponine-T	37 000
Tropomyosine	34-36 000
Chaîne légère-1	25 000
Troponine-I	24 000
Troponine-C	20 000
Chaîne légère-2	18 000
Chaîne légère-3	16 000

L'électrophorégramme de la *myosine du muscle blanc squelettique* du Lapin est maintenant classique. Sur le gel (Pl.38, Fig a₁), on distingue en haut la bande très importante des chaînes lourdes. Les trois autres bandes migrant beaucoup plus vite, représentent les *trois chaînes légères* dont les poids moléculaires sont de : 25 000, 18 000 et 16 000 (L₂₅, L₁₈ et L₁₆). La myosine du muscle squelettique normal du Rat montre les mêmes bandes (Pl.38, Fig a₄). En plus, nous observons une deuxième bande importante juste en-dessous des chaînes lourdes. Cette bande est apparue dans toutes les préparations de myosine de Rat (Pl.38, Figs a₄ et c₁). Nous n'avons pas pu l'identifier jusqu'à présent, ni l'isoler au cours de nos préparations.

Les gels de la myosine du Rat nous montrent également une hétérogénéité concernant sa composition en chaînes légères. Cette hétérogénéité a été mise en évidence par Lowey et Risby (1971). Ces auteurs ont démontré que la *myosine du muscle rouge possède des chaînes légères différentes* de celles de la myosine du muscle blanc, et ils ont établi leur poids moléculaire comme étant de 24 000, 18 000 et 15 000 (L₂₄, L₁₈ et L₁₅). L'hétérogénéité de la composition en chaînes légères de la myosine du Rat est donc due au mélange des myosines du muscle rouge et du muscle blanc.

Les *myosines foetales* du Lapin et du Rat (Pl.38, Figs a₃ et a₅) ne montrent nettement que l'existence de *deux chaînes légères* : la L₂₅ et la L₁₈. Néanmoins les foetus que nous avons étudiés étaient à un âge de gestation où la troisième chaîne légère commence déjà à apparaître légèrement. La myosine foétale du Rat montre également l'hétérogénéité de la composition en chaînes légères, particulièrement au niveau de la première chaîne légère, où l'on reconnaît parfaitement la L₂₅ du muscle blanc et la L₂₄ du muscle rouge.

Les *myosines tumorales* enfin ne possèdent que les deux premières chaînes légères, la troisième étant complètement absente (Pl.38, Figs a₂ et a₆). Sur ces deux derniers gels apparaît une autre bande assez importante, celle de l'actine. Malgré l'utilisation d'un relaxant puissant lors de l'extraction et de la purification des myosines tumorales, nos préparations sont généralement contaminées par l'actine.

Nous reconnaissons sur quelques gels (Pl.38, Figs a₄ et a₆) les bandes représentant la tropomyosine (TM) et la troponine-T (TN-T) et pratiquement sur tous les gels la bande de la troponine-C (TN-C). De plus nous observons d'autres petites bandes de différents poids moléculaires (27 000, 22 000 et 11 000) dont nous ne connaissons pas l'identité, mais celle d'un poids moléculaire de 11 000 pourrait éventuellement correspondre à la parvalbumine (Pl.38, Fig a₄).

L'enregistrement densitométrique des gels des myosines du Lapin (Pl.39) nous montre que la chaîne L₂₅ est la plus abondante dans la myosine normale (Pl.39, Fig a) et dans la myosine tumorale (Pl.39, Fig c). Dans la myosine foetale, les chaînes L₂₅ et L₁₈ sont en proportion égale, la L₁₆ n'existant que très faiblement. Chez le Rat (Pl.40), nous constatons que les chaînes L_{25/24} sont prédominantes dans les myosines normale et tumorale (Pl.40, Figs a et c). Dans la myosine foetale par contre, la chaîne L₁₈ est plus importante que la chaîne L_{25/24} (Pl.40, Fig b).

Les enregistrements densitométriques révèlent également l'importance de l'actine contaminant régulièrement les préparations des myosines tumorales (Pl.39, Fig c; Pl.40, Fig c).

En ce qui concerne la myosine tumorale obtenue à partir des leiomyosarcomes, elle ne possède que les deux chaînes légères L₂₅ et L₁₈ comme la myosine foetale et la myosine tumorale des rhabdomyosarcomes du Lapin (Pl.38, Fig b).

Nous avons également analysé la fraction précipitable à pH 5,0 obtenue à partir de certaines tumeurs, et nous avons constaté qu'on retrouve les chaînes lourdes de la myosine, mais on n'observe plus qu'une seule bande au niveau des chaînes légères : celle qui correspond à la chaîne L₁₈ (Pl.38, Fig c).

2. Electrophorèse en présence d'urée à pH alcalin.

L'électrophorégramme des myosines du muscle squelettique du Lapin et du Rat ne montre pas trois bandes pour les chaînes légères, mais quatre (Pl.41, Figs a₁ et b₁). En effet, la chaîne L₁₈ existe sous deux formes différentes dont une est phosphorylée (L₁₈-PO₄).

Cette forme phosphorylée manque dans les myosines foetales (Pl.41, Figs a₂ et b₂) ainsi que dans les myosines tumorales (Pl.41, Figs a₃ et b₃). Dans les fractions précipitables à pH 5,0, elle n'existe que très faiblement chez le Lapin (Pl.41, Fig a₅) et semble être absente chez le Rat (Pl.41, Fig b₄). Cette fraction montre chez le Lapin deux bandes supplémentaires (X) dont nous ignorons encore l'identité (Pl.41, Fig a₅).

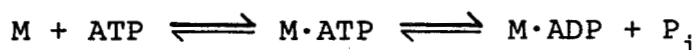
Comme l'a déjà révélé l'électrophorèse en présence de SDS, la chaîne L_{16/15} semble manquer dans les myosines tumorales et n'apparaît dans les myosines foetales que vers la fin de la gestation. De plus, nous observons sur les gels de myosines tumorales une bande plus haute assez importante représentant l'actine.

La myosine tumorale du leiomyosarcome du Lapin (Pl.41, Fig a₄) est identique à celle du rhabdomyosarcome (Pl.41, Fig a₃) du même animal.

D. LES ACTIVITES ATPasiques.

Sachant que le site actif de la myosine est protégé par les chaînes légères sensibles au traitement alcalin, nous avons pensé qu'il était indispensable de mesurer l'activité ATPasique de la myosine tumorale et de la comparer à celle des myosines normales et foetales, et ceci d'autant plus, que nous avons démontré qu'il manque une des chaînes légères sur les myosines foetales et tumorales.

L'activité spécifique qui s'exprime en nmoles de phosphore libéré (P_i) par minute et par mg de myosine, est la mesure de la vitesse de la réaction (hydrolyse de l'ATP) schématisée ci-dessous :



Si on mesure l'activité spécifique en fonction de la concentration du Ca²⁺, on obtient une courbe sigmoïde. La myosine est donc une enzyme allostérique et possède plusieurs sites de fixation du Ca²⁺. A la concentration de 10 mM en CaCl₂, tous les sites sont saturés

et on détermine à partir des mesures de l'activité spécifique la vitesse maximale (V_{\max}) de la réaction enzymatique des différentes myosines.

1. L'activité de la Ca^{2+} ATPase.

En ce qui concerne l'activité spécifique ATPasique de la myosine du muscle blanc du Lapin, nos résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus par Léger *et al.* (1975). Lors de nos expériences, nous avons mesuré par dosage du phosphore inorganique libéré (P_i) au cours de l'hydrolyse de l'ATP une moyenne de 546 ± 48 nmoles P_i /min/mg de myosine (Tableau V), ce qui correspond parfaitement aux résultats des mêmes auteurs qui indiquent 567 ± 150 nmoles P_i /min/mg de myosine. Nous trouvons une légère baisse de l'activité spécifique (510 ± 35 nmoles P_i /min/mg de myosine) pour la myosine foetale (Tableau V).

Pour les myosines du Rat cependant, les valeurs de l'activité spécifique ATPasique sont inversées (Tableau V) : l'activité de la myosine foetale est légèrement plus forte que celle de la myosine normale sans atteindre néanmoins, l'activité mesurée chez la myosine foetale du Lapin.

L'activité la plus importante que nous avons obtenue est celle de la myosine foetale du veau, que nous avons mesurée uniquement à titre comparatif (myosine extraite d'un foetus de veau âgé de 3 mois environ) (Tableau V).

L'activité spécifique ATPasique des myosines tumorales du Lapin et du Rat est très basse (Tableau V), et nous avons dosé 30 ± 10 nmoles P_i /min/mg de myosine chez le Lapin et 60 ± 20 nmoles P_i /min/mg de myosine chez le Rat. La fraction de myosine précipitable à pH 5,0 ne possède aucune activité ATPasique.

L'activité ATPasique propre à la myosine s'accroît en fonction de l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} dans le milieu de réaction. Nous avons donc fait varier les concentrations de Ca^{2+} entre 0,01 mM et 10 mM. La courbe que l'on peut établir lors de cette cinétique possède un plateau inférieur constant jusqu'à une concentration en Ca^{2+} de 0,1 mM, et un plateau supérieur à partir

Tableau V . Activités spécifiques (V_{\max}) de la Ca^{2+} ATPase de différentes myosines. Les valeurs sont exprimées en nmoles P_i /min/mg de myosine.

Myosines	$V_{\max} \text{Ca}^{2+}$
MBL	546 ± 48
MFL	510 ± 35
MTL ↓ pH7	30 ± 10
MTL ↓ pH5	0
MNR	450 ± 60
MFR	470 ± 21
MTR ↓ pH7	60 ± 20
MTR ↓ pH5	0
MFV	660 ± 20
MFH	414 ± 10
MTH	90

MBL : Myosine du muscle blanc du Lapin, MFL : Myosine foetale du Lapin, MTL : Myosine tumorale du Lapin, MNR : Myosine normale du Rat, MFR : Myosine foetale du Rat, MTR : Myosine tumorale du Rat, MFV : Myosine foetale du Veau, MFH : Myosine foetale humaine, MTH : Myosine tumorale humaine.

↓: précipitée à .

d'une concentration en Ca^{2+} de 5 mM, ce dernier représentant l'activité spécifique ATPasique de la myosine. Le plateau inférieur de cette courbe ne peut être abaissé davantage qu'en présence d'EGTA qui complexe les cations bivalents, donc le Ca^{2+} .

Les courbes obtenues lors des mesures de l'activité ATPasique des myosines normale et foetale du Lapin (Fig.23) sont parfaitement parallèles, bien que celle de la myosine foetale soit inférieure à celle de la myosine normale. La courbe de l'activité ATPasique de la myosine tumorale du Lapin par contre, n'est point comparable aux deux autres. Cette myosine ne montre aucune activité à faible concentration en calcium, et les plus fortes concentrations augmentent beaucoup moins son activité ATPasique que celle des myosines normale et foetale (Fig. 23).

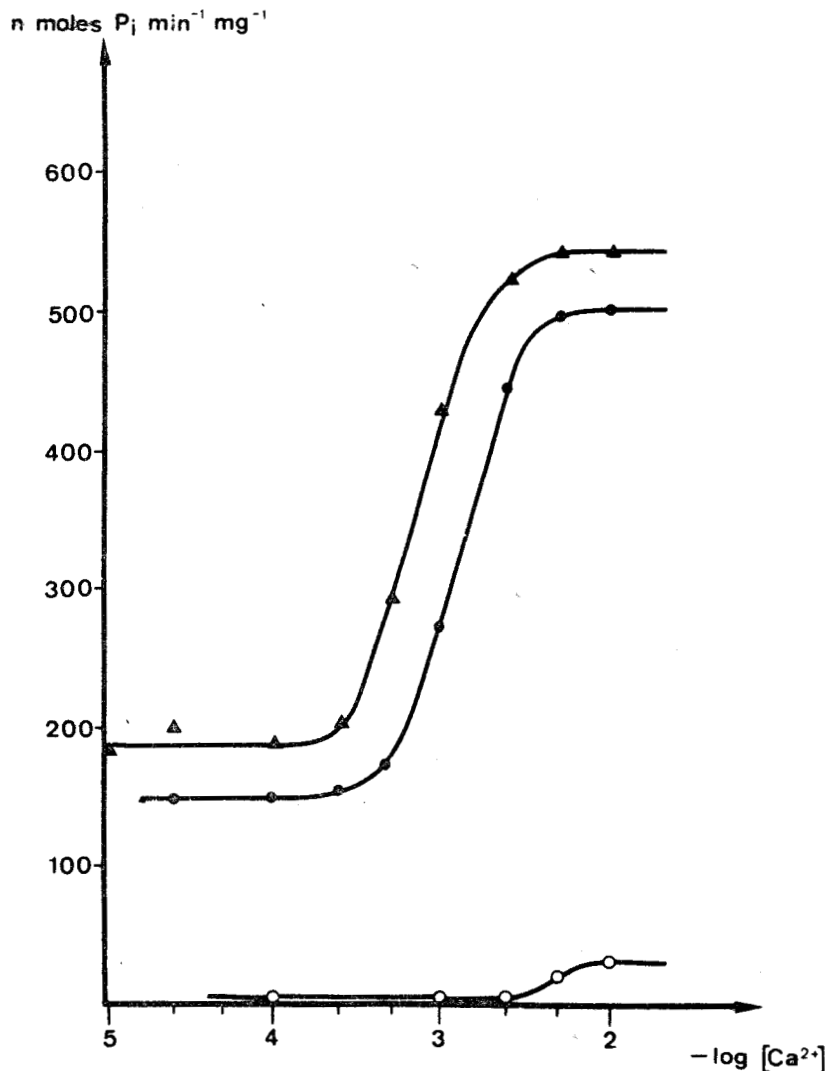


Fig.23 . L'activité ATPasique des différentes myosines du *Lapin* en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de réaction. —▲— myosine du muscle blanc normal; —●— myosine du muscle foetal; —○— myosine du muscle tumoral.

Nous avons obtenu des résultats pratiquement identiques lors de nos mesures de la Ca^{2+} ATPase des myosines du Rat (Fig.24), mis à part le fait que la myosine foetale est plus active que la myosine normale. L'activité de la myosine tumorale n'est pratiquement pas augmentée dans les mêmes conditions.

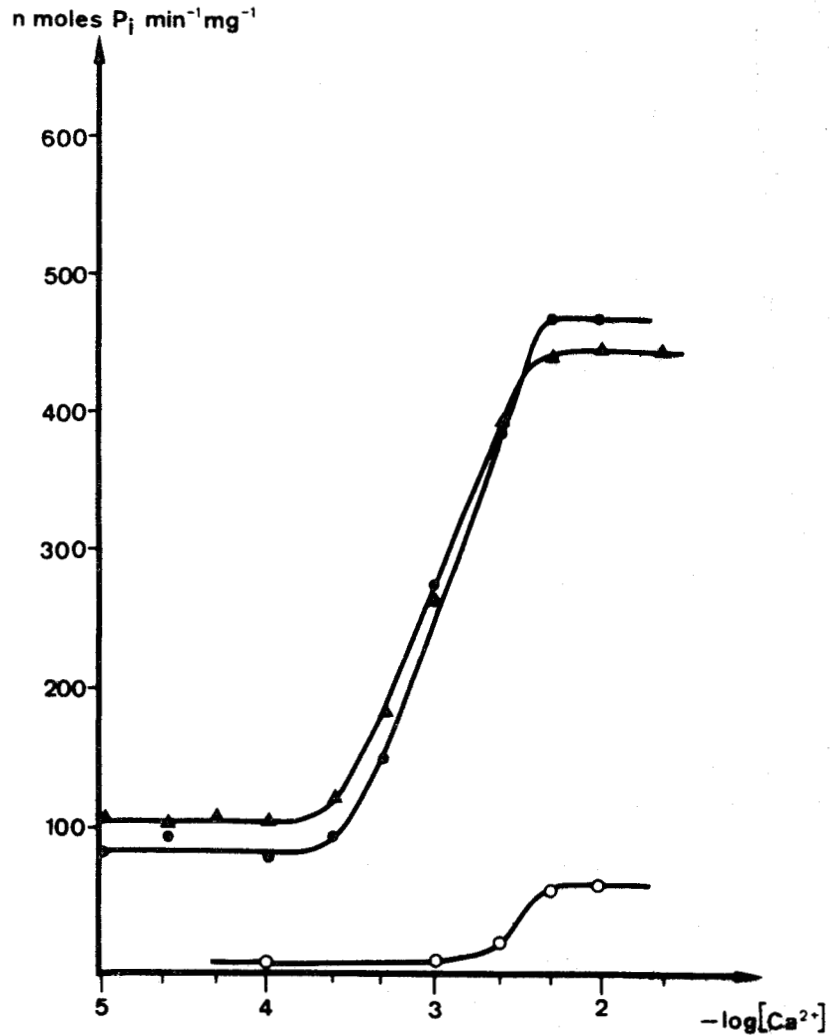


Fig.24 . L'activité ATPasique des différentes myosines du Rat en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de réaction. —▲— myosine du muscle normal; —●— myosine du muscle foetal; —○— myosine du muscle tumoral.

A titre de comparaison, nous avons rassemblé les courbes de l'activité ATPasique des myosines normales et foetales du Lapin et du Rat sur une même figure, et nous avons constaté une décroissance de l'activité de la Ca^{2+} ATPase des quatres myosines dans l'ordre suivant : myosine normale du muscle blanc du Lapin, myosine foetale du Lapin, myosine foetale du Rat, myosine normale du Rat (Fig. 25).

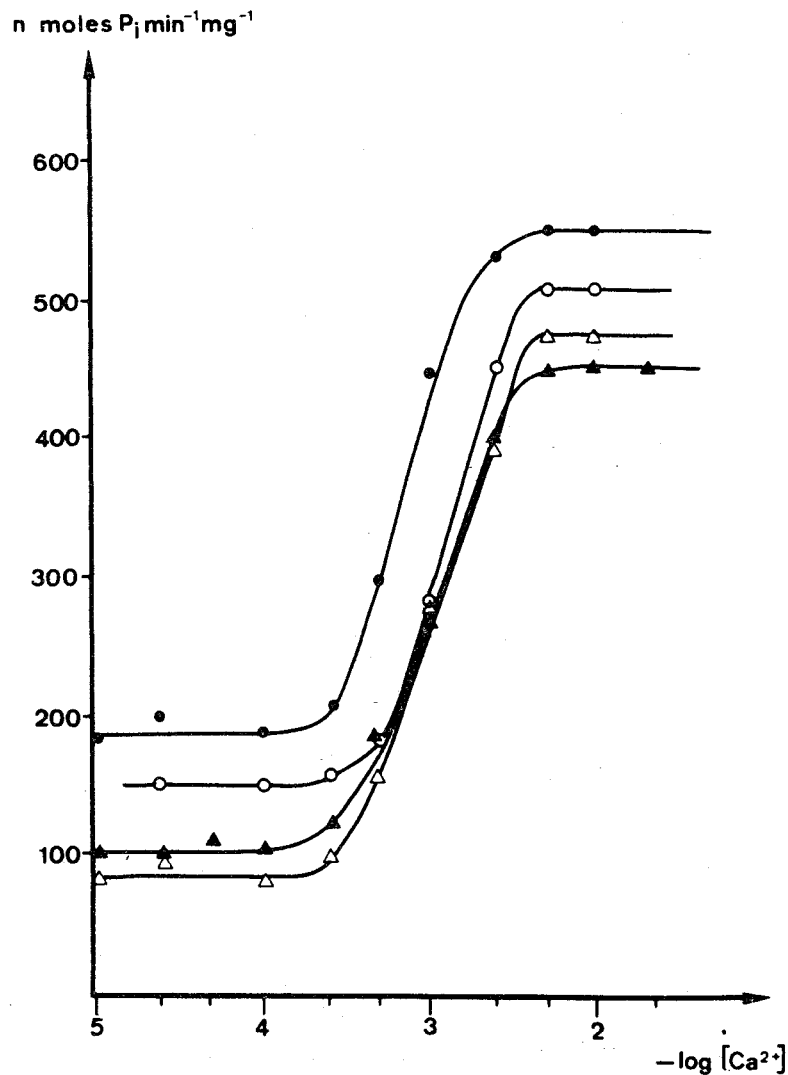


Fig. 25 . Comparaison de l'activité ATPasique des myosines normales et foetales du Rat et du Lapin en fonction de la concentration en calcium dans le milieu de réaction. —●— myosine du muscle blanc normal du Lapin; —○— myosine du muscle foetal du Lapin; —▲— myosine du muscle normal du Rat; —△— myosine du muscle foetal du Rat.

Etant donné la faible augmentation de l'activité des myosines tumorales du Rat et du Lapin en fonction de la concentration en CaCl_2 , la différence révélée lors de nos mesures ne nous semble pas être significative.

Cependant, nous devons ajouter que les valeurs de l'activité spécifique des myosines tumorales sont des valeurs approximatives étant donné que ces myosines sont toujours contaminées par l'actine. Mais les mesures planimétriques à partir des enregistrements densitométriques des gels révèlent que la contamination par l'actine n'excède pas 5 % par rapport à la myosine totale. Les chaînes légères représentent environ 12 % (Dreizen et Richards, 1973). La faible présence d'actine peut néanmoins intervenir en ce qui concerne la détermination de la concentration en myosine, et les valeurs de l'activité spécifique des myosines tumorales sont donc environ 5 % trop basses.

2. L'activité de la Mg^{2+} ATPase.

L'activité de la Mg^{2+} ATPase est une activité propre à l'actomyosine bien qu'elle soit située sur la myosine même. Lorsqu'une myosine est pure, cette activité est très basse. Les valeurs que nous avons trouvées se situent entre 20 et 40 nmoles P_i /min/mg de protéines. Elles montrent que les préparations des myosines contiennent très peu d'actine, car en présence d'actine, à proportion égale, l'activité est environ vingt fois plus élevée. Ceci est le cas pour l'actomyosine. Nos mesures révèlent que *toutes les myosines* (sauf les fractions précipitables à pH 5,0) possèdent l'activité ATPasique dépendante du Mg^{2+} .

L'activité de la Mg^{2+} ATPase augmente lorsqu'on ajoute de l'actine dans le milieu d'incubation. Nous avons effectué ces expériences et nous avons constaté que la myosine est activée 10 à 20 fois en présence d'actine. Seules les fractions précipitables à pH 5,0 ne possédant pas d'activité de la Mg^{2+} ATPase en absence d'actine, ne sont pas activées lorsqu'on ajoute de l'actine.

Ces résultats sont cependant assez hétérogènes parce que les mesures de la Mg^{2+} ATPase sont faites à basse force ionique et que (dans ces conditions) la myosine précipite en formant souvent des agrégats. Tous les sites actifs ne sont donc pas libres. Pour des mesures plus correctes, il faudrait les effectuer non pas sur les molécules entières de la myosine mais plutôt sur leurs sous-fragments HMM ou HMM-S₁, qui ne s'agrègent pas à basse force ionique. Mais étant donné les très faibles rendements en myosines tumorales et foetales nous n'avons pas encore pu entreprendre ces expériences de l'activation de la Mg^{2+} ATPase par l'actine avec des sous-fragments HMM ou HMM-S₁.

E. DISCUSSION.

Après l'étude morphologique détaillée en microscopie électronique, nous avons entrepris l'étude biochimique des différentes myosines. Alors que nous avons pu utiliser les techniques classiques pour extraire les myosines normales du Rat et du Lapin (Perry, 1955), nous avons rencontré, dès le départ, des difficultés concernant l'extraction et l'isolement des myosines foetales et en particulier des myosines tumorales. Ces techniques classiques n'ont donné que des rendements extrêmement faibles et nous avons dû prolonger considérablement le temps d'extraction afin de faciliter la libération des protéines myofibrillaires. Bien que cette prolongation du temps d'extraction soit suffisante pour extraire quantitativement l'actomyosine foetale, elle n'a apporté que peu de changements en ce qui concerne le rendement de l'actomyosine tumorale. Une première amélioration de l'extraction de l'actomyosine tumorale a été enregistrée en augmentant la force ionique ($I=0,6$ au lieu de $I=0,3$), mais le meilleur rendement a été incontestablement obtenu en utilisant un relaxant puissant à forte concentration, tel que le $K_4P_2O_7$ à 40 mM.

Les difficultés que nous avons rencontrées lors de l'extraction de la myosine tumorale sont probablement en rapport avec l'état de supercontraction du sarcomère de la tumeur musculaire. En effet, à très faibles concentrations en ATP et en Ca^{2+} , la myosine forme avec l'actine un complexe actomyosine qui ne peut être extrait du muscle qu'en utilisant une force ionique élevée (Swynghedauw et Bouveret, 1970; Shiverick *et al.*, 1975). Dans les sarcomères supercontractés de la tumeur, nous retrouvons donc le complexe actomyosine. Nous n'avons pas pu mettre en évidence le manque d'ATP, mais les précipités amorphes ou sous forme de microcristaux dans le réticulum sarcoplasmique, nous indiquent que le Ca^{2+} est probablement complexé et ne peut plus intervenir dans le mécanisme de la contraction ou de la relaxation, car dès que le Ca^{2+} est à une concentration plus élevée que l'ATP, il inhibe la formation du complexe actomyosine et, *in vitro*, il empêche sa superprécipitation (Swynghedauw et Bouveret, 1970).

Dans la tumeur, la formation du complexe actomyosine semble être irréversible, et il n'y a que la présence d'un relaxant qui permette de l'extraire avec un rendement satisfaisant. Mais ce

relaxant ne doit pas seulement agir sur le complexe actomyosine mais aussi sur le complexe régulateur au niveau du filament fin, donc sur la troponine et la tropomyosine.

Les filaments synthétiques de myosine du muscle squelettique ressemblent beaucoup aux filaments épais natifs (Huxley, 1963; Sanger, 1971; Pollard, 1975). Néanmoins les filaments reprécipités sont très variables en ce qui concerne leur longueur. La longueur moyenne peut être différente d'une préparation de myosine à l'autre, mais se situe en général entre 0,8 et 1,5 μm (Pollard, 1975). Il est fort possible que la variation de la longueur des "filaments synthétiques" des différentes préparations de myosine est due aux différences de quantité de la C-protéine susceptible de contaminer la myosine (Offer et Moos, 1973), mais une étude systématique n'a jamais été entreprise pour confirmer l'action de la C-protéine sur la formation des filaments synthétiques.

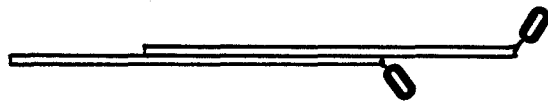
Sanger (1971) par contre, démontre que la longueur des filaments dépend de divers facteurs intervenant au cours de la précipitation, tels que le pH, la force ionique, la présence de différents cations (K^+ , Na^+ , NH_4^+), la constante diélectrique et finalement les méthodes de préparation et surtout de précipitation. Ainsi on obtient des filaments beaucoup plus longs en diminuant la force ionique par dialyse que par dilution rapide.

C'est finalement Wachsberger et Pepe (1974), qui montrent que des cations bivalents (Mg^{2+} , Ca^{2+}) induisent d'une part, une meilleure formation des filaments synthétiques sous forme bipolaire, et déterminent d'autre part, leur longueur. C'est pour cette raison que nous nous sommes inspirés des travaux de ces auteurs au cours de nos études ultrastructurales sur les filaments synthétiques des myosines normales, foetales et tumorales du Rat et du Lapin. Ceci nous a également permis de nous placer toujours dans des conditions identiques pour la précipitation de toutes les myosines étudiées.

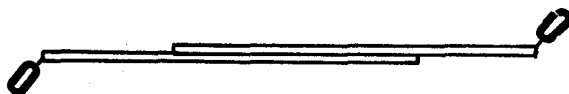
Les exigences pour la formation des filaments synthétiques sont différentes suivant l'origine des myosines. Par exemple, la myosine extraite à partir du Myxomycète *Physarum*, ne forme des filaments bipolaires qu'en présence de cations bivalents (Nachmias, 1973); la myosine de l'utérus forme des filaments bipolaires courts (0,4

à 0,6 μm) en l'absence de cations bivalents, mais la présence de MgCl_2 (5 à 10 mM) est nécessaire pour obtenir des filaments plus longs (0,6 à 1,2 μm) qui montrent souvent l'aspect d'une association longitudinale de filaments bipolaires très courts (0,2 μm) (Wachsberger et Pepe, 1974). La myosine du muscle squelettique par contre, n'exige pas la présence de cations bivalents pour former des filaments bipolaires courts ou des filaments fusiformes longs; c'est surtout l'abaissement de la force ionique par dilution rapide à pH 6,8 qui fait précipiter cette myosine sous forme de filaments bipolaires d'une longueur homogène (0,5 à 0,6 μm) (Huxley, 1963; Sanger, 1971; Morimoto et Harrington, 1973; Wachsberger et Pepe, 1974) qui, d'ailleurs, est beaucoup moins importante que la longueur du filament natif (1,6 μm).

D'où viennent donc ces différences de longueur et comment s'associent les molécules de myosine pour former les filaments? La C-protéine n'en est certainement pas responsable, car elle détermine la distance longitudinale entre les molécules de myosine (Offer et Moos, 1973). Comme les filaments se forment également en absence de la C-protéine (Offer *et al.*, 1973) il faut donc chercher une autre explication. Pour cela, nous devons prendre en considération le fait que deux molécules de myosine peuvent s'associer de deux façons différentes, les sites d'interaction se trouvant sur la LMM (Pepe, 1967; Harrington *et al.*, 1972) : l'association parallèle ou tête-queue ("head-to-tail")



ou l'association anti-parallèle ou queue-queue ("tail-to-tail").



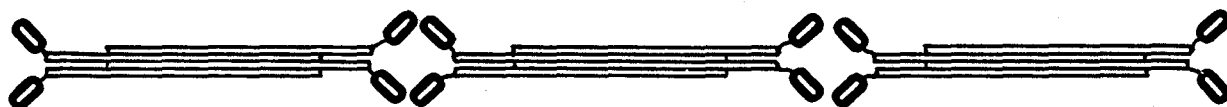
La formation et la détermination de la longueur des filaments *in vitro* est donc le résultat d'une compétition des sites d'interaction (Pepe, 1967; Harrington *et al.*, 1973).

L'interaction initiale entre deux molécules de myosine est, tout au moins pour la myosine de muscle squelettique, l'association queue-queue. La position opposée des têtes globulaires de la myosine impose ensuite l'association tête-queue des autres molécules de myosine afin que le filament puisse se former. Lors d'une diminution lente de la force ionique par dialyse, les stades initiaux se forment pendant toute la durée de la dialyse. Dès que les molécules libres de myosine dans la solution sont épuisées, aucune croissance des filaments ne peut plus avoir lieu. C'est donc à partir de l'apparition des premières associations queue-queue que sont formés les filaments les plus longs. Lorsqu'on diminue la force ionique, par dilution rapide par exemple, beaucoup d'associations queue-queue se forment et les filaments ne sont pas seulement plus courts, mais aussi plus homogènes dans leur longueur.

In vivo, les conditions ne sont pas les mêmes. D'abord, au cours de la différenciation musculaire, l'épuisement des molécules libres de myosine n'existe pas, car la cellule les synthétise au fur et à mesure de la croissance cellulaire (dans le muscle lisse) ou de la fusion des myoblastes (dans le muscle squelettique). De plus, on ne connaît pas encore exactement la concentration des cations bivalents libres dans le cytoplasme de la cellule musculaire, et on doit supposer que les cations bivalents jouent un rôle dans l'assemblage des molécules de myosine et éventuellement dans la détermination de la longueur des filaments. Le rôle des protéines du filament fin dans la croissance des filaments épais est encore moins connu dans l'état actuel des recherches sur les protéines myofibrillaires.

Il semble que les cations bivalents induisent rapidement, tout au moins *in vitro*, l'association queue-queue des molécules. Ceci fait apparaître des filaments bipolaires courts de la myosine des Myxomycètes (Nachmias, 1973) et l'association longitudinale de filaments bipolaires très courts de la myosine utérine (Wachsberger et Pepe, 1974).

Nous avons observé une structure semblable dans les filaments synthétiques de la fraction de myosine précipitable à pH 5,0. On peut penser qu'il existe une perturbation de la compétition des sites d'interaction et, dans ces conditions, nous trouvons sur les filaments, en même temps que l'association queue-queue, une *troisième association* de molécules que nous dénommons association *tête-tête*.



En ce qui concerne les filaments longs des myosines foetales et tumorales, les cations bivalents (Mg^{2+}) ne semblent avoir aucun effet sur l'association des molécules, et nous n'obtenons en leur présence que des filaments fusiformes longs. Il s'agit donc probablement de filaments compacts (Pollard, 1975) constitués de myosine à bas niveau énergétique ($M \cdot ADP \cdot P_i$).

Les filaments synthétiques monopolaires sont un cas particulier où l'association queue-queue ne semble pas avoir lieu. Le site d'interaction myosine-myosine sur la LMM doit donc être modifié lors de la synthèse de la molécule.

Alors que nous avons constaté une première ressemblance entre les myosines foetales et tumorales au niveau de l'ultrastructure du filament synthétique, nous en trouvons une deuxième, à notre avis plus importante, au niveau des chaînes légères de la molécule même. Ces deux myosines possèdent les mêmes chaînes légères, celles de 25 000 et de 18 000 de poids moléculaire. L'absence de la troisième chaîne légère (P.M. : 16 000) dans la myosine foetale est connue depuis quelques années (Dow et Stracher, 1971; Rourke, 1975), mais personne n'a jusqu'à présent étudié la myosine tumorale. La ressemblance entre les deux myosines ne concerne pas seulement les poids moléculaires de leurs chaînes légères : nous avons constaté que la forme phosphorylée de la L_{18} ne semble exister ni sur la myosine foetale, ni sur la myosine tumorale.

Cette forme phosphorylée de la L_{18} active *in vivo* la myosine squelettique et augmente donc son activité ATPasique (Perry, 1977), mais n'a aucun effet sur l'activité ATPasique *in vitro*. Si elle manque dans les myosines foetales et tumorales, il doit donc exister dans ces cas un autre système régulateur.

La fraction précipitable à pH 5,0 obtenue à partir des préparations de myosine de certaines tumeurs musculaires ne possède que la L_{18} qui semble exister sous ses deux formes, phosphorylée et non phosphorylée. On peut penser à une myosine dégradée lors de son extraction et purification ou au cours de la croissance tumorale, néanmoins Pinset et Morel (Proc. IX FEBS Meeting, Budapest, 1974; Journées du Muscle, Montpellier, 1976) ont démontré que la myosine perd - lors de sa dégradation - en premier sa chaîne légère L_{18} . Cette fraction qui forme des filaments synthétiques et possède les chaînes lourdes et une chaîne légère de la myosine, peut donc être considérée comme une myosine pathologique. Mais comme il lui manque les deux chaînes légères L_{25} et L_{16} , il nous semble logique que cette myosine ne possède aucune activité ATPasique, puisqu'il est bien connu que ce sont ces deux chaînes légères qui protègent les sites actifs de l'ATPase situés sur le sous-fragment HMM- S_1 de la myosine.

Donc nous devons nous intéresser davantage à l'activité ATPasique des autres myosines. Nous avons observé que l'activité ATPasique de la myosine foetale du Lapin est légèrement inférieure à celle du même muscle adulte, et que chez le Rat, les activités sont inversées. Ces observations ont déjà été faites par d'autres auteurs (Léger *et al.*, 1975). D'après Dow et Stracher (1971) cette baisse de l'activité ATPasique de la myosine du muscle blanc embryonnaire serait due à la très grande sensibilité de la myosine embryonnaire à l'oxydation de ses groupements -SH. Cette hypothèse ne peut cependant pas être adaptée aux myosines des muscles rouges foetaux et adultes. Il faut donc chercher l'origine ailleurs.

En effet, des études histochimiques ont montré qu'il existe différents types de fibres musculaires (Yellin et Guth, 1970) qui se distinguent par le taux de leur activité ATPasique (Guth et Samaha, 1969) : les fibres possédant une activité ATPasique élevée prédominent dans le muscle blanc, les fibres avec une activité

ATPasique plus faible se trouvent essentiellement dans le muscle rouge. En plus, ces mêmes auteurs ont démontré que l'activité ATPasique des fibres du muscle blanc est stable à pH alcalin (fibres du type A) et celle des fibres du muscle rouge est stable à pH acide (fibres du type B). La différence des activités ATPasiques des fibres du muscle blanc et celles du muscle rouge explique donc les différences trouvées chez les myosines du Lapin et du Rat.

En ce qui concerne les myosines foetales, Mme E. Farkas (communication personnelle) a démontré que chez le muscle foetal humain il n'existe pas encore de différenciation qui permette de distinguer les fibres musculaires du type A des fibres du type B. On observe par contre des fibres musculaires d'un type intermédiaire, et les différences entre le type A et le type B n'apparaissent qu'à la fin du développement foetal.

La myosine du muscle blanc possède une activité ATPasique plus élevée que la myosine du muscle rouge (Léger *et al.*, 1975). Les myosines foetales représentent alors un autre type de myosine avec une activité enzymatique intermédiaire, due au fait que la myosine embryonnaire n'est pas encore complètement différenciée. Néanmoins, l'évolution que vont prendre les myosines foetales est déjà mise en évidence par la différence de leur activité ATPasique. C'est ainsi que l'activité spécifique ATPasique de la myosine foetale du muscle blanc du Lapin est légèrement plus élevée que celle de la myosine foetale du muscle rouge du Rat.

L'état incomplet de la différenciation des myosines foetales est également démontré par l'absence de la forme phosphorylée de la chaîne légère L_{18} et par l'absence de la chaîne légère L_{16} .

Néanmoins, il ne faut pas considérer que l'absence de la chaîne L_{16} découvre les sites actifs de la myosine, car cette chaîne légère est probablement remplacée sur la myosine foetale par la chaîne L_{25} . Ceci est d'autant plus vraisemblable que l'on sait que ces deux chaînes légères (L_{25} et L_{16}) ont des motifs antigéniques communs, et la différence de poids moléculaire peut s'expliquer par l'existence d'une séquence polypeptidique supplémentaire sur la chaîne L_{25} (Horvath et Gaetjens, 1972).

C'est donc là que repose certainement une des raisons de la faible activité ATPasique de la myosine tumorale. Il est fort possible que la synthèse de la myosine tumorale soit perturbée et qu'il ne manque pas seulement une chaîne légère, mais que les sites actifs de la HMM-S₁ tumorale soient découverts, contrairement aux sites actifs de la myosine foetale.

Il faut donc admettre que cette anomalie de la protéine n'est pas due à une dégradation puisque l'anomalie s'observe chez les myosines de toutes les tumeurs musculaires. Une explication de cette baisse de l'activité spécifique d'un enzyme purifié peut être l'existence d'une anomalie de la structure primaire. L'un des éléments les plus labiles, probablement responsable des différences existant entre les activités ATPasiques des myosines de muscles lent et rapide, est constitué par les chaînes légères. Il est séduisant d'envisager une transformation de ces chaînes aboutissant à la formation d'un nouvel *isoenzyme* possédant une activité ATPasique anormalement basse. Deux exemples en ont déjà été fournis : la dystrophie musculaire obtenue par carence en vitamine E chez le Lapin provoque une baisse de l'activité ATPasique et du taux de 3-méthyl-histidine de la myosine avec apparition dans un muscle rapide de chaînes légères de type muscle lent (Lobley *et al.*, 1971). De même, après stimulation électrique prolongée d'un muscle squelettique rapide, l'activité ATPasique de la myosine baisse et il apparaît des chaînes légères de type muscle lent (Streter *et al.*, 1973).

Enfin, nous pouvons aussi envisager une autre explication qui serait l'existence d'un inhibiteur fortement associé à la myosine, mais nous n'avons pas encore eu l'occasion de vérifier cette hypothèse.

En ce qui concerne la myosine précipitable à pH 5,0, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que cette protéine pathologique possède un caractère "anormal" de structuration.

VI. ETUDES DES ACTINES NORMALES ET TUMORALES DU RAT.

A. EXTRACTION ET PURIFICATION.

Deux méthodes différentes ont été employées pour extraire les actines normale et tumorale du Rat à partir de leurs "poudres" acétoniques. Par la première méthode qui utilise l'eau distillée, on extrait l'actine d'une façon très lente et douce; la deuxième méthode -à force ionique élevée- par contre, est plus rapide (10 min au lieu d'une heure). Par ces deux procédés on obtient de l'actine sous sa forme globulaire (G-actine), mais on n'extrait pas les mêmes protéines contractiles et cytoplasmiques contaminant toujours le premier extrait brut. On peut ainsi plus facilement identifier les autres protéines du filament fin. En ce qui concerne l'extraction et la purification, la seule différence entre l'actine normale et l'actine tumorale repose sur le rendement d'extraction. C'est ainsi que nous obtenons *dix fois moins d'actine tumorale* à partir d'une même quantité de "poudre" acétonique.

B. ETUDES PHYSICOCHEMIQUES.

1. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Les différentes extractions brutes des actines normale et tumorale du Rat, ainsi que les mêmes actines purifiées ont été analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

a) *L'actine.*

Les électrophorégrammes révèlent que toutes les préparations obtenues soit après extraction par l'eau distillée (Pl.42, Figs a à c), soit après extraction à force ionique élevée (Pl.42, Figs d à f), contiennent de l'actine. Il n'existe aucune différence de poids moléculaire entre l'actine normale et l'actine tumorale

purifiées après un cycle de dépolymérisation-repolymérisation (Pl.42, Figs g et h).

b) *Les autres protéines du filament fin.*

Malgré les très nombreux travaux sur les protéines du filament fin comme la tropomyosine et la troponine, les auteurs ne sont pas encore d'accord en ce qui concerne leur poids moléculaire, en particulier celui de la TN-C. C'est ainsi que certains auteurs indiquent pour la TN-C un poids moléculaire de 18 000 et d'autres de 20 000, suivant le système d'électrophorèse utilisé. Nous nous référons ici au poids moléculaire indiqué par Greaser *et al.*, (1973) (P.M. 20 000 pour la TN-C) qui ne le déterminent pas uniquement par électrophorèse en présence de SDS, mais aussi à partir de la composition en acides aminés et de leur coefficient de sédimentation. Pour les autres protéines, tous les auteurs indiquent les mêmes poids moléculaires (Tableau IV).

Après extraction brute de l'actine normale du Rat à l'eau distillée, l'électrophorégramme (Pl.42, Fig a) révèle que cette préparation est contaminée par d'autres protéines du filament fin : tropomyosine et les trois facteurs de la troponine. En plus nous retrouvons d'autres protéines de différents poids moléculaires (30 000, 28 000, 17 000 et 15 500), dont nous ne connaissons pas l'identité, et des protéines de poids moléculaires plus élevés (55 000, 70 000 et 100 000) qui correspondent probablement à la tubuline, la β -actinine et l' α -actinine respectivement.

Les extraits bruts de deux différentes tumeurs (Pl.42, Figs b et c) par contre, ne montrent que les protéines de poids moléculaires plus élevés et trois bandes correspondant à des protéines de faible poids moléculaire : 16 000, 15 500 et 14 000.

Les mêmes échantillons ont été ensuite soumis à une deuxième extraction à force ionique élevée : dans ces conditions, nous constatons que les électrophorégrammes de ces extraits montrent pratiquement les mêmes bandes (Pl.42, Fig d à f). Néanmoins il manque sur ces gels la tropomyosine et deux facteurs de la troponine : TN-T et TN-I.

Tableau VI. Présence et identification des protéines extraites à partir des "poudres" acétoniques et révélées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (I : force ionique, N : actine normale, T : actine tumorale).

Poids moléculaires	Protéines	1ère extraction (H ₂ O)		2ème extraction (I=0,6)		1ère extraction (I=0,6) N (Lapin)
		N	T	N	T	
100 000	α-actinine	+	+	+	+	-
70 000	β-actinine	+	-	+	+	-
55 000	tubuline	+	±	+	+	-
45 000	actine	+	+	+	+	+
37 000	TN-T	+	-	-	-	+
34 000	Tropomyosine	+	-	-	-	+
30 000	?	+	-	±	±	-
28 000	?	+	+	+	±	-
24 000	TN-I	+	-	-	-	-
21 500) 21 000)	TN-C	+	-	+	+	-
18 000	?	+	-	+	+	-
16 000	?	-	+	+	+	-
15 500	?	+	+	-	-	-
14 000	TN-fragment	-	+	+	+	-

Si l'on fait directement l'extraction à force ionique élevée sans extraction préalable à l'eau distillée, la tropomyosine et la TN-T contaminent l'actine (Pl.42, Fig i), expérience faite sur une "poudre acétonique" de l'actine normale du Lapin. Après un cycle de dépolymérisation-repolymérisation, cette actine est "pratiquement pure" (Pl.42, Fig k).

Le tableau VI résume les protéines qui sont révélées lors des électrophorèses en présence de SDS des différentes extractions des actines normales et tumorales. L'absence ou la présence des différentes protéines est indiquée par les signes négatif (-) ou positif (+) respectivement. On constate que la tropomyosine, la TN-T et la TN-I sont absentes dans les extractions d'actine à partir des deux tumeurs. Comme nous avons extrait l'actomyosine à force ionique élevée ($I=0,6$) avant de préparer la poudre acétonique, l'absence de ces protéines ne doit pas nous surprendre. Nous rappelons que la tropomyosine et la TN-T ont été observées sur les électrophorèses en présence de SDS des myosines tumorales. Il n'y a que la TN-I que nous n'avons jamais identifiée, ni sur les gels des myosines tumorales, ni sur les gels de l'actine des deux tumeurs.

2. Etudes physicochimiques par dichroïsme circulaire.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS nous a montré que l'actine normale et l'actine tumorale semblent être identiques. Afin de vérifier l'identité des deux actines, nous avons entrepris des études par dichroïsme circulaire sur les deux actines purifiées.

La F-actine normale purifiée du Rat montre un spectre dichroïque avec des bandes situées à 220-221 nm et à 208-209 nm (Fig. 26). La proportion dans la molécule en hélice α est estimée à 31 %.

D'après les études dichroïques, la F-actine tumorale purifiée ne semble pas présenter de structure en hélice α . On peut supposer que l'actine tumorale ne polymérise pas de la même façon que l'actine normale. Afin de vérifier ces résultats nous avons examiné les mêmes préparations des deux actines en microscopie électronique.

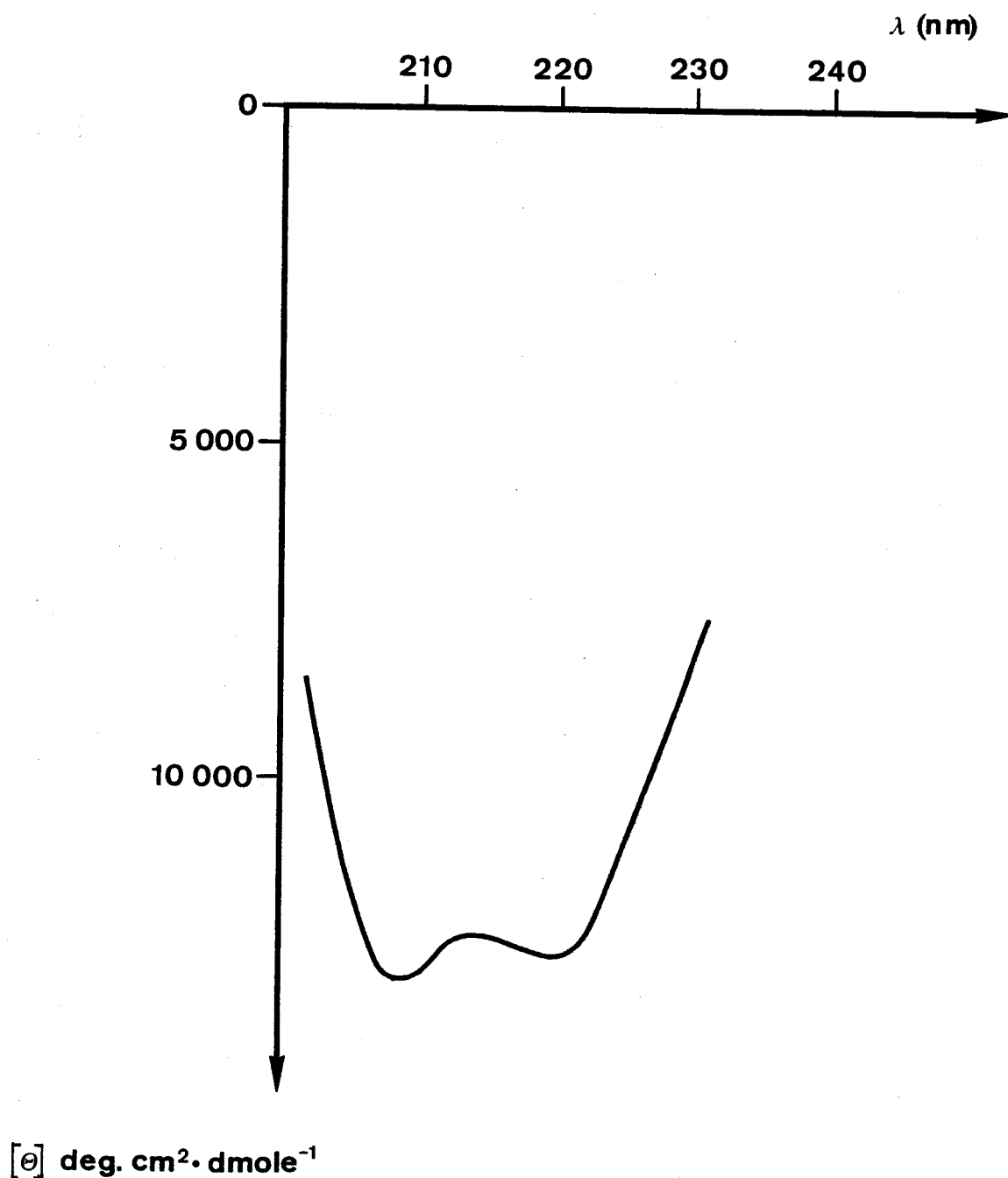


Fig.26. Spectre dichroïque de la F-actine du muscle blanc du Lapin après un cycle de dépolymérisation-repolymérisation. La F-actine est dans une solution de KCl 100 mM, Tris-HCl 5 mM, ATP 0,1 mM, pH 7,5. Des concentrations de 0,2 à 0,8 mg/ml ont été utilisées.

C. ASPECT ULTRASTRUCTURAL DES FILAMENTS D'ACTINE.

1. Les actines purifiées.

La F-actine normale purifiée est examinée en microscopie électronique par la technique du contraste négatif. Elle se présente sous forme de longs filaments fins lisses d'une épaisseur très régulière de 7 nm, mais sans aucune longueur moyenne précise. Sur toute la longueur du filament, on reconnaît sa sous-structure globulaire (Pl.43, Fig a) représentant les molécules de la G-actine.

En ce qui concerne l'actine tumorale purifiée, on observe aussi des filaments, mais ils n'ont pas le même aspect que ceux de l'actine normale (Pl.43, Fig b). Tout d'abord ils sont enchevêtrés et n'ont aucune épaisseur précise. De plus, on ne reconnaît plus du tout la sous-structure globulaire des filaments de l'actine normale. L'actine tumorale ne polymérise donc pas réellement, mais elle s'agrège plutôt sous forme de "pseudo-filaments".

2. Comportement des actines en présence de HMM.

Si l'on met l'actine normale en présence de la HMM, ces deux protéines interagissent et on obtient des filaments "chevronnés" (arrow-head structured filaments) (Pl.44, Fig a) qui sont tout à fait identiques à ceux décrits classiquement, en particulier par Moore *et al.* (1970) et Spudich *et al.* (1972). Les chevrons représentent la HMM et ils sont toujours dirigés dans le même sens sur un même filament. Donc le filament d'actine possède une polarité bien précise déterminée par sa structure hélicoïdale (Voir Fig.10).

Si l'on met l'actine tumorale en présence de la HMM, ces deux protéines interagissent également, mais on n'obtient pas de "filaments chevronnés" (Pl.44, Fig b). On constate que les agrégats d'actine sont reliés entre eux par de courts filaments. De plus les agrégats d'actine sont plus épais que les "pseudo-filaments" en absence de HMM. Nous supposons que les molécules de HMM se sont intégrées dans les agrégats d'actine, ce qui provoque l'enchevêtrement de l'acto-HMM, sans que nous reconnaissions la structure chevronnée de l'acto-HMM normale.

D. DISCUSSION.

Les études biochimiques et physicochimiques des actines normale et tumorale du Rat révèlent certaines différences entre ces deux actines. Bien que les deux actines puissent être extraites de la même façon et qu'elles aient le même poids moléculaire, elles montrent des différences fondamentales dans leur comportement.

Le fait que l'actine tumorale soit extraite avec un plus faible rendement que l'actine normale ne semble pas être dû, *à priori*, à une différence entre ces deux actines. Il faut se rendre compte que les "poudres" acétoniques sont préparées à partir d'un broyat de muscle ou de tumeur après extraction de la myosine, et que justement la myosine tumorale n'est pas extraite de la même façon que la myosine normale, voir différences de force ionique et de concentration du relaxant. Donc, au cours de l'extraction de la myosine tumorale, on extrait également une grande partie de l'actine.

De plus, le broyat du muscle normal ne contient pratiquement que des cellules musculaires différenciées avec essentiellement des protéines myofibrillaires. Ceci n'est pas le cas pour le broyat de tumeur qui contient à côté des myofibrilles tumorales différenciées, une grande quantité de myoblastes non différenciés (ou en cours de différenciation). La quantité de protéines myofibrillaires contenues dans les cellules est donc dès le départ beaucoup plus faible dans la tumeur que dans le muscle adulte normal.

Des différences fondamentales par contre, sont observées au niveau de la polymérisation des actines. L'actine normale polymérise facilement et forme des filaments fins très réguliers même en absence de la tropomyosine et de la troponine. Il existe donc un ou plusieurs facteurs déterminant la polymérisation de la G-actine en F-actine d'une part, et la longueur du filament d'autre part. Depuis quelques années, on a considéré la β -actinine comme étant ce facteur (Maruyama, 1966), mais depuis nous avons démontré que la G-actine polymérise parfaitement après purification très poussée. Après plusieurs cycles de dépolymérisation-repolymérisation, la β -actinine est complètement éliminée des préparations de l'actine. Pourtant, la G-actine polymérise toujours en F-actine avec une longueur très

homogène des filaments. Ceci est particulièrement le cas pour l'actine extraite à partir du muscle frais.

Dans l'état actuel des études sur l'actine, on ne connaît donc pas encore le ou les facteurs intervenant lors de la polymérisation de l'actine et déterminant la longueur du filament. Néanmoins nous pouvons supposer qu'il en existe dans la cellule *in vivo*, et que ces facteurs interviennent lorsqu'on extrait l'actine à partir du muscle frais. L'homogénéité de la longueur des filaments est détruite dans une préparation d'actine extraite d'une "poudre" acétonique. Le traitement à l'acétone du broyat musculaire doit donc éliminer le ou les facteurs déterminant la longueur des filaments d'actine.

En ce qui concerne l'actine tumorale, il ne doit pas seulement manquer un facteur régulateur de la longueur du filament, mais il faut aussi supposer que l'actine doit avoir subi un changement de conformation qui provoque une agrégation de la G-actine et défavorise une polymérisation régulière.

Malgré ce changement de conformation, l'actine tumorale peut toujours interagir avec la HMM normale. Néanmoins le site d'interaction peut être affecté, mais l'état agrégé de l'actine ne nous permet pas d'affirmer que toutes les molécules de G-actine interagissent avec les molécules de HMM. De plus, nous n'avons pas pu observer la polarité du filament fin que l'on constate pour le filament fin du muscle normal après interaction avec la HMM : toutes les molécules de HMM sur un même filament fin sont dirigées dans le même sens.

En ce qui concerne les autres protéines du filament fin, nous avons constaté que dans les extraits bruts de l'actine tumorale il manque généralement la tropomyosine, la TN-T et la TN-I. Seule la TN-C peut être observée d'une façon régulière. Ceci ne signifie absolument pas que ces protéines sont absentes dans le tissu tumoral, au contraire, nous avons observé lors de nos études sur la myosine tumorale que celle-ci est fréquemment contaminée par la tropomyosine et la TN-T (Pl.38, Fig a). Nous n'avons jamais observé par contre,

la TN-I dans les préparations ni de la myosine, ni de l'actine tumorales. *Ce facteur de la troponine semble donc être absent dans la tumeur musculaire.*

L'absence de la TN-I peut expliquer l'état de "supercontraction" du sarcomère du muscle tumoral. Dès qu'on enlève la TN-I du filament fin (ou qu'on augmente son affinité pour la TN-C), la tropomyosine rentre dans le sillon de la double hélice du filament fin (TM-"shift"), et la tête globulaire de la myosine peut se fixer sur l'actine. L'absence de la TN-I perturbe donc l'effet coopératif entre les trois facteurs du complexe régulateur (troponine) et la tropomyosine. L'interaction de l'actine avec la myosine peut encore avoir lieu, mais de façon irréversible (Perry *et al.*, 1973), car la tropomyosine n'est plus tirée par la TN-I vers la périphérie du filament fin.

Les autres protéines apparaissant sur un électrophorégramme sont difficilement identifiables. Certaines peuvent être des protéines cytoplasmiques extraites en même temps que les protéines du filament fin. La protéine de poids moléculaire 14 000 peut être éventuellement considérée comme un fragment protéolytique du complexe troponine (Greaser *et al.*, 1973). Jusqu'à présent des travaux sur ce polypeptide n'ont pas été poursuivis afin de l'identifier ou de le localiser sur le filament fin.

VII. LE RHABDOMYOSARCOME HUMAIN.

Pendant longtemps, le rhabdomyosarcome humain a été considéré comme une tumeur relativement rare. Mais les études effectuées sur cette tumeur depuis les quinze à vingt dernières années ont montré que le rhabdomyosarcome est, non seulement une tumeur très maligne, mais que les rhabdomyosarcomes embryonnaires et alvéolaires sont les deux tumeurs les plus fréquentes observées chez l'homme en dessous de vingt ans. Chez les jeunes enfants, les rhabdomyosarcomes représentent 50 % de toutes les tumeurs du tissu "mou" (Dito et Batsakis, 1962; Mahour *et al.*, 1967; Enzinger et Shiraki, 1969; Sinkovics *et al.*, 1970; Sutow *et al.*, 1970; Donaldson *et al.*, 1973; Bale et Reye, 1975; Liebner, 1976; Weichert *et al.*, 1976). L'augmentation de la fréquence de cette tumeur reflète surtout les progrès qui ont été faits concernant le diagnostic, dus en partie à l'apport de la microscopie électronique.

La tumeur peut apparaître à n'importe quel âge de l'enfance, mais la majorité est observée chez les enfants de 3 à 4 ans (Weichert *et al.*, 1976). Chez des enfants de 10 à 12 ans, la tumeur apparaît moins souvent, mais sa fréquence augmente à nouveau chez des adolescents de 15 à 18 ans (Enzinger et Shiraki, 1969; Sutow *et al.*, 1970).

Le rhabdomyosarcome est généralement découvert dans un nombre relativement réduit de sites typiques :

- la région de la tête et de la nuque (Donaldson *et al.*, 1973; Liebner, 1976).
- les extrémités (Enzinger et Shiraki, 1969).
- les régions périrectales et périnéales (Enzinger et Shiraki, 1969; Srouji *et al.*, 1976).
- le tronc (Weichert *et al.*, 1976).

Le cas que nous allons étudier dans ce chapitre est une tumeur congénitale vulvo-périnéale d'un nouveau-né.

A. OBSERVATIONS CLINIQUES ET MACROSCOPIQUES.

La tumeur a été observée chez un nouveau-né de 3 kgs, de sexe féminin, premier enfant, né à terme, de parents sans tares génétiques.

Dès la naissance, on trouve :

- d'une part, une tumeur vulvo-périnéale de 10 cm de diamètre refoulant en avant et vers le bas les grandes lèvres (Pl.45, Fig a.).
- et d'autre part, un foyer d'ostéolyse du tibia gauche.

Au cinquième jour de la vie de l'enfant, le chirurgien pratique (en semi-urgence) l'exérèse de la tumeur.

A l'intervention chirurgicale, la tumeur est dure, polylobée, très richement vascularisée. Le chirurgien réussit à cliver la tumeur et à libérer complètement la vessie, le vagin et le rectum qui ne paraissent pas être envahis par la tumeur. Le poids de la pièce d'exérèse est de 180 g (Pl.45, Fig b.). La tumeur ne présente aucune nécrose, ni zone hémorragique.

Pour confirmer le diagnostic de métastase, on pratique au 30^{ème} jour de la vie de l'enfant une biopsie de la lésion ostéolytique tibiale.

L'enfant meurt à l'âge de 3 mois, en présentant une récurrence tumorale de même localisation et de même taille que la tumeur primitive, sans signe d'obstruction urinaire ou intestinale.

B. ETUDES HISTOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DE LA TUMEUR PRIMITIVE.

1. Etudes histologiques.

Histologiquement, le néoplasme est de type mésenchymateux, mais de structure hétérogène. 90 % des surfaces examinées montrent des éléments indifférenciés fusocellulaires (Pl.46, Fig a). L'examen histologique ne permet pas d'apporter des arguments décisifs pour préciser le caractère de ces cellules : cellules fibroblastiques, cellules cancéreuses d'origine muscle lisse, cellules cancéreuses d'origine schwannienne ou rhabdomyoblastes allongés.

En examinant soigneusement de nombreuses lames histologiques, on peut trouver deux aspects significatifs d'une évolution rhabdopoiétique de cette tumeur. Il s'agit de petits flots de cellules au sein de zones fusocellulaires. Ces zones sont de deux types : d'une part, ayant l'aspect de rhabdomyosarcome embryonnaire indif-

férencié (Pl.46, Fig b) et, d'autre part, ayant l'aspect de rhabdomyosarcome embryonnaire botryoïde (Pl.46, Figs c et d).

2. Etudes en microscopie électronique.

L'examen en microscopie électronique a été effectué sur du matériel fixé au formaldéhyde (fixation pour coupes histologiques) puis au OsO₄.

En examinant de très nombreuses coupes, nous avons pu trouver quelques cellules contenant des structures myofibrillaires. Le plus souvent nous avons observé de grandes plages de myofilaments orientés de façon totalement anarchique dans le cytoplasme (Pl.47, Fig a). On ne retrouve que très rarement une orientation parallèle de filaments fins (Pl.47, Fig b) ou une ébauche de myofibrilles caractérisée par la présence de stries Z (Pl.47, Fig c). Dans certaines cellules de type fibroblastique, on observe une quantité considérable de filaments de 10 nm (Pl.47, Fig d).

La fixation au formaldéhyde est inhabituelle et surtout impropre à une étude en microscopie électronique, car elle préserve mal les organites et les membranes cellulaires. Ainsi, nous avons dû renoncer à un examen plus approfondi de l'ultrastructure de la tumeur primitive.

C. ETUDES HISTOLOGIQUE ET ULTRASTRUCTURALE DE LA RÉCIDIVE TUMORALE.

1. Etudes histologiques.

Dans la récurrence tumorale, on retrouve les mêmes éléments histologiques que dans la tumeur primitive, mais avec de différents rapports de quantité. On constate une très importante augmentation absolue et relative des zones d'aspect de rhabdomyosarcome embryonnaire botryoïde et indifférencié par rapport à la composante fusocellulaire.

La zone d'aspect embryonnaire botryoïde (Pl.48, Fig a) est particulièrement développée à la périphérie de la tumeur sous le

revêtement malpighien. Dans cette zone, on observe de multiples cellules indifférenciées, souvent étoilées ou allongées (Pl.48, Fig b). Dans le cytoplasme de ce dernier type cellulaire, on reconnaît parfois des structures fibrillaires allongées et des ébauches de striation (Pl.48, Fig b).

Les zones de rhabdomyosarcome embryonnaire indifférencié sont dispersées de façon irrégulière dans la partie plus profonde de la tumeur (Pl.48, Fig c). Elles sont caractérisées par un polymorphisme cellulaire : cellules de grande taille (Pl.48, Fig d) et cellules allongées (Pl. 48, Fig e). Une grande partie de ces cellules montrent des structures fibrillaires intracytoplasmiques et leurs noyaux possèdent des nucléoles énormes (Pl.48, Figs d et e).

2. Etudes en microscopie électronique.

En microscopie électronique, nous avons pu retrouver les mêmes cellules que nous avons observées lors de l'examen histologique.

La zone botryoïde de la tumeur est caractérisée par de très larges espaces intercellulaires contenant une quantité considérable de fibres de collagène. Dans cette zone sont logées des cellules fusiformes avec parfois deux ou plusieurs noyaux (Pl.49, Fig a).

La zone indifférenciée contient des cellules polymorphes de toutes tailles, caractérisées par l'existence de myofilaments intracytoplasmiques et de noyaux à contours irréguliers.

a) *Les structures fibrillaires.*

La plupart des cellules de la récurrence tumorale contiennent des structures fibrillaires. Dans certaines cellules, elles montrent l'aspect embryonnaire, c'est-à-dire des filaments fins et des filaments épais, mais sans organisation sarcomérique ou myofibrillaire (Pl.49, Fig b; Pl.50, Fig a). Au cours de la différenciation, les myofilaments se parallélisent davantage (Pl.50, Fig a), et il y a apparition des stries Z (Pl.50, Fig b). Les stries Z sont généralement très épaisses ou même hypertrophiées, et les sarcomères sont habi-

tuellement irréguliers (Pl.50, Fig b). On observe de gros amas de glycogène entre les myofibrilles, particulièrement au niveau des stries Z (Pl.50, Fig b).

b) *Les noyaux.*

Les noyaux sont - comme dans les tumeurs musculaires chimio-induites - généralement très irréguliers, ceci aussi bien dans les cellules allongées des zones botryoïdes (Pl.49, Fig a) que dans les cellules pleiomorphes des zones indifférenciées (Pl.49, Fig b; Pl. 51, Fig a). Nous avons retrouvé en microscopie électronique les énormes nucléoles des noyaux des cellules des zones embryonnaires indifférenciées, que nous avons observés auparavant lors des études histologiques (Pl.51, Figs a et b). Ces nucléoles sont constitués d'un matériel finement granulaire, amorphe, très compact et très dense aux électrons. Sur des coupes ultra-fines, on reconnaît que ce matériel compact renferme quelques petites cavités. De plus, la plupart des noyaux possèdent une quantité considérable de grains péricromatiniens (Pl.49, Fig a ; Pl.51; Pl.52, Fig a), et on observe fréquemment des corps nucléaires de type granuleux (Pl.51, Fig b) ou de type fibrillaire (Pl.49, Fig a; Pl.51, Fig b; Pl.52, Fig a).

c) *Le réticulum sarcoplasmique.*

Le réticulum sarcoplasmique est peu développé. Dans les cellules immatures -ne contenant que des ébauches myofibrillaires-, il existe sous forme d'ergastoplasme et possède une quantité considérable de précipités finement granulaires et amorphes dans ses cavités (Pl.51, Fig a; Pl.52, Fig b). Dans les cellules avec une différenciation myofibrillaire plus avancée (Pl.50), le réticulum sarcoplasmique est de type lisse, peu fréquent et ne montre plus le précipité granulaire dans ses citernes.

D. ETUDES DES MYOSINES TUMORALE ET FOETALE HUMAINES.

La myosine tumorale humaine a été extraite à partir de 80 g de la récidive tumorale. Pour l'extraction de la myosine foetale, nous nous sommes servis de 60 g de muscle foetal humain. Les deux myosines ont été extraites et purifiées suivant les méthodes em-

ployées pour les myosines foetales et tumorales du Rat et du Lapin.

1. Etude ultrastructurale des filaments synthétiques.

Les myosines ont été précipitées par dilutions rapides en absence et en présence de $MgCl_2$ 10 mM comme dans le protocole décrit auparavant. Les deux myosines précipitent en absence de $MgCl_2$ essentiellement sous forme de *filaments bipolaires* comme les myosines normales du muscle squelettique du Rat et du Lapin (Pl.53, Figs a et b). Précipitées en présence de $MgCl_2$ 10 mM, par contre, les deux myosines forment essentiellement des *filaments synthétiques très allongés et fusiformes* (Pl.53, Figs c et d), alors que les myosines du muscle squelettique précipitent de façon très homogène sous forme de filaments courts (0,5 μm) et bipolaires (Pl.36). Nous n'avons pas pu préparer de la myosine à partir du muscle squelettique normal adulte humain.

2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

Les myosines humaines (tumorale et foetale) sont comparées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS avec la myosine du muscle blanc du Lapin.

Sur l'électrophorégramme des trois myosines (Pl.54), on reconnaît sur tous les gels les chaînes lourdes (HC), les M-protéines (M), la C-protéine (C), l'actine et les chaînes légères (L_{25} , L_{18} et L_{16}).

La *myosine tumorale humaine* (Pl.54, gel 2) ne possède que deux chaînes légères (L_{25} et L_{18}) comme les myosines tumorales du Rat et du Lapin. Ces deux chaînes légères existent également dans la *myosine foetale humaine* (Pl.54, gel 3). L'électrophorégramme révèle aussi d'autres bandes, dont nous avons déjà établi l'identité et les poids moléculaires : la troponine T (TN-T) et la tropomyosine (TM) (Pl.54, gel 1), puis la troponine C (TN-C) (Pl.54, gels 1 et 3) et une protéine de poids moléculaire de 27 000 (Pl.54, gels 2 et 3). La bande de poids moléculaire de 24 000 de la myosine

du muscle blanc du Lapin (Pl.54, gel 1) correspond certainement à la troponine I (TN-I). Ceci est d'autant plus probable que toutes les autres protéines du complexe régulateur du filament fin sont présentes dans cette préparation.

En ce qui concerne la myosine tumorale humaine, nous observons sur le gel (Pl.54, gel 2) de nombreuses bandes dont les poids moléculaires se situent entre 140 000 et 45 000 et entre 34 000 et 25 000. Ces bandes correspondent vraisemblablement à des fragments polypeptidiques issus de la protéolyse des chaînes lourdes. En effet, il existe beaucoup d'enzymes protéolytiques dans les tumeurs.

Nous ne pouvons pas encore identifier, dans l'état actuel de nos travaux, la bande de poids moléculaire de 17 000 observée dans le gel de la myosine foetale humaine (Pl.54, gel 3).

3. L'activité de la Ca²⁺-ATPase.

Nous avons effectué des mesures de l'activité spécifique de la Ca²⁺-ATPase des deux différentes myosines humaines. Etant donné que nous n'avons pu préparer la myosine du muscle squelettique normal humain, et que nous n'avons trouvé dans la littérature, aucune référence concernant son activité ATPasique, nous pouvons comparer l'activité des myosines humaines foetale et tumorale seulement avec celle de la myosine d'un autre muscle rouge, donc du muscle squelettique du Rat.

La myosine foetale humaine possède une activité spécifique de la Ca²⁺-ATPase (414 ± 10 nmoles P_i/min/mg de myosine) comparable à celle de la myosine du muscle normal squelettique du Rat (450 ± 60 nmoles P_i/min/mg de myosine) (Tableau V, page 133).

L'activité spécifique de la myosine tumorale est très basse, et nous avons dosé 90 nmoles P_i/min/mg de myosine. Ces résultats sont tout à fait comparables à ceux obtenus avec les myosines tumorales du Rat et du Lapin, où nous avons dosé respectivement 30 ± 10 et 60 ± 20 nmoles P_i/min/mg de myosine (Tableau V).

E. DISCUSSION.

Dans le rhabdomyosarcome humain spontané nous observons pratiquement tous les caractères morphologiques essentiels que nous avons déjà décrits lors de nos études sur les tumeurs musculaires du Rat et du Lapin. Nous retrouvons les différents types cellulaires, les noyaux déformés avec de grands nucléoles et des corps nucléaires, les précipitations granulaires dans le réticulum sarcoplasmique et des anomalies dans la différenciation myofibrillaire (tout au moins dans la récurrence tumorale) : orientation irrégulière des myofibrilles, épaississement au niveau des stries Z et absence de la ligne M.

Contrairement à la récurrence tumorale, les structures myofibrillaires sont extrêmement rares dans la tumeur primitive, ce qui a amené les anatomo-pathologistes à classer cette tumeur comme un mésoenchymome. L'examen très approfondi de nombreuses coupes histologiques a finalement permis de prévoir une évolution rhabdomyosarcomateuse de la récurrence tumorale. En effet, les résultats de nos études morphologiques et ultrastructurales ont confirmé ces hypothèses. Néanmoins, il est difficile de comprendre pourquoi la récurrence tumorale touche préférentiellement un seul type tissulaire (dans ce cas, il s'agit du tissu musculaire), contrairement à la tumeur primitive. Ce phénomène reste actuellement encore inexplicable.

Les myosines humaines du foetus et de la tumeur spontanée semblent être très comparables à celles des foetus et des tumeurs chimio-induites du Rat et du Lapin. Nous observons d'abord les mêmes filaments synthétiques : les deux myosines précipitent en absence de $MgCl_2$ sous forme de filaments bipolaires, mais dès qu'on ajoute du $MgCl_2$ (10 mM) dans la solution des myosines, les filaments apparaissent longs et fusiformes après précipitation rapide par dilution. De plus, on rencontre des analogies au niveau de la répartition des chaînes légères : les deux myosines ne possèdent que deux chaînes légères, les chaînes L_{25} et L_{18} . Et finalement, on constate aussi chez l'Homme une nette différence entre l'activité spécifique de la Ca^{2+} -ATPase de la myosine foetale et celle

de la myosine tumorale. Alors que l'activité spécifique ATPasique de la myosine foetale est très élevée en présence du Ca^{2+} à 10 mM, celle de la myosine tumorale est fortement abaissée. Nous retrouvons donc aussi dans le cas de la myosine de la tumeur spontanée une *isoenzyme* comparable aux myosines des tumeurs expérimentales du Rat et du Lapin.

L'intérêt de notre travail ne repose pas seulement sur les analogies que nous avons mises en évidence au niveau des différentes myosines tumorales. Il est important de savoir que tous les *résultats biochimiques* que nous avons décrits peuvent être obtenus en moins de trois jours. Ce délai de temps peut être éventuellement respecté pour l'examen histologique d'une tumeur, mais ne peut pas être tenu pour l'examen en microscopie électronique.

L'étude biochimique de la myosine peut donc être considérée également comme une méthode très rapide de diagnostic, surtout dans le cas des rhabdomyosarcomes embryonnaires dont le diagnostic est souvent très difficile. De plus, elle est une méthode précise pour distinguer le rhabdomyosarcome indifférencié du fibrosarcome, car *les myosines de ces deux tumeurs sont très différentes au niveau de leur composition en chaînes légères* : la myosine du rhabdomyosarcome possède deux chaînes légères du muscle squelettique, les chaînes L_{25} et L_{18} , le fibrosarcome par contre, possède deux chaînes légères complètement différentes : les chaînes L_{20} et L_{15} de la myosine fibroblastique (Adelstein et Conti, 1976).

CONCLUSIONS GENERALES

L'étude des modifications morphologiques et physiologiques du tissu musculaire au cours de la tumorigénèse chimio-induite ou spontanée nous a amené à aborder plusieurs problèmes relatifs au phénomène de la contraction musculaire.

DANS UN PREMIER TEMPS, nous avons mis au point une méthode d'implantation du Ni_3S_2 permettant l'induction de *rhabdomyosarcomes* chez le Lapin bien que Hueper (1955) insiste sur le fait que le Ni_3S_2 ne provoque que des fibrosarcomes chez le Lapin.

Par la même méthode, nous avons également obtenu quelques *leiomyosarcomes* du muscle squelettique. Cette observation n'est pas surprenante, quand on sait que les muscles strié, lisse et cardiaque ainsi que les cellules myoépithéliales dérivent tous de cellules mésenchymateuses. C'est ainsi que l'on peut expliquer également l'apparition de leiomyosarcomes dans le myocarde.

- L'un des points les plus intéressants est la mise en évidence de deux types de différenciation des structures contractiles (même dans des conditions identiques de déclenchement et même dans une seule tumeur) :

1. *différenciation embryonnaire* caractérisée par l'apparition des filaments de myosine et d'actine et l'organisation de ces filaments en sarcomère avant la formation des stries Z.
2. *différenciation tumorale proprement dite* : les stries Z apparaissent d'abord, puis l'actine, puis la myosine; l'ordre de la différenciation est donc inversé.

Dans les myofibres tumorales matures, on ne distingue absolument plus ces deux types de différenciation.

Ce fait est extrêmement important. Il met en cause la polarité du filament d'actine, et donc en cause la structure sinon primaire au moins tertiaire de cette protéine. De plus, l'étude plus poussée de cette donnée pourrait contribuer à éclaircir le mécanisme de la formation des sarcomères.

D'autres observations morphologiques nous semblent être assez importantes pour être soulignées :

- L'épaississement des stries Z dans les tumeurs. Il peut être dû à une synthèse ou une polymérisation mal contrôlées dans la tumeur de différentes protéines musculaires, en particulier de l'actine et des actinines.

- L'absence de la ligne M. Fait important qui incite à penser que plusieurs protéines (trois au moins) n'ont pas été synthétisées ou assemblées dans la tumeur.

- La présence des structures paracrystallines (dans le rhabdomyosarcome du Lapin) qui sont encore peu connues. Leur existence met une fois de plus en cause les propriétés de polymérisation de la myosine et de l'actine et donc de leur structure.

DANS UN SECOND TEMPS, nos recherches nous ont permis de mettre au point une technique d'extraction des myosines foetales et surtout des myosines tumorales. *L'application de cette nouvelle méthode nous a permis de préciser l'ultrastructure des filaments synthétiques et le comportement enzymatique des différentes myosines.*

- Nous avons d'abord montré une ressemblance entre les myosines foetales et tumorales au niveau de l'ultrastructure de leurs filaments synthétiques. *Nous avons observé que les filaments de ces deux myosines sont longs et fusiformes lorsqu'on les précipite in vitro par dialyse et particulièrement par dilution rapide en présence de $MgCl_2$.* Par contre, les filaments de la myosine du muscle squelettique normal sont courts et bipolaires et de longueur très homogène après précipitation dans les mêmes conditions.

- Nous avons démontré l'existence d'une deuxième ressemblance entre les myosines foetales et tumorales au niveau de la répartition de leurs chaînes légères après analyse électrophorétique. *Les électrophorégrammes révèlent que les myosines tumorales possèdent les mêmes chaînes légères (L_{25} et L_{18}) que les myosines foetales, et que la forme phosphorylée de la chaîne L_{18} est absente dans les deux myosines.* Fait important, car c'est la phosphorylation de cette chaîne légère qui augmente l'activité ATPasique de la myosine.

- De plus, nous avons isolé une myosine tumorale "proprement dite", caractérisée par l'existence d'une seule chaîne légère : la L_{18} .

Ces ressemblances ultrastructurales et électrophorétiques entre les myosines foetales et tumorales pourraient nous permettre de penser qu'il s'agit d'un *exemple caractéristique de protéines de structure oncofoetales*.

Or, si l'on compare ces deux myosines sur le plan enzymatique (activité ATPasique), aucune ressemblance ne peut être constatée. La faible activité ATPasique de la myosine tumorale implique nécessairement l'existence d'une modification de la conformation des chaînes lourdes, et plus précisément, de leurs sites actifs sur la tête globulaire de la molécule. Ces résultats suggèrent donc la possibilité d'existence d'un nouveau type d'*isoenzyme*, caractéristique du tissu tumoral, qui, bien que très proche de l'isoenzyme foetal, s'en distinguerait fondamentalement sur le plan de l'activité enzymatique.

Toutefois, la myosine tumorale précipitable à pH 5,0 échapperait à cette conception d'ensemble et pourrait constituer véritablement une individualité consécutive à la transformation oncogène.

En ce qui concerne les *protéines du filament fin*, nous avons observé des modifications au niveau des protéines tumorales. Nous avons constaté l'absence du facteur inhibiteur de la troponine dans les tumeurs et nous pouvons supposer que la G-actine doit avoir subi un changement de conformation qui défavorise, *tout au moins in vitro*, une polymérisation régulière en F-actine.

Toutes ces observations sont cohérentes car elles convergent au même point : il y a altération des structures et des propriétés des protéines myofibrillaires et en particulier de la myosine et de l'actine.

L'ensemble des modifications observées au niveau des protéines myofibrillaires tumorales expliqueraient donc *d'une part l'aspect supercontracté du sarcomère et, d'autre part le blocage de la contraction, dans le rhabdomyosarcome*. De plus, l'étude de la stabilité du complexe actomyosine tumorale pourrait apporter des informations nouvelles sur la nature et le mécanisme d'action des facteurs qui renforcent la stabilité du complexe, et peut-être

sur les conditions de polymérisation des deux protéines myofibrillaires principales : myosine et actine.

Nous avons eu la chance d'avoir choisi un modèle expérimental intéressant, car les résultats obtenus lors de nos recherches sur la myosine de la tumeur expérimentale sont parfaitement superposables avec ceux obtenus pour la myosine de la tumeur spontanée chez l'Homme.

Ce modèle expérimental nous paraît donc convenir parfaitement à la continuation d'études de biologie moléculaire au niveau du contrôle de la synthèse des protéines myofibrillaires tumorales, car, sur un plan plus général, on peut penser que les mécanismes moléculaires intervenant dans la transformation tumorale spontanée ou chimio-induite sont comparables.

B I B L I O G R A P H I E

- ADELSTEIN, R.S. et CONTI, M.A. (1973).
The characterization of contractile proteins from platelets and fibroblasts. In : "The mechanism of muscle contraction" Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology., Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 599-605.
- ADELSTEIN, R.S. et CONTI, M.A. (1976).
The effect of phosphorylation on platelet myosin and studies on substrates for platelet myosin light-chain kinase. In : "Cell Motility -Book B- Actin, Myosin and Associated Proteins". Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation., Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory, 725-738.
- ADELSTEIN, R.S., CONTI, M.A., JOHNSON, G.S., PASTAN, I. et POLLARD, T.D. (1972).
Isolation and characterization of myosin from cloned mouse fibroblasts.
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 69, 3693-3697.
- ADELSTEIN, R.S., POLLARD, T.D. et KUEHL, W.M. (1971).
Isolation and characterization of myosin and two myosin fragments from human blood platelets.
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 69, 2703-2707.
- ADLER, A.J., GREENFIELD, N.J. et FASMAN, G.D. (1973).
Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides. In : Methods in Enzymology, S.P.Colowick et N.O. Kaplan (eds)., Vol. 27, 375-735.
- ALLBROOK, D., BAKER, W.C. et KILKCALYDY-WILLIS, W.H. (1966).
Muscle regeneration in experimental animals and in man.
J.Bone Joint Surg., 48B, 153-169.
- ALLEN, J.R., HSU, T.C. et CARSTENS, L.A. (1975).
Dehydroretronecine-induced Rhabdomyosarcomas in Rats.
Cancer Research, 35, 997-1002.
- ALLERA, A., BECK, R. et WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1971).
Weitreichende fibrilläre Protoplasma differenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. VIII. Identifizierung der Plasmafilamente von *Physarum polycephalum* als F-Actin durch Anlagerung von heavy meromyosin *in situ*.
Cytobiologie, 4, 437-449.
- ALLERA, A. et WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1972).
Weitreichende fibrilläre Protoplasma differenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. IX. Aggregationszustände des Myosins und Bedingungen zur Entstehung von Myosinfilamenten in den Plasmodien von *Physarum polycephalum*.
Cytobiologie, 6, 261-286.
- APPELMAN, H.D. et HELWIG, E.B. (1976).
Gastric epitheloid leiomyoma and leiomyosarcoma (leiomyoblastoma).
Cancer, 38, 708-728.
- BALE, P.M. et REYE, R.D.K. (1975).
Rhabdomyosarcoma in childhood.
Pathology, 7, 101-111.

BALK, S.D. (1971).

Calcium as regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 68, 271-275.

BARANY, G. et MERRIFIELD, R.B. (1973).

An ATP-binding peptide. In : "The mechanism of muscle contraction" Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology., Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 121-125.

BARNES, B.G. (1961)

Ciliated secretory cells in the *pars distalis* of the mouse hypophysis. J.Ultrastruct. Research, 5, 453-467.

BASRUR, P.K., SYKES, A.K. et GILMAN, J.P.W. (1970).

Changes in mitochondrial ultrastructure in nickel-sulfid induced rhabdomyosarcoma. Cancer, 25, 1142-1152.

BATTIFORA, H.A., EINSEINSTEIN, R. et SCHILD, J.A. (1969).

Rhabdomyoma of Larynx. Ultrastructural study and comparison with granular cell tumors (Myoblastomas). Cancer, 23, 183-190.

BEARMAN, R.M. (1974).

Primary leiomyosarcoma of the heart. Arch.Pathol., 98, 62-65.

BECK, R., HINSEN, H., KOMNICK, H., STOCKEM, W. et WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1970).

Weitreichende fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. V. Kontraktion, ATPase-Aktivität und Feinstruktur isolierter Actomyosin-Fäden von *Physarum polycephalum*.

Cytobiologie, 2, 259-274.

BECK, R., KOMNICK, H., STOCKEM, W. et WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1969).

Weitreichende fibrilläre Protoplasmadifferenzierungen und ihre Bedeutung für die Protoplasmaströmung. IV. Vergleichende Untersuchungen an Actomyosin-Fäden und glycerinierten Zellen.

Cytobiologie, 1, 99-114.

BECKER, C.G. et NACHMAN, R.L. (1973).

Contractile proteins of endothelial cells, platelets and smooth muscle.

Am.J.Pathol., 71, 1-22.

BEINBRECH, G. (1970).

Zur Funktion der Mikrotubuli beim Wachstum der Myofibrillen von Insektenmuskeln.

Z.Zellforsch., 109, 138-146.

BERRY, S.J. et JOHNSON, E. (1975).

Formation of temporary flagellar structures during insect organogenesis.

J.Cell Biol., 65, 489-492.

BORAM, L.H., ERLANDSON, R.A. et HAJDU, S.I. (1972).
Mesodermal mixed tumor of the uterus.
Cancer, 30, 1295-1306.

BOUTEILLE, M., KALIFAT, S.R. et DELARUE, J. (1967).
Ultrastructural variations of nuclear bodies in human diseases.
J.Ultrastruct.Research, 19, 474-486.

BRINKLEY, B.R. et STUBBLEFIELD, E. (1970).
Ultrastructure and interaction of the kinetochore and centriole
in mitosis and meiosis. In : Advances in Cell Biology, D.M.Prescott,
L.Goldstein, E.McConney (eds)., North-Holland Publication Comp.
Amsterdam, 119-185.

BRUNI, C. et RUST, J.N. (1975).
Fine structure of dividing cells and of nondividing differentiating
cells of nickel-sulfid induced rhabdomyosarcomas.
J.Nat.Cancer Inst., 54, 687-696.

CHURCH, J.C.T., NORONHA, R.F.X. et ALLBROOK, D. (1966).
Satellite cells and skeletal muscle regeneration.
Brit.J.Surg., 53, 638-642.

CLAY.A. (1972).
Les tumeurs primitives du muscle strié.
Lille Médical, 17, 650-656.

COHEN, C., CASPAR, D.L.D., JOHNSON, J.P., NAUSS, K., MARGOSSIAN,
S.S. et PARRY, D.A.D. (1973).
Tropomyosin-troponin assembly. In : "The mechanism of muscle con-
traction" Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology
Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 287-297.

CONNEY, A.H. et KLUTCH, A. (1963).
Increased activity of androgen hydroxylases in liver microsomes
of rats pretreated with phenobarbital and other drugs.
J.Biol.Chem., 238, 1611-1617.

CORNOG, J.L. (1969).
The ultrastructure of leiomyoblastoma. With comments on the light
microscopic morphology.
Arch.Pathol, 87, 404-410.

CORNOG.J.L. (1974).
Gastric leiomyoblastoma. A clinical and ultrastructural study.
Cancer, 34, 711-719.

CORNOG, J.L. et GONATAS, N.K. (1967).
Ultrastructure of rhabdomyoma.
J.Ultrastruct.Research., 20, 433-450.

CRAMER, J.W., MILLER, J.A. et MILLER, E.C. (1960).
The hydroxylation of the carcinogen 2-acetylaminofluorene by rat
liver : stimulation by pretreatment *in vivo* with 3-methylcholan-
threne.
J.Biol.Chem., 235, 250-256.

CROWTHER, R.A., FINCH, J.T. et PEARSE, P.M.F. (1976).
On the structure of coated vesicles.
J.Cell Biol., 103, 785-798.

- DALTON, A.J. (1966).
An electron microscopic study of a virus-induced murine sarcoma (Moloney).
Natl.Cancer Inst.Monograph, 22, 143-168.
- DANIEL, M.R. (1966).
Strain differences in the response of rats to the injection of nickel sulfid.
Brit.J.Cancer, 20, 886-895.
- DANIEL, M.R., EDWARDS, M. et WEBB, M. (1974).
The effect of metal serum complexes on differentiating muscle *in vitro*.
Brit.J.Exp.Pathol., 55, 237-244.
- DANIEL, M.R., HEATH, J.C. et WEBB, M. (1967).
Respiration of metal induced rhabdomyosarcomata.
Brit.J.Cancer, 21, 780-786.
- DAVIES, P., BECHTEL, P. et PASTAN, I. (1977).
Filamin inhibits actin activation of heavy meromyosin ATPase.
FEBS Letters, 77, 228-232.
- DE THE, G.M., RIVIERE, M. et BERNHARD, W. (1960).
Examen au microscope électronique de la tumeur VX₂ du lapin domestique dérivée du papillome de Shope.
Bull.Assoc.Franç. Etude Cancer, 47, 570-584.
- DINGEMANS, K.P. (1969).
The relation between cilia and mitoses in the mouse adenohipophysis.
J.Cell Biol., 43, 361-367.
- DITO, W.R. et BATSAKIS, J.G. (1962).
Rhabdomyosarcoma of the head and neck.
Archs.Surg., 84, 582-588.
- DONALDSON, S.S., CASTRO, J.R., WILBUR, J.R. et JESSE, R.H. (1973).
Rhabdomyosarcoma of head and neck in children. Combination, treatment by surgery, irradiation and chemotherapy.
Cancer, 31, 26-35
- DORMAN, J.D. (1973).
The histopathology of neurogenic muscular atrophy. In : "The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol. 12, C.M.Pearson et F.K. Mostofi (edts); Williams and Wilkins Company Baltimore, 249-262.
- DOW, J. et STRACHER, A. (1971).
Identification of the essential light chains of myosin.
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 68, 1107-1110.
- DREIZEN, P. et RICHARDS, D.H. (1973).
Studies on the role of light and heavy chains in myosin adenosine triphosphatase. In : "The mechanism of muscle contraction" Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 29-45.

DURYCE, W.R. (1969).

Dependence of tumor formation in frogs on abnormal nucleolar formation.

Recent Results in Cancer Research (Berlin), Sp.Supl. 82-100.

DVIZHKOV, P.P. et FEDEROVA, V.I. (1967).

(Cancerogenic properties of chromic oxide) (en russe).

Vop.Onkol., 13, 57-62.

EBASHI, S., OHTSUKI, I. et MIHASHI, K. (1973).

Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin.

In : "The mechanism of muscle contraction" Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 215-223.

ELZINGA, M., COLLINS, J.H., KUEHL, W.M. et ADELSTEIN, R.S. (1973).

Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle.

Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 70, 2687-2691.

ENGEL, A.G. (1973).

Vacuolar myopathies : multiple etiologies and sequential structural studies. In : "The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol. 12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (eds); Williams and Wilkins Company Baltimore, 301-341.

ENGEL, W.K. (1973).

Duchenne muscular dystrophy : a histologically based Ischemia hypothesis and comparison with experimental Ischemia myopathy. In : "The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol.12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (eds); Williams and Wilkins Company Baltimore, 453-472.

ENGELBRECHT, F.M. et BURGER, B.F. (1973).

Biological effect of asbestos dust on the peritoneal viscera of rats.

S.Afr.Med.J., 47, 1746-1750.

ENZINGER, F.M., LATTES, R. et TORLONI, H. (1970).

Classification histologique internationale des tumeurs. Vol.3. Types histologiques des tumeurs des tissus mous.

Organisation Mondiale de la Santé. Genève, 31-33.

ENZINGER, F.M. et SHIRAKI, M. (1969).

Alveolar rhabdomyosarcoma (an analysis of 110 cases).

Cancer, 24, 18-31.

EPSTEIN, H.F., ARONOW, B.J. et HARRIS, H.E. (1976).

Myosin-paramyosin cofilaments: enzymatic interactions with F-actin.

Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A. 73, 3015-3019.

FARE, G. (1964a).

Protein binding during mouse skin carcinogenesis by 9-10-dimethyl-1-2-benzanthracene. The effect of copper acetate and the non-random distribution of induction times among mice given identical treatment.

Brit.J.Cancer , 18, 768-776.

FARE, G. (1964b)

The protective effects of beef and yeast extracts and copper acetate in the diet against rat liver carcinogenesis by 4-dimethylaminoazobenzene.

Brit.J.Cancer, 18, 782-791.

FERON, V.J., EMMELLOT, P. et VOSSENAAR, T.

Lower respiratory tract tumors in syrian golden hamsters after intratracheal instillations of diethylnitrosamine alone and with ferric oxide.

Europ.J.Cancer, 8, 445-449.

FINCK, H. (1965).

Immunochemical studies on myosin. IV. Immunochemical comparison of rabbit and chicken skeletal muscle myosins.

Biochim. Biophys. Acta, 111, 239-246.

FISCHMAN, D.A. (1967).

An electron microscope study of myofibril formation in embryonic chick skeletal muscle.

J.Cell Biol., 32, 557-575.

FISKE, C.H. et SUBBAROW, Y. (1925).

The colorimetric determination of phosphorus.

J.Biol.Chem., 66, 375-400.

FONTE, G.F., SEARLS, R.L. et HILFER, S.R. (1971).

The relationship of cilia with cell division and differentiation.

J.Cell.Biol., 49, 226-229.

FRIEDMANN, I. et BIRD, E.S. (1969).

Electron-microscope investigation of experimental rhabdomyosarcoma.

J.Pathol., 97, 375-382.

FUCHS, R.P.P., LEFEVRE, J.F., POUYET, J. et DAUNE, M.P. (1976).

Comparitive orientation of the fluorene residue in native DNA modified by N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene and two 7-halogeno derivatives.

Biochemistry, 15, 3347-3351.

FURST, A., HARO, R.T. et SCHLAUDER, M. (1972).

Experimental chemotherapy of nickel-induced fibrosarcomas.

Oncology, 26, 422-426.

GELBOIN, H.V. (1967).

Carcinogens, Enzyme induction and Gene action. In : "Advances in Cancer Research", A.Haddow et S.Weinhouse (edts). Academic Press, New York and London, Vol 10, 1-81.

GIBBONS, I.R., FRONK, E., GIBBONS, B.H. et OGAWA, K. (1976).

Multiple forms of Dynein in sea urchin sperm flagella. In : "Cell Motility -Book C- Microtubules and related proteins". Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation., Vol.3, Cold Spring Harbor Laboratory, 915-932.

GILLIS, J.M. (1975).

Le contrôle intracellulaire de la contraction musculaire.

La Recherche, 6, 840-849.

GILMAN, J.P.W. (1962).

Metal carcinogenesis. II. A study on the carcinogenic activity of cobalt, copper, iron, and nickel compounds.
Cancer Res., 22, 158-162.

GILMAN, J.P.W. (1965).

Muscle tumorigenesis. In : Canadian Cancer Conference, Proc. VIth Can. Cancer Res. Conf., Honey Harbour, Ontario, 1964, Pergamon Press, 209-223.

GILMAN, J.P.W. et RUCKERBAUER, G.M. (1962).

Metal carcinogenesis. I. Observations on the carcinogenicity of a refinery dust, cobalt oxide, and colloidal thorium dioxide.
Cancer Res., 22, 152-157.

GOA, J.A. (1953).

A micro-biuret method for protein determination : determination of total protein in cerebrospinal fluid.
Scand.J.Clin.Lab.Invest., 5, 218-222.

GREASER, M.L., YAMAGUCHI, M., BREKKE, C., POTTER, J. et GERGELY, J. (1973).

Troponin subunits and their interactions. In : "The Mechanism of Muscle Contraction". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 235-244.

GREEN, I. et MOMMAERTS, W.F.H.M. (1953).

Adenosinetriphosphatase systems of muscle. I. An electrotitrimetric method of measurement.
J.Biol.Chem., 202, 541-549.

GRIFFEN, T.B., COULSTON, F., GOLDBERG, L., WILLS, H. et RUSSEL, J.C. (1975).

Biologic effects of air borne particulate lead on continuously exposed rats and rhesus monkeys. In : Environmental Quality and Safety. F.Coulston et F.Korte (edts). Georg Thieme Verlag (Stuttgart) Academic Press, New-York, Suppl.Vol.II., 229 pages.

GUTH, L. et SAMAHA, F.J. (1969).

Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle.
Exper.Neurol., 25, 138-152.

GUTHRIE, J. (1964a).

Observations on the zinc induced testicular teratomas of fowl.
Brit.J.Cancer, 18, 130-142.

GUTHRIE, J. (1964b).

Histological effect of intratesticular injections of cadmium chloride in domestic fowl.
Brit.J.Cancer, 18, 255-260.

HADDOW, A. et HORNING, E.S. (1960).

On the carcinogenicity of an iron-dextran complex.
J.Nat.Cancer.Inst., 24, 109-147.

HADDOW, A., ROE, F.J.C., DUKES, C.E. et MITCHLEY, B.C.V. (1964).

Cadmium neoplasia : sarcomata at the site of injections of cadmium sulphate in rats and mice.
Brit.J.Cancer, 18, 667-673.

HADLOW, W.J. (1973).

Myopathies of animals. In : "The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol. 12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (edts); Williams and Wilkins Company Baltimore, 364-409.

HALME, E. (1969).

Carcinogene Wirkung von Zink im Trinkwasser. Stadthygiene, 20, 174-175.

HALME, E. et HALME, A. (1969).

Heavy metals present in the nucleus and the genesis of cancer. Vitalstoffe Zivil.Krankenh., 138-140; 182-188; 233-234.

HAM, A.W. (1974 a).

Muscle Tissue. In : "Histology". A.W.Ham (edt). J.B.Lippincott Company Philadelphia and Toronto, 7th edition, 526-556.

HAM, A.W. (1974b).

Cytoplasm and cytoplasmic organelles : coated vesicles. In : "Histology". A.W.Ham. (edt). J.B.Lippincott Company Philadelphia and Toronto. 7th edition, 135-138.

HARRINGTON, J.S., ROE, F.J.C. et WALTERS, M. (1967).

Studies on the mode of action of asbestos as a carcinogen. S.Afr.Med.J., 41, 800-804.

HARRINGTON, W.F., BURKE, M. et BARTON, J.S. (1973).

Association of myosin to form contractile systems. In : "The Mechanism of Muscle Contraction". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 77-85.

HARTWIG, J.H. et STOSSEL, T.P. (1975).

Isolation and properties of actin, myosin, and a new actin-binding protein in rabbit alveolar macrophages. J.Biol.Chem., 250, 5696-5705.

HAY, E. (1963).

The fine structure of differentiating muscle in the salamander tail. Z.Zellforsch., 59, 6-34.

HEATH, J.C. (1960).

The histogenesis of malignant tumors induced by cobalt in the rat. Brit.J.Cancer, 14, 478-482.

HEATH, J.C. et DANIEL, M.R. (1964).

The production of malignant tumors by nickel in the rat. Brit.J.Cancer, 18, 261-264.

HEATH, J.C. et WEBB, M. (1967).

The primary rhabdomyosarcomata induced in the rat by cobalt, nickel and cadmium. Brit.J.Cancer, 21, 768-779.

HEATH, J.C., WEBB, M. et CAFFREY, M. (1969).

The interaction of carcinogenic metals with tissues and body fluids. Cobalt and horse serum. Brit.J.Cancer, 23, 153-166.

HEUMANN, H.G. (1971).

Über die Funktionsweise glatter Muskelfasern. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Darmmuskulatur der Hausmaus. Cytobiologie, 3, 259-281.

HINGLAIS-GUILLAUD, N., MORICARD, R. et BERNHARD, W. (1961).

Ultrastructure des cancers pavimenteux invasifs du col utérin chez la femme.

Bull.Cancer, 48, 283-316.

HINSSEN, H. (1970).

Synthetische Myosinfilamente von Schleimpilz-Plasmodien.

Cytobiologie, 2, 326-331.

HINSSEN, H. (1972).

Actin in isoliertem Grundplasma von *Physarum polycephalum*.

Cytobiologie, 5, 146-164.

HOFFMANN-BERLING, H. (1953).

Die Wasser-Glyzerin-extrahierte Zelle als Modell der Zellmotilität.

Biochim. Biophys. Acta, 10, 628.

HOFFMANN-BERLING, H. (1954).

Adenosintriphosphat als Betriebsstoff von Zellbewegungen.

Biochim. Biophys. Acta, 14, 182-194.

HORRATH, B.Z. et GAETJENS, E. (1972).

Immunochemical studies on the light chains from skeletal muscle myosin.

Biochim. Biophys. Acta, 263, 779-793.

HUEPER, W.C. (1955 a).

Experimental studies in metal cancerigenesis. IV. Cancer produced by parenterally introduced metallic nickel.

J.Nat.Cancer Inst., 16, 55-73.

HUEPER, W.C. (1955b).

Experimental studies in metal cancerigenesis. VII. Tissue reaction to parenterally introduced powdered metallic chromium and chromite ore.

J.Nat.Cancer Inst., 16, 447-469.

HUEPER, W.C. (1963).

Environmental carcinogenesis in man and animals.

Ann. New York Acad. Sci., 108, 963-1038.

HUEPER, W.C. (1967).

Carcinogenic hazards from arsenic and metal containing drugs.

In : "Potential carcinogenic hazards from drugs. Evaluation of risks". R.Truhaut (edt). Springer Verlag (Berlin). U.I.C.C. Monograph series, presenting the proceedings of a symposium held in Paris from 3-6 November 1965., Vol.VII. 249 pages.

HOUK, T.W. et UE, K. (1974).

The measurement of actin concentration in solution : a comparison of methods.

Anal.Biochem., 62, 66-74.

- HUXLEY, H.E. (1963).
Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle.
J.Mol.Biol., 7, 281-308.
- HUXLEY, H.E. (1964).
Structural arrangements and the contraction mechanism in striated muscle.
Proc.Roy.Soc., B160, 442-448.
- HUXLEY, H.E. (1965).
The mechanism of muscular contraction.
Scientific American, 213, 18-27.
- HUXLEY, H.E. (1973).
Structural changes in the actin- and myosin- containing filaments during contraction. In : "The Mechanism of Muscle Contraction".
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 361-376.
- INOUE, S. (1959).
Mobility of cilia and the mechanism of mitosis. In : Biophysical Science. A Study Program. J.L.Oncley (edt), New-York, John Wiley, 402.
- JERVELL, D.F., CHRISTOFFERSEN, T. et MORLAND, J. (1965).
Studies on the 3-methylcholanthrene induction and carbohydrate repression of rat liver dimethylaminoazobenzene reductase.
Arch.Biochem.Biophys., 111, 15-22.
- JOHN, H.A. (1974).
The myosin of developping and dystrophic skeletal muscle.
FEBS Letters, 39, 278-282.
- JOHNSON, W.H. et KAHN, J.S. (1959).
Paramyosin and contraction of "catch muscles".
Science, 130, 160-161.
- KAKULAS, B.A. (1973)
Observations on the etiology of polymyositis. In : "The striated muscle". Monographs in Pathology. Vol. 12, C.M.Pearson et F.K. Mostofi (edts). Williams and Wilkins Company Baltimore, 485-497.
- KAMIYA, N. et KURODA, K. (1965).
Movement of the myxomycete Plasmodium.I. A study of glycerinated models.
Proc.Jap.Acad., 41, 837-841.
- KAR, A.B., KAMBOJ, V.P., GOSWAMI, A. et CHOWDHURY, S.R. (1964).
Studies on a methylcholanthrene induced fibrosarcoma of the rat testis and its response to cadmium.
Acta Biol.Med.German, 13, 209-227.
- KAY, S. et STILL, W.J.S. (1969).
A comparative electron microscopic study of a leiomyosarcoma and bizarre leiomyoma (leiomyoblastoma) of the stomach.
Am.J.Clin.Pathol., 52, 403-413.

- KELLY, A.M. (1971).
Sarcoplasmic reticulum and T-tubules in differentiating rat skeletal muscle.
J.Cell Biol., 49, 335-344.
- KENDRICK-JONES, J., SZENTKIRALYI, E.M. et SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1976).
Regulatory light chains in Myosin.
J.Mol.Biol., 104, 747-775.
- KERCKAERT, J.P. (1977).
Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis.
Anal.Biochem. (in press).
- KLOTZ, C., BERSON, G. et SWYNGHEDAUW, B. (1973).
Etude des protéines myofibrillaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée ou de SDS.
Ann.Bio.Clin., 31, 413-419.
- KNAPPEIS, G.G. et CARLSEN, F. (1968).
The ultrastructure of the M-line in skeletal muscle.
J.Cell.Biol., 38, 202-211.
- KOBAYASHI, N. et OKAMOTO, T. (1974).
Effects of lead oxide on the induction of lung tumors in syrian hamsters.
J.Nat.Cancer Inst., 52, 1605-1610.
- KOMITOWSKI, D. (1968).
(Experimental beryllium conducted bone tumors as a model of osteogenic sarcoma). (en polonais).
Chir.Narzad.Ruchu., 33, 237-242.
- KOMNICK, H., STOCKEM, W. et WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1973).
Cell-Motility : Mechanisms in protoplasmic streaming and ameboid movement.
Intern.Rev.Cytology, 34, 169-249.
- KUNDRAT, E. et PEPE, F.A. (1971)
The M-band. Studies with fluorescent antibody staining.
J.Cell.Biol., 48, 340-347.
- LABKOVSKY, B.M. (1967).
(The effects of magnesium salts on induction of pulmonary adenomas in mice by urethan). (en russe).
Vop.Onkol., 13, 121.
- LAEMMLI, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature, 227, 680-685.
- LANGVAD, E. (1964).
"Imferon" carcinogen or co-carcinogen? Internal factors determining the course of oncogenic virus infection?
Un.Nord.Conca Cancer, 6, 10.
- LASNERET, J. (1967).
Etudes des tumeurs provoquées chez le rat par le virus du sarcome de Moloney.
Bull.Cancer, 54, 193-200.

- LAU, T.J., HOCKETT, R.L. et SUNDERMAN, W.F. (1972).
The carcinogenicity of intravenous nickel carbonyl in rats.
Cancer Res., 32, 2253-2258.
- LEGER, J.J., BERSON, G., DELCAYRE, C., KLOTZ, C., SCHWARTZ, K.,
LEGER, J., STEPHENS, M. et SWYNGHEDAUW, B. (1975).
Heart contractile proteins.
Biochimie, 57, 1249-1273.
- LEHMAN, W., KENDRICK-JONES, J. et SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1973).
Myosin-linked regulatory systems : comparative studies. In : "The
Mechanism of muscle contraction" Cold Spring Harbor Symposia on
Quantitative Biology. Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory.
319-330.
- LEONE, Ph.G. et TAYLOR, H.B. (1973).
Ultrastructure of a benign polypoid rhabdomyoma of the vagina.
Cancer, 31, 1414-1418.
- LEVINE, R.J.C., ELFVIN, M., DEWEY, M.M. et WALCOTT, B. (1976).
Paramyosin in invertebrate muscles.II. Content in relation to
structure and function.
J.Cell Biol., 71, 273-279.
- LIEBNER, E.J. (1976).
Embryonal rhabdomyosarcoma of head and neck in children. Correla-
tion of stage, radiation dose, local control, and survival.
Cancer, 37, 2777-2786.
- LOBLEY, G.E., PERRY, S.V. et STONE, D. (1971).
Structural changes in myosin induced by vitamine E dystrophy.
Nature, 231, 317-318.
- LOCKSHIN, R.A. et BEAULATON, J. (1974).
Programmed cell death. Cytochemical evidence for lysosomes during
the normal breakdown of the intersegmental muscle.
J.Ultrastruct.Research., 46, 43-62.
- LOWEY, S. et COHEN, C. (1962).
Studies on the structure of myosin.
J.Mol.Biol., 4, 293-308.
- LOWEY, S. et RISBY, D. (1971).
Light chains from fast and slow muscle myosins.
Nature, 234, 81-85.
- LUCIS, O.J., LUCIS, R. et ATERMAN, K. (1972).
Tumorigenesis by cadmium.
Oncology, 26, 53-67.
- MAHOUR, G.H., SOULE, E.H., MILLS, S.D. et LYNN, H.B. (1967).
Rhabdomyosarcoma in infants and children : a clinicopathologic
study of 75 cases.
J.Pediatr.Surg., 2, 402-409.
- MARKHAM, R., FREY, S. et HILLS, G.J. (1963).
Methods for the enhancement of image detail and accentuation of
structure in electron microscopy.
Virology, 20, 88-102.

- MARUYAMA, K. (1966).
Effect of β -actinin on the particle length of F-actin.
Biochim.Biophys.Acta., 126, 389-398.
- MASAKI, T. et TAKAITI, O. (1974).
M-protein.
J.Biochem., 75, 367-381.
- MASKAR, N. (1972).
Heterotopisches Gewebewachstum mit bösartiger Degenerierung in den Hoden von Hähnen nach Einspritzung von Zinkchlorid-Lösung.
Acta Anat.(Basel), 81, 68-73.
- MASSON.P. (1956).
Tumeurs humaines.
Maloine, Ed.Paris
- MATHE, G. et AMIEL, J.L. (1963).
La carcinogénèse. III.-Par substances chimiques.
La Revue du Praticien, 13, 1087-1097.
- MATSUDO, H., HODGKIN, N.M. et TANAKA, A. (1974).
Japanese gastric cancer . Potentially carcinogenic silicates (talc) from rice.
Arch.Pathol., 97, 366-368.
- MATSUURA, K. (1974).
(Experimental studies on production of osteosarcoma by beryllium and on effects of irradiation thereon). (en japonais).
J.Jap.Orthop.Ass., 48, 403-418.
- MINKOVITZ, S. (1964).
Multiple carcinomata following ingestion of medicinal arsenic.
Ann.Intern.Med., 61, 296-299.
- MOLONEY, J.B. (1966).
A virus-induced rhabdomyosarcoma of mice.
Nat.Cancer Inst.Monograph, 22, 139-142.
- MOORE, P.B., HUXLEY, H.E. et DEROSIER, D.J. (1970).
Three-dimensional reconstruction of F-actin, thin filaments and decorated thin filaments.
J.Mol.Biol., 50, 279-295.
- MORIMOTO, K. et HARRINGTON, W.F. (1973).
Isolation and composition of thick filaments from rabbit skeletal muscle.
J.Mol.Biol., 77, 165-175.
- MUNGER, B.L. (1958).
A light and electron microscopic study of cellular differentiation in the pancreatic islets of the mouse.
Am.J.Anat., 103, 275
- MUNSAT, T.L. (1973).
Congenital myopathies. In : " The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol. 12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (edts). Williams and Wilkins Company Baltimore, 442-452.

- MURRAY, J.M. et WEBER, A. (1974).
The cooperative action of muscle proteins.
Scientific American, Fevr.1974, 58-71.
- NACHMIAS, V.T. (1973).
Physarum myosin : two new properties. In : "The mechanism of muscle contraction". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.
Vol. 37, Cold Spring Harbor Laboratory, 607-612.
- NAGAI, R. et KAMIYA, N. (1966).
Movement of the myxomycete plasmodium. II. Electron microscopic studies on fibrillar structures in the plasmodium.
Proc.Jap.Acad., 42, 934-939.
- NAMEROFF, M.A., REZNIK, M., ANDERSON, P. et HANSEN, J.L. (1970).
Differentiation and control of mitosis in a skeletal muscle tumor.
Cancer Res. 30, 596-600.
- NEVILLE, D.M. (1971).
Molecular weight determination of proteindodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system.
J.Biol.Chem., 246, 6328-6334.
- OFFER, G. et MOOS.C. (1973).
C-protein and the periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. In : "The mechanism of muscle contraction". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol.37, Cold Spring Harbor Laboratory, 87-95.
- OFFER, G., MOOS, C. et STARR, R.L. (1973).
A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extraction, purification, characterization.
J.Mol.Biol., 74, 653-676.
- O'GORA, R.W. et BROWN, J.M. (1967).
Comparison of the carcinogenic actions of subcutaneous implants of iron and aluminium in rodents.
J.Nat.Cancer Inst., 38, 947-957.
- OSTLUND, R.E., PASTAN, I. et ADELSTEIN, R.S. (1974).
Myosin in cultured fibroblasts.
J.Biol.Chem., 249, 3903-3907.
- OTTOLENGHI, A.D., HASEMAN, J.K., PAYNE, W.W., FALK, H.L. et Mac FARLAND, H.N. (1974).
Inhalation studies of nickel sulfide in mulmonary carcinogenesis of rats.
J.Nat.Cancer Inst., 54, 1165-1172.
- PEARSE, B.M.F. (1975).
Coated vesicles from pig brain : purification and biochemical characterization.
J.Mol.Biol., 97, 93-98.
- PEARSE, B.M.F. (1976).
Clathrin : a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles.
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 73, 1255-1259.

PEARSON, C.M. (1973).

The pathologic features of the periodic paralyses. In : "The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol.12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (edts). Williams and Wilkins Company Baltimore, 427-441.

PECHERE, J.F., DEMAILLE, J., CAPONY, J.P., DUTRUGE, E., BARON, G. et PINA, C. (1975).

Muscular parvalbumins. Some explorations into their possible biological significance. In : "Calcium Transport in Contraction and Secretion". E.Carafoli (ed *et al.*). North Holland Publishing Company, 459-468.

PECHERE, J.F., DERANCOURT, J. et HAIECH, J. (1977).

The participation of parvalbumins in the activation-relaxation cycle of vertebrate fast skeletal muscle.

FEBS Letters, 75, 111-114.

PEDERSEN, E., HØGEVEIT, A.C. et ANDERSEN, A. (1973).

Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway.

Int.J.Cancer, 12, 32-41.

PELFRENE, A. et SHUBIK, P. (1975).

Le talc est-il carcinogène? Revue des données actuelles.

Nouv.Presse Médicale, 4, 801-803.

PEPE, F.A. (1967).

The myosin filament. I. Structural organization from antibody staining observed in electron microscopy.

J.Mol.Biol., 27, 203-225.

PERK, K., SHACHAT, D.A. et MOLONEY, J.B. (1968).

Pathogenesis of a rhabdomyosarcoma (undifferentiated type) in rats induced by murine sarcoma virus (Moloney).

Cancer Res., 28, 1197-1206.

PERRIE, W.T. et PERRY, S.V. (1970).

An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin.

Biochem.J., 119, 31-38.

PERRY, S.V. (1955).

Myosin adenoinetriphosphatase. In : "Methods in Enzymology", Vol.2, S.P.Colowick et N.O.Kaplan (edts) Academic Press New-York, 582-588.

PERRY, S.V. (1977).

Phosphorylation of muscle proteins in relation to regulation.

XXVII Intern. Congr. of Physiol.Sciences. Heidelberg-Louvain Satellite Symposium on excitation-contraction coupling in smooth muscle.

Heidelberg, July 1977.

PERRY, S.V., COLE, H.A., HEAD, J.F. et WILSON, F.J. (1973).

Localization and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex. In : "The Mechanism of Muscle Contraction".

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol.37, Cold Spring Harbor Laboratory, 251-262.

PETRI, M. (1968).

High Incidence of intraperitoneal rhabdomyosarcomas in rats after growth and regression of *Nosema curiculi*-infected Yoshida ascites sarcoma.

Acta Pathol.Microbiol.Scand., 73, 1-12.

PETRYSHYN, R. et NICHOLLS, D.M. (1976).

Protein synthesis in dystrophic muscle. Activity of the pH 5 supernatant fraction of muscle in dystrophic mice.

Biochim.Biophys.Acta, 435, 391-404.

POLLARD, T.D. (1975).

Electron microscopy of synthetic myosin filaments. Evidence for cross-bridge flexibility and copolymer formation.

J.Cell Biol., 67, 93-104.

POLLARD, T.D. et ITO, S. (1970).

Cytoplasmic filaments of *Amoeba proteus*. I. The role of filaments in consistency changes and movement.

J.Cell Biol., 46, 267-289.

PONSOLLE, L., WISSOCQ, J.C. et GALLE, P. (1974).

Etude des inclusions microcristallines dans le proventricule des Syllidiens (*Annelida polychaeta*).

Cytobiologie, 9, 169-179.

PORZIO, M.A. et PEARSON, A.M. (1977).

Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Biochim.Biophys.Acta, 490, 27-34.

POSWILLO, D.E. et COHEN, B. (1971).

Inhibition of carcinogenesis by dietary zinc.

Nature, 231, 447-448.

PRICE, H.M. (1973).

Ultrastructural pathologic characteristics of the skeletal muscle fiber : an introductory survey. In : "The striated muscle". Mono-graphs in Pathology, Vol.12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (eds).

Williams and Wilkins Company Baltimore, 144-184.

RASH, J.E., SHAY, J.W. et BIESELE, J.J. (1969).

Cilia in cardiac differentiation.

J.Ultrastruct.Research, 29, 470-484.

REDDY, J., SVOBODA, D., AZARNOFF, D. et DAWAR, R. (1973).

Cadmium induced Leydig cell tumors of rat testis : morphologic and cytochemical study.

J.Nat.Cancer Inst., 51, 891-903.

REEVES, A.L. (1966).

Lung and lymphnode isozymes during beryllium-induced pulmonary carcinogenesis.

Proc.Amer.Ass.Cancer Res., 7, April (124 pages).

REEVES, A.L., DEITCH, D. et VORWALD, A.J. (1967).

Beryllium carcinogenesis. I. Inhalation exposure of rats to beryllium sulfate aerosol.

Cancer Res., 27, 439-445.

- REEVES, A.L. et VORWALD, A.J. (1967).
Beryllium carcinogenesis. II. Pulmonary deposition and clearance of inhaled beryllium sulfate in the rat.
Cancer Res., 27, 446-451.
- RENGELSON, W., KIM, U., OSPINA, J. et HOLLAND, J.F. (1968).
Hemangioendothelial sarcoma of liver from chronic arsenic intoxication by Fowler's solution.
Cancer, 21, 514-522.
- REZNIK, M. (1973).
Current concepts of skeletal muscle regeneration. In : "The striated muscle". Monographs in Pathology, Vol.12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (eds), Williams and Wilkins Company Baltimore, 185-225.
- REZNIK, M., NAMEROFF, M.A. et HANSEN, J.L. (1970).
Ultrastructure of a transplantable murine rhabdomyosarcoma.
Cancer Res., 30, 601-610.
- RIOPELLE, J.L. et THERIAULT, J.P. (1956).
Sur une forme méconnue de sarcome des parties molles : le rhabdomyosarcome alvéolaire.
Ann.Anat.Path., 1, 88-111.
- ROBBINS, E. et GONATAS, N.K. (1964).
The ultrastructure of a mammalian cell during the mitotic cycle.
J.Cell Biol., 21, 429-463.
- ROE, F.J.C., DUKES, C.E., CAMERON, K.M., PUGH, R.C.B. et MITCHLEY, B.C.V. (1964).
Cadmium neoplasia : testicular atrophy and Leydig cell hyperplasia in rats and mice following the subcutaneous injection of cadmium salts.
Brit.J.Cancer, 18, 674-681.
- ROE, F.J.C., LANCASTER, M.C. (1964).
Natural, metallic and other substances, as carcinogens.
Brit.Med.Bull., 20, 127-133.
- ROURKE, A.W. (1975).
Myosin in developing normal and dystrophic chicken pectoralis. I. Synthesis and degradation.
J.Cell Physiol., 86, 343-352.
- RUBENSTEIN, P.A. et SPUDICH, J.A. (1977).
Actin microheterogeneity in chick embryo fibroblasts.
Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 74, 120-123.
- SALAZAR, H. et TOTTEN, R.S. (1970).
Leiomyoblastoma of the stomach. An ultrastructural study.
Cancer, 25, 176-185.
- SANGER, J.B. (1971).
Formation of synthetic myosin filaments. Influence of pH, ionic strength, cation substitution, dielectric constant, and method of preparation.
Cytobiologie, 4, 450-466.

- SARKAR, K., TOLNAI, G. et MCKAY, D.E. (1973).
Embryonal rhabdomyosarcoma of the prostate. An ultrastructural study.
Cancer, 31, 442-448.
- SAXEN, E.A. (1953).
On the factor of age in the production of subcutaneous sarcomas in mice by 20-methylcholanthrene.
J.Nat.Cancer Inst., 14, 547-569.
- SCHÄFER-DANNEEL, S. (1967).
Strukturelle und funktionelle Voraussetzungen für die Bewegung von *Amoeba proteus*.
Z.Zellforsch., 78, 441-462.
- SCHIAFFINO, S. et MARGRETH, A. (1969).
Coordinated development of the sarcoplasmic reticulum and T-system during postnatal differentiation of rat skeletal muscle.
J.Cell Biol., 41, 855-875.
- SCHLUMBERGER, H.G. et ZACK, G. (1959).
Neoplasia in the parakeet. IV. Transplantable methyl-cholanthrene-induced rhabdomyosarcomas.
Cancer Res., 19, 954-958.
- SCHROEDER, H.A., BALASSA, J.J. et VINTON, W.H. (1964).
Chromium, lead, cadmium, nickel and titanium in mice : effect on mortality, tumors and tissue levels.
J.Nutr., 83, 239-250.
- SELLAKUMAR, A.R., MONTESANO, R., SAFFIOTTI, U. et KAUFMAN, D.G. (1973).
Hamster respiratory carcinogenesis induced by benzo(a)pyrene and different dose levels of ferric oxide.
J.Nat.Cancer Inst., 50, 507-510.
- SELYE, H., GABBIANI, G. et TUCHWEBER, B. (1962).
Tumeurs expérimentales par implant de corps étrangers chimiquement inertes.
Rev.Europ.Cancérologie, 1, 80-91.
- SHABAD, L.M., PYLEV, L.N., KRIVOSHEE, L.V., KULAGINA, T.F. et NEMENKO, B.A. (1974).
Experimental studies on asbestos carcinogenicity.
J.Nat.Cancer Inst., 52, 1175-1187.
- SHAFIQ, S.A., GORYCKI, M.A. et MAURO, A. (1968).
Mitosis during postnatal growth in skeletal and cardiac muscle of the rat.
J.Anat., 103, 135-141.
- SHAMBERGER, R.J. (1970).
Rapport entre le sélénium et le cancer. I. Effet inhibiteur du sélénium sur la carcinogénèse.
J.Nat.Cancer Inst., 44, 931-936.
- SHELLEY, W.B. (1973).
Chondral dysplasia induced by zirconium and hafnium.
Cancer Res., 33, 287-292.

- SHIMADA, Y., FISCHMAN, D.A. et MOSCONA, A.A. (1967).
The fine structure of embryonic chick skeletal muscle cells differentiated *in vitro*.
J.Cell Biol., 35, 445-453.
- SHIVERICK, K.T., HAMBRELL, B.B. et ALPERT, N.R. (1976).
Structural and functional properties of myosin associated with the compensatory cardiac hypertrophy in the rabbit.
J.Mol.Cell Cardiol., 8, 837-851.
- SHIVERICK, K.T., THOMAS, L.L. et ALPERT, N.R. (1975).
Preparation of cardiac myosin : application to hypertrophied myocardium.
Biochem.Biophys.Acta, 393, 124-133.
- SHIZUTA, Y., SHIZUTA, H., GALLO, M., DAVIES, P., PASTAN, I. et LEWIS, M.S. (1976).
Purification and properties of filamin, an actin binding protein from chicken Gizzard.
J.Biol.Chem., 251, 6562-6567.
- SILVERMAN, J.F. et KAY, S. (1976).
Multiple pulmonary leiomyomatous hamartomas. Report of a case with ultrastructure examination.
Cancer, 38, 1199-1204.
- SINKOVICS, J.G., SHIRATO, E., CABINESS, J.R. et MARTIN, R.G. (1970).
Rhabdomyosarcoma after puberty. Clinical, Tissue Culture and immunological studies.
J.Med., 1, 313-326.
- SMALL, J.V. et SOBIESZEK, A. (1973).
The core component of the myosin-containing elements of vertebrate smooth muscle. In : "The Mechanism of Muscle Contraction" Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol.37 , Cold Spring Harbor laboratory, 439-442.
- SMALL, J.V. et SOBIESZEK, A. (1977).
Studies on the function and composition of the 10 nm (100 Å) filaments of vertebrate smooth muscle.
J.Cell Sci., 23, 243-268.
- SOROKIN, S. (1962).
Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells.
J.Cell Biol., 15, 363-377.
- SPUDICH, J.A. (1973).
Effects of cytochalasin B on actin filaments. In : "The Mechanism of Muscle Contraction". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol.37, Cold Spring Harbor Laboratory, 585-593.
- SPUDICH, J.A., HUXLEY, H.E. et FINCH, J.T. (1972).
Regulation of skeletal muscle contraction. II. Structural studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin.
J.Mol.Biol., 72, 619-632.

- SPUDICH, J.A. et WATT, S. (1971).
The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin.
J.Biol.Chem., 246, 4866-4871.
- SRENG, L. et QUENNEDY, A. (1976).
Role of a temporary ciliary structure in the morphogenesis of insect glands. An electron microscope study of the tergal glands of male *Blattella germanica* L (*Dictyoptera*, *Blattellidae*).
J.Ultrastruct.Research., 56, 78-95.
- SROUJI, M.N., DONALDSON, M.H., CHATTEN, J. et KOBLENZER, C.S.(1976).
Perianal rhabdomyosarcoma in childhood.
Cancer, 38, 1008-1012.
- STANTON, M.F. (1974).
Fiber carcinogenesis : is asbestos the only hazard ?
J.Nat.Cancer Inst., 52, 633-634.
- STENBÄCK, F.G., FERRERO, A. et SHUBIK, P. (1973a).
Synergistic effects of diethylnitrosamine and different dusts on respiratory carcinogenesis in hamsters.
Cancer Res., 33, 2209-2214.
- STENBÄCK, F.G., FERRERO, A., MONTESANO, R. et SHUBIK, P. (1973b).
Synergistic effects of ferric oxide on dimethylnitrosamine carcinogenesis in the syrian golden hamster.
Z.Krebsforsch., 79, 31-38.
- STOBBE, G.D. et DARGEON, H.W. (1950).
Embryonal rhabdomyosarcoma of the head and neck in children and adolescents.
Cancer, 3, 826-836.
- STOCKDALE, F. et HOLTZER, H. (1961).
DNA synthesis and myogenesis.
Expt.Cell Res., 24, 508-519.
- STOCKEM, W. (1970).
Die Eignung von Pioloform F für die Herstellung elektronenmikroskopischer Trägerfilme.
Mikroskopie, 26, 185-189.
- STOCKEM, W. et KOMNICK, H. (1970).
Erfahrungen mit der Styrol-Methacrylat-Einbettung als Routine-methode für die Licht- und Elektronenmikroskopie.
Mikroskopie, 26, 199-203.
- STOSSEL, T.P. et HARTWIG, J.H. (1975).
Interactions between actin, myosin, and an actin-binding protein from rabbit alveolar macrophages.
J.Biol.Chem., 250, 5706-5712.
- STOSSEL, T.P., et POLLARD, T.D. (1973).
Myosin in polymorphonuclear leukocytes.
J.Biol.Chem., 248, 8288-8294.

- STOUT, A.P. (1946).
Rhabdomyosarcoma of the skeletal muscles.
Ann.Surg., 123, 447-472.
- STRTER, F.A., GERGELY, J., SALMONS, S. et ROMANNL, F. (1973).
Synthesis by fast muscle of myosin light chains characteristic
of slow muscle in response to long-term stimulation.
Nature New Biology, 241, 17-19.
- STUBBLEFIELD, E. et BRINKLEY, B.R. (1966).
Cilia formation in chinese hamster fibroblasts *in vitro* as a response
to colcimid treatment.
J.Cell Biol., 30, 645-652.
- STUBBLEFIELD, E. et BRINKLEY, B.R. (1967).
Architecture and function of the mammalian centriole. In : "Forma-
tion and Fate of Cell Organelles". K.B.Warren (edt), Academic Press
Inc., New York, 175-217.
- SUNDERMAN, F.W. et DONNELLY, A.J. (1965).
Studies of nickel carcinogenesis. Metastasizing pulmonary tumors
in rats induced by the inhalation of nickel carbonyl.
Am.J.Pathol., 46, 1027-1041.
- SUNDERMAN, F.W., LAU, T.J. et CRALLEY, L.J. (1974).
Inhibitory effect of manganese upon muscle tumorigenesis by nickel
subsulfide.
Cancer Res., 34, 92-95.
- SUTOW, W.W., SULLIVAN, M.P., RIED, H.L., TAYLOR, H.G. et GRIFFITH,
K.M. (1970).
Prognosis in childhood rhabdomyosarcoma.
Cancer, 25, 1384-1390.
- SWYNGHEDAUF, B. et BOUVERET, P. (1970).
L'adenosine triphosphatase et la superprécipitation de l'acto-
myosine du myocarde et du muscle squelettique blanc.
Bull.Soc.Chim.Biol., 52, 721-740.
- SWYNGHEDAUF, B., BOUVERET, P. et HATT, P.Y. (1973).
ATPases of microsomes, mitochondria, plasmamembranes and purified
myofibrils in rabbit's chronic aortic insufficiency.
J.Mol.Cell Cardiol., 5, 441-459.
- SZENT-GYÖRGYI, A. (1949).
Free energy relations and contraction of actomyosin.
Biol.Bull., 96, 140-161.
- TANNENBAUM, M., WEISS, M. et MARX, A.J. (1969).
Ultrastructure of the human mammary ductule.
Cancer, 23, 958-978.
- TAPP, E. (1966).
Beryllium induced sarcomas of the rabbit tibia.
Brit.J.Cancer, 20, 778-783.
- TOKER, C. (1969).
Glomangioma. An ultrastructural study.
Cancer, 23, 487-492.

TRUHAUT, R. (1949).

Les facteurs chimiques de cancérisation.

Biologie Médicale, 38, 1-48.

TURBECK, B.O. (1974).

A study of concentrically laminated concretions, "Spherites", in the regenerative cells of the midgut of lepidopterous larvae.

Tissue and Cell, 6, 627-640.

ULBRECHT, M., GRUBHOFER, N., JAISLE, F. et WALTER, S. (1960).

Die erschöpfende Reinigung von Actin-Präparaten. Zahl und Art der phosphathaltigen prosthetischen Gruppen von G- und F-Actin.

Biochim.Biophys.Acta, 45, 443-459.

VENKATACHALAM, H.A. et GREALLY, J.G. (1969).

Fine structure of glomus tumor : similarity of glomus cells to smooth muscle.

Cancer, 23, 1176-1184.

WALTERS, M. et ROE, F.J.C. (1965).

A study of the effects of zinc and tin administered orally to mice over a prolonged period.

Food Cosmet.Toxicol., 3, 271-276.

WALTON, J.N. (1973).

Progressive muscular dystrophy : structural alterations in various stages and in carriers of Duchenne dystrophy. In : "The striated muscle" Monographs in Pathology, Vol.12, C.M.Pearson et F.K.Mostofi (edts). Williams and Wilkins Company Baltimore, 263-291.

WANG, K., ASH, J.F. et SINGER, S.J. (1975).

Filamin, a new high-molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells.

Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 72, 4483-4486.

WARNER, F.D. (1976).

Cross-bridge mechanisms in ciliary motility : the sliding-bending conversion. In : "Cell Motility" -Book C- Microtubules and related proteins". Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol.3, Cold Spring Harbor Laboratory, 891-914.

WARREN, R.H. (1974).

Microtubular organization in elongating myogenic cells.

J.Cell Biol., 63, 550-567.

WEBB, M., HEATH, J.C. et HOPKINS, T. (1972).

Intranuclear distribution of the inducing metal in primary rhabdomyosarcomata induced in the rat by nickel, cobalt and cadmium.

Brit.J.Cancer, 26, 274-278.

WEBER, H.H. et PORTZEHL, H. (1952).

Kontraktion, ATP-Cyclus und fibrilläre Proteine des Muskels.

Erg.Physiol., 47, 369-468.

WEBER, K. et GROESCHEL-STEWART, U. (1974).

Antibody to myosin : the specific visualization of myosin-containing filaments in non-muscle cells.

Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 71, 4561-4564.

- WEEDS, A.G. et FRANK, G. (1973).
Structural study on the light chains of myosin. In : "The Mechanism of Muscle Contraction" Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol.37, Cold Spring Harbor Laboratory, 9-14.
- WEEDS, A.G., TRENTHAM, D.R., KEAN, C.J.C. et BULLER, A.J. (1974).
Myosin from cross-reinnervated cat muscles.
Nature, 247, 135-139.
- WEICHERT, K.A., BOVE, K.C., ARON, B.S. et LAMPKIN, B. (1976).
Rhabdomyosarcoma in children. A clinicopathological study of 35 patients.
Am.J.Clin.Pathol., 66, 692-701.
- WEINZIERL, S.M. et WEBB, M. (1972).
Interaction of carcinogenic metals with tissue and body fluids.
Brit.J.Cancer, 26, 279-291.
- WELSH, R.A. et MEYER, A.T. (1969).
Ultrastructure of gastric leiomyoma.
Arch.Pathol., 87, 71-81.
- WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E. (1964).
Differentiations of the ground cytoplasm and their significance for the generation of the motive force of ameboid movement.
In : "Primitive motile systems in Cell Biology", R.D.Allen et N. Kamiya, Academic Press New-York, 79-109.
- YAFFE, D. et GERSHON, D. (1967).
The effect of polyoma virus on differentiating multinucleated muscle fibers.
Israel J.Med.Sci., 3, 329-330.
- YASUZUMI, G., SHIRAI, T., NAKAI, Y. et KOSHINO, Y. (1975).
Fine structure of nuclei as revealed by electron microscopy. VIII. Possible origine and function of nuclear bodies appearing in pre-cancerous and degenerating cell nuclei.
Cytobiologie, 11, 30-43.
- YELLIN, H. et GUTH, L. (1970).
The histochemical classification of muscle fibers.
Expt.Neurol., 26, 424-432.
- YOUNG, M. et REES, M.K. (1967).
Studies on the isolation and molecular properties of homogenous globular actin.
J.Biol.Chem., 242, 4449-4457.
- ZAWIRSKA, B. et MEDRAS, K. (1968).
Tumors and disorders of the porphyrin metabolism in rats with chronic experimental lead poisoning. I. Morphologic study.
Zbl. Allg. Path. Path. Anat., 111, 1-12.