

N° d'ordre : 980

50376
1982
85

50376
1982
85

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN PHYSIOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE (3ème cycle)

par

Philippe WION

ÉTUDE DU COUPLAGE MÉCANO-CHIMIQUE DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE CRABE. INFLUENCE DES ANIONS.



Soutenue le 29 juin 1982 devant la Commission d'Examen

M. BISERTE	Professeur à l'Université de Lille II
M. BRULE	Docteur à l'Université de Lille I
M. GUILBAULT	Professeur à l'Université de Lille I
M. KREMBEL	Professeur à l'Université de Lille I
M. ROUSSEAU	Professeur à l'Université de Lille I

**Travail réalisé au laboratoire de Physiologie Cellulaire
de l'Université des Sciences et Techniques de Lille,
Laboratoire associé au CNRS, n° 308.**

AVANT-PROPOS

Le présent travail a été réalisé au laboratoire de Physiologie Cellulaire de l'Université de LILLE sous la direction du Professeur GUILBAULT.

Que Monsieur le Professeur GUILBAULT soit ici remercié pour avoir bien voulu me faire confiance en m'accueillant dans son laboratoire.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur ROUSSEAU, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de mon profond respect et de ma sincère admiration.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur BRULE qui a bien voulu me confier cette recherche. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance pour son enthousiasme à la recherche, et son dévouement total.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur BISERTE, Monsieur le Professeur KREMBEL, d'avoir accepté, malgré leurs nombreuses tâches, de consacrer leur temps et leur compétence à l'examen de mon travail.

Je voudrais enfin remercier l'ensemble des membres du laboratoire, pour leur aide constante et leur sympathie, ainsi que toi Martine pour ta gentillesse permanente et ton aide morale précieuse.

SOMMAIRE

I - INTRODUCTION

II - HISTORIQUE

- 1) Les constituants protéiques des myofibrilles
 - Filament épais
 - Filament fin
- 2) Cinétique de l'interaction Actine-myosine-ATP
- 3) Régulation de l'interaction Actine-myosine-ATP
 - Régulation par le biais de l'actine
 - Régulation par le biais de la myosine
- 4) Fibres musculaires squelettiques de crustacés
 - Type de régulation
 - Influence des anions.

III - TECHNIQUES

- 1) Animaux d'expérience
- 2) Enregistrement de la contraction des myofibrilles
- 3) Isolement des myofibrilles en vue de la mesure de leur activité ATPasique
 - Dosage spectrophotométrique des protéines
 - Détermination de l'activité ATPasique
- 4) Solutions
- 5) Détermination de l'activité des ions calcium (Ca^{++}) dans les solutions.

IV - RESULTATS

- 1) Structure et composition protéinique des myofilaments.
- 2) Activité ATPasique et contraction en conditions de référence et expression des résultats.

- 2-1 Détermination de la concentration optimale d'ATP.
 - 2-2 Activité ATPasique en fonction de l'activité du calcium (${}^a\text{Ca}^{++}$).
 - 2-3 Activité APTasique en fonction du temps de stockage des myofilaments dans une solution de KCl 0.1 M.
 - 2-4 Contraction des myofibrilles en fonction de ${}^a\text{Ca}^{++}$.
 - 2-5 Corrélacion entre l'activité ATPasique et la tension mécanique.
 - 2-6 Conclusion.
- 3) Effet du remplacement des ions Cl^- par différents anions.
- 3-1 Influence des ions CH_3COO^- .
 - 3-1-1 Ion CH_3COO^- et activité ATPasique des myofilaments en fonction de pCa.
 - a) Myofilaments stockés en KCl 0,1 M.
 - b) Myofilaments stockés en KCH_3COO 0,1 M.
 - 3-1-2 Ion CH_3COO^- et contraction des myofibrilles en fonction de ${}^a\text{Ca}^{++}$.
 - 3-1-3 Corrélacion entre l'activité ATPasique et la tension.
 - 3-1-4 Conclusion.
 - 3-2 Influence des ions $\text{CH}_3\text{O SO}_3^-$.
 - 3-2-1 Ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ et activité APTasique des myofilaments en fonction de pCa.
 - a) Myofilaments stockés en KCl 0,1 M.
 - b) Myofilaments stockés en KCH_3OSO_3 0,1M.
 - 3-2-2 Ion $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ et contraction des myofibrilles en fonction de ${}^a\text{Ca}^{++}$.
 - 3-2-3 Corrélacion entre l'activité APTasique et la tension.
 - 3-2-4 Conclusion.
 - 3-3 Influence des ions NO_3^- .
 - 3-3-1 Ions NO_3^- et activité ATPasique des myofilaments en fonction de la pCa.
 - a) Myofilaments stockés en KCl 0,1 M.
 - b) Myofilaments stockés en KNO_3 0,1 M.

3-3-2 Ion NO_3^- et contraction des myofibrilles en fonction de $^a\text{Ca}^{++}$.

3-3-3 Conclusion.

V - RESUME ET CONCLUSION GENERALE

A) Activité ATPasique

a) Protéines stockées dans le KCl 0,1 M.

b) Protéines stockées en milieux anormaux.

B) Tension mécanique.

C) Relation entre Activité ATPasique-Tension.

INTRODUCTION

Le couplage excitation-contraction des fibres musculaires est généralement décomposé en deux phases : l'une concerne le couplage électro-calcique, c'est-à-dire les phénomènes intervenant entre l'excitation et la libération de Ca^{++} des réservoirs internes constitués par le réticulum sarcoplasmique ; l'autre le couplage mécano-chimique correspondant à la transformation de l'énergie chimique libérée au cours de l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Si les différents événements responsables du couplage mécano-chimique des fibres musculaires striées squelettiques sont connus, par contre les processus physicochimiques impliqués sont encore, à l'heure actuelle, du domaine de l'hypothèse.

Au niveau de la fibre musculaire striée squelettique de crabe, l'étude de l'activité ATPasique et de la contraction des myofibrilles isolées en relation avec leur environnement ionique, ont fait l'objet d'un mémoire de thèse (BRULE, 1978). Ce mémoire a permis la mise en évidence, dans les mécanismes mécano-chimiques, d'optima de concentration pour les ions Ca^{++} et Mg^{++} , du rôle activateur des ions Na^+ ou K^+ , et a permis d'attirer l'attention sur l'influence de l'environnement anionique au niveau de ce couplage.

Notre travail a consisté à poursuivre et à mieux définir les effets des anions sur ce couplage mécano-chimique.

La première partie de ce mémoire porte sur l'étude de la composition en protéines des myofibrilles, de façon à déterminer à quel type de fibre musculaire la fibre de Crabe s'apparente.

La deuxième partie concerne l'étude de la relation liant l'activité ATPasique à la contraction des myofibrilles placées dans des conditions dites de référence, c'est-à-dire en présence d'ions chlorure.

La troisième partie concerne les modifications des caractéristiques enzymatiques et mécaniques lors d'un remplacement total ou partiel des ions Cl^- par des ions acétate (CH_3COO^-), méthylsulfate ($\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$) ou nitrate (NO_3^-).

Enfin, une dernière partie concerne la conclusion générale des différents résultats qui sont présentés et discutés au fur et à mesure de leur énoncé.

Avant d'aborder l'exposé des résultats, il est donné une revue bibliographique concernant la composition des myofibrilles et, dans leur grande ligne, les différents processus impliqués dans le couplage mécano-chimique.

HISTORIQUE

1) Les constituants protéiques des myofibrilles.

En 1939, ENGEIARDT et LUBIMOVA trouvent que la myosine possède une activité enzymatique en présence d'ions Ca^{++} . Cependant ce n'est qu'à partir des années 1940-1947 que les expériences de SZENT-GYÖRGI permettent de mieux comprendre les relations liant les myofibrilles à leur contraction. Cet auteur découvre que les myofibrilles sont en fait constituées de myosine et d'actine.

La myosine et l'actine représentent environ 80 % des protéines contractiles. Depuis les premiers travaux de SZENT-GYÖRGI, d'autres protéines musculaires ont été identifiées telles que : la tropomyosine (TM) et la troponine (TN) (EBASHI et ENDO, 1968), l' α actine et la β actine, la protéine C (MANNHERZ et GOODY, 1976), la protéine M, la titine, la desmine (WANG et al., 1979), la protéine de la ligne Z (OHASHI et MARUYAMA, 1979).

Toutefois, les protéines qualifiées d'essentielles, et dont le rôle est aujourd'hui précisé sont au nombre de quatre :

- . La myosine, qui est concentrée au niveau des gros filaments (bande anisotrope du sarcomère : bande A).

- . L'actine, la tropomyosine et la troponine, qui forment les filaments fins (bande isotrope, pénétrant plus ou moins profondément dans la bande A).

a) Filaments épais (myosine).

La myosine, principale protéine contractile, est formée par une molécule asymétrique comportant une tête globulaire. Elle possède deux chaînes lourdes de poids moléculaire élevé, auxquelles sont associées de façon covalente des chaînes légères. Les études de fragmentations protéolitiques de la myosine ont permis d'obtenir d'importantes informations sur sa structure (LOWEY et al., 1969) (Fig. 1).

Ces auteurs observent que la myosine brièvement soumise à l'action de la trypsine est coupée au niveau de liaisons peptidiques particulières,

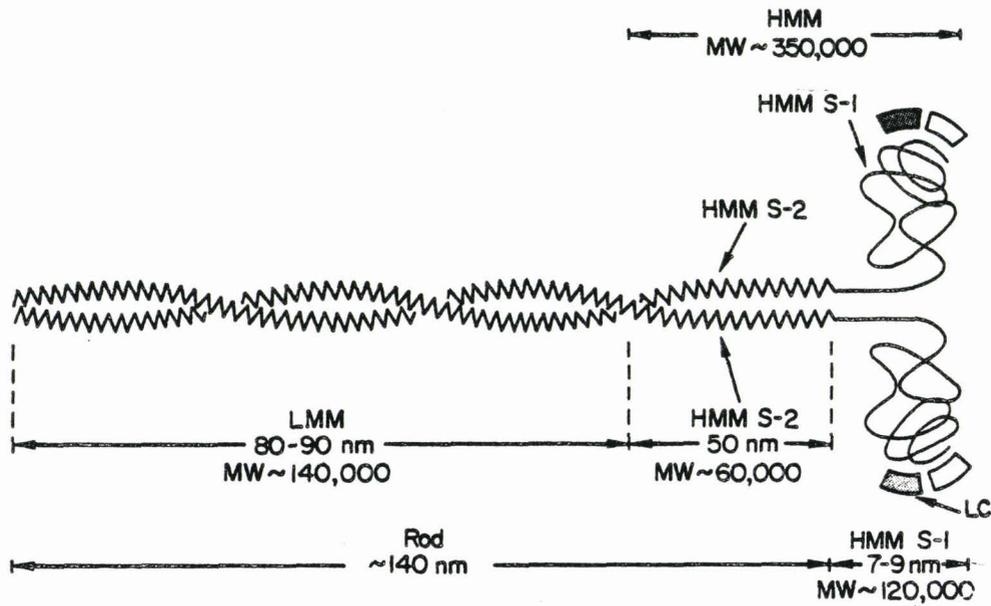


Figure 1

Représentation schématique de la structure de la myosine. HMM, méromyosine lourde ; LMM, méromyosine légère ; S-1, sous-fragment 1 ; S-2, sous-fragment 2 ; LC, chaînes légères (d'après DANCKER, 1977).

situées à peu près au milieu de la queue de la molécule donnant un fragment lourd et un fragment léger appelés respectivement méromyosine lourde (HMM) et méromyosine légère (LMM). De plus, si la méromyosine lourde est elle-même soumise à l'action de la papaïne, deux fragments sont alors obtenus et en particulier le fragment S1 au niveau duquel se trouvent les chaînes légères de la myosine (LC) impliquées dans l'activité ATPasique et dans la capacité d'interagir avec l'actine. De plus, il existe deux protéines majeures pour le système phosphorylant : la kinase et la phosphatase, toutes deux situées au niveau de la chaîne légère.

La kinase est un enzyme hautement spécifique dont l'activité est dépendante du calcium, mais indépendante des nucléotides cycliques. Cet enzyme a été isolé du muscle squelettique (NAIRN et PERRY, 1979), cardiaque (FREARSON et PERRY, 1975), du muscle lisse et de cellules "non musculaires" (DABROWSKA et HARTSHORNE, 1978). Cette kinase est composée de deux protéines : - la première est une chaîne lourde, responsable de la spécificité de l'enzyme, qui ne peut que catalyser la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine ; - la seconde plus légère est la protéine liant le calcium : la calmoduline.

La phosphatase "déphosphoryle" la chaîne légère de la myosine de façon spécifique. Toutefois, son activité n'apparaît pas être dépendante du calcium.

La myosine seule provoque l'hydrolyse du groupement phosphore terminal de l'ATP, mais son activité enzymatique est relativement faible. En présence d'actine, par contre, cette hydrolyse de l'ATP augmente de plus de 20 fois car l'actine, sous sa forme filamenteuse accroît la quantité d'ATP liée à la myosine sous la forme de myosine-ADP-Pi (OFFER et al., 1972).

b) Filaments fins (Actine-tropomyosine-troponine).

Principal constituant des filaments fins (60 %), l'actine, simple

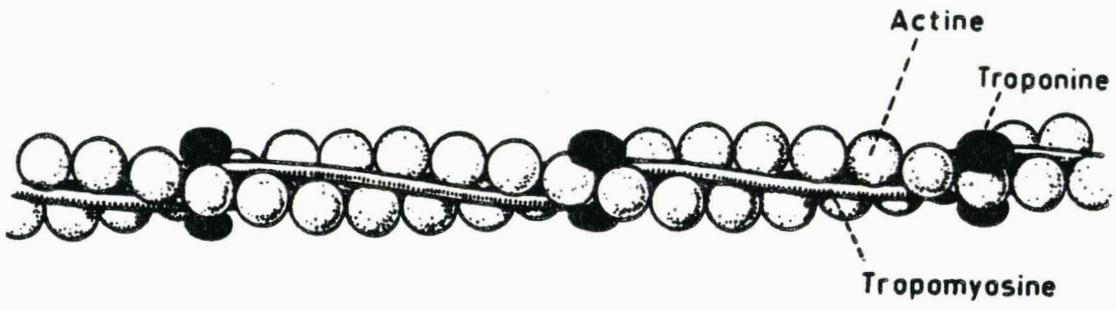


Figure 2

Structure moléculaire du filament fin ; le diamètre du "globule" d'actine est de 5,5 nm environ (d'après EBASHI et ENDO, 1968).

chaîne protéique contenant 376 acides-aminés (WEIHING et KORN, 1972), se présente sous deux formes : actine G (globulaire) et actine F (fibreuse) ; cette dernière est un polymère d'actine G.

De fait, l'actine et la myosine sont les éléments nécessaires et suffisants pour opérer la transduction de l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique. Cependant le contrôle de la contraction musculaire par le calcium dépend d'un groupe de protéines régulatrices qui sont associées au filament d'actine, ce groupe comprend la tropomyosine (TM) et le complexe troponine (TN) formé de trois sous-unités (EBASHI et ENDO, 1968) (Fig. 2).

Les rapports stoechiométriques des divers composants du filament fin montrent qu'une unité est constituée de 7 molécules d'actines G pour une molécule de tropomyosine et de troponine (POTTER et GERGELY, 1974).

- La tropomyosine est une molécule polaire de forme allongée (410 Å de long) dont le poids moléculaire est de l'ordre de 70 000 daltons. Elle est composée de deux chaînes polypeptidiques enroulées en hélice α et est associée au filament d'actine. Toutefois, la tropomyosine extraite de muscles de vertébrés n'a pas toujours une même structure, en ce sens qu'elle peut être formée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (CUMMINS, 1979).

- La troponine est un complexe protéinique composé de 3 sous-unités, qui régule l'activité contractile dans les muscles de vertébrés (TNI, TNT, TNC).

- La TNI (Troponin-inhibiting subunit) est une molécule basique. Tout le long de cette molécule se trouvent des résidus hydrophobes dont deux représentent respectivement le site de liaison à l'actine et le site d'interaction avec la TNC. La fonction essentielle de la TNI est d'inhiber l'interaction actine-myosine en relation avec la tropomyosine et le remaniement des sous-unités de la troponine (PERRY et al. 1972). Ainsi EATON et al. en 1976 montrent que la tropomyosine, seule, inhibe 50 à 60 % de l'interaction actine-

myosine alors que l'addition de TNI élève cette inhibition à 100 %, en augmentant l'affinité de la tropomyosine pour la F. actine.

- La TNT (Tropomyosin-binding subunit) est la sous-unité la plus basique dont le site de liaison de la tropomyosine a pu être localisé au niveau de N terminal (CASPAR et al., 1969). La fonction de la TNT est de connecter le complexe TNC-TNI au filament d'actine, ce qui confère la sensibilité calcique à l'interaction actine-myosine.

- La TNC (Troponin-calcium binding subunit) est la sous-unité la plus acide car elle possède une grande quantité de résidus d'acide aspartique et glutamique (LOWEY et al. 1969 ; COLLINS, 1974). Seule cette sous-unité de troponine lie le calcium. POTTER et GERGELY en 1974 proposent un modèle dans lequel la TNC possède 6 sites liant les ions Ca^{++} ou Mg^{++} , ces sites pouvant être regroupés en 3 paires. Une paire de sites liant exclusivement le magnésium, une autre exclusivement le calcium, et une dernière liant de façon compétitive le calcium et le magnésium. Ainsi l'ion Mg^{++} affecte l'affinité de l'ion Ca^{++} pour la TNC.

2) Cinétique de l'interaction actine-myosine-ATP.

Le calcium, par l'intermédiaire de la TNC, active l'ATPase de la myosine qui hydrolyse l'ATP, ce qui permet la libération de l'énergie nécessaire à la contraction.

Actuellement, deux modèles permettent d'expliquer les différentes phases de la cinétique enzymatique. Le plus classique, celui de LYMN et TAYLOR (1971), fournit un mécanisme possible pour le cycle dissociation-association de la myosine à l'actine. L'autre modèle (modèle de l'état réfractaire modifié), découlant en fait du modèle de LYMN et TAYLOR, s'appuie sur des considérations expérimentales récentes effectuées par STEIN et al. en 1980. Si pour LYMN et TAYLOR, le phosphore inorganique (Pi) libéré est l'étape lente du cycle, pour STEIN et al., c'est la présence d'une étape de transition

entre un état réfractaire et un état non réfractaire qui régule la cinétique (Fig. 3).

L'hydrolyse de l'ATP en ADP et Pi en présence d'actomyosine comprend essentiellement 4 étapes : - une étape de liaison de l'actine à la myosine et au nucléotide ATP ; - une étape de dissociation de l'actine du complexe myosine-ATP ; - une étape d'hydrolyse de l'ATP et de réassociation de l'actine ; - une étape de libération des produits d'hydrolyse (ADP, Pi).

1ère étape :

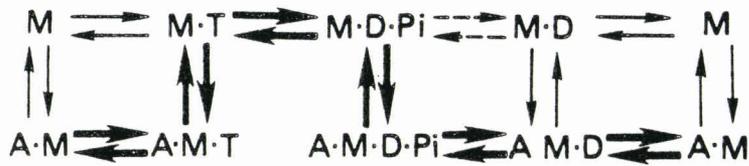
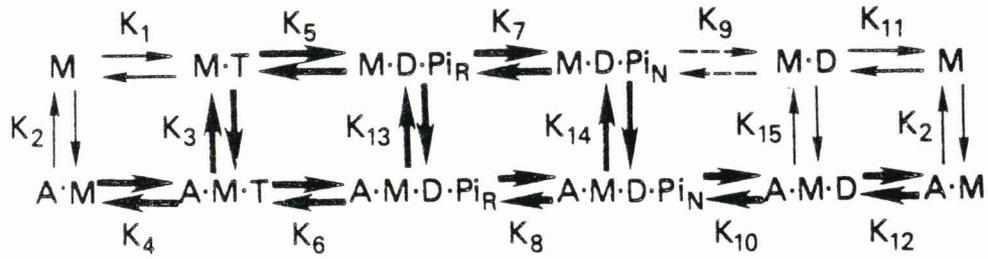
La sous-unité S_1 de la myosine (Fig. 1) se lie à l'actine avec une constante de liaison K_2 de 10^7 à 10^8 M^{-1} (WHITE et TAYLOR, 1976 ; GREENE et EISENBERG, 1980). Après cette liaison de l'actine à la myosine une chute très importante de l'énergie libre est observée in vivo, elle correspond à la liaison de l'ATP à l'actomyosine (DAWSON et al., 1978). La constante d'équilibre de l'ATP à l'actomyosine (K_4) est de l'ordre de 10^7 M^{-1} (MARSTON et WEBER, 1975). Comme pour la liaison de l'ATP à la myosine, la liaison de l'ATP au complexe acto-myosine se déroule probablement en deux étapes avec la formation d'un intermédiaire qui est suivi par une modification de conformation moléculaire (SLEEP et TAYLOR, 1976).

2ème étape :

Cette étape concerne la dissociation de l'actine du complexe acto-myosine-ATP (K_3). Cette dissociation se produit parce que la liaison de l'ATP au niveau de la tête de la myosine affaiblit la liaison actine-myosine.

3ème étape :

Cette étape concerne le clivage initial de l'ATP (sans libération des produits), attaché à la HMM (chaîne lourde de la myosine), en ADP et Pi (K_5), et la réassociation de l'actine au complexe myosine-ADP-Pi.

Lymn and Taylor Model:**Modified Refractory State Model:**Figure 3

Cinétique de l'hydrolyse de l'ATP par la myosine (M) et l'actomyosine (AM) suivant deux modèles, celui de LYMN et TAYLOR et celui de l'état réfractaire modifié de STEIN et al. T, ATP ; D, ADP ; Pi, Phosphate inorganique.



Dans le modèle d'état réfractaire modifié, l'hydrolyse de l'ATP peut se réaliser par le biais de la myosine ou de l'acto-myosine. Ainsi, SLEEP et HUTTON (1978) en mesurant le clivage initial de Pi en présence d'actine, suggèrent que cette étape peut être aussi rapide, que S_1 soit ou non attaché à l'actine ($K_5 \approx K_6$).

4ème étape :

Cette étape concerne la libération du Pi puis de l'ADP du complexe AM-ADP-Pi.

LYMN et TAYLOR suggèrent que cette étape entraînant la libération de Pi est lente. Pour STEIN et al. (1980), c'est l'étape de transition $AM-D-Pi_r \rightleftharpoons AM-D-Pi_n$ qui est lente.

En conclusion, les caractéristiques de ces schémas amènent à penser que la liaison de l'ATP à la myosine dans le complexe acto-myosine cause une dissociation rapide de l'actine et de la myosine, suivie par le clivage initial de l'ATP qui donne le complexe M-ADP-Pi qui se décompose lentement pour donner les produits de la réaction en absence d'actine. Par contre, la réassociation de l'actine avec le complexe amène une libération rapide des produits, ceci représentant en fait la base de l'activation de l'ATPase de la myosine par l'actine.

La nature cyclique (association-dissociation) explique l'interaction des "cross-bridges" entre la myosine et l'actine. Les modifications des "cross-bridges" ont pu être étudiées par les techniques de diffraction aux rayons X et de microscopie électronique (REEDY et al., 1965). Ces études ont permis de mettre en évidence une modification de l'angle des "cross-bridges" passant de l'état d'"attachement" à l'état relaxé. Ces changements d'angle ont été pris en compte dans le modèle de LYMN et TAYLOR. Ainsi le changement de 45° à 90° (état relaxé), est supposé correspondre au clivage initial de l'ATP par la myosine et le changement de 90° à 45° (état d'"attachement") correspondre à l'activation par l'actine lors de la libération de l'ADP et du Pi.

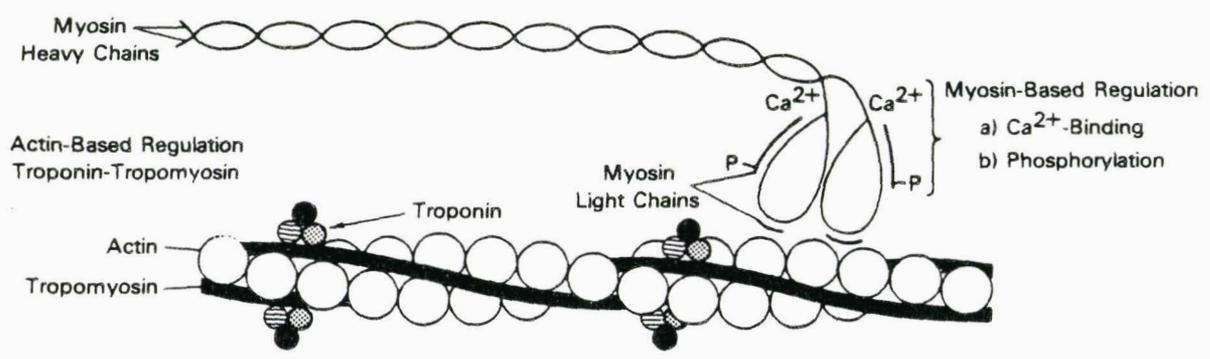


Figure 4

Représentation des trois principaux systèmes de régulation (d'après ADELSTEIN et EISENBERG, 1980).



3) Régulation de l'interaction actine-myosine-ATP.

Le mécanisme régulateur dominant dans le muscle squelettique de vertébrés et le muscle cardiaque est basé sur l'actine, celui basé sur la myosine jouant un rôle important dans les muscles de mollusques et les muscles lisses de vertébrés (Fig. 4). Il faut cependant signaler que, certaines fibres contiennent à la fois les deux systèmes régulateurs basés sur l'actine et sur la myosine (SZENT-GYÖRGI, 1975).

- Régulation par le filament fin :

Dans les muscles cardiaques et squelettiques de vertébrés, l'activité de l'ATPase de la myosine purifiée est très faible en absence d'actine. L'addition d'actine augmente l'hydrolyse de 100 à 200 fois, cela même en absence de calcium. La régulation est imposée par addition de tropomyosine et de troponine qui se lient au filament d'actine (WEBER et MURRAY, 1973).

En absence d'ions Ca^{++} ($< 10^{-7}\text{M}$), la tropomyosine occupe avec la troponine une position excentrique qui recouvre la région de l'actine contenant le site réactionnel pour la myosine. Il y a donc un empêchement stérique à l'interaction actine-myosine. Cette situation résulte du fait que la TNI maintient la TM dans cette position excentrique grâce à sa haute affinité pour l'actine. Par contre, en présence d'une concentration d'ions Ca^{++} supérieure à 10^{-7}M , la diminution de l'affinité de la TNI pour l'actine permet à la TM d'occuper sa position "naturelle", c'est-à-dire dans la gorge du filament d'actine. Ce déplacement découvre alors le flanc du filament d'actine et permet ainsi son interaction avec la myosine.

- Régulation par le filament épais :

Cette régulation est envisagée pour 2 types de muscles, l'un correspond aux muscles de mollusques, l'autre aux protéines contractiles isolées du muscle lisse et des cellules autres que les fibres musculaires.

Les muscles de mollusques contiennent au niveau de la myosine une chaîne légère spécifique qui inhibe, en absence de calcium, l'ATPase de la myosine activée par l'actine. Ainsi, lorsque la concentration de calcium atteint 10^{-5} M, l'ion Ca^{++} se fixe directement à la myosine, et lève l'inhibition (SZENT-GYÖRGI, 1975). Ce type de régulation, qui a été décrit pour le muscle de la coquille Saint-Jacques, est le seul qui ne demande pas de modifications covalentes ou l'addition de protéines séparées pour être dépendant du calcium.

La myosine isolée de nombreux muscles lisses tels que le gésier (SOBIESZEK et SMALL, 1977) et l'utérus (LEBOWITZ et COOKE, 1979) nécessitent la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine pour que l'activation de l'ATPase de la myosine par l'actine puisse se réaliser. Le calcium se liant à la calmoduline régule ce système par le biais de la kinase qui catalyse la phosphorylation de la myosine.

En conclusion de tous ces types de régulation, il apparaît que la liaison du calcium aux protéines contractiles est de première importance dans la contraction musculaire. Ainsi, une augmentation de l'activité de Ca^{++} de 10^{-7} à 10^{-5} M est nécessaire pour initier l'activation de l'ATPase de la myosine par l'actine, et ceci dans tous les systèmes décrits, soit par liaison avec la TNC (muscle squelettique et cardiaque), la calmoduline (muscle lisse et cellules "non musculaires"), ou encore avec la myosine (mollusques).

4) Fibres musculaires de crustacés

En 1975, LEHMAN et SZENT-GYÖRGI montrent qu'au niveau du muscle squelettique de crabe, la régulation calcique se situe au niveau du filament fin, par contre en 1977, LEHMAN à la suite de nouvelles expériences est amené à conclure que celle-ci est située au niveau du filament épais (myosine). Cependant cet auteur admet que suivant les conditions expérimentales, l'un ou l'autre type de régulation peut s'affirmer.

De plus, outre l'intervention des ions Ca^{++} dans la régulation de l'interaction actine-myosine-ATP, il est nécessaire de considérer d'autres facteurs dont le rôle est loin d'être négligeable, tels que le pH, la force ionique, la concentration en ions Mg^{++} , ATP, cations monovalents (Na^+ , K^+) et anions. Le rôle important des facteurs pH, force ionique, concentrations en ions Mg^{++} , ATP et cations monovalents, dans l'hydrolyse de l'ATP et le développement de la tension mécanique, a été mis en évidence par de nombreux auteurs tant au niveau de la fibre squelettique de crabe (PORTZEHL et al., 1969 ; DE VILLAFRANCA et FRIEDMAN, 1975 ; BRULE, 1978), de balane (ASHLEY et MOISESCU, 1977), qu'au niveau de la fibre cardiaque (FENNER et al., 1973) ou de vertébré (STRZELECKA-GOLASEZWSKA, 1978 a et b ; TANAKA et TANAKA, 1979). Cependant, peu de travaux relatifs à l'influence des anions ont été réalisés sur les fibres de crustacés, si ce n'est ceux de ASHLEY et MOISESCU (1977) et de BRULE (1978).

L'influence d'anions sur différentes ATPases est cependant bien établie. En effet, de nombreux travaux mettent très clairement en évidence le rôle activateur ou inhibiteur des anions au niveau de différentes ATPases tels que : celle des branchies (HO et CHANG, 1980); celle de la mitochondrie (EBEL et LARDY, 1974 ; SANTIAGO et al., 1980 ; LOPEZ-ZABALZA, 1980 ; SUZUKI, 1980) ; celle des vésicules synaptiques de l'organe électrique de la torpille (ROTHLEIN et PARSONS, 1980). Cette même influence est retrouvée par WAREN et al. (1966), SEIDEL (1969), puis par JACOBS et GUTHE (1970) au niveau des myofibrilles du psoas de lapin. Ces auteurs montrent que l'activité ATPasique et la contraction des myofibrilles dépendent de l'espèce anionique. Plus récemment au laboratoire, les travaux de BRULE (1978), BRULE et al. (1980), WION (1980) ont également mis en évidence l'importance de quelques anions dans le développement de la contraction et dans l'activation de l'ATPase des myofibrilles de crabe.

TECHNIQUES

1) Animaux d'expérience

Les expériences sont réalisées à partir de myofibrilles de fibres musculaires squelettiques isolées des pattes locomotrices (péripodés Pe1, Pe2, Pe3) du crabe *carcinus maenas*. Les animaux proviennent des côtes de la mer du Nord et sont fournis régulièrement au laboratoire. Ils sont conservés en vie dans une eau de mer régulièrement renouvelée et maintenue à basse température (de l'ordre de 10°C).

2) Enregistrement de la contraction des myofibrilles

La fibre isolée, dont le diamètre varie de 100 à 400 μm et la longueur de 3000 à 10 000 μm , est obtenue par section, sous contrôle binoculaire, des fibres voisines ainsi que des nombreux filets nerveux. Cette fibre isolée reste solidaire, d'un côté, d'une petite surface de carapace et, de l'autre, d'une portion d'endosquelette (l'apodème). La dissection est effectuée, sous contrôle binoculaire, dans le liquide physiologique (ASW), dont la composition, en mM, donnée par FATT et KATZ (1953) est : NaCl, 513 ; KCl, 12,9 ; CaCl_2 , 11,8 ; MgCl_2 , 23,6 ; $\text{CO}_3 \text{HNa}$, 2,6. La fibre, une fois isolée, est placée dans une petite cuve remplie de ce liquide physiologique (pH 7,8). Dans cette cuve en plexiglass d'une contenance de 1 ml, la fibre est maintenue à une de ces extrémités (côté de la carapace), par une machoire de plexiglass, l'autre extrémité (apodème) est reliée par un petit crochet à la tige d'un transducteur, constitué par une cellule U15P (ancienne tête de lecture d'électrophone). La fibre, avant tout traitement, est amenée à sa longueur d'équilibre (l_0) ; l_0 représente la longueur maximale pour laquelle est décelée la plus faible tension au niveau du transducteur (de l'ordre de 2 mg). La fibre est alors étirée de 25 % à partir de cette longueur d'équilibre, l_0 . Dès lors, "les myofibrilles isolées" sont obtenues selon la méthode mise au point par BRULE et GUILBAULT (1975).

La fibre est soumise à ASW dépourvu de calcium et de magnésium et auquel est ajouté de l'EDTA. Ce traitement est réalisé dans le but d'éliminer tout le calcium de la fibre. Dans un second temps la fibre est traitée par une solution hypertonique de glycérol afin de réaliser le découplage entre l'excitation et la contraction (BOLZER, 1961 ; RAPOPORT et al., 1968) et de détruire "fonctionnellement" les systèmes membranaires. La fibre est finalement mise dans une solution relaxante qui permet le relâchement complet des myofibrilles. A la suite de ces divers traitements la fibre musculaire ne présente que des myofibrilles fonctionnelles (BRULE, 1978).

3) Isolement des myofibrilles en vue de la mesure de leur activité ATPasique

La technique de préparation des myofibrilles isolées est celle décrite par PERRY et GREY (1956) et HOTTA et BOWEN (1970), adaptée par BRULE (1978) aux fibres de crabe. Les fibres musculaires sont homogénéisées dans un broyeur (virtis 23). Des centrifugations successives dans diverses solutions permettent l'obtention d'un culot final renfermant essentiellement des protéines contractiles comme en atteste l'examen biochimique et de microscopie électronique (BRULE, 1978). Dans les conditions normales, elles sont conservées dans une solution de KCl 0,1M. Dans le cas où est étudiée l'influence d'une espèce anionique, elles sont alors placées dans une solution du sel de potassium correspondant (KCH_3COO , KCH_3OSO_3 , KNO_3).

- Dosage spectrophotométrique des protéines :

la quantité de protéines myofibrillaires présente en suspension est dosée par une méthode colorimétrique dérivée de celle de LOWRY et al., 1951. La lecture s'effectue au spectrophotomètre à 750 nm ceci 30 min après établissement à l'obscurité de la coloration bleue spécifique des protéines en présence du réactif de Folin. Pour chaque série de dosages une courbe étalon est réalisée en partant d'une solution de B.S.A. (Bovin Sérum Albumine) à 500 μ /ml en présence de 0,05 ml de KCl 0,1M pH 6,8, et ce, dans le but de conserver une concentration ionique identique à celle de la suspension de myofibrilles

- Détermination de l'activité ATPasique :

l'activité ATPasique de ces suspensions myofibrillaires est déterminée par la mesure de la quantité de Pi libérée au cours de l'hydrolyse de l'ATP par les myofilaments. Une coloration bleue apparaît en ajoutant dans le mélange final de l'amidol. En 1 heure, à l'obscurité, la coloration est établie, et ainsi le dosage du Pi est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre réglé sur une longueur d'onde de 725 nm. Comme pour les protéines, une courbe étalon est réalisée en partant d'une solution de KH_2PO_4 .

4) Solutions

Les protéines contractiles en suspension ou les myofibrilles isolées sont mises en présence d'une solution dont le contenu ionique donné par BRULE (1978) constitue le milieu de référence, à savoir : Ca^{++} , 1 mM ; Mg^{++} , 7 mM ; Na^+ , 54 mM ; ATP^{--} , 4 mM et Cl^- , 172 mM. Dans un premier temps, à partir de ce milieu l'influence de l'activité des ions Ca^{++} ($a_{\text{Ca}^{++}}$) est étudiée sur l'activité ATPasique et la contraction des myofibrilles. Dans un deuxième temps, est étudiée selon le même protocole, l'influence des ions Ca^{++} dans le milieu où les ions Cl^- sont totalement ou partiellement remplacés par les ions NO_3^- , $\text{CH}_3\text{-O-SO}_3^-$, ou CH_3COO^- .

5) Détermination de l'activité des ions calcium ($a_{\text{Ca}^{++}}$) dans les solutions

La détermination de l'activité des ions Ca^{++} des diverses solutions utilisées est réalisée à partir d'une mesure potentiométrique (ionanalyseur orion research microprocessor). L'électrode de mesure est très spécifique. Ainsi, pour une variation de dix fois la concentration de Ca^{++} elle répond par une variation de potentiel de 29 mV, il s'agit donc bien d'une électrode réversible aux ions Ca^{++} . L'électrode mesure fidèlement $a_{\text{Ca}^{++}}$ pour des valeurs comprises entre $5 \cdot 10^{-7}$ à 10^1 M. L'étalonnage de l'électrode est obtenu à partir de trois solutions de CaCl_2 dont l'activité de calcium est connue. Dès lors, la

détermination de l'activité des ions Ca^{++} dans différentes solutions peut être effectuée.

Toutefois, les électrodes de mesure ne sont pas exclusivement sensibles au calcium, ainsi l'ion Mg^{++} peut interférer et causer de ce fait une erreur de l'ordre de 10 % dans la détermination de l'activité des ions Ca^{++} . Cependant, cette interférence n'est significative que lorsque l'ion Mg^{++} est présent dans la solution à une concentration 1000 fois supérieure à celle de Ca^{++} . Comme dans les conditions expérimentales, la plus forte variation de concentration entre l'ion Mg^{++} et Ca^{++} est de l'ordre de 500 ; il est concevable de considérer que les très faibles activités de Ca^{++} déterminées dans ces conditions sont satisfaisantes.

RESULTATS

1) Structure et composition protéinique des myofilaments.

En 1970, MATHIEU sur la fibre musculaire striée squelettique de crabe, montre par une étude microscopique que l'espace myofibrillaire est comparable à la "Fibrillenstruktur" décrite par KRÜGER (1949) à propos des muscles rapides de vertébrés. Toutefois, même si l'organisation classique de l'actine et de la myosine donne la striation connue, il apparaît un désynchronisme net de la striation entre les myofibrilles voisines, voir même une obliquité des bandes à l'intérieur d'une même myofibrille.

Sur des fibres "glycérinées", où il n'existe plus de structure membranaire de soutien (DELORME 1977 voir BRULE 1978), la tension développée passe par un maximum et se maintient durant quelques temps (de l'ordre de la minute) ; il n'est pas possible de la maintenir plus longtemps car il y a en effet rupture de la préparation. Cette rupture pourrait s'expliquer par un état de rigor des myofibrilles isolées, car lors de l'isolement de la préparation, elles se trouvent, pendant un court instant, en absence d'ATP. Cependant, l'addition d'ATP et d'un complexe régénérateur de l'ATP (phosphocréatine et créatine Kinase) aux différentes solutions utilisées pour l'obtention de ces myofibrilles isolées, ne modifie en rien les résultats obtenus lors du développement de leur tension mécanique. En fait, cette rupture est comprise dans la mesure où les sarcomères présentent des longueurs différentes. Ainsi, au niveau de chaque sarcomère, du fait de leur différence de longueur, les forces génératrices élémentaires sont différentes et peuvent expliquer la rupture des myofilaments.

Dans le but d'une étude plus précise de la composition des myofilaments de la fibre musculaire striée squelettique de crabe, une électrophorèse analytique sur gel d'acrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (S.D.S.) de l'actomyosine a été réalisée (Fig. 5).

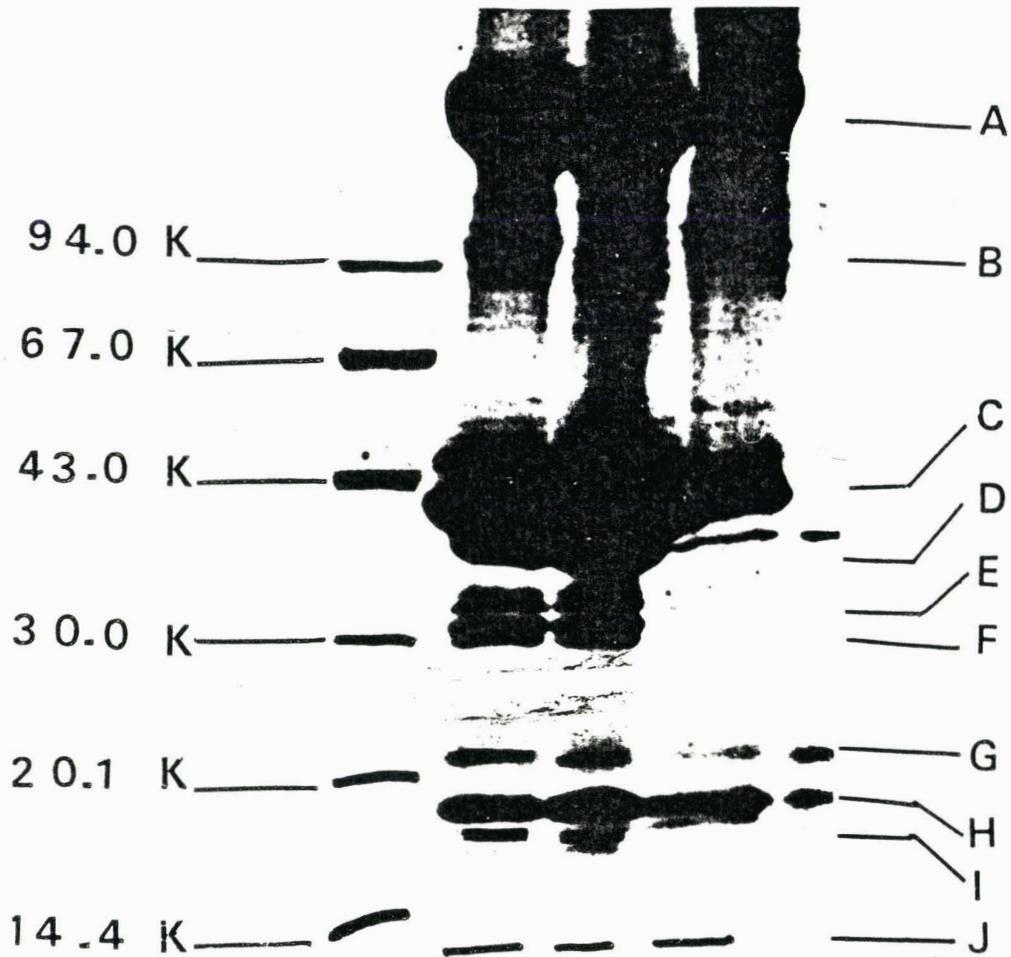


Figure 5

Electrophorèse analytique de l'actomyosine de crabe sur gel d'acrylamide en présence de SDS.

A, monomères de chaînes lourdes de myosine ; B, paramyosine ; C, actine ; D, tropomyosine ; E, TNI ; F, TNT ; H, I, J, chaînes légères de myosine, G, TNC.

Une protéine oligomérique peut être dissociée en sous-unités et le poids moléculaire de ses sous-unités déterminé par l'électrophorèse sur gel SDS. L'électrophorèse sur gel en gradient d'acrylamide (6 à 20 %) et en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS) est faite sur plaque (150 x 150 x 1 mm), selon la technique de LAEMMLI (1970). Ce traitement de la protéine par un détergent, SDS, permet la dissociation en sous-unités et déroule complètement chaque chaîne polypeptidique pour former un complexe allongé entre le polypeptide et le SDS ; les chaînes hydrocarbonées étant solidement liées par des liaisons hydrophobes à la chaîne polypeptidique. Ainsi, les groupements (sulfate) chargés du détergent sont exposés au milieu aqueux. Ces complexes ne diffèrent donc que par leur masse. La vitesse de migration n'est fonction par conséquent que de la masse de l'ensemble polypeptide-SDS-. La migration de ces complexes se réalise sur un gel en gradient d'acrylamide (6 à 20 %) pendant 6 heures à 30°C sous (50 mA) 35V. Le champ électrique fournit la force d'entraînement des molécules. Sachant que les molécules migrent linéairement sur le gel en fonction du logarithme de leur poids moléculaire, il est possible de déterminer, grâce à des protéines témoins de poids moléculaire connu, celui des différents composants de l'actomyosine. La technique d'électrophorèse préparative sur gel d'acrylamide (Fig. 5), permet de mettre en évidence des monomères de chaîne lourde de myosine (A : 200 000 daltons), de paramyosine (B : 90 000 daltons), d'actine (C : 42 000 daltons), de tropomyosine (D : 37 000 daltons), de TNI (E : 34 000 daltons), de TNT (F : 30 000 daltons), de TNC (G : 15 000 daltons), ainsi que trois types de chaînes légères de myosine (H, I, J : 23 000, 18 000, 14 000 daltons).

L'étude de la structure de l'actomyosine par cette technique d'électrophorèse, donne aussi une séparation quantitative des différents composants, quantité qui peut être déterminée à l'aide d'un "scanner". Cet appareil permet en fait de quantifier un composant présent dans le gel, en fonction de sa

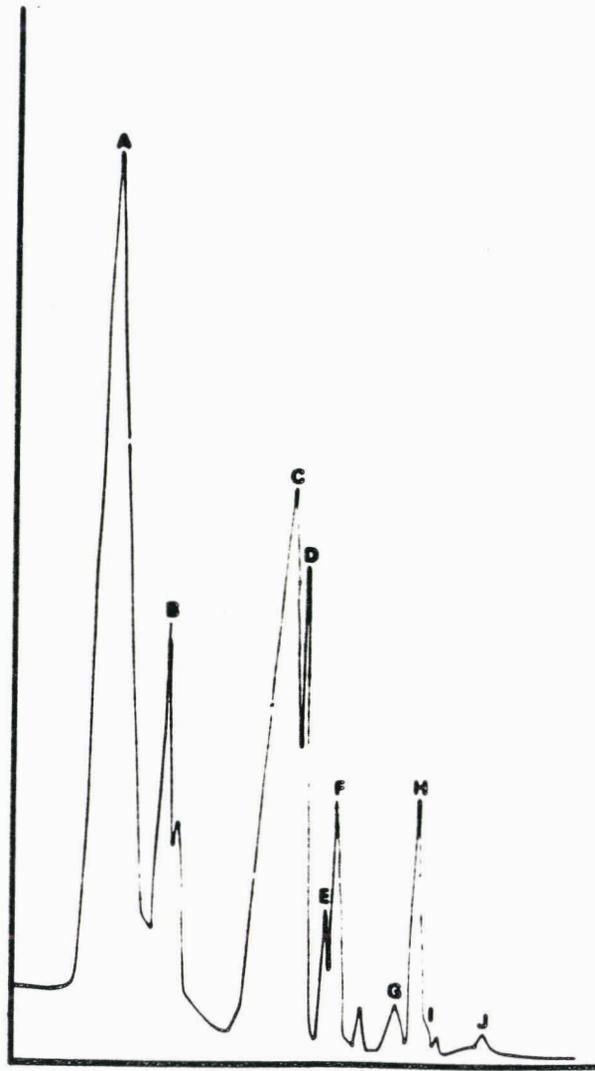


Figure 6

Profil de "scanner" déterminé à partir de l'électrophorèse analytique de l'actomyosine de fibre de crabe.

densité optique. La figure 6 donne le profil de "scanner" obtenu pour les différents composants de l'actomyosine. Comme la surface de chaque pic correspond à la quantité d'un composant donné, il est alors possible d'évaluer les proportions des différents composants.

La myosine proprement dite, représente 60 % de l'actomyosine, l'actine 17 %, la paramyosine 7 %, la tropomyosine 8 % et le complexe de la troponine 8 %. Au vu de ces résultats, il apparaît donc que l'actomyosine de crabe de par sa composition présente les caractéristiques d'un muscle strié squelettique. Ainsi les chaînes lourdes de myosine et l'actine sont en proportion et ont des poids moléculaires comparables à ceux déterminés pour le muscle squelettique strié de lapin (GAZITH et al., 1970). De même, il est bien connu que la répartition en chaînes légères de la myosine varie selon le type de muscle étudié. Par exemple, la myosine du muscle cardiaque possède deux type de chaînes légères, celle du muscle squelettique trois, alors que celle du muscle lisse, deux. Toutefois, l'actomyosine de crabe possède aussi certaines caractéristiques de muscle de Mollusques, puisqu'elle contient de la paramyosine. Cette molécule, qui est formée de deux polypeptides (Mc CUBBIN et KAY, 1968 ; DE VILLAFRANCA et HAINES, 1974) est supposée jouer un rôle de support à la myosine (DE VILLAFRANCA, 1971 a et b).

Ainsi, l'actomyosine de crabe, comme celle de beaucoup d'invertébrés (SZENT-GYÖRGI, 1975) présente à la fois des caractéristiques des muscles squelettiques de vertébrés et de Mollusques.

2) Activité ATPasique en conditions de référence et expression des résultats.

Nos conditions de référence correspondent à une mesure d'activité ATPasique dans un milieu où la concentration des cations est maintenue constante à l'exception de celle des ions Ca^{++} , et où l'anion d'accompagnement est l'ion chlorure. Après avoir déterminé la concentration d'ATP nécessaire pour obtenir une réaction optimale, l'activité ATPasique peut alors être

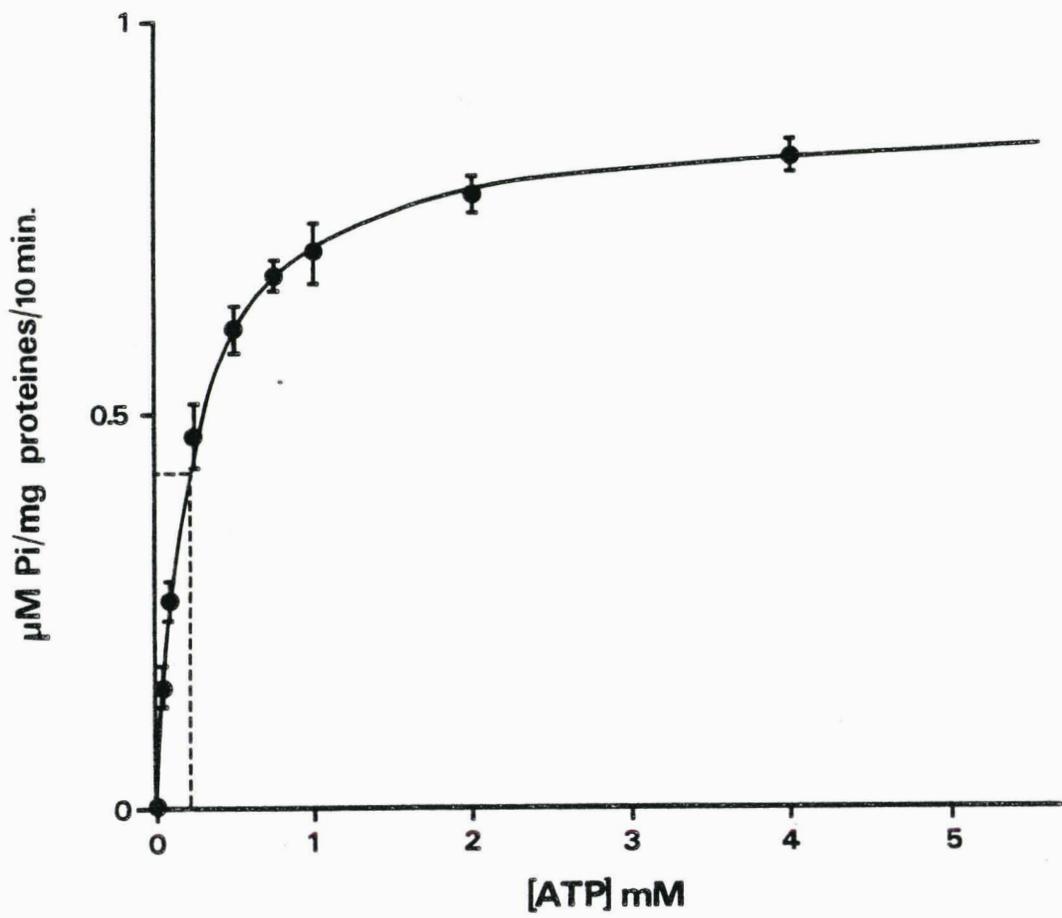


Figure 7

Relation liant le taux de Pi libéré à la concentration d'ATP.
Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

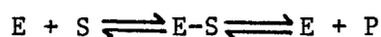


mesurée par détermination photolorimétrique du phosphore inorganique libéré (Pi), et exprimée en fonction de l'activité des ions Ca^{++} . Par diverses représentations, il est possible d'entrevoir la cinétique de la réaction enzymatique.

2-1 Détermination de la concentration d'ATP.

La figure 7 montre les effets de la concentration d'ATP sur la vitesse de réaction enzymatique.

Dans la théorie de MICHAELIS-MENTEN, l'enzyme (E) réagit dans une première étape avec le substrat (S) pour former le complexe enzyme-substrat (E-S). Ce dernier se décompose dans une deuxième étape pour redonner l'enzyme et libérer le produit (P) selon les réactions suivantes :



Ce qui, dans le cas de l'activité ATPasique devient :



L'équation de MICHAELIS-MENTEN permet, par l'intermédiaire d'une constante (K_m) de relier la vitesse initiale d'hydrolyse (V_o) à la vitesse maximale (V_m) et à la concentration initiale en substrat (ATP).

$$V_o = V_m \cdot (\text{ATP}) / (K_m + (\text{ATP})).$$

La constante de MICHAELIS-MENTEN (K_m) peut être déterminée graphiquement, elle est égale à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de la réaction est la moitié de la vitesse maximale. La figure 7 montre que la constante K_m est égale à $2,3 \cdot 10^{-4}$ M. Cette activité ATPasique mesurée par la quantité de Pi libérée, qui présente un optimum théorique de $0,874 \mu \text{M.Pi/mg}$ protéine/s/10 min, se trouve être considérablement réduite pour des concentrations inférieures à 4mM. Pour de très faibles concentrations d'ATP, la vitesse de la réaction enzymatique est proportionnelle à la concentration du substrat. Pour de fortes concentrations de substrat, la vitesse devient constante, l'enzyme est alors dit "saturé par son substrat", et se retrouve

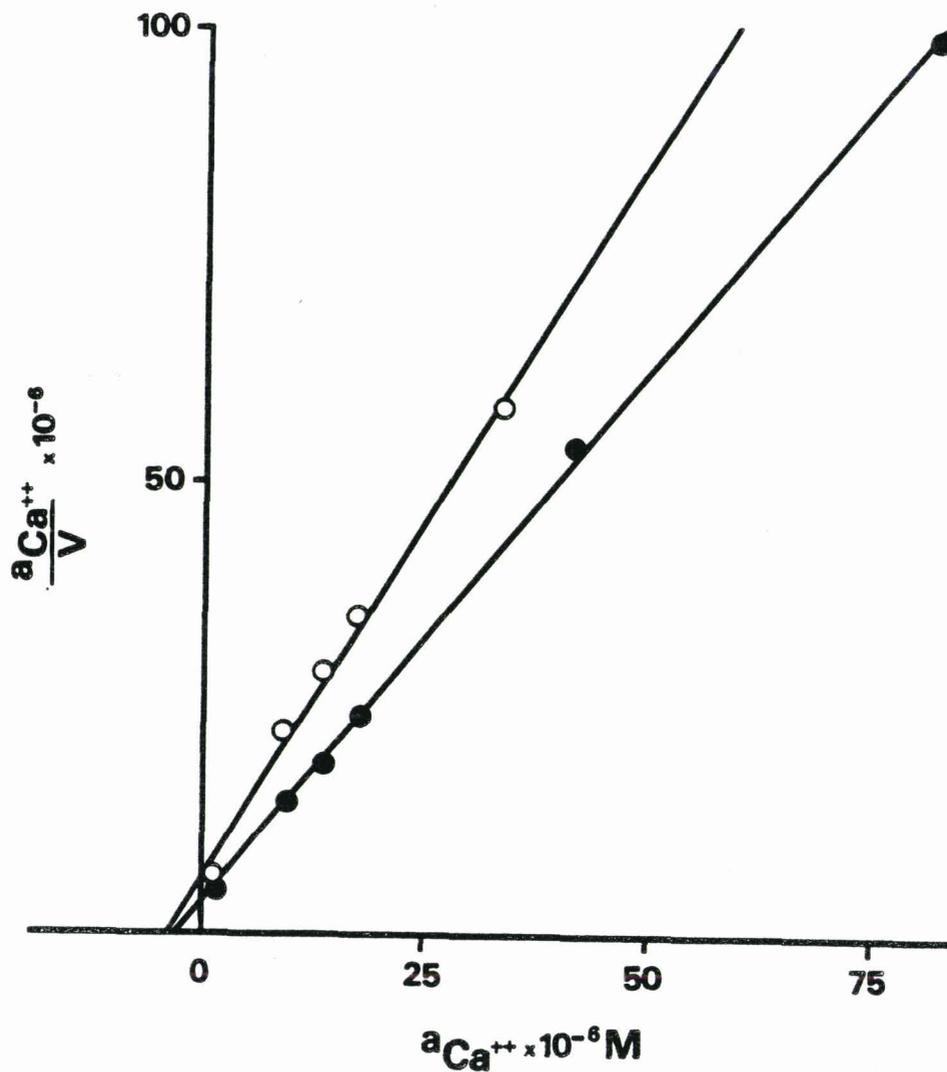


Figure 8

Relation de HAENES liant $a_{Ca^{++}}/V$ à $a_{Ca^{++}}$ (μM) dans les conditions de référence après 40 min. (●) ou 1020 min. (○) de stockage des protéines dans la solution de KCl 0,1 M.

Les points correspondent aux valeurs moyennes expérimentales.

L'ordonnée à l'origine correspond au rapport K_D/V_m , l'abscisse à l'origine à K_D et la pente de droite à l'inverse de V_m .

entièrement sous la forme E-ATP, ce qui permet d'obtenir pendant toute la durée de la réaction une vitesse d'hydrolyse constante et maximale. Cette dernière condition est réalisée lorsque la concentration en substrat est égale à 10 fois K_m . Compte-tenu de la valeur de K_m ($2,3 \cdot 10^{-4} M$), pour la suite des expériences, la concentration en ATP a été fixée à 4mM. Cette concentration est d'ailleurs égale à la concentration saturante déterminée par FENNER et al. (1973) pour la myosine myocardiaque.

2-2 Activité ATPasique en fonction de $a_{Ca^{++}}$

L'ATPase myofibrillaire ne doit pas son activité uniquement à sa structure protéique, mais nécessite en outre des cofacteurs ou coenzymes comme le calcium qui se comporte en réalité comme un "substrat spécifique" de l'enzyme.

Le rôle joué par le calcium dans la régulation de la contraction et de la relaxation a été rapporté dans de nombreuses revues parmi lesquelles citons SANDOW (1965), FUCHS (1974), EBASHI (1976). Le calcium régule en fait l'association de l'actine et de la myosine lors de l'hydrolyse d'ATP en se fixant soit sur la TNC, soit sur la Kinase ou soit sur la myosine (cela dépend du muscle étudié). Si le calcium est considéré comme un "substrat" de l'enzyme, l'analyse de la cinétique de l'hydrolyse de l'ATP en fonction de $a_{Ca^{++}}$, ne peut être déterminée dans le cadre de la théorie de MICHAELIS-MENTEN, car cette équation de vitesse ne peut s'appliquer que pour une réaction enzymatique à un seul substrat. Toutefois, il a été démontré qu'avant la fixation du calcium, 90 % de la myosine se trouve présente sous la forme de myosine-ADP-Pi (LYMN et TAYLOR, 1971 ; WEBER et MURRAY, 1973 ; LYMN, 1974 ; MANNHERZ et GOODY, 1976, ADELSTEIN et EISENBERG, 1980). Dans ces conditions, l'ion Ca^{++} peut être considéré comme le seul substrat, et l'analyse de la cinétique enzymatique envisagée à partir de l'équation de MICHAELIS-MENTEN :

$$V_o = V_m \cdot a_{Ca^{++}} / (K_D + a_{Ca^{++}}).$$

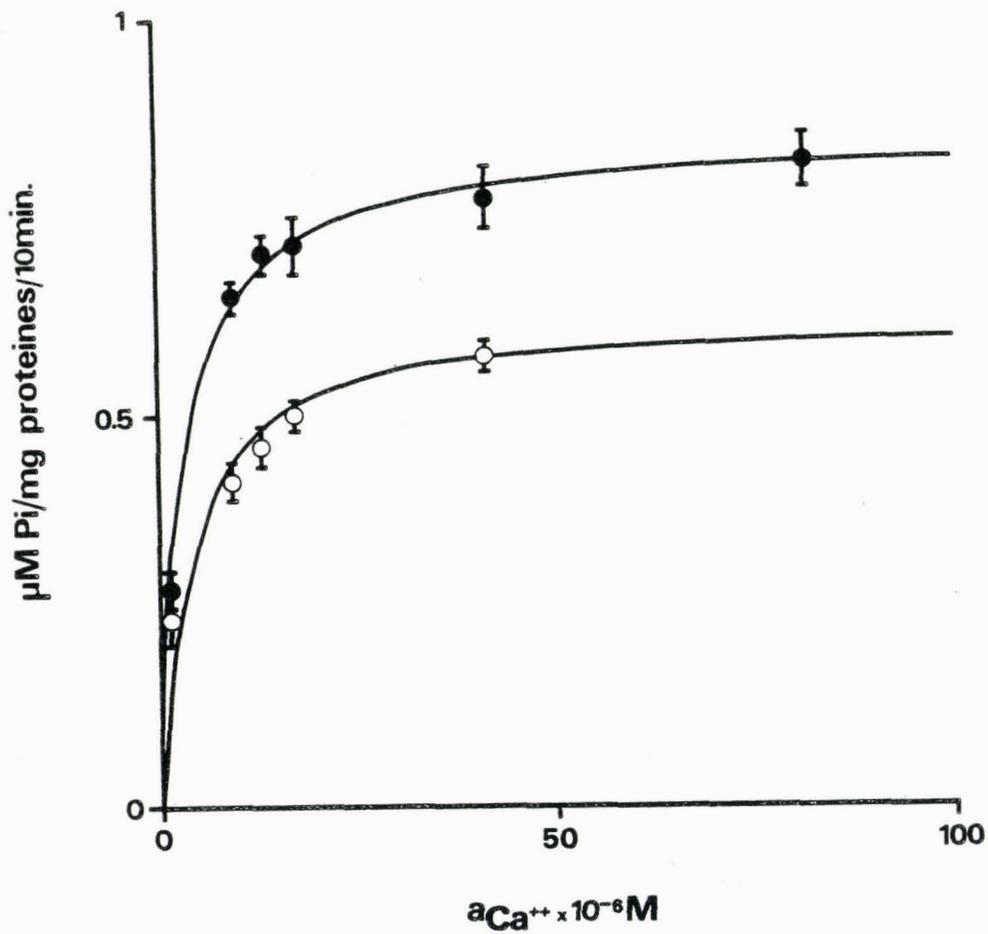


Figure 9

Relation hyperbolique liant le taux de Pi libéré ($\mu M Pi/mg \text{ proteines}/10 \text{ min.}$) à $a_{Ca^{++}}$ (μM) dans les conditions de référence après 40 min. (●) ou 1020 min. (○) de stockage des protéines dans la solution de KCl 0,1 M. Chaque point des 2 courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

V_o : vitesse initiale d'hydrolyse d'ATP

V_m : vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP

K_D : constante apparente de dissociation du complexe enzyme-calcium

$a_{Ca^{++}}$: activité de l'ion Ca^{++} .

Cette équation peut être transformée algébriquement en d'autres relations d'une utilisation plus aisée pour l'exploitation des résultats. L'une d'elles consiste simplement à prendre l'inverse de l'équation de MICHAELIS-MENTEN.

Cette équation linéaire $\left(\frac{1}{V_o} = \frac{K_D}{V_m} \times \frac{1}{a_{Ca^{++}}} + \frac{1}{V_m}\right)$ (relation de LINEWEAVER-BURK)

permet d'une part de déterminer la vitesse maximale (V_m), la constante apparente de dissociation (K_D), et d'autre part de donner d'intéressants renseignements sur les différents types d'inhibition enzymatique. Une autre transformation de l'équation de MICHAELIS-MENTEN : $\frac{a_{Ca^{++}}}{V_o} = \frac{K_D}{V_m} + \frac{1}{V_m} \times a_{Ca^{++}}$ (représentation de HAENES), permet de donner simplement V_m et K_D , et d'amplifier les défauts de linéarité qui se trouvent être minimisés par la relation de LINEWEAVER-BURK.

La relation traduisant la phase d'activation de l'activité ATPasique en fonction de l'activité de calcium ($a_{Ca^{++}}$), exprimée selon la représentation de HAENES est linéaire comme le montre la figure 8. La valeur calculée de l'effet maximal est de $0,85 \mu\text{MPi/mg.protéines}/10\text{min.}$, alors que la valeur expérimentale obtenue est de $0,826 \mu\text{MPi/mg.protéines}/10\text{min.}$ (valeur comparable à celle obtenue par PORTZEHL et al. en 1964 pour les myofibrilles de crabe). La constante apparente de dissociation (K_D) qui représente l'activité de calcium pour laquelle la vitesse de réaction est égale à la moitié de la vitesse maximale est de $3,05 \cdot 10^{-6} \text{M}$. A partir de l'équation de cette droite, la relation hyperbolique, liant l'activité ATPasique à l'activité de calcium (Fig. 9), peut être déterminée.

Dans la littérature, très souvent l'activité APTasique est exprimée non pas en fonction de l'activité des ions, mais en fonction du logarithme décimal de l'inverse de cette activité : $pCa = -\log(a_{Ca^{++}})$. La figure 10

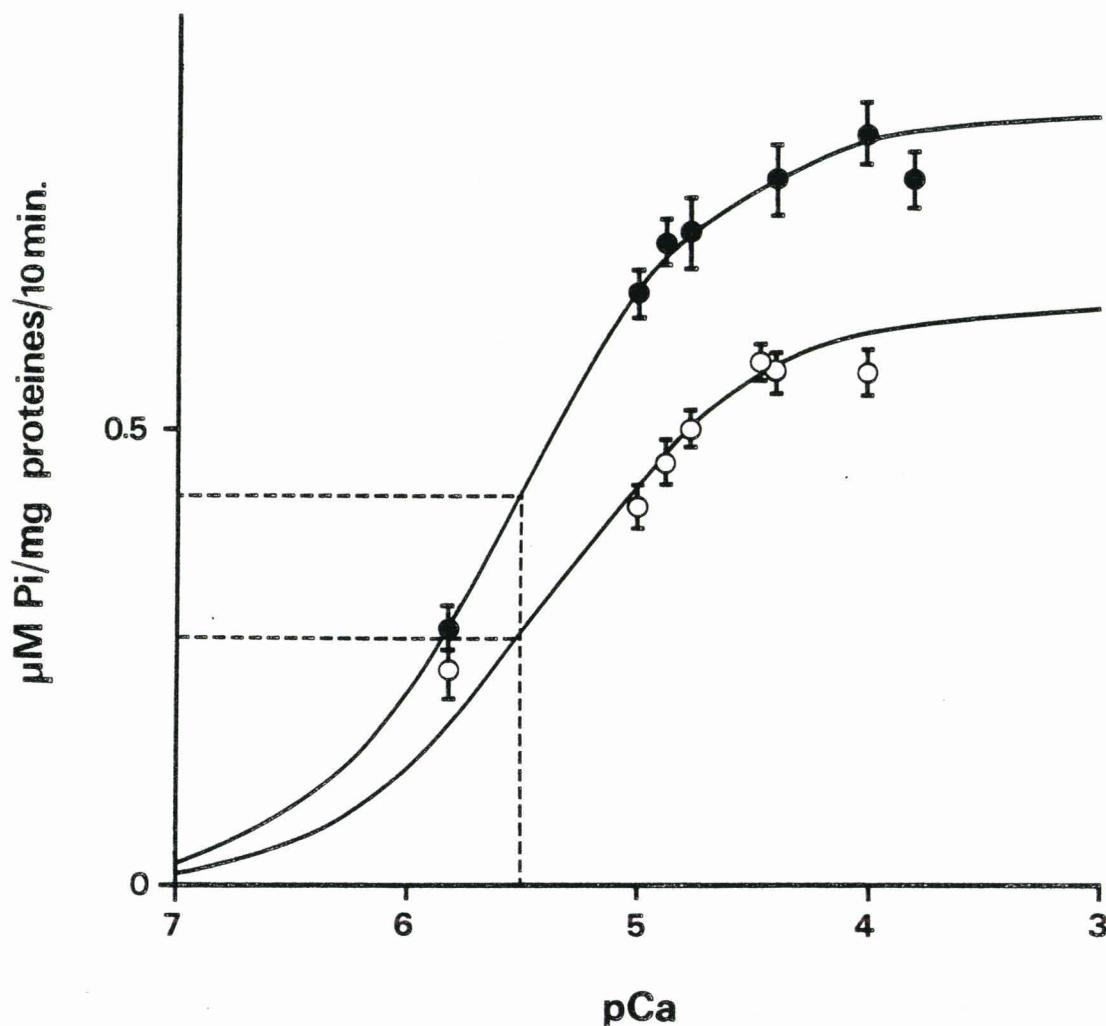


Figure 10

Relation liant l'hydrolyse d'ATP à pCa dans les conditions de référence après 40 min. (●) ou 1020 min. (○) de stockage des protéines dans la solution de KCl 0,1 M.

Pour chaque courbe, la valeur de l'abscisse du point dont l'ordonnée représente 50 % de la valeur maximale du taux d'hydrolyse d'ATP correspond au logarithme décimal de K_p .

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

traduit la relation liant pCa à la quantité de Pi libéré en 10 minutes par mg de protéines (myofilaments). Cette courbe montre que l'activité ATPasique des protéines myofibrillaires est en relation avec la fixation du calcium au niveau de ces protéines, et présente deux phases : une phase d'activation qui est déterminée à partir de la relation de HAENES, et une phase d'inhibition.

- La phase d'activation ($pCa > 4,09$) résulte de la fixation d'un calcium sur un site régulateur situé soit sur la troponine C (LEHMAN et SZENT GYÖRGI, 1975), ou sur la myosine (LEHMAN, 1977). La valeur de K_D de la troponine C isolée déterminée par POTTER et GERGELY (1975), est de $0,4 \cdot 10^{-6} M$. Toutefois, lorsque K_D est déterminé à partir du complexe troponine (TNC-TNI-TNT), ces derniers auteurs montrent que la valeur est d'environ 10 fois plus grande. Dans ces conditions, la valeur de K_D que nous avons déterminée ne permet pas de supposer que la fixation du calcium se ferait exclusivement au niveau de la myosine, puisque la valeur de K_D déterminée précédemment est de $3,05 \cdot 10^{-6} M$ donc intermédiaire entre celle déterminée pour le complexe troponine et celle pour la troponine C.

- La phase d'inhibition ($pCa < 4,09$), tout à fait en accord avec PORTZEHL et al. (1969), résulte soit de la fixation d'un calcium sur un second site à faible affinité et dont la saturation provoque une déformation inactivante de l'enzyme, soit d'une fixation partielle du calcium, par excès, sur son site, la fixation étant alors insuffisante pour assurer la réaction, ou soit comme le suggère SOBIEZEH et SMALL (1976), d'une compétition entre le Ca-ATP et Mg ATP pour le site de l'ATPase de la myosine. Cette phase d'inhibition permet d'expliquer la différence existante entre la valeur expérimentale de V_m ($0,826 \mu\text{MPi}/\text{mg} \cdot \text{protéines}/10 \cdot \text{min}$) et celle calculée à partir de la relation linéaire ($0,85 \mu\text{MPi}/\text{mg} \cdot \text{protéines}/10 \cdot \text{min}$).

Connaissant V_m théorique, il est également possible d'exploiter les résultats à l'aide de la "représentation de HILL" dans le but de déterminer la valeur stochiométrique de la réaction. Ce type de représentation graphique

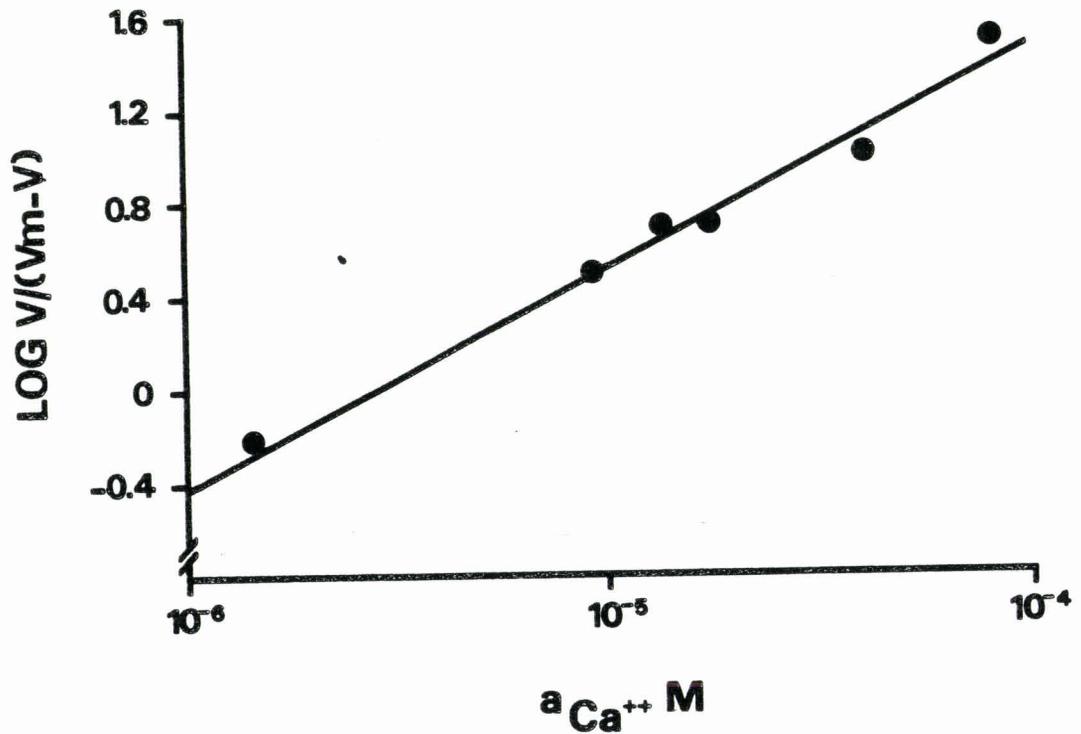


Figure 11

Représentation de HILL.

Relation liant $\log V/(V_m - V)$ à $\log a_{Ca^{++}}$ dans les conditions de référence.

Les points correspondent aux valeurs expérimentales données à la figure 10.



consiste en fait à exprimer le logarithme décimal du rapport de la valeur de la vitesse sur celle de la vitesse maximale diminuée de celle de la vitesse $\log.(V_0/(V_m - V_0))$ en fonction de la valeur de l'activité de calcium produisant l'effet. Cette relation est linéaire et de la forme $\log.(V_0/V_m - V_0) = a \cdot \log. a_{Ca^{++}} + b$.

Si la pente (a) a une valeur égale à 1 ou très proche, la réaction enzymatique est dite de "type bimoléculaire" ; en d'autres termes une molécule d'enzyme réagit avec une molécule de calcium. Quand la valeur de a est égale à 2, 3, 4, ou à un nombre non entier, ceci indique que la réaction est beaucoup plus complexe. Dans les conditions de référence, la figure 11 qui traduit la relation de HILL montre que la valeur de la pente de la droite est de 0,953, donc très proche de 1 ; ce résultat permet de considérer que la réaction enzyme-substrat est de type bimoléculaire.

2-3 Activité ATPasique en fonction du temps de stockage des myofilaments

La relation de HAENES (Fig. 8), traduisant l'activité ATPasique en fonction de $a_{Ca^{++}}$ pour des protéines ayant séjournées soit 40 ou 1020 min dans la solution de KCl 0,1 M (pH 6,8) et à 0°C, montre une variation en fonction du temps de la vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP qui, de 0,851 $\mu\text{MPi}/\text{mg. protéines}/10$ min après 40 min de stockage, passe à 0,629 $\mu\text{MPi}/\text{mg. protéines}/10$ min, après 1020 min, soit une diminution de 26 %. Par contre, la valeur de K_D ne varie pas de façon significative (de $3,05 \cdot 10^{-6}$ M, elle passe à $3,95 \cdot 10^{-6}$ M). Cette baisse d'activité ATPasique en fonction du temps a été mise en évidence par AZUMA et al. (1975), ils montrent que l'activité ATPasique de la myosine d'un mollusque maintenue dans une solution de KCl 0,5 M et à 0°C est relativement instable et diminue de 10 à 30 % par jour.

2-4 Contraction des myofibrilles en fonction de $a_{Ca^{++}}$

La contraction qui résulte d'un raccourcissement myofibrillaire est due à l'intervention du calcium qui module l'interaction de la myosine avec

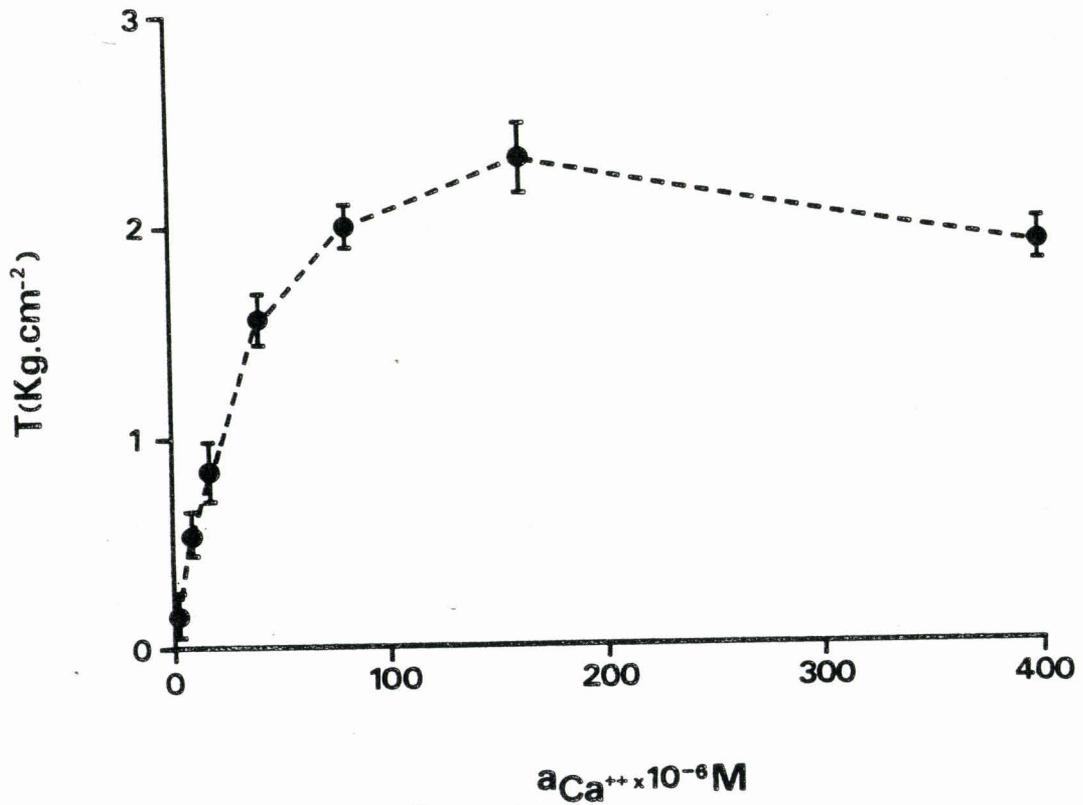


Figure 12

Relation liant la tension mécanique (Kg.cm^{-2}) développée par les myofibrilles à l'activité de calcium dans les conditions de référence.

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 8$).

l'ATP et l'actine, mais elle est également en relation avec l'activité ATPasique (WEBER et MURRAY, 1973 ; FUCHS, 1974 et 1977 ; MANHERZ et GOODY, 1976 ; ADELSTEIN et EISENBERG, 1980).

Pour expliquer le phénomène de la contraction, deux hypothèses sont couramment envisagées.

1ère hypothèse

Lorsque le calcium est libéré dans le sarcoplasme, il se fixe immédiatement sur un site régulateur, ce qui entraîne la fixation de la myosine sur un monomère de G actine. Il s'ensuit alors une modification conformationnelle productrice d'énergie telle que la tête de la myosine forme un angle de 45° avec sa queue, permettant au filament fin de se déplacer le long du filament épais (MANHERZ et GOODY, 1976 ; ADELSTEIN et EISENBERG, 1980).

2ème hypothèse

Lors de l'hydrolyse de l'ATP par la tête de myosine à pH 7, la formation d'ions H^+ provoque une acidification locale au niveau de la charnière flexible d'une molécule voisine de myosine. Cette acidification induirait un changement de conformation, vraisemblablement une transition dépendante du pH d'une structure en hélice α à une conformation au hasard.

La relation liant la tension mécanique développée par les myofibrilles en fonction de $a_{Ca^{++}}$ (Fig. 12) présente un décours hyperbolique en ce qui concerne la phase d'activation ($a_{Ca^{++}} \leq 1,61 \cdot 10^{-4} M$). La tension maximale développée, dans ces conditions, pour une activité de Ca^{++} de $1,61 \cdot 10^{-4} M$ est de $2,32 \text{ Kg} : \text{cm}^{-2}$.

ASHLEY et MOISESCU en 1977 sur les myofibrilles de Balane ont montré l'action coopérative de deux ions Ca^{++} dans le mécanisme de développement de la tension, ce qui traduit l'intervention de deux substrats. Ce fait signifie que la relation de MICHELIS-MENTEN à un substrat n'est plus applicable dans ces conditions. Sur le couturier de grenouille, HASELGROVE (1972, 1975) présume que

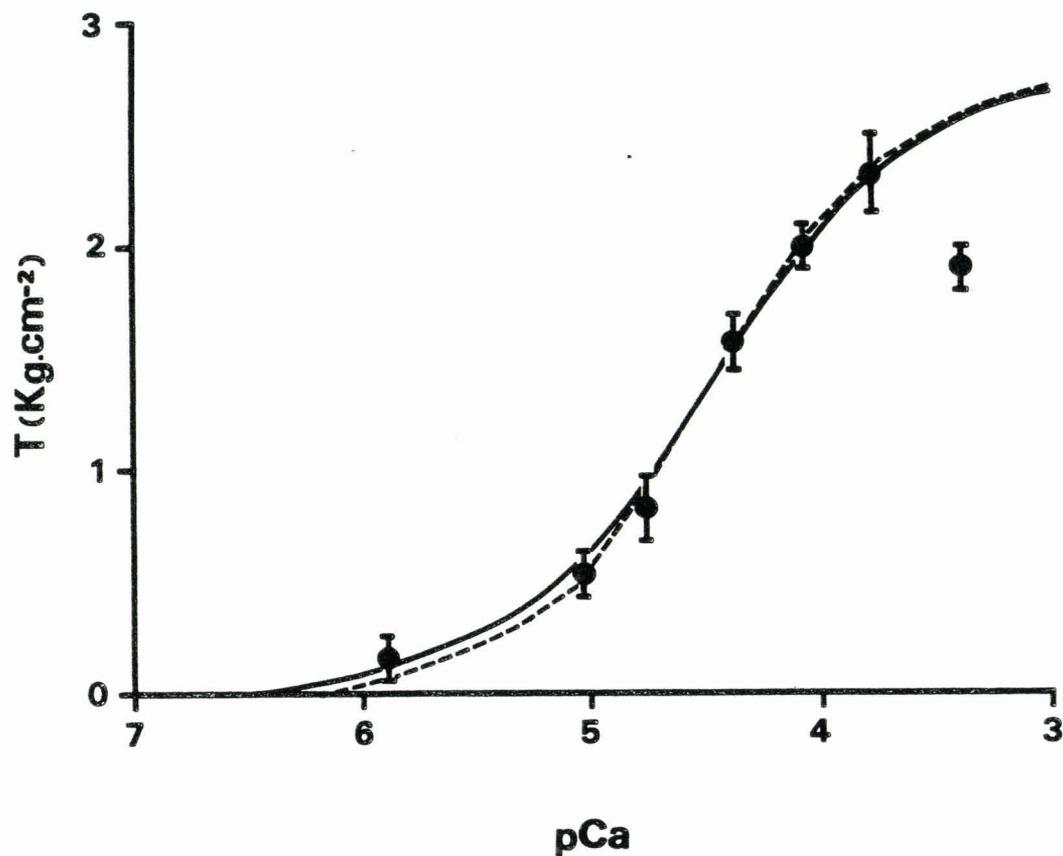


Figure 13

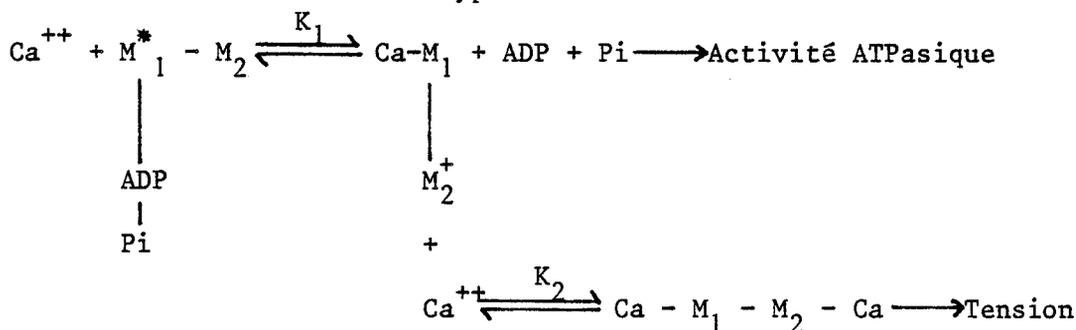
Relation liant la tension mécanique ($\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) développée par les myofibrilles, à pCa dans les conditions de référence.

La courbe en trait plein est tracée à partir de l'équation du mécanisme à double déplacement, celle en pointillée à partir de l'équation du schéma d'ASHLEY-MOISESCU (1977).

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 8$).

les changements de conformation du filament de myosine associés aux mouvements des "cross-bridges" lors du développement d'une tension, sont indépendants de l'interaction de ce filament avec l'actine. Ces changements résulteraient en fait d'un système de contrôle calcique intervenant directement au niveau de la myosine et en parallèle avec le système calcique lié à l'actine. Beaucoup de muscles d'invertébrés contiennent à la fois des systèmes régulateurs basés sur l'actine et la myosine, la troponine étant en concentration insuffisante pour expliquer le développement de la tension mécanique. Dans ces muscles, le calcium et le magnésium interviendraient en se liant sur une chaîne légère de la tête de la myosine (LEHMAN et SZENT GYÖRGI, 1975 ; GOLDBERG et LEHMAN, 1978). De même, HUXLEY (1972), MORIMOTO et HARRINGTON (1974), puis LEVY et al. (1976) montrent en fait que la liaison du calcium sur la myosine, durant l'activation du muscle, affecte directement la mobilité des "cross-bridges". De l'ensemble des résultats, FUCHS (1974, 1977) conclut que de toute évidence lorsque les liaisons des "cross-bridges" entre l'actine et la myosine sont formées, non seulement un site additionnel liant le calcium apparaît, mais une propriété coopérative est imposée aux sites de liaison.

En ce qui concerne nos résultats, dans la mesure où l'analyse de la cinétique enzymatique de l'hydrolyse d'ATP en fonction de l'activité du calcium ne fait intervenir qu'un seul site liant l'ion Ca^{++} , site (M_1) situé soit sur la TNC ou sur la myosine, il apparaît que le second calcium se fixerait sur un autre site (M_2) simultanément ou après que l'hydrolyse de l'ATP ait été réalisée et suivant un schéma de ce type :



Cette suite de réaction est similaire à une réaction à double déplacement connu en biochimie sous le nom de mécanisme "ping-pong". Ainsi, pour ce

mécanisme, le substrat (A) se combine avec l'enzyme (E) pour donner un complexe (EA) qui libère le produit (P), en laissant l'enzyme sous une autre forme (E^*). Le second substrat (B) se combine alors avec E^* pour donner le complexe E^*B qui se décompose en libérant le produit Q et l'enzyme libre E. L'équation générale de la vitesse de la réaction est :

$$V_o = V_m / (1 + (K_m^A/A) + (K_m^B/B))$$

Ce qui donne en double inverse :

$$1/V_o = (K_m^A/V_m) (A)^{-1} + (1 + K_m^B \cdot (B)^{-1}) V_m^{-1}$$

Dans l'hypothèse où ce mécanisme est impliqué lors du développement de la tension, les deux substrats A et B sont identiques (ions Ca^{++}) et se fixent sur un site M_1 avec une constante K_1 et sur M_2 avec une constante K_2 .

Dans ces conditions, la relation devient alors :

$$1/T_o = (K_1/T_m) (a_{Ca^{++}})^{-1} + (1 + (K_2/a_{Ca^{++}})) \cdot T_m^{-1}$$

où T_o est la tension développée pour une $a_{Ca^{++}}$ donnée et T_m est la tension maximale théorique.

L'équation peut encore s'inscrire :

$$(a_{Ca^{++}}/T_o) = (K_1 + K_2/T_m) + (a_{Ca^{++}}/T_m)$$

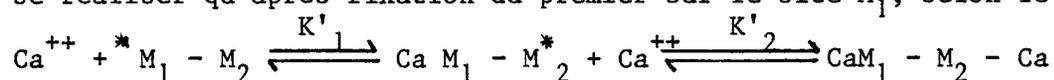
Cette relation linéaire permet donc de déterminer de façon précise T_m , mais ne permet que de déterminer la somme des deux constantes K_1 et K_2 sans dissociation possible. C'est à partir de l'équation de cette droite, que la relation (Fig. 13) liant la tension au logarithme décimal de l'inverse de $a_{Ca^{++}}$ a été établie. Cette relation donne à K (somme des deux constantes K_1 et K_2) la valeur de $3,24 \cdot 10^{-5} M$. En réalité, comme pour l'activité ATPasique la relation liant la tension à pCa (Fig. 13), décrit en fait deux phases ; une phase d'activation ($pCa > 3,8$) qui est prise en compte pour déterminer la relation linéaire et une phase d'inhibition ($pCa < 3,8$). Cette valeur "charnière" de pCa de 3,8 est comparable à celle mentionnée par HELLMAN et PODOLSKY, 1969 ; PORTZEHL et al., 1969 ; ENDO et al., 1977 ; SAIDA et NONOMURA, 1978 ; TANAKA et TANAKA, 1979 ; CORNELIUS, 1980. En effet, pour des concentrations de Ca^{++} supérieures à $10^{-4} M$ ($pCa < 4$), la tension maximale décroît,

cette inhibition résultant d'une compétition entre Ca-ATP et le Mg-ATP pour le site de l'ATPase de la myosine (SOBIESZEH et SMALL, 1976).

La contraction des myofibrilles en présence d'ions Cl^- présente donc un optimum de contraction de $2,32 \text{ kg.cm}^{-2}$, pour une valeur de pCa de 3,8, alors que la valeur déterminée à partir de la relation linéaire est de $2,78 \text{ kg.cm}^{-2}$. Cette valeur théorique de tension mécanique correspond à celle effectivement enregistrée au niveau de la fibre intacte, lors d'une contracture potassique (BRULE et al., 1972 ; BRULE, 1978). Une même différence de tension mécanique enregistrée au niveau de la fibre intacte et pelée ne peut s'expliquer uniquement par un retard dans la diffusion du Mg.ATP ou par une déplétion de celui-ci (CORNELIUS, 1980), mais est probablement liée à la technique d'isolement utilisée (glycérol). A l'appui de cette hypothèse, ORENTLICHER et al. (1974) montrent que l'isolement des myofibrilles par le Brij 58, au contraire des autres produits, cause moins de diminution de tension mécanique.

Si le schéma à double déplacement est applicable au mécanisme de la contraction des myofibrilles, il est possible de déterminer la valeur de K_1 en étudiant la relation liant l'activité de l'ATP à l'activité de calcium. La valeur de K_1 déterminée dans ces conditions est de $3,05 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Par soustraction ($K - K_1 = K_2$), la valeur de K_2 serait alors de $2,94 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

Connaissant la valeur de T_{max} théorique, il est possible de déterminer de façon plus précise les valeurs de K_1 et K_2 à l'aide de la relation de ASHLEY et MOISESCU (1977) découlant d'un schéma, qui rend compte de l'action coopérative de deux ions Ca^{++} dans le processus d'activation de la tension des muscles squelettiques de crustacés. Ainsi, pour ASHLEY et MOISESCU, le développement d'une tension résulte en fait de la fixation de deux ions Ca^{++} sur deux sites différents M_1 et M_2 , la fixation du second Ca^{++} sur M_2 ne pouvant se réaliser qu'après fixation du premier sur le site M_1 , selon le schéma suivant :



A partir du schéma consécutif l'équation donnant la relation liant T à $a_{Ca^{++}}$ est la suivante :

$$T/T_m = K'_1 - K'_2 a_{Ca^{++}}^2 (1 + K'_1 a_{Ca^{++}} + K'_1 K'_2 a_{Ca^{++}}^2)^{-1} \text{ où } K'_1 \text{ et } K'_2 \text{ représentent les constantes apparentes d'association, et sont égales à l'inverse des constantes apparentes de dissociation. } (K'_1 = 1/K_1 ; K'_2 = 1/K_2).$$

Par transformation algébrique, la relation d'ASHLEY-MOISESCU donne :

$$(a_{Ca^{++}})^2 \left(\frac{T_m}{T} - 1 \right) = a_{Ca^{++}} \cdot K_1 + K_1 \cdot K_2$$

Cette équation est représentée par une droite de pente K_1 dont l'ordonnée à l'origine est $K_1 \cdot K_2$. A partir de nos résultats K_1 a une valeur de $1,55 \cdot 10^{-6} M$ et celle de K_2 de $3,15 \cdot 10^{-5} M$. A partir de l'équation de cette droite donnée ci-dessus, la relation sigmoïde liant la tension développée par les myofilaments à pCa peut être déterminée (Fig. 13). Cette figure montre en fait une légère différence entre les relations déterminées à partir du schéma à double déplacement, et à partir du schéma d'ASHLEY et MOISESCU (1977). Cette dernière relation ayant un meilleur coefficient de corrélation ($r = .996$), représente probablement mieux le phénomène lié au développement de la tension.

Quoiqu'il en soit il apparaît toutefois que deux ions Ca^{++} sont requis pour le développement d'une tension. Pour ce qui est des valeurs de K_1 et de K_2 , il est à noter une différence suivant que ces valeurs sont déterminées à partir de l'équation qui traduit le mécanisme à double déplacement ou celui d'ASHLEY-MOISESCU. Il faut cependant signaler que pour le premier mécanisme, il a été postulé que K_1 représenterait la constante apparente de dissociation du calcium pour le site M_1 , déterminée à partir de la relation liant l'activité ATPasique à l'activité de calcium (Fig. 8) ; or la détermination de cette constante pour l'activité ATPasique n'est pas réalisée à partir des myofibrilles "en place" comme pour la tension, mais sur des myofilaments en suspension (voir chapitre technique). Ceci pourrait expliquer la modification de l'affinité du calcium pour le site M_1 et donc aboutir à une valeur de K_1

sensiblement différente. La valeur de K_1 ($1,55 \cdot 10^{-6} M$), obtenue par le modèle d'ASHLEY-MOISESCU, est plus proche de la constante déterminée pour la TNC ($0,4 \cdot 10^{-6} M$) par POTTER et GERGELY (1975).

De ce fait, il est permis de supposer, en accord avec de nombreux auteurs, que l'affinité du site calcique pouvait être modifiée par les techniques d'isolement des myofibrilles. Dans notre cas, l'isolement est réalisé d'une part par le triton -X-100 pour ce qui est de la détermination de la relation Activité ATPasique - pCa, et d'autre part par le glycérol pour la détermination de la relation tension - pCa. En effet, CORNELIUS (1980) montre qu'il existe une différence de 1 unité de pCa entre la relation tension - pCa obtenue pour la fibre entière et celle pour la fibre "pelée" chimiquement à l'aide de triton X 100. Pour cet auteur, cette différence ne peut s'expliquer non par un retard dans la diffusion du calcium, mais plutôt être liée à la technique d'isolement utilisée.

2-5 Corrélation entre l'activité ATPasique et la tension mécanique

L'utilisation pour la contraction de l'énergie libérée au cours de l'hydrolyse de l'ATP par les myofibrilles est encore envisagée de façon différente selon les auteurs. Ainsi pour TAWADA et al (1974), l'énergie délivrée par le clivage de l'ATP est thermodynamiquement utilisée pour le travail mécanique, alors que pour HATZE (1973), l'énergie chimique est convertie en énergie électrique, laquelle est à son tour convertie en énergie mécanique et en chaleur. Quoiqu'il en soit, une relation assez simple entre l'activité ATPasique de la myosine et de la vitesse de raccourcissement de différents muscles de vertébrés et d'invertébrés a été déterminée par BARANY (1967). Par contre, pour BOWEN et MANDELKERN (1971), la relation est plus complexe puisqu'une tension mécanique importante peut se développer lors d'une faible hydrolyse d'ATP. Cependant, une bonne corrélation entre l'hydrolyse de l'ATP et la tension mécanique des fibres est obtenue par BENDALL (1953) notamment avec

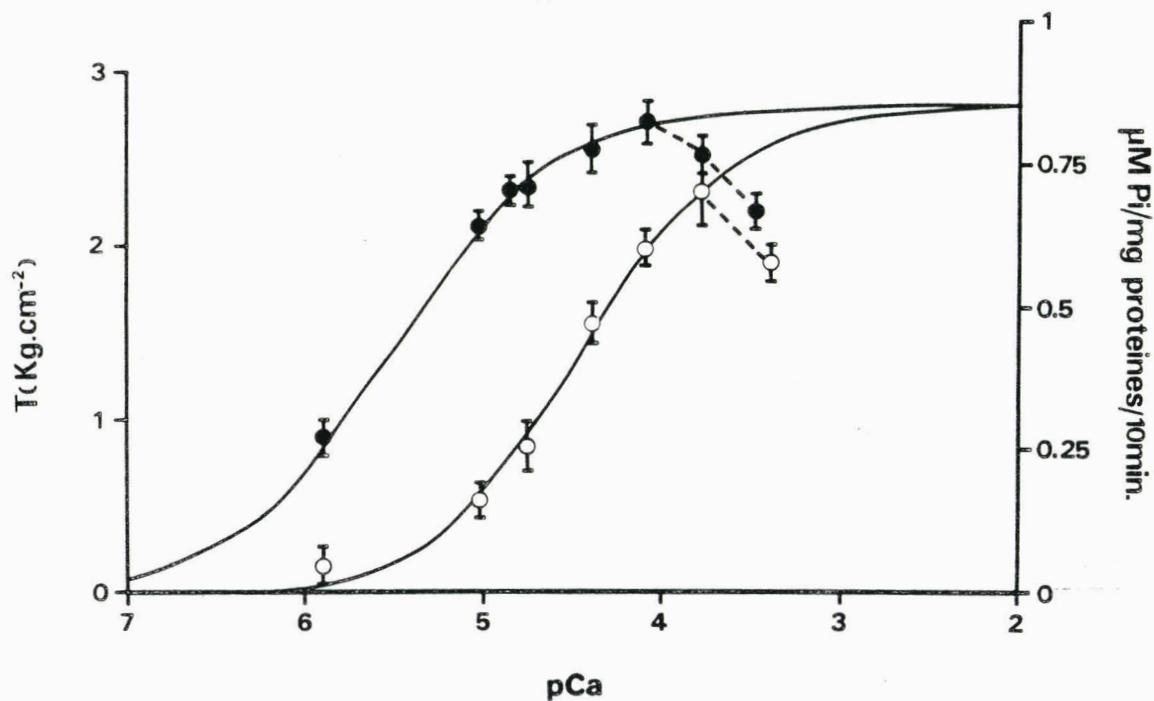


Figure 14

Tension mécanique développée par les myofilaments (Kg.cm^{-2} , ○) et taux de Pi libéré ($\mu\text{M Pi/Mg.proteines/10 min.}$, ●) en fonction de pCa.

Chaque point pour la tension représente $m \pm \sigma$ ($n = 8$) et chaque point pour le taux de Pi libéré $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

des fibres traitées par le glycérol.

En ce qui concerne les myofibrilles de crabe, la figure 14 qui traduit la tension mécanique développée d'une part, et l'activité ATPasique d'autre part en fonction de pCa, montre une variation de une unité pCa entre les deux phénomènes qui sont parallèles.

Dans ces conditions, il est donc possible d'envisager la détermination d'une relation liant l'activité ATPasique (V) et la tension mécanique (T). La relation $\frac{V}{T} = f(V)$ est une droite dont l'équation est $\frac{V_0}{T_0} = 2,944 - 2,973.V_0$ ($r = .997$). A partir de cette équation, la relation liant T à V présentée à la figure 15 est une hyperbole. Cette relation hyperbolique entre l'activité ATPasique et la tension mécanique a déjà été précisée par BENDALL (1953) pour des fibres traitées comme dans nos conditions expérimentales par le glycérol.

2-6 Conclusion

Dans nos conditions de référence, les myofilaments de crabe, placés dans un milieu ne renfermant comme anions que les ions Cl^- (hormis l'ATP) présentent pour une pCa de 4,09 un taux d'hydrolyse d'ATP maximal de 0,826 $\mu\text{MPi/mg.protéines/10 min}$. Cette valeur est tout à fait comparable à celle déterminée par PORTZEHL et al. (1964) sur la même préparation. Par ailleurs, la demi-activation apparaît pour une activité de calcium de $3,05 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (K_D). La réaction enzymatique observée dans de telles conditions de référence est de type bimoléculaire, et peut être analysée suivant l'équation de MICHAELIS-MENTEN. Les myofibrilles isolées en place nécessitent deux ions calcium pour le développement du phénomène mécanique. La cinétique de la tension mécanique, en fonction de pCa, peut être analysée de deux façons : soit par le mécanisme à double déplacement, ou soit par celui d'ASHLEY-MOISESCU (1977). Ce dernier mécanisme permet en plus de déterminer les deux constantes apparentes de dissociation (K_1 et K_2) des sites M1 et M2 pour le calcium (K_1 a une valeur de $1,55 \cdot 10^{-6} \text{M}$ et K_2 une valeur de $3,15 \cdot 10^{-5} \text{M}$). La tension maximale développée

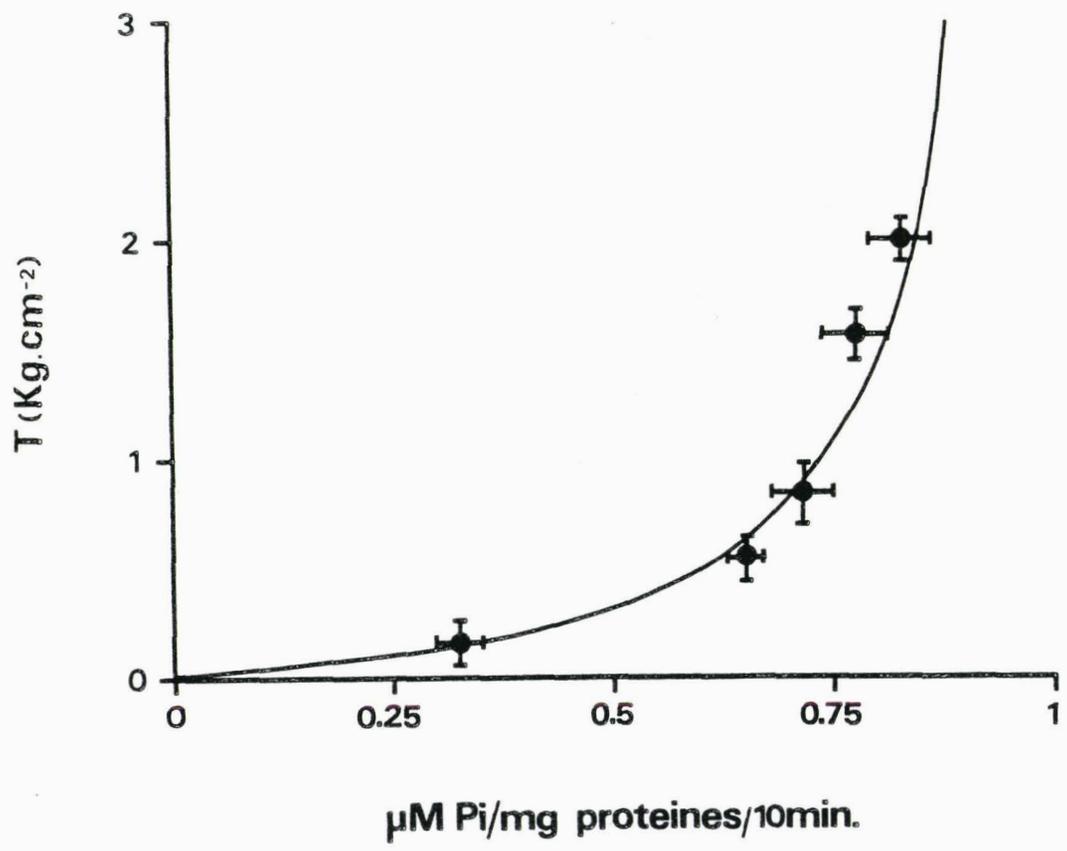


Figure 15

Relation liant la tension mēcanique dēveloppēe par les myofibrilles ($\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$) au taux de P_i libērē ($\mu\text{M Pi/mg}\cdot\text{protēines/10 min.}$).

Chaque point pour la tension reprēsente $m \pm \sigma$ ($n = 8$) et chaque point pour le taux de P_i libērē $m \pm \sigma$ ($n = 5$).



par les myofibrilles en place est de $2,32 \text{ kg.cm}^{-2}$, elle apparaît pour une pCa de 3,8. Enfin, la relation liant l'activité ATPasique et la tension mécanique est de la forme :

$$\frac{V_0}{T_0} = a V_0 + b$$

Si cette relation permet une bonne corrélation entre l'activité ATPasique et la contraction des myofibrilles, elle ne correspond probablement pas à la réalité dans la mesure où les préparations des myofibrilles sont différentes suivant que l'on mesure leur activité ATPasique, ou leur contraction. Malheureusement il n'a pas été possible sur ce type de préparation de suivre simultanément la contraction sur une période de 10 min. compatible avec une mesure relativement précise de son activité ATPasique. En effet, la tension mécanique, dans les conditions d'isométrie, du fait de la longueur différente des sarcomères, ne se maintient pas plus d'une minute.

3) Effet du remplacement des ions Cl^- par différents anions :

L'influence des ions Ca^{++} sur l'activité ATPasique et la contraction des myofibrilles, est étudiée à partir de milieux où les ions Cl^- sont remplacés totalement ou partiellement par les ions CH_3COO^- , $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ ou NO_3^- .

Une grande variété d'anions est connue pour affecter l'hydrolyse de l'ATP lorsque celle-ci est catalysée par l'ATPase mitochondriale (EBEL et LARDY, 1975 ; LOPEZ-ZABALZA et al., 1980) ou l'ATPase de la myosine (JACOBS et GUTHE, 1970 ; SEIDEL, 1969, WARREN et al., 1966). En 1980, LOPEZ et al. montrent que les deux types d'anions, activateur et inhibiteur, sont en compétition pour le même site de l'enzyme. WARREN et al. (1966) démontrent, à l'aide de techniques physicochimiques que les anions désorganisent en fait la structure des différentes macromolécules, notamment celle de l'ATPase de la myosine.

3-1 Influence des ions CH_3COO^-

Quelle que soit l'origine de l'ATPase, l'anion acétate (CH_3COO^-) a

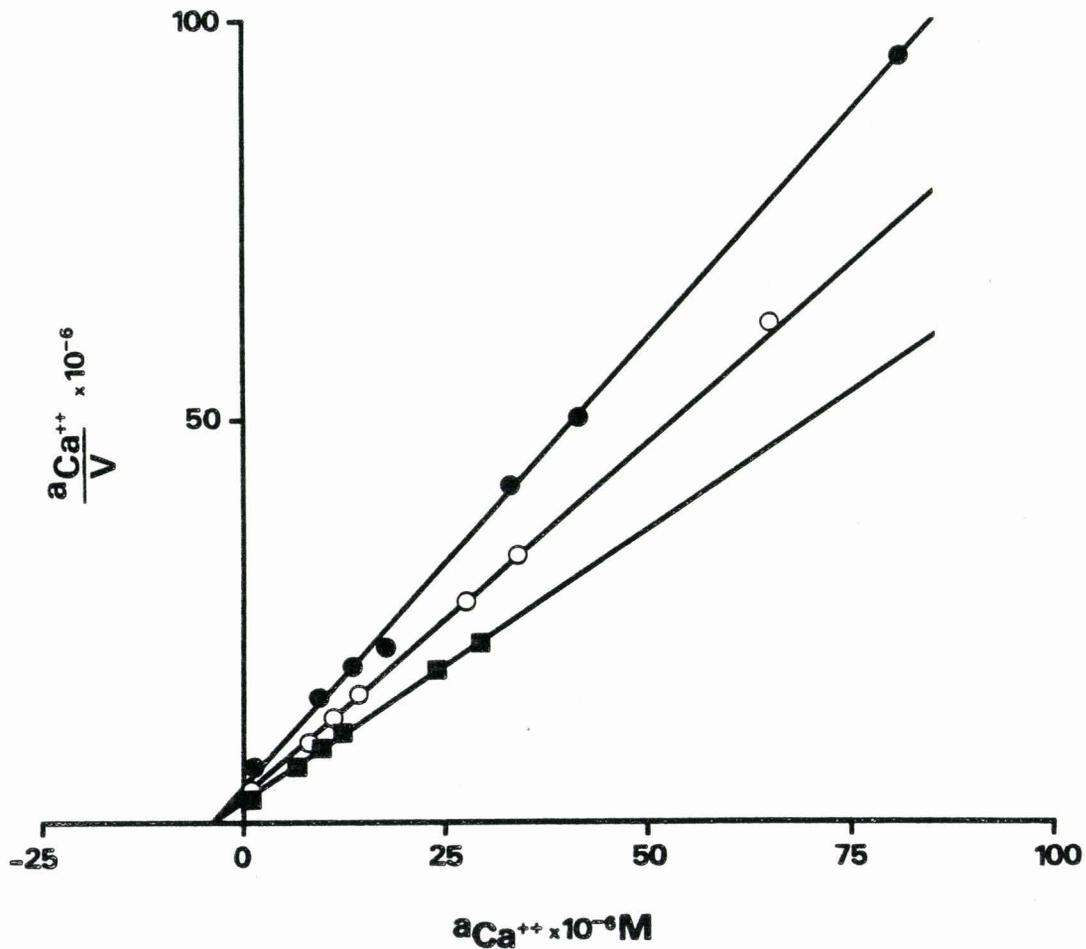


Figure 16

Relation de HAENES liant $a_{Ca^{++}}/V$ à $a_{Ca^{++}}$ (μM) (protéines ayant été stockées 40 min. dans la solution de KCl 0,1 M) pour différentes concentrations d'acétate et de chlorure (●, 122 mM Cl^- et 50 mM CH_3COO^- ; ○, 76 mM Cl^- et 98 mM CH_3COO^- ; ■, 50 mM Cl^- et 122 mM CH_3COO^-).

Les points correspondent aux valeurs moyennes expérimentales.

toujours été considéré comme un activateur (WARREN et al., 1966 ; SEIDEL, 1969 ; JACOBS et GUTHE, 1970 ; EBEL et LARDY, 1975 ; SANTIAGO et al., 1980 ; LOPEZ-ZABALZA et al., 1980).

3-1-1 Ions CH_3COO^- et Activité ATPasique des myofilaments en fonction de pCa.

a) myofilaments stockés en solution de KCl 0,1 M :

En présence de différentes concentrations d'ions CH_3COO^- , les relations linéaires liant $a_{\text{Ca}^{++}/V}$ à $a_{\text{Ca}^{++}}$ (Fig. 16) permettent de donner la valeur de $3,49 \cdot 10^{-6} \pm 0,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ pour la constante apparente de dissociation du complexe protéines - Ca^{++} ; cette valeur est comparable à celle déterminée dans les conditions de référence ($\text{Cl}^- = 172 \text{ mEq}$, $K_D = 3,05 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Fig. 8). Il est de plus possible de constater une augmentation de la vitesse maximale d'hydrolyse de l'ATP en fonction de l'accroissement de la concentration en ions acétate. Comme le montrent les figures 16 et 17, la valeur de la constante apparente de dissociation (K_D) du complexe protéine-Ca, déterminée pour différentes concentrations d'ions CH_3COO^- , est identique. Dans ces conditions, les ions acétate ne semblent pas modifier l'affinité du Ca^{++} pour son site, mais simplement augmenter la vitesse de disparition du complexe protéine-ATP. Ceci traduit le fait que l'ion acétate intervient en tant qu'activateur ou que l'ion chlorure vis-à-vis de l'acétate intervient en tant qu'inhibiteur non compétitif simple. Un inhibiteur non compétitif simple peut se combiner à la fois avec l'enzyme libre et avec le complexe enzyme-substrat. Les inhibiteurs non compétitifs simples se fixent au niveau d'un site de l'enzyme qui est différent du site actif, ils entraînent un changement de conformation de l'enzyme tel que le complexe enzyme-substrat ne peut se former ou se décomposer à sa vitesse habituelle. Ainsi, au niveau des myofilaments de crabe, l'ion Cl^- pourrait intervenir en se fixant réversiblement sur un groupement fonctionnel de l'enzyme indispensable au maintien de sa conformation tridimensionnelle active. Cette conformation deviendrait de plus en plus active en fonction de l'augmentation de la concentration en ion acétate. D'ores et déjà, il est possible

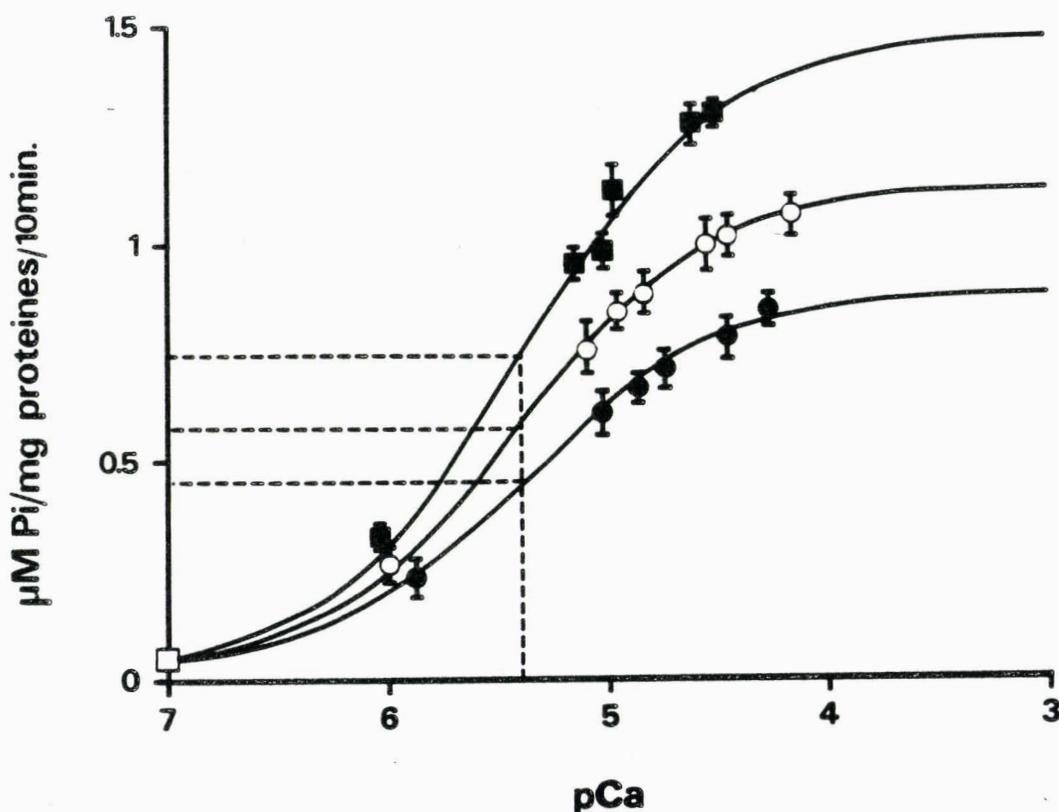


Figure 17

Taux de Pi libéré ($\mu\text{M Pi/mg.protéines/10 min.}$) en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 40 min. dans la solution de KCl 0,1 M) pour différentes concentrations d'acétate et de chlorure (■, 50mM. Cl^- et 122 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,995$; ○, 76 mM Cl^- et 98 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,998$; ●, 122 mM Cl^- et 50 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,994$).

La variation de la concentration en Cl^- est obtenue avec une modification simultanée et inverse de la concentration en CH_3COO^- .

Dans chaque cas n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

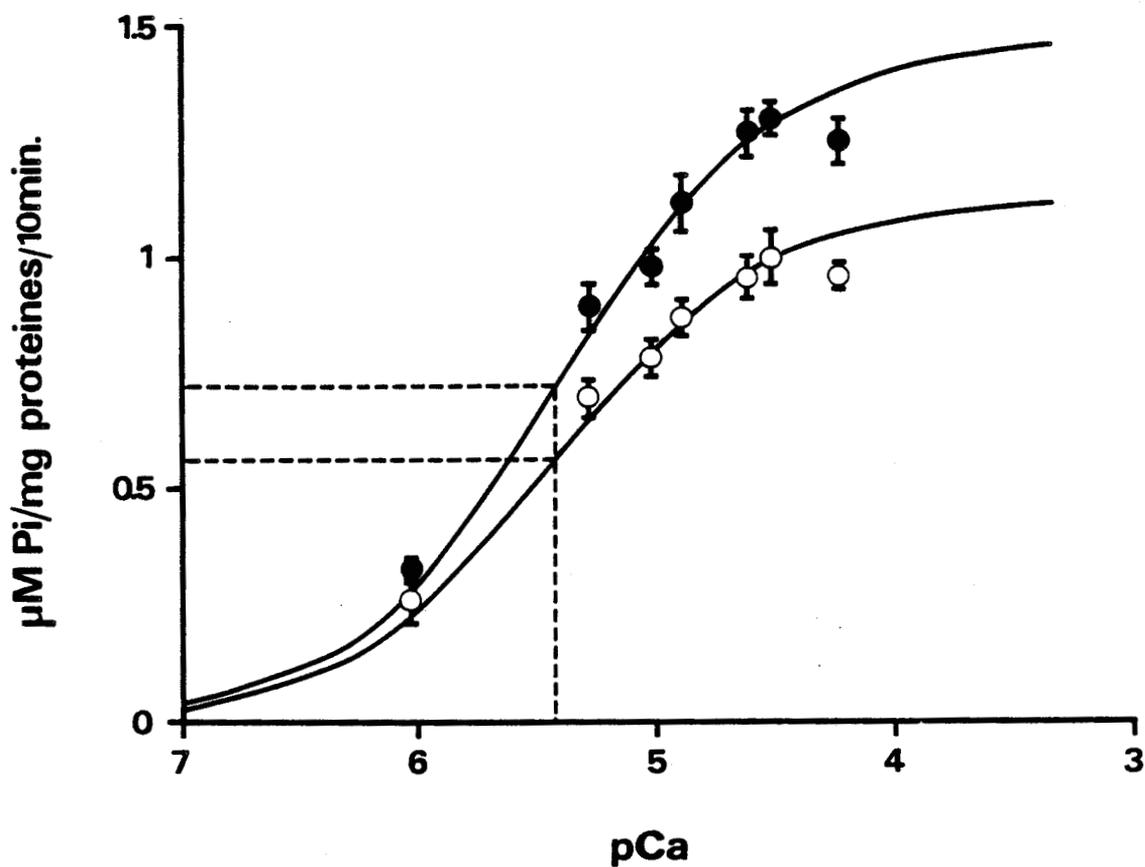


Figure 18

Influence des ions CH_3COO^- (122 mM) sur la relation sigmoïde liant le taux de Pi libéré ($\mu\text{M Pi/mg.protéines/10 min.}$) à pCa. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCl 0,1 M pendant 40 min. (●) ou 1020 min. (○).

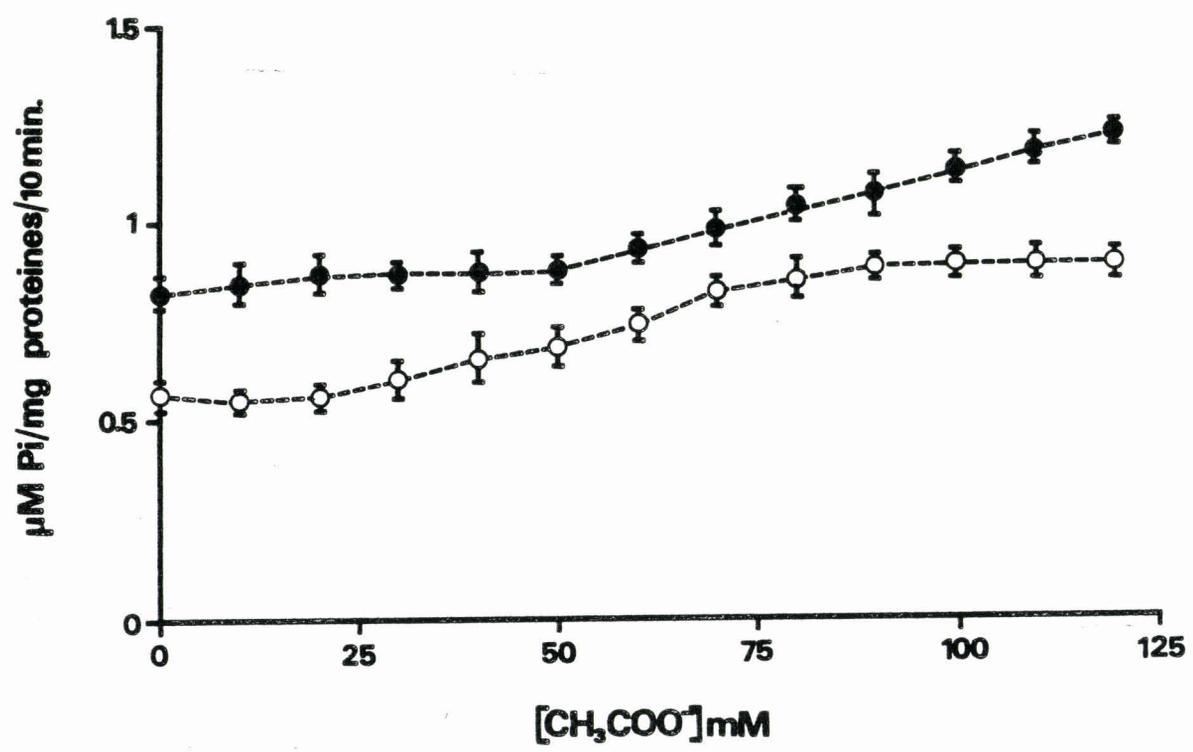


Figure 19

Relation liant le taux de Pi libéré (µM Pi/mg. protéines/10 min.) à la concentration de CH₃COO⁻ (mM) pour une valeur de a_{Ca⁺⁺} égale à 81,28.10⁻⁶M. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCl 0,1 M pendant 40 min (●) ou 1020 min. (○).



de postuler un rôle, non pas inhibiteur, mais de régulateur de l'ion Cl^- au niveau du couplage mécano-chimique. Les relations sigmoïdes représentées à la figure 18 montrent, en fonction du temps de stockage des myofibrilles dans la solution de KCl 0,1 M, une diminution de la vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP (de 1,46 $\mu\text{MPi}/\text{mg.protéines}/10$ min après 40 min, elle passe à 1,115 $\mu\text{MPi}/\text{mg protéines}/10$ min après 1020 min) soit une diminution de 23 %. Par contre, la valeur de K_D ne varie pas de façon significative ($3,73 \cdot 10^{-6} \text{M}$ contre $3,59 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Cette diminution de V est identique à celle établie en conditions de référence (Fig. 8). De même, dans tous les cas, la valeur du coefficient de HILL est très proche de 1, ce qui signifie qu'en présence d'ions acétate, la réaction est toujours de type bimoléculaire.

En conclusion, l'activité ATPasique des myofilaments stockés en solution de KCl 0,1 M possède, en présence de CH_3COO^- (Fig. 16, Fig. 17), une constante apparente de dissociation du complexe enzyme-calcium identique à celle de référence avec un accroissement de l'optimum d'activité ATPasique ; cet accroissement dépendant de la concentration en ions CH_3COO^- . Ce dernier fait est illustré par la figure 19 qui représente le taux maximum d'hydrolyse d'ATP en fonction de la concentration en ions acétate pour une activité de Ca^{++} constante ($81,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$), et ce, après 40 min. ou 1020 min. de stockage des protéines dans une solution de KCl 0,1 M. Ainsi, pour une variation de la concentration en ions acétate de 0 mM à 122 mM, l'activité ATPasique augmente de l'ordre de 47 % et de 56 % respectivement après 40 min. et 1020 min. de stockage.

b) myofilaments stockés en solution de CH_3COOK 0,1 M :

En présence d'ions CH_3COO^- , la relation sigmoïde liant le taux d'hydrolyse d'ATP à $p\text{Ca}$ (Fig. 20), présente un optimum de 1,76 $\mu\text{MPi}/\text{mg protéines}/10$ min. pour une $p\text{Ca}$ de 4,3 alors que l'optimum théorique n'est que de 0,860 $\mu\text{MPi}/\text{mg protéines}/10$ min. dans les conditions de référence. Ainsi le remplacement de tous les ions Cl^- par des ions CH_3COO^- provoque une augmentation de 125 %

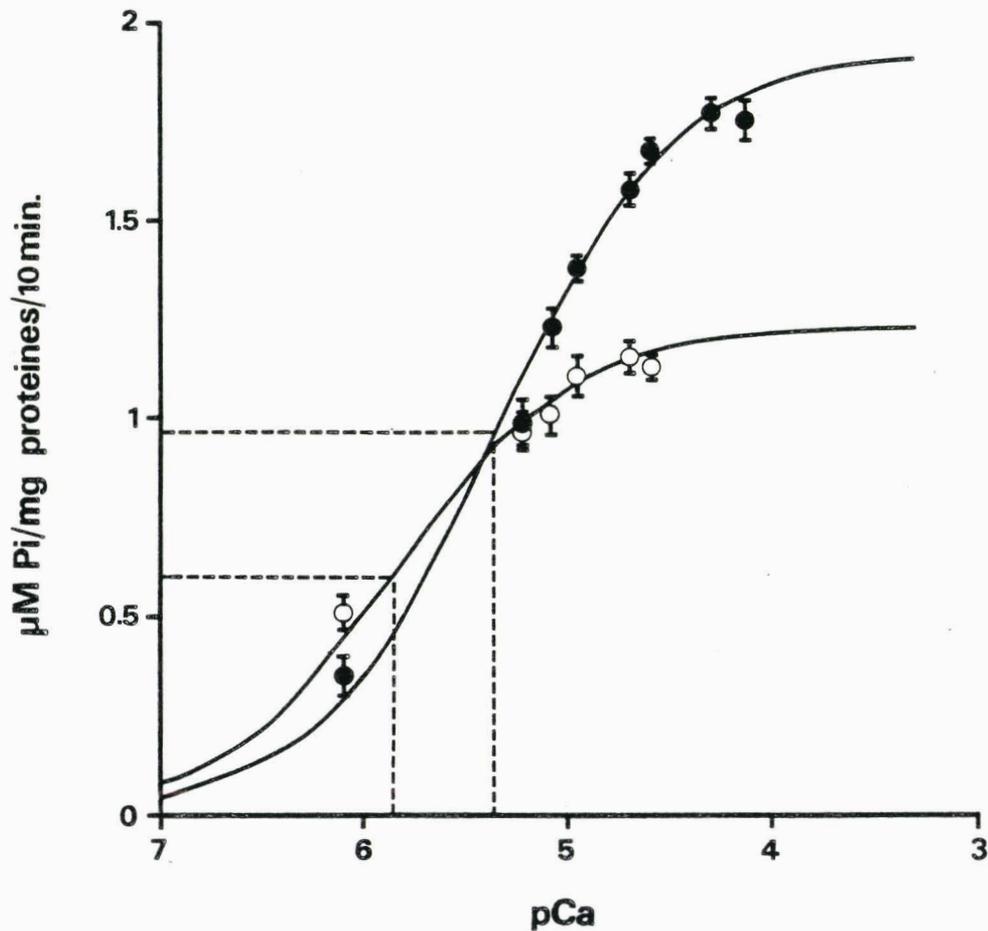


Figure 20

Relation liant le taux de Pi libéré à pCa déterminée pour une concentration de CH_3COO^- de 172 mM. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCH_3COO 0,1 M pendant 40 min. (●) ou 1020 min. (○).

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

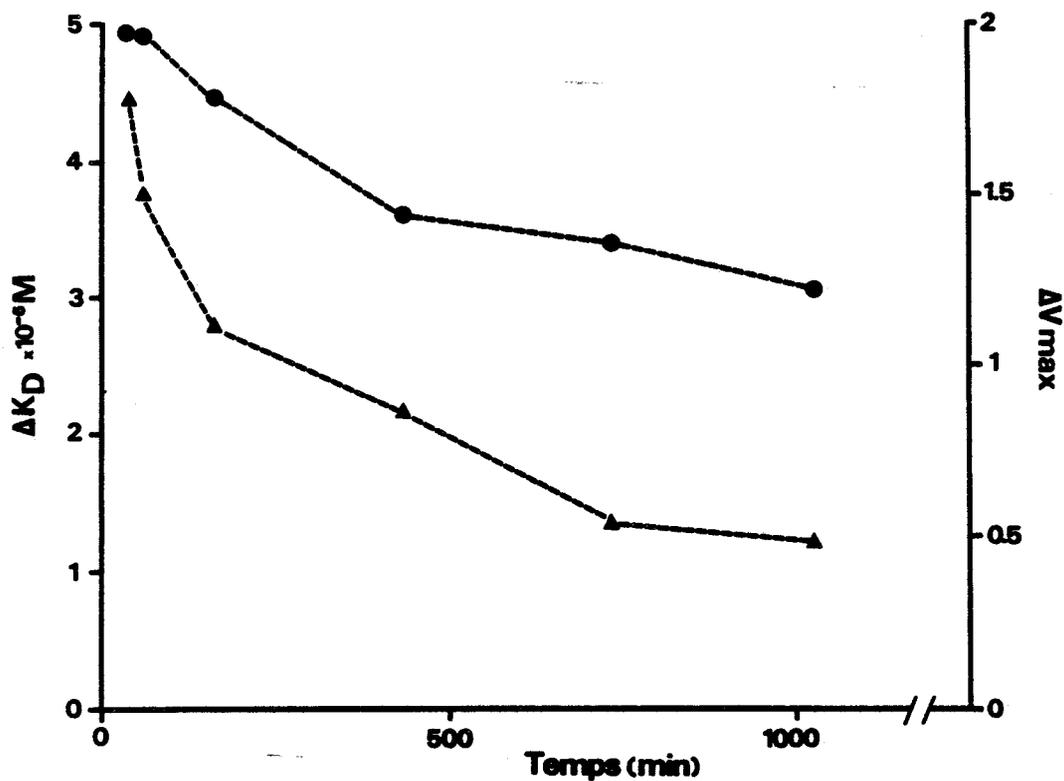


Figure 21

Variation de la constante apparente de dissociation, K_D , (▲) et de la vitesse d'hydrolyse d'ATP, exprimée en $\mu\text{M Pi/mg.protéines/10 min.}$, (●), en fonction du temps de stockage des protéines dans la solution de KCH 500 0,1 M.

Les réactions enzymatiques sont réalisées dans une solution renfermant une concentration d'acétate maximale (172 mM).



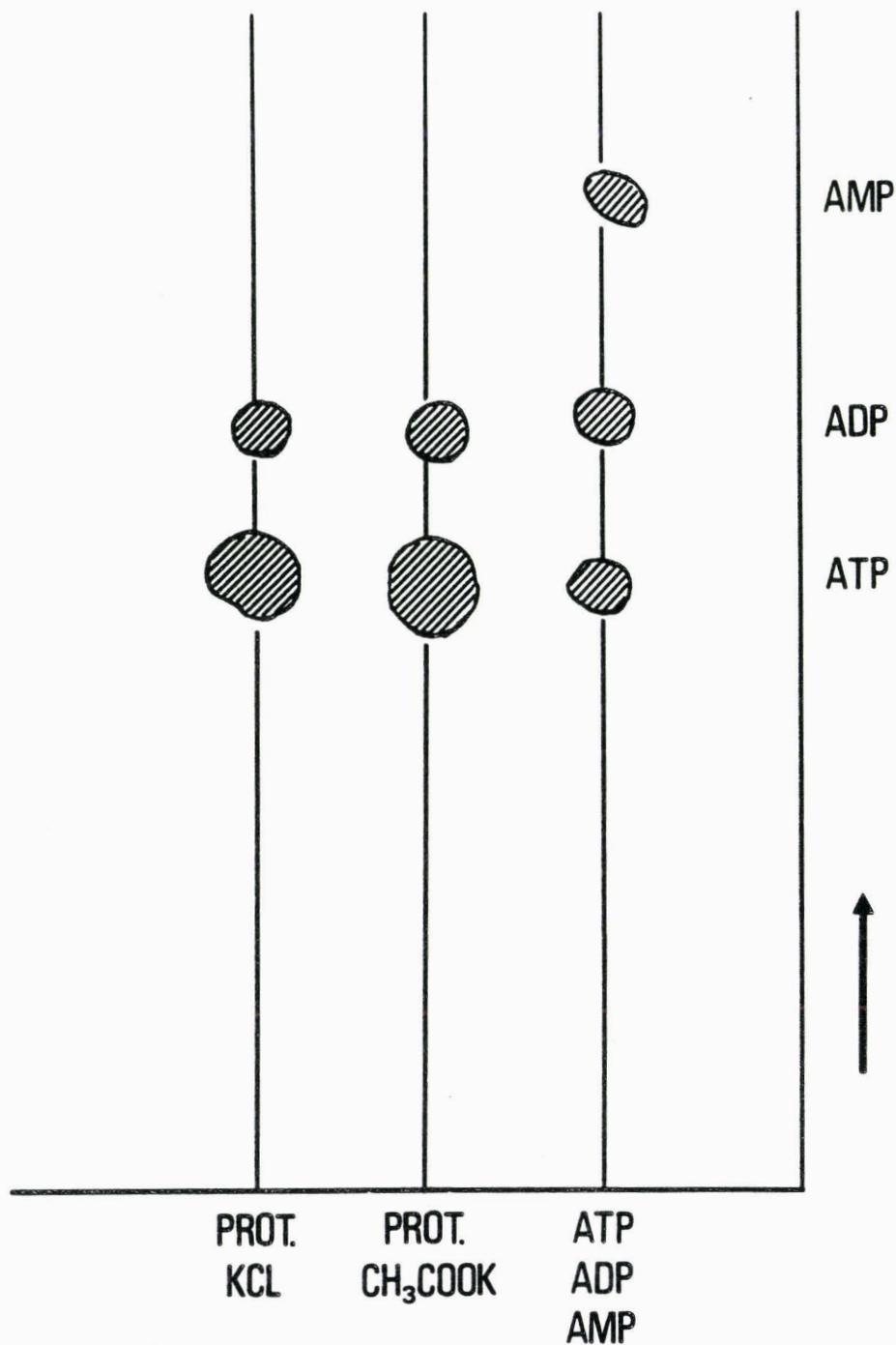


Figure 22

Séparation chromatographique des différents métabolites de l'ATP, en tampon isobutyrique.

Cette chromatographie donne les résultats de la dégradation de l'ATP par des protéines stockées dans une solution de KCl 0,1 M ou de KCH₃COO 0,1 M par rapport à une solution témoin renfermant de l'ATP, de l'ADP et de l'AMP.

BIS
1962

de l'activité ATPasique pour les protéines ayant séjournées 40 min. dans la solution de CH_3COOK 0,1 M, par contre, l'accroissement n'est plus que de 94,5 % après 1020 min. Dans ces nouvelles conditions de stockage des protéines (KCH_3COO), une variation de la constante apparente de dissociation du complexe enzyme- Ca^{++} en fonction du temps, est observée. Cette constante qui, dans les conditions de référence a une valeur de $3,05 \cdot 10^{-6} \text{M}$, après 40 min. de stockage dans le CH_3COOK 0,1 M, augmente ($K_D = 4,45 \cdot 10^{-6} \text{M}$) pour ensuite diminuer puisqu'elle n'est plus que de $1,415 \cdot 10^{-6} \text{M}$ après 1020 min. (Fig. 20). La figure 21 donne la variation de cette constante apparente de dissociation, ainsi que la variation de vitesse d'hydrolyse d'ATP en fonction du temps de stockage des protéines en CH_3COOK 0,1 M.

La différence observée dans les valeurs de K_D déterminées dans les conditions d'un stockage des protéines en solution de KCH_3COO 0,1 M peut s'expliquer en proposant un rôle destabilisant de l'acétate en absence de chlore vis-à-vis du site liant le Ca^{++} . La diminution de la valeur de K_D en fonction du temps de stockage des protéines en solution de KCH_3COO rend compte d'une augmentation de l'affinité des sites pour le Ca^{++} . Ainsi, après 1020 min. de stockage dans l'acétate, l'affinité des sites pour le calcium est plus importante de 68 % qu'après 40 min. de stockage.

L'ion CH_3COO^- apparaît donc provoquer une variation de l'affinité des sites pour le Ca^{++} et une augmentation de l'activité ATPasique par rapport à l'ion chlorure. Cette augmentation de l'activité ATPasique par l'acétate peut s'expliquer par un renforcement de la conformation active de l'ATPase de la myosine, mais aussi éventuellement par une activation d'une ADPase qui hydrolyserait l'ADP en AMP et P_i . Afin de vérifier ce dernier point, une chromatographie a été réalisée à partir de deux lots de protéines stockées dans une solution de KCl 0,1 M et dans une solution de KCH_3COO 0,1 M (Fig. 22).

Comme pour la mesure de l'activité ATPasique (voir chapitre technique), 0,1 ml de suspension de myofibrilles (110 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont additionnées au milieu de réaction. Dès lors, 50 μl sont immédiatement prélevés et mis en présence

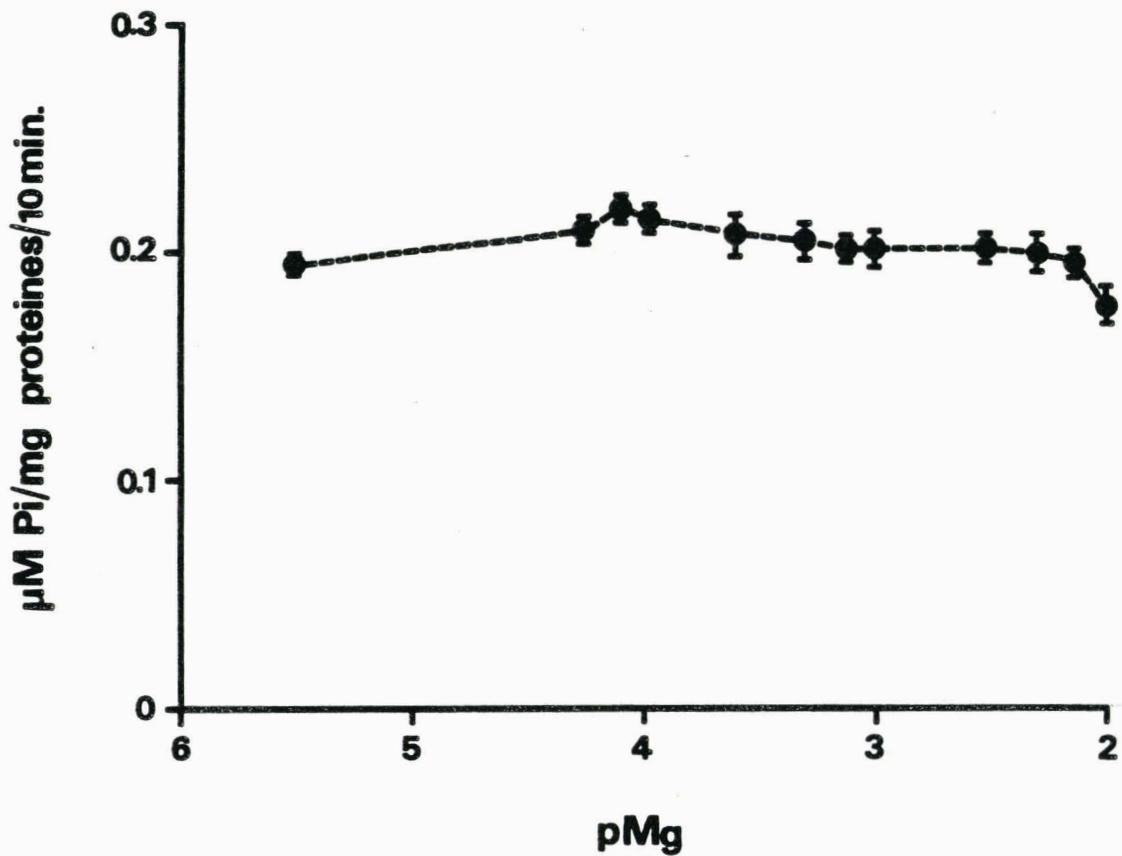


Figure 23

Relation liant le taux de Pi libéré ($\mu\text{M Pi/mg.protéines/10 min.}$) à pMg déterminée pour une concentration maximale de CH_3COO^- de 172 mM ($\text{pCa} > 9$). Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCH_3COO 0,1 M pendant 40 min.

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

d'1 μ l d'une solution d'ATP marquée au C_{14} , (correspondant à 0,05 μ Ci.). Après 10 minutes, (temps de réaction), 30 μ l de l'incubat sont déposés sur une ligne tracée à 9 cm du bord inférieur d'une feuille de papier whatman 3MM et séchés rapidement afin de stopper la réaction enzymatique. La chromatographie à affinité de phase s'effectue pendant 18 heures environ à la température de 20°C. Elle est réalisée en une seule étape dans un tampon isobutyrique (66 ml d'acide isobutyrique, 10 ml de NH_4OH concentré et 33 ml d' H_2O). La migration chromatographique des dérivés de l'adénine (ATP, ADP, AMP), se réalise en fonction de la polarité des molécules car le papier (cellulose) qui est très hydrophile retient tout ce qui est polaire, alors que le solvant organique (acide isobutyrique) entraîne ce qui est moins polaire. Comme le montre la figure 22, aucune hydrolyse d'ADP en AMP et en Pi n'est visualisée. L'action de l'acétate est donc bien localisée au niveau de l'ATPase de la myosine. De même, il est possible d'envisager que l'acétate puisse être un activateur d'une ATPase dépendante du Mg^{++} , puisqu'en présence d'une faible activité de calcium ($pCa > 9$), une activité ATPasique de l'ordre de 0,2 μ m de Pi/mg protéines/10 min est observée.

La figure 23 infirme cette hypothèse puisque aucune variation significative de l'activité ATPasique n'apparaît pour une grande variation de pMg. L'action de l'ion CH_3COO^- est donc bien d'activer l'ATPase de la myosine dépendante du calcium. De plus, comme le montre la figure 24, cet effet activateur est réversible.

Pour l'étude de cette réversibilité, les dosages enzymatiques sont effectués à partir d'une même suspension myofibrillaire divisée en trois parties. Une d'entre elles est lavée dans la solution de KCl 0,1 M, et les deux autres dans celle de KCH_3COO 0,1 M. Enfin, une des deux dernières parties est relavée 40 min. ou 1020 min. après dans la solution de KCl 0,1 M. Il est ainsi possible d'obtenir des myofibrilles en suspension dans une solution ne renfermant que très peu d'acétate. Le dosage enzymatique peut alors être effectué sur ces

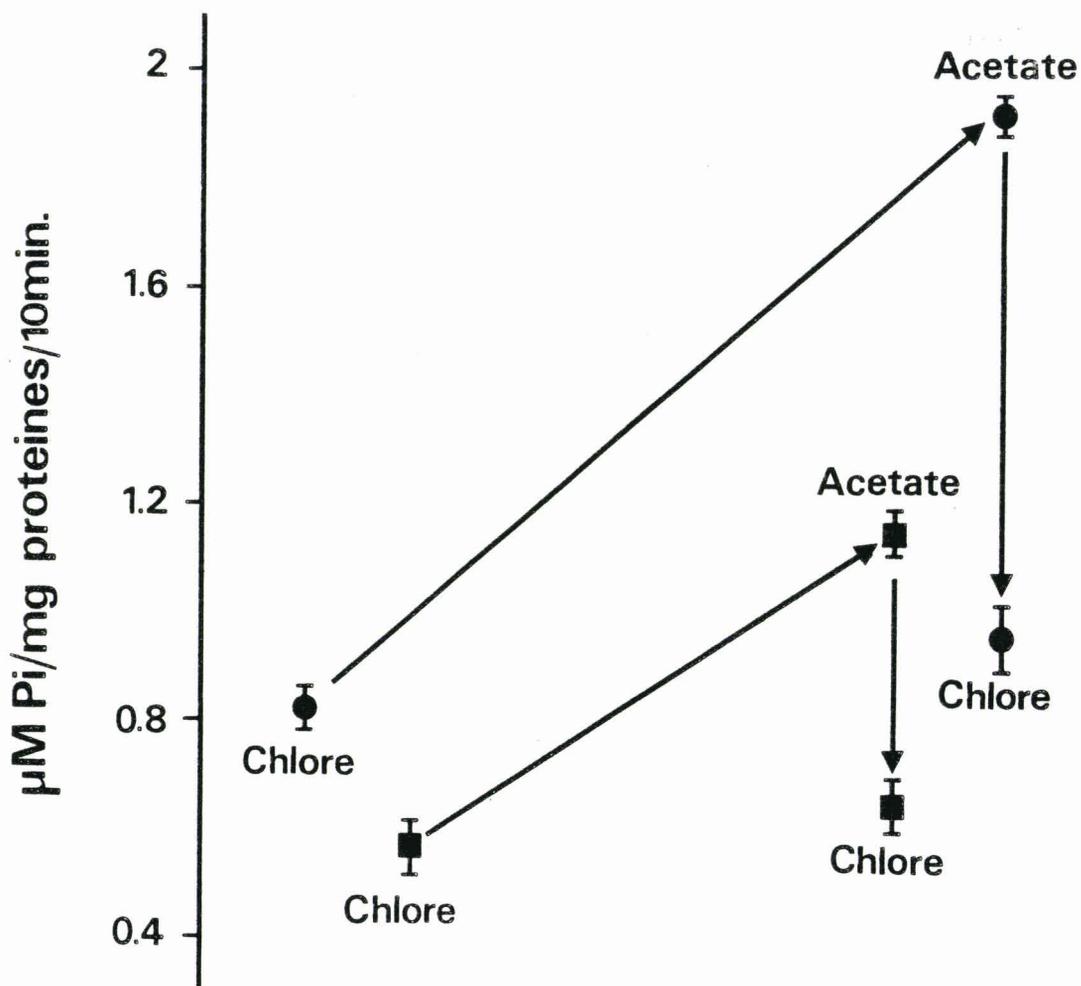


Figure 24

Quantité de Pi libéré en fonction de l'environnement anionique du milieu de réaction.

Les points marqués acétate correspondent à l'activité ATPasique mesurée en présence de cet anion utilisé en remplacement des ions chlore.

Les dosages sont effectués à partir d'une même suspension myofibrillaire divisée en 4 parties (2 d'entre elles étant lavées en milieu sans chlore).

Les flèches dirigées vers le bas, après un passage de 40 ou 1020 min. en acétate, indiquent que ces deux suspensions sont relavées en milieu de référence.

Chaque point de la figure représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

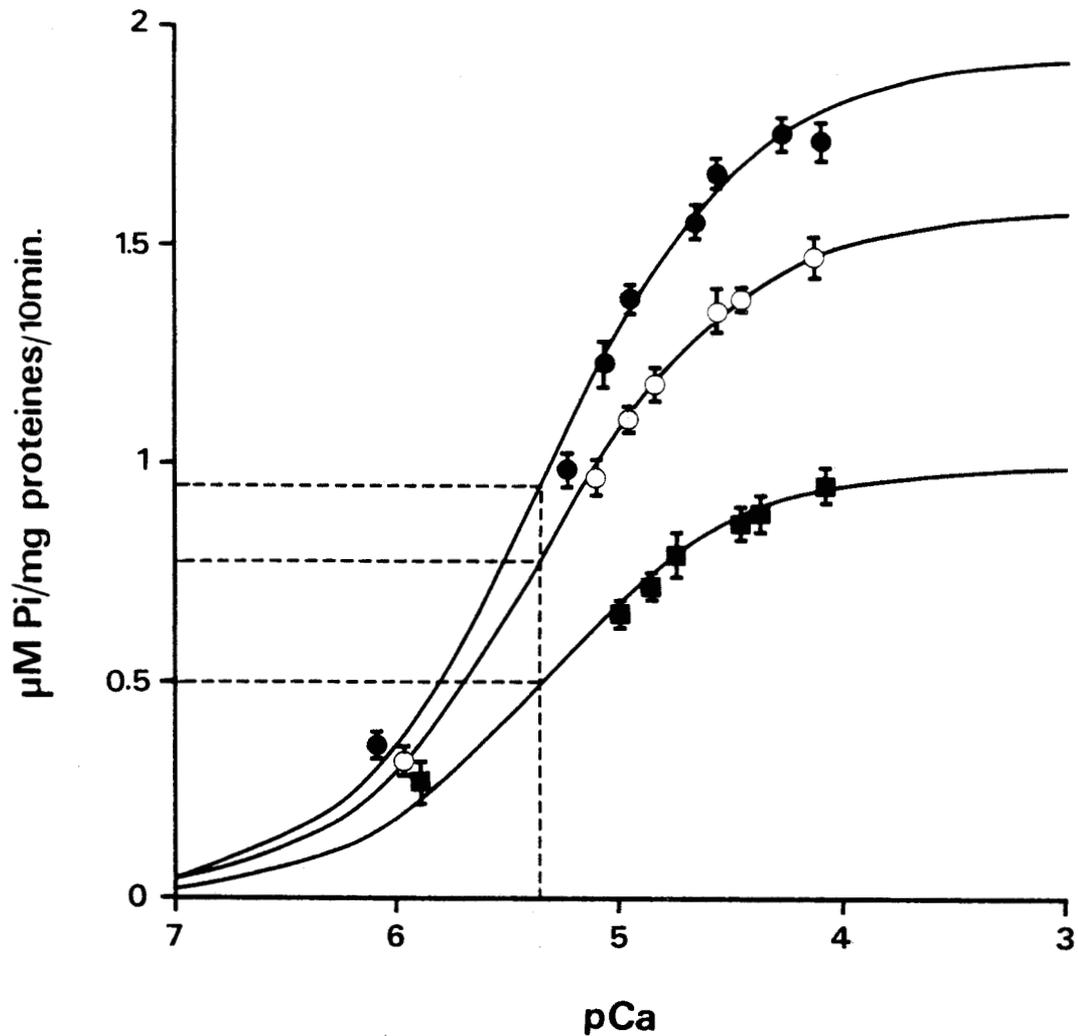


Figure 25

Taux de Pi libéré en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 40 min. dans la solution de KCH_3COO 0,1 M) pour différentes concentrations d'acétate et de chlorure (■, 122 mM Cl^- et 50 mM CH_3COO^- ; $n_H = 0,898$; ○, 76 mM Cl^- et 98 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,999$; ●, 172 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,966$).

Dans chaque cas n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).



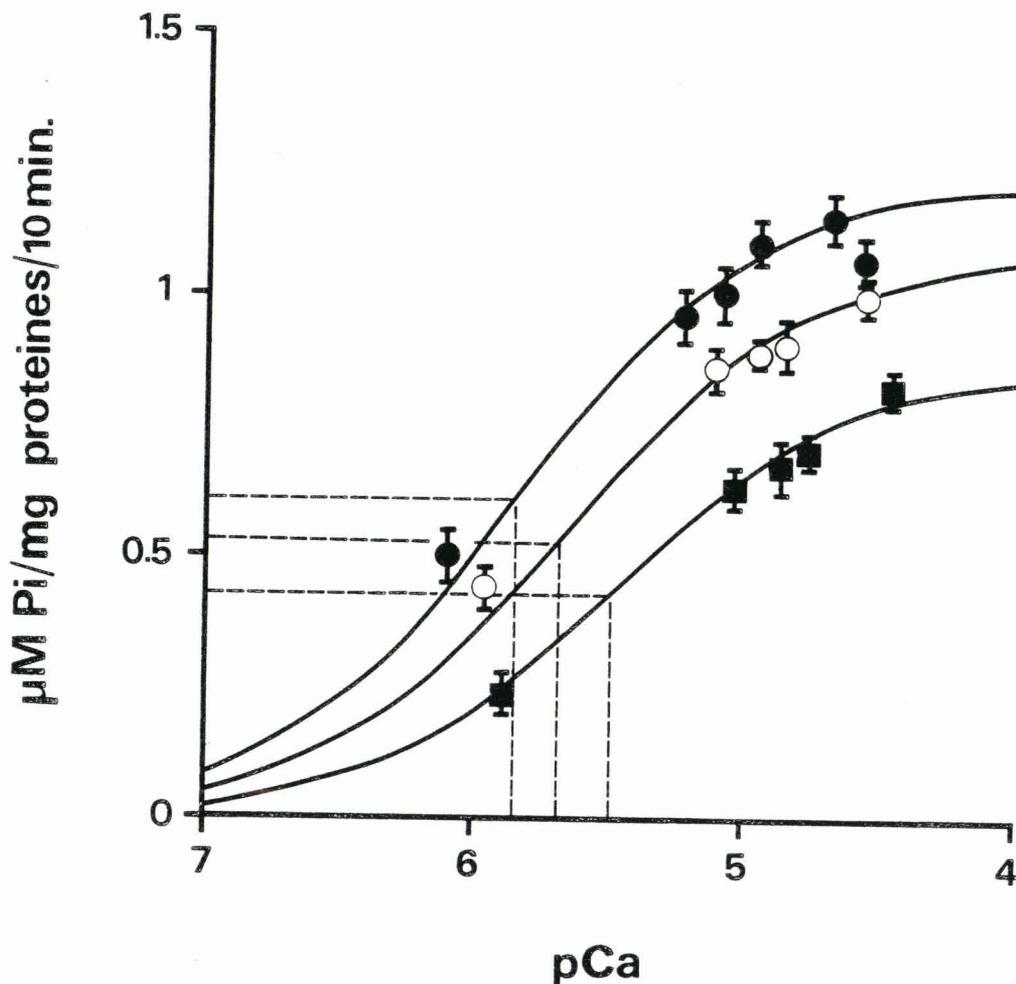


Figure 26

Taux de Pi libéré en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 1020 min dans la solution de KCH_3COO 0,1 M) pour différentes concentrations d'acétate et de chlorure (■, 122 mM Cl^- et 50 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,876$; ○, 76 mM Cl^- et 98 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,91$; ●, 172 mM CH_3COO^- , $n_H = 0,94$).

Dans chaque cas n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

lots de protéines ayant séjournées pendant 40 min. et 1020 min. dans une solution de KCl 0,1 M ou de KCH_3COO 0,1M. La figure 24 traduit la réversibilité et montre que l'acétate n'apparaît pas être fixée de façon covalente à un groupement fonctionnel indispensable à la catalyse. Ce fait justifie l'analyse de la cinétique des réactions enzymatiques à l'aide de l'équation de MICHAELIS-MENTEN, puisque pour étudier l'activation ou l'inhibition d'un facteur il est nécessaire que la formation des complexes enzymes-substrat-activateur ou inhibiteur soit réversible.

En présence de différentes concentrations de CH_3COO^- et de chlorure les relations sigmoïdes (Fig. 25) déterminées à partir de la relation de HAENES, montrent que la valeur théorique de la constante apparente de dissociation ($4,45 \cdot 10^{-6} \text{M}$) est identique quelle que soit la concentration en ions CH_3COO^- , alors que la vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP augmente en fonction de l'accroissement de la concentration en CH_3COO^- . Ce résultat est identique à celui obtenu lors du stockage des myofilaments en solution de KCl 0,1 M (Fig. 17). Là encore, l'acétate apparaît intervenir comme un activateur et l'ion chlorure comme un inhibiteur non compétitif simple.

Pour les protéines stockées dans l'acétate pendant 1020 min. les relations sigmoïdes liant la vitesse d'hydrolyse de l'ATP à pCa (Fig. 26), montrent une diminution de la valeur de la constante apparente de dissociation et une augmentation de la vitesse maximale d'hydrolyse d'ATP en fonction de l'accroissement de la concentration en ion CH_3COO^- . Ce fait rend compte là encore d'un rôle activateur de cet anion. Toutefois, en ce qui concerne la variation de la constante apparente de dissociation, elle ne peut être uniquement imputable à un effet du stockage, mais également due à un effet de la concentration finale d'acétate sur l'affinité du site calcique dans la mesure où cette constante varie en fonction de la concentration en acétate. Sur des protéines stockées dans l'acétate depuis 1020 min., cet anion apparaît être encore un activateur (augmentation de l'hydrolyse de l'ATP en fonction de l'augmentation de la concentration en acétate), mais l'ion chlorure n'apparaît plus

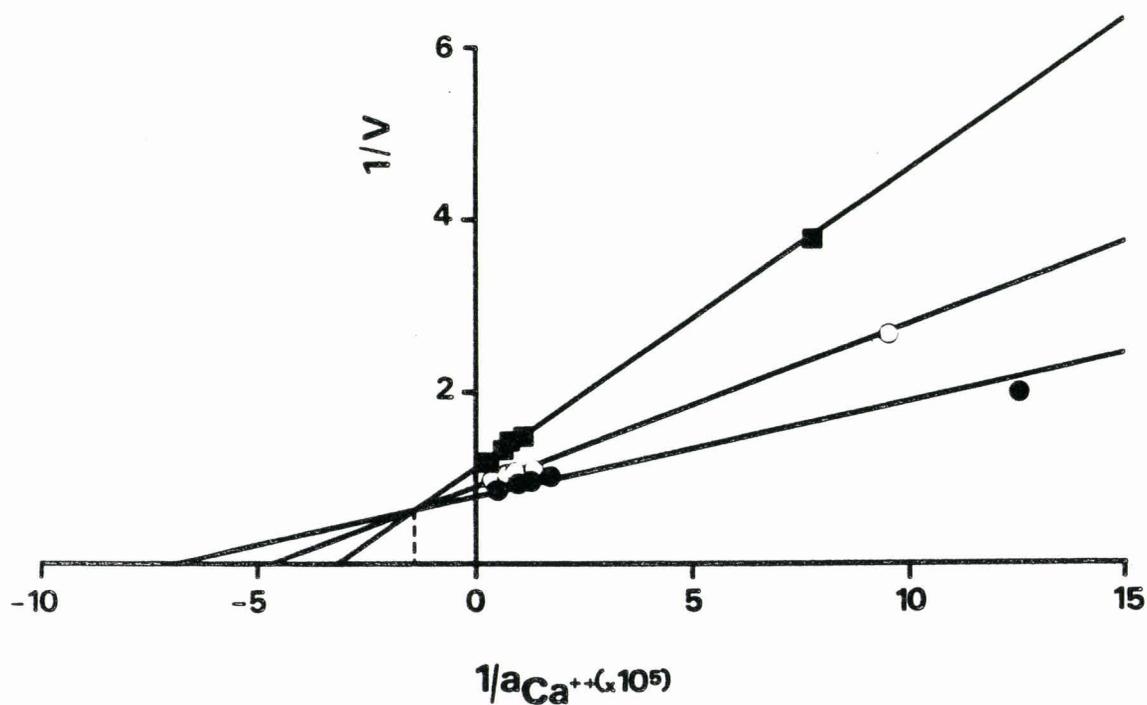


Figure 27

Relation en double réciproque $1/V$ à $1/a_{Ca^{++}}$ (protéines ayant été stockées 1020 min. dans la solution de KCH_3COO 0,1 M) pour différentes concentrations d'acétate et de chlorure (■, 122 mM Cl^- et 50 mM CH_3COO^- ; ○, 76 mM Cl^- et 98 mM CH_3COO^- ; ●, 172 mM CH_3COO^-).

Les points correspondent aux valeurs moyennes expérimentales.

intervenir comme un inhibiteur compétitif simple, (la valeur de K_D diminuant en fonction de la diminution de la concentration en chlorure). Afin d'obtenir de plus amples renseignements sur le type d'inhibition produit par les ions Cl^- la "linéarisation" en double réciproque de la relation de MICHAELIS et MENTEN montre que les diverses droites obtenues suivant les concentrations en acétate et chlorure se coupent toutes à gauche de l'axe des ordonnées, en un point d'abscisse correspondant à une valeur de $a_{Ca^{++}}$ de $7.10^{-5}M$ (Fig. 27). Ce résultat caractérise un type d'inhibition connu sous le nom d'inhibition non compétitive mixte. Il s'agirait donc d'une inhibition due à la déformation de l'enzyme sous l'effet des ions chlorure conduisant à la fois à une diminution de l'affinité et à une réduction du pouvoir catalytique. Ces deux effets n'intervenant statistiquement pas forcément pour les mêmes concentrations en inhibiteur (chlorure). Enfin comme dans toutes les conditions de stockage des protéines le coefficient de HILL est très proche de 1 cela implique que la réaction reste de type bimoléculaire.

En conclusion : la compétition entre les ions acétate et chlorure dépend de la durée de stockage des protéines en solution de CH_3COO 0,1 M. Pour des protéines ayant séjournées 40 min. dans l'acétate, l'ion chlorure intervient en tant qu'inhibiteur non compétitif simple, alors que pour les protéines ayant séjournées pendant 1020 min., il intervient en tant qu'inhibiteur non compétitif mixte. Toutefois, dans les deux cas, il apparaît que l'ion acétate puisse être considéré comme un activateur. Cet effet activateur est illustré à la Figure 28 qui montre que, quelle que soit la durée de stockage des protéines dans une solution de KCH_3COO 0,1 M, la vitesse d'hydrolyse de l'ATP est fonction de la concentration en ion CH_3COO^- .

Ainsi, après 40 min. de stockage, pour une variation de la concentration en acétate de 50 mM à 172 mM, l'activité ATPasique augmente environ de 95 % alors que l'accroissement n'est que de 49 % après 1020 min. de stockage.



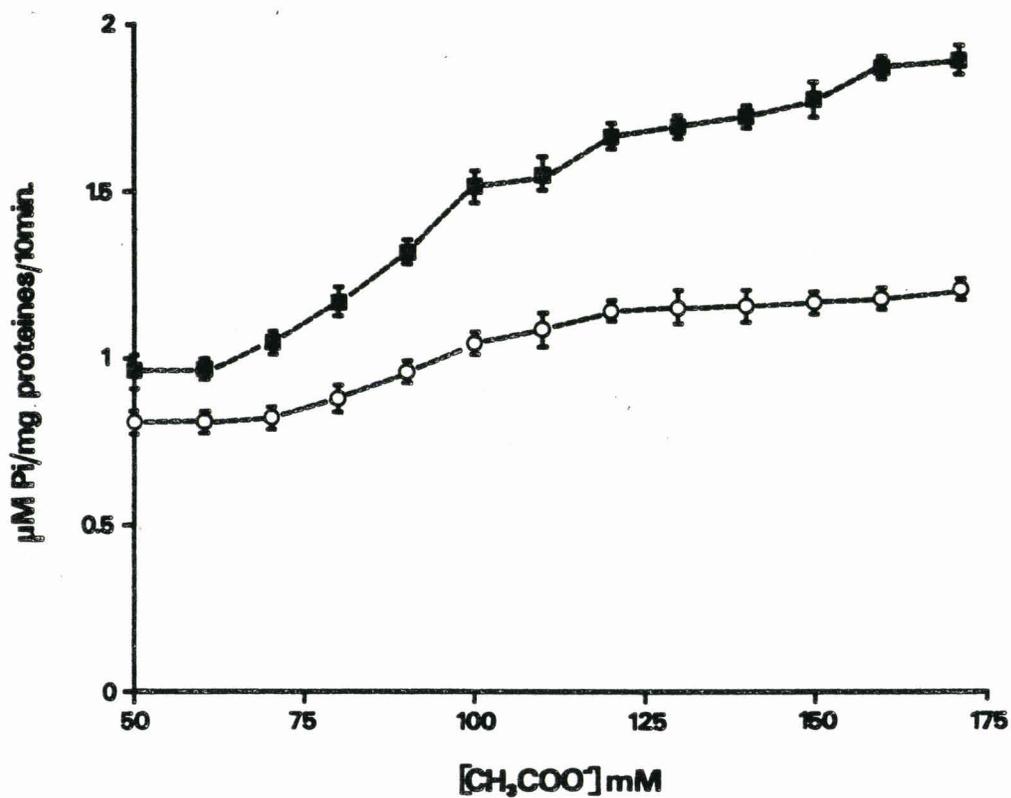


Figure 28

Relation liant le taux de Pi libéré à la concentration de CH_3COO^- (mM) pour une valeur de $a_{\text{Ca}^{++}}$ égale à $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCH_3COO 0,1 M pendant 40 min. (■) ou 1010 min. (○).

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

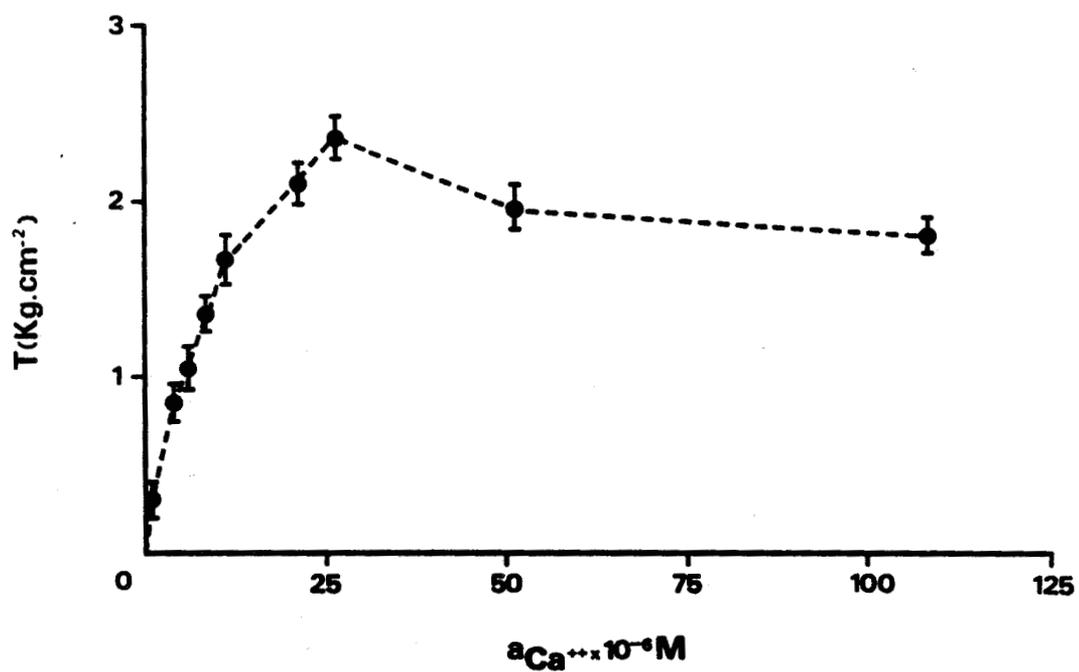


Figure 29

Relation liant la tension mécanique (Kg.cm^{-2}), développée par les myofibrilles à l'activité de calcium en présence de 172 mM d'acétate.



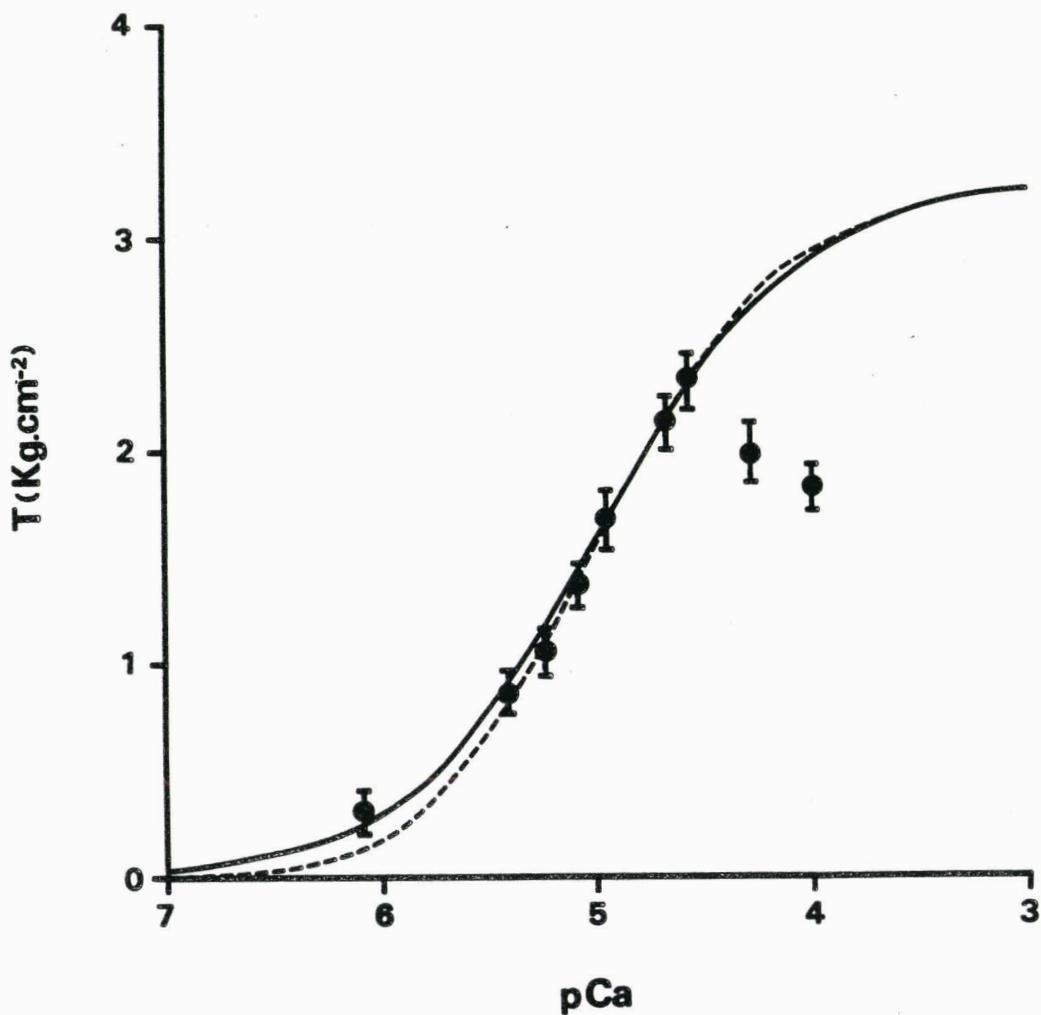


Figure 3

Relation liant la tension mécanique (Kg.cm^{-2}), développée par les myofibrilles, à pCa en présence de 172 mM d'acétate.

La courbe en trait plein est tracée à partir de l'équation du mécanisme à double déplacement, celle en pointillée à partir de l'équation du schéma d'ASHLEY-MOISESCU (1977).

3-1-2- Ions CH_3COO^- et contraction des myofibrilles en fonction de $a_{\text{Ca}^{++}}$:

La relation liant la tension mécanique développée par les myofibrilles en fonction de $a_{\text{Ca}^{++}}$ en présence d'ions acétate (Fig. 29) conserve comme dans les conditions de référence un aspect hyperbolique. Là encore deux phases apparaissent : une phase d'activation et une phase d'inhibition. Par contre, la pente concernant la phase d'activation est plus importante puisque l'optimum de $2,37 \text{ Kg.cm}^{-2}$ est atteint pour une $a_{\text{Ca}^{++}}$ de $2,58 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ contre $16 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en référence (Fig. 12-13).

Afin de mieux préciser le rôle de l'ion acétate dans le développement de la tension, les relations déterminées à partir du schéma à double déplacement ou du schéma de ASHLEY-MOISESCU (1977) traduisant l'effet coopératif des ions Ca^{++} , ont été établies.

A partir du schéma à double déplacement la relation (Fig. 30), liant la tension au logarithme décimal de l'inverse de $a_{\text{Ca}^{++}}$, permet de déterminer un optimum théorique de contraction de $3,18 \text{ Kg.cm}^{-2}$, et une constante K , qui représente la somme de K_1 et K_2 , de $9,94 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Connaissant la valeur de T_{max} théorique, il est alors possible d'étudier la relation liant la contraction à $p\text{Ca}^{++}$ selon le modèle de ASHLEY-MOISESCU (1977) permettant l'évaluation de K_1 et K_2 . Tout comme dans les conditions de référence, la figure 30 montre une très légère différence entre la relation obtenue à partir du schéma à double déplacement, et celle à partir du schéma d'ASHLEY et MOISESCU. La relation d'ASHLEY-MOISESCU permet de déterminer un K_1 de $0,89 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ et un K_2 de $9,16 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. Par rapport aux conditions de référence, il apparaît d'une part une augmentation de la tension maximale ($3,18 \text{ Kg.cm}^{-2}$ contre $2,78 \text{ Kg.cm}^{-2}$), et d'autre part une diminution de K_1 et K_2 ($0,89 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ et $9,16 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ contre respectivement $1,55 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ et $3,15 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). Le point le plus important qui doit être dégagé concerne, par rapport aux conditions de référence, l'augmentation de T_m ; augmentation qui peut d'ailleurs être reliée à celle observée pour l'activité ATPasique.

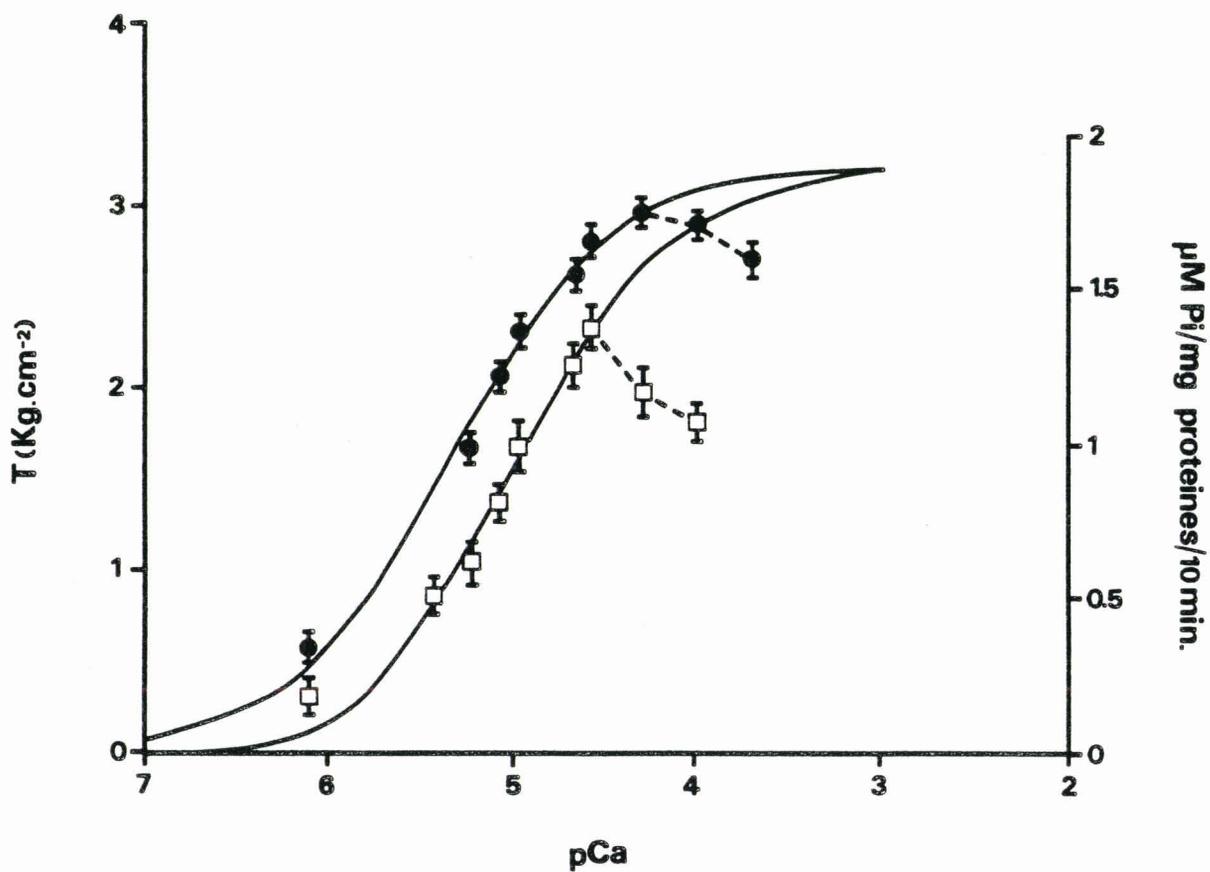


Figure 31

Tension mécanique développée par les myofilaments (Kg.cm^{-2} , \square) et taux de Pi libéré ($\mu\text{M Pi/mg.protéines/10 min.}$; \bullet) en fonction de pCa.

3-1-3- Corrélation entre l'activité ATPasique et la tension :

La figure 31 montre les deux relations liant d'une part la contraction et d'autre part la vitesse d'hydrolyse de l'ATP à pCa. Entre les deux courbes, il apparaît un parfait parallélisme, le décalage étant de 0,4 unité pCa. Comme dans les conditions de référence, il existe donc une étroite relation liant les deux phénomènes. Cette relation exprimée à la figure 32 a été obtenue à partir de la relation linéaire suivante : $V_o/T_o = 1,256 - 0,323V_o$ ($r = .989$). La relation liant T_o à V_o est donc là encore une relation hyperbolique. Toutefois, il est à noter une diminution de la pente de la relation ($-0,323$ contre $-2,97$ en référence). Cette diminution de la pente de la relation linéaire rend compte d'un "mauvais rendement" lors de la conversion de l'énergie chimique libérée par l'hydrolyse de l'ATP en énergie mécanique.

En accord avec les résultats de JACOBS et GUTHE (1970), il semble que l'ion CH_3COO^- agit sur l'actomyosine de crabe comme activateur en augmentant l'affinité des sites pour les ions Ca^{++} , mais aussi en modifiant directement ou indirectement le site actif responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Nos résultats sont également en accord avec ceux obtenus par WARREN et al. (1966), SEIDEL (1969). Pour ces auteurs, la modification du site actif serait essentiellement due à un changement de conformation de la protéine, imputable au groupement méthyl de l'acétate. Dans le but de vérifier cette influence éventuelle du groupement méthyl, l'étude des ions méthylsulfate ($\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$) a été réalisée.

3-2 Influence des ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$:

Contrairement à l'acétate, beaucoup moins de travaux concernent les effets du méthylsulfate sur l'activité ATPasique de l'actomyosine et sur la tension mécanique développée par les myofibrilles isolées.

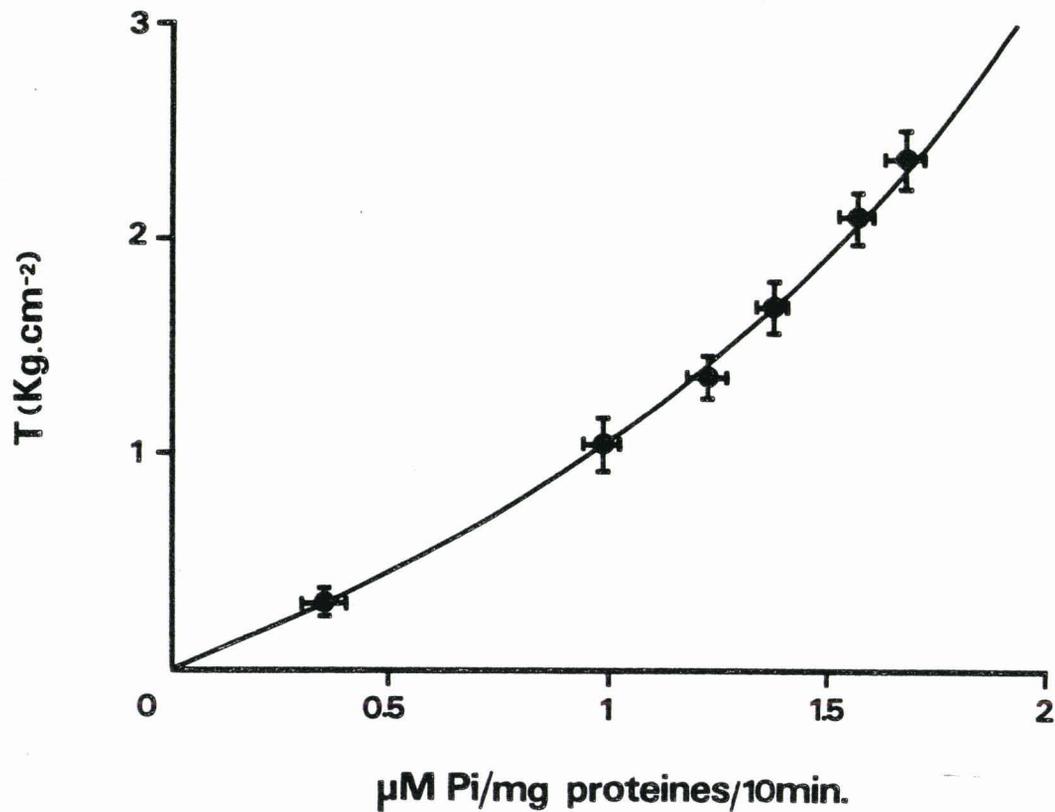


Figure 32

Relation liant la tension mécanique développée par les myofibrilles (Kg.cm^{-2}) au taux de Pi libéré ($\mu\text{M Pi/mg.protéines/10 min.}$).

Chaque point de la tension représente $m \pm \sigma$ ($n = 8$) et chaque point pour le taux de Pi libéré $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

3-2-1- Ion $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ et Activité APTasique des myofilaments en fonction de pCa :

a) Myofilaments stockés en solution de 0,1 M :

En présence de différentes concentrations d'ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ les relations sigmoïdes liant la vitesse d'hydrolyse d'ATP à pCa (Fig. 33), déterminées à partir de la relation linéaire de HAENES, montrent que :

- d'une part, l'hydrolyse d'ATP maximale théorique (0,86 $\mu\text{Mpi/mg.protéines/10 min.}$) ne varie pas en fonction de l'augmentation de la concentration en méthylsulfate (taux maximum d'hydrolyse semblable au taux déterminé dans les conditions de référence).

- d'autre part, en fonction de la concentration en $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ la valeur de K_D augmente et donc l'affinité du site pour le calcium diminue. Ainsi, comme le montre la figure 33, la valeur de K_D qui est de $3,05 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ en conditions de référence passe à $1,01 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en présence de 122 mM de méthylsulfate et 50 mM de chlorure.

Des résultats obtenus, il ne semble pas que les ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ modifient la vitesse de disparition du complexe myofilament-ATP, mais diminuent l'affinité du site actif pour l'ion Ca^{++} .

Ceci permet d'avancer l'hypothèse que l'ion $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ intervient en tant qu'inhibiteur compétitif puisque quelle que soit sa concentration, le même taux maximum d'hydrolyse est atteint. L'inhibition compétitive se rencontre généralement dans le cas où l'inhibiteur est un analogue chimique du substrat, en l'occurrence le calcium, il existe dès lors une sorte de compétition entre l'inhibiteur et le substrat pour le centre actif. L'inhibiteur peut former un complexe avec l'enzyme, et bien que ce complexe soit dissociable tant que l'inhibiteur demeure fixé, il occupe une partie plus ou moins étendue du centre actif et empêche alors la fixation du véritable substrat. Il en résulte une augmentation de la constante apparente de dissociation (K_D) de l'enzyme pour le substrat, alors que l'optimum de la réaction n'est pas modifiée. Cependant, en ce qui concerne notre analyse, le méthylsulfate n'est pas un

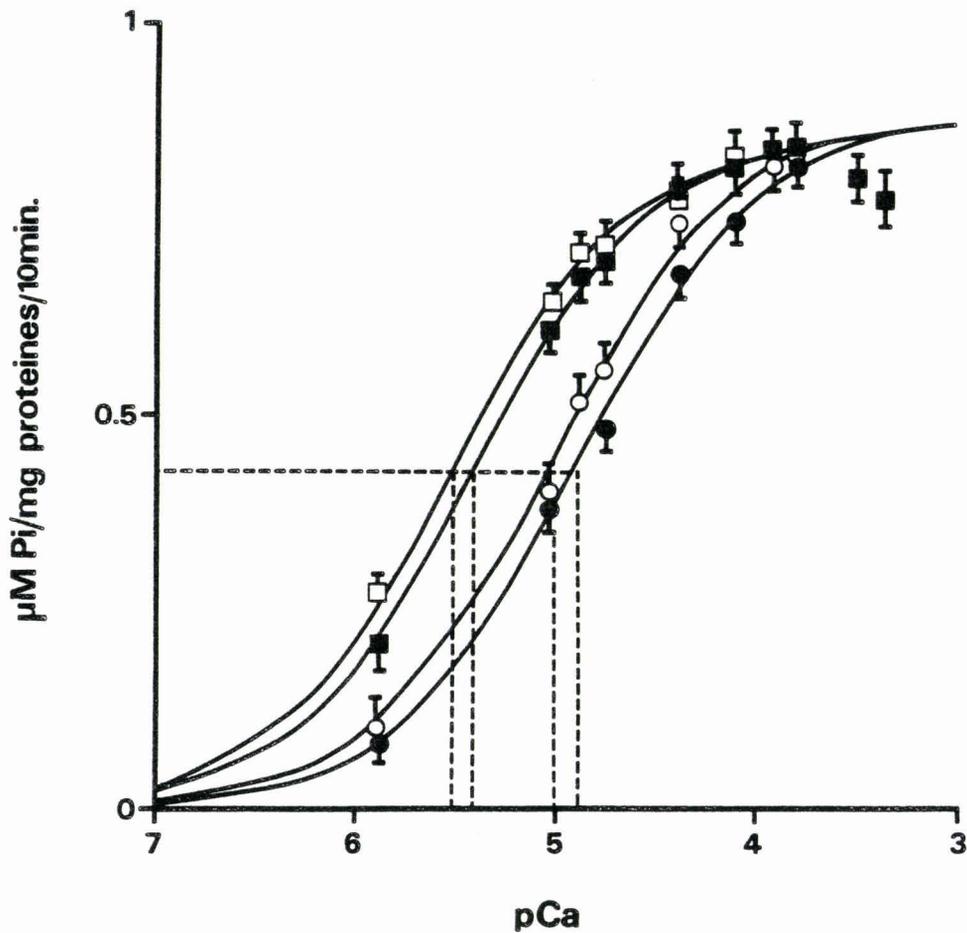


Figure 33

Taux de Pi libéré en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 40 min. dans la solution de KCl 0,1 M) pour différentes concentrations d'acétate et de chlorure (□, 172 mM Cl⁻, $n_H = 0,987$; ■, 122 mM Cl⁻ et 50 mM CH₃COO⁻, $n_H = 0,993$; ○, 76 mM Cl⁻ et 98 mM CH₃COO⁻, $n_H = 0,987$; ●, 50 mM Cl⁻ et 122 mM CH₃COO⁻, $n_H = 0,97$).

Dans chaque cas, n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

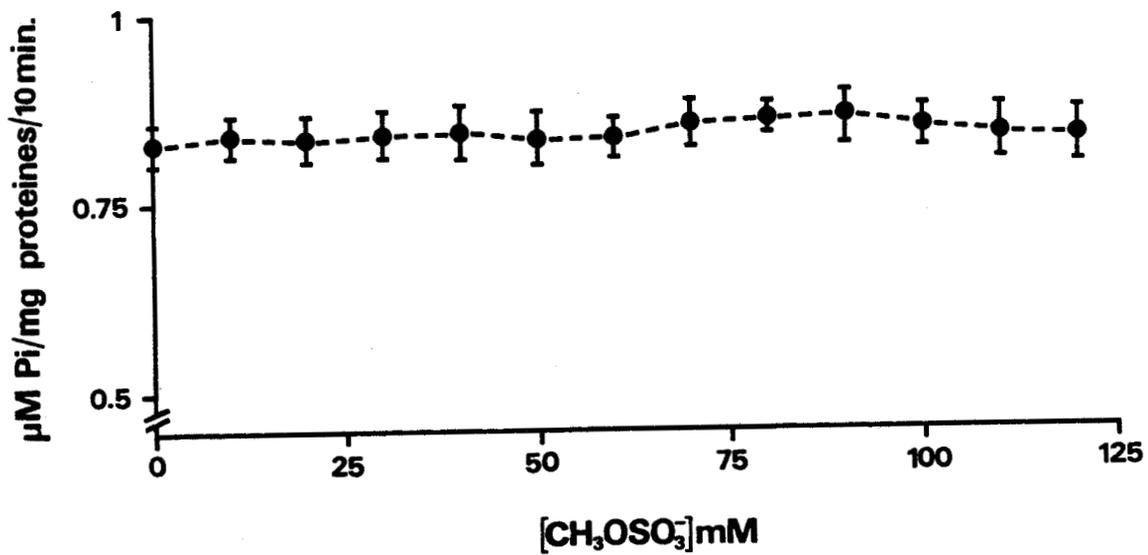


Figure 34

Relation liant le taux de Pi libéré à la concentration de $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ (mM) pour une valeur de $a_{\text{Ca}^{++}}$ égale à $16,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCl 0,1 M pendant 40 min.

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).



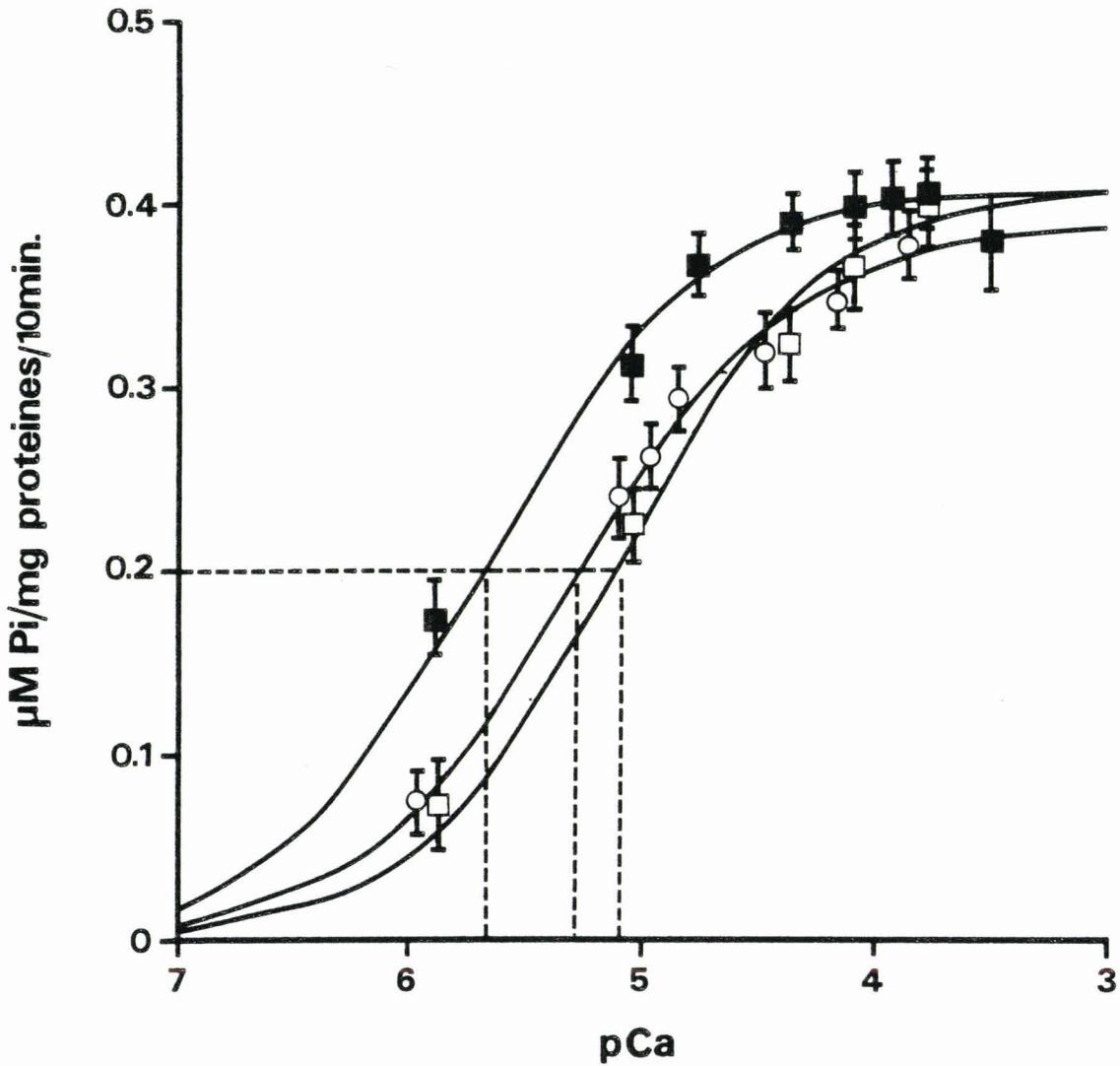


Figure 3 5

Taux de Pi libéré en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 40 min. dans la solution de KCH_3OSO_3 0,1 M) pour différentes concentrations de méthylsulfate et de chlorure (\blacksquare , 172 mM $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, $n_H = 0,966$; \circ , 76 mM Cl^- et 98 mM $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, $n_H = 1,036$; \square , 122 mM Cl^- et 50 mM $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, $n_H = 0,953$).

Dans chaque cas n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

analogue chimique du calcium et par conséquent, ce type d'inhibition ne devrait pas pouvoir s'appliquer. Toutefois, MONOD (voir PENASSE, 1974), a montré que ce type d'inhibition pouvait s'appliquer dans le cas des enzymes oligomériques. Ainsi, la fixation du substrat ou de l'inhibiteur, chacun sur un site particulier, s'accompagne d'une déformation de l'enzyme. Cette déformation peut atteindre la région du site de fixation du substrat et par conséquent défavoriser cette dernière fixation. Il en résulte alors un comportement compétitif, et ce même pour des ligands n'ayant pas le même site de fixation.

Des enzymes sont dits oligomériques lorsqu'ils contiennent deux ou plusieurs chaînes polypeptidiques séparées. C'est le cas de l'ATPase myofibrillaire dans la mesure où le site actif liant l'ATP est situé sur la chaîne légère de la myosine et où le site de fixation du calcium est situé au niveau de la troponine C ou au niveau de la chaîne lourde de myosine ; de ce fait, dans le cadre de notre étude, l'hypothèse de MONOD peut s'appliquer et permet d'expliquer l'inhibition compétitive entre le calcium et le méthylsulfate.

En conclusion, l'activité ATPasique des myofilaments stockés en solution de KCl 0,1 M en fonction de pCa mais aussi en fonction de la concentration en ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ ou Cl^- (Fig. 33), présente une augmentation de la valeur de la constante apparente de dissociation du complexe enzyme-calcium qui suit l'augmentation de la concentration en $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, alors que l'optimum d'activité ATPasique est identique. Ceci est confirmé puisque la figure 34 montre que le taux d'ATP hydrolysé pour une activité de Ca^{++} constante ($161,28 \cdot 10^{-6} \text{M}$) est indépendant de la concentration en Cl^- et en $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$.

De plus, dans tous les cas, la détermination du coefficient de HILL donnant une valeur très proche de 1, montre que la réaction reste toujours de type bimoléculaire.

b) Myofilaments stockés dans la solution de $\text{KCH}_3\text{OSO}_3 \cdot 0,1 \text{M}$.

En présence uniquement d'ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ la relation sigmoïde liant le taux d'hydrolyse d'ATP à pCa (Fig. 35), présente un taux optimum d'hydrolyse d'ATP de $0,41 \mu\text{Mpi/mg.protéines/10 min}$. Ainsi, le remplacement de tous les ions Cl^-

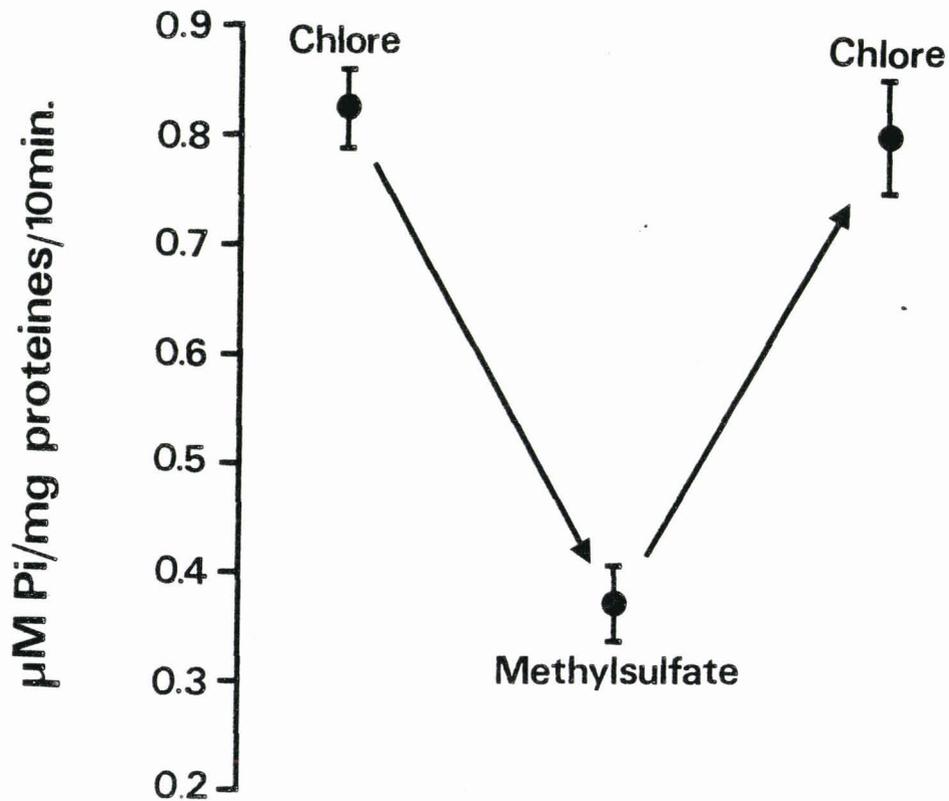


Figure 36

Quantité de Pi libéré en fonction de l'environnement anionique du milieu de réaction.

Les points marqués méthylsulfate correspondent à l'activité ATPasique mesurée en présence de cet anion utilisé en remplacement de l'ion chlore.

Les dosages sont effectués à partir d'une même suspension myofibrillaire divisée en 2 parties (l'une d'entre elles étant lavée en milieu sans chlore).

La flèche dirigée vers le bas, après un passage de 40 min. en méthylsulfate, indique que cette suspension est relavée en milieu de référence.

Chaque point de la figure représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

par des ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ provoque cette fois une diminution de 52 % du taux maximum d'hydrolyse d'ATP par rapport aux conditions de référence.

En présence de différentes concentrations d'ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, les relations sigmoïdes (Fig. 35) déterminées à partir de la relation linéaire de HAENES, montrent, comme dans le cas des protéines stockées dans la solution de KCl 0,1 M, que l'optimum d'activité ATPasique est indépendant de la concentration en ions Cl^- et $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$. En ce qui concerne la valeur de la constante apparente de dissociation du complexe calcium-enzyme, elle est là encore proportionnelle à l'augmentation de la concentration en $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$. D'autre part, comme dans le cas des protéines en présence d'ions CH_3COO^- , les effets du $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ sur l'activité ATPasique sont parfaitement réversibles (Fig. 36).

Il semble donc que le méthylsulfate n'affecte pas de façon drastique la conformation de l'actomyosine, par conséquent l'analyse de la cinétique de la réaction enzymatique à l'aide de l'équation de MICHAELIS-MENTEN, est possible. De plus avec MONOD, il peut être envisagé l'hypothèse d'une inhibition de type compétitif produite par les ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$. De plus, la diminution de l'optimum d'activité ATPasique observée dans le cas des protéines stockées en $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ doit être interprétée comme la conséquence du mode de stockage de ces protéines.

Ces résultats concernant les effets du méthylsulfate mettent une fois de plus en valeur le rôle important joué par l'ion Cl^- . Ainsi, lors du stockage des protéines en solution de KCH_3OSO_3 (absence de chlorure), l'enzyme acquiert une configuration moins active que lors d'un stockage des protéines en KCl 0,1 M. Cette modification de la configuration enzymatique peut être due probablement à une liaison du méthylsulfate sur un site liant les anions, cette liaison étant "lâche," car la réversibilité est possible (Fig. 36).

En conclusion, la courbe de la figure 37 qui représente le taux d'ATP hydrolysé en fonction de la concentration en chlorure pour une $a_{\text{Ca}^{++}}$ constante ($161,3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$),

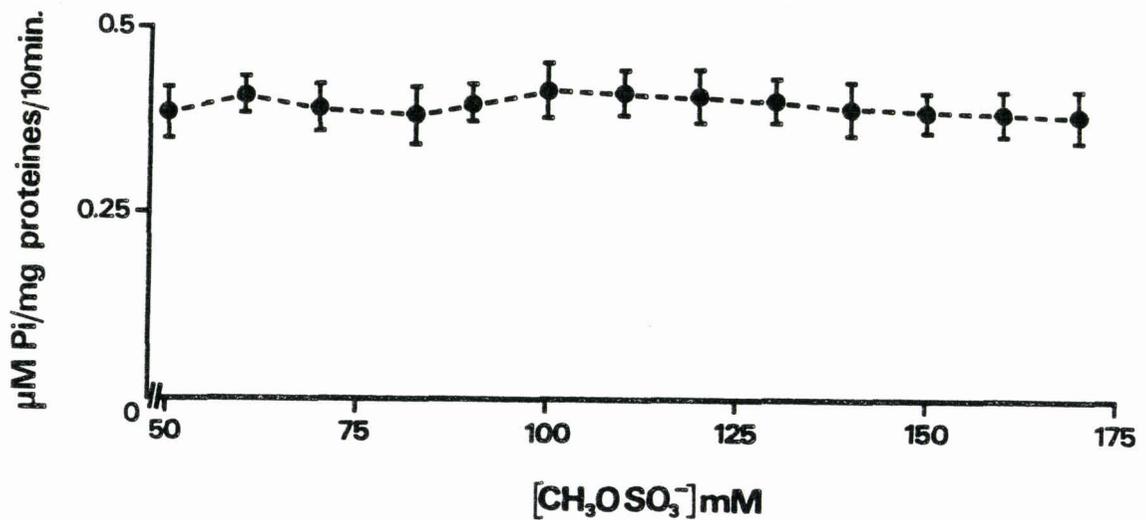


Figure 37

Relation liant le taux de Pi libéré à la concentration de $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ (mM) pour une valeur de $a_{\text{Ca}^{++}}$ égale à $161,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCH_3OSO_3 0,1 M pendant 40 min.

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

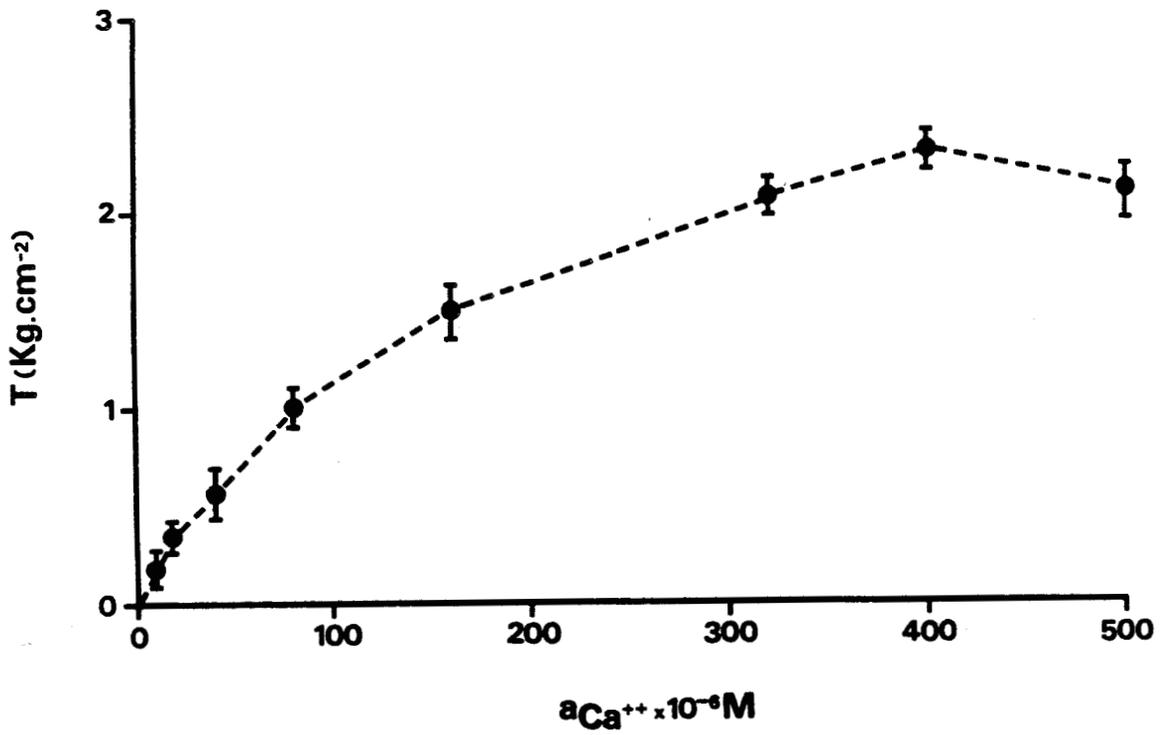


Figure 38

Relation liant la tension mécanique ($\text{Kg}\cdot\text{cm}^{-2}$), développée par les myofibrilles, à l'activité de calcium en présence de 76 mM de Cl^- et de 98 mM de CH_3SO_3^- .



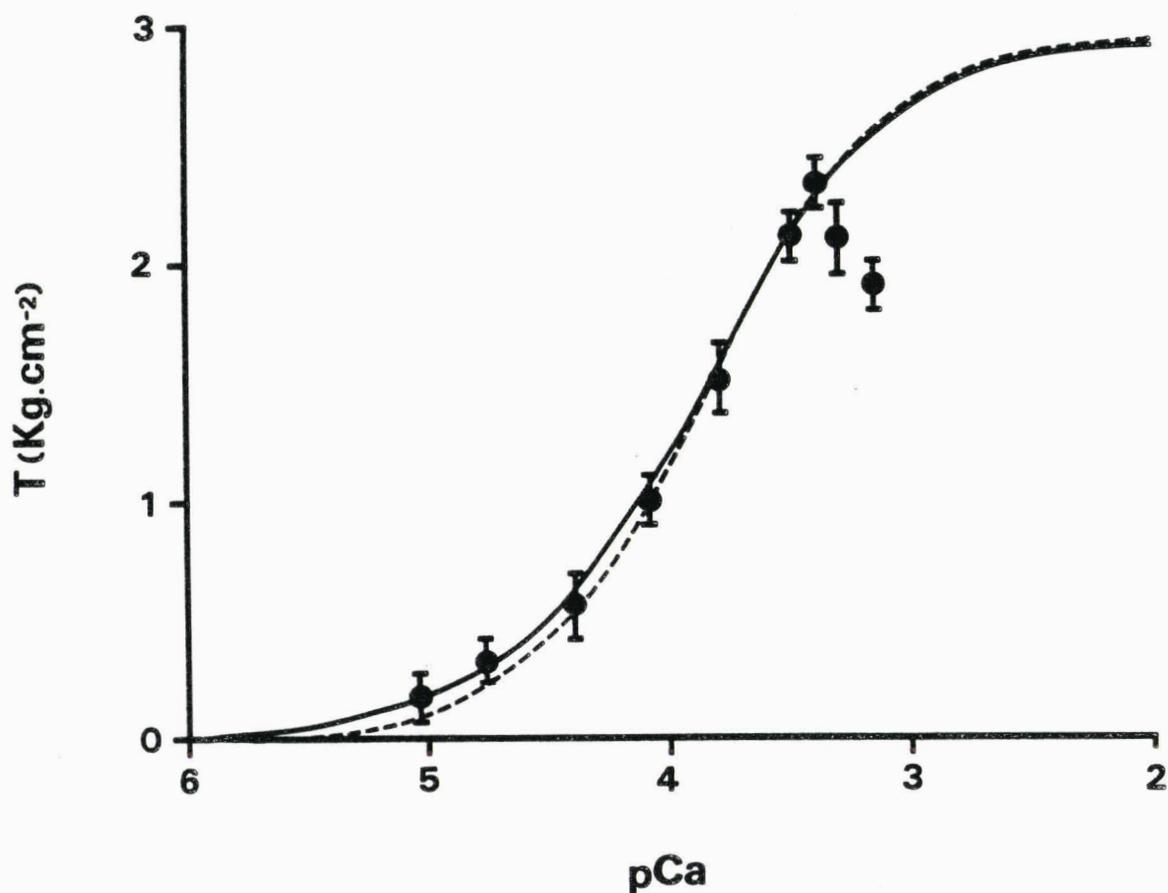


Figure 39

Relation liant la tension mécanique (Kg.cm^{-2}), développée par les myofibrilles, à pCa en présence de 76 mM de Cl^- et de 98 mM de CH_3SO_3^- .

La courbe en trait plein est tracée à partir de l'équation du mécanisme à double déplacement, celle en pointillés à partir de l'équation du schéma d'ASHLEY et MOISESCU (1977).

confirme le maintien de l'activité ATPasique à un taux constant égal à environ 50 % du taux maximal atteint dans les conditions de référence.

Enfin, la détermination du coefficient de HILL donne là encore une valeur proche de 1, signifiant donc que la réaction en présence de $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ reste de type bimoléculaire.

3-2-2- Ion $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ et contraction des myofibrilles en fonction de $a_{\text{Ca}^{++}}$:

Les myofibrilles isolées à l'aide des diverses solutions mais où les ions Cl^- sont remplacés par les ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ (voir chapitre techniques), ne peuvent, développer quelle que soit l'activité de calcium, qu'une tension mécanique au plus égale à $0,3 \text{ kg.cm}^{-2}$. C'est la raison pour laquelle les résultats exposés ci-dessus concernent la contraction de myofibrilles isolées à partir de solutions ne renfermant que les ions Cl^- : les ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ n'étant introduits que dans les diverses solutions de contraction.

Tout comme dans les conditions de référence, la relation liant la tension mécanique développée par les myofilaments en fonction de $a_{\text{Ca}^{++}}$ conserve pour la phase d'activation un aspect hyperbolique, et présente également une phase d'inhibition, comme le montre la figure 38. L'optimum de $2,32 \text{ kg.cm}^{-2}$ est atteint pour une activité de calcium de 4.10^{-4} M , alors qu'il l'était dans les conditions de référence pour une valeur de $a_{\text{Ca}^{++}}$ de $1,61.10^{-4} \text{ M}$. Il apparaît ainsi qu'en présence de $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ les myofibrilles développent une tension maximale équivalente à celle déterminée dans les conditions de référence. Afin de mieux préciser le rôle de $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ dans le développement de la tension, ont été établies les relations déterminées à partir du schéma à double déplacement et de celui de ASHLEY-MOISESCU (1977). A partir du schéma à double déplacement, la relation de la Fig. 39 liant la tension mécanique à $p\text{Ca}$ permet de déterminer un optimum de contraction de $2,94 \text{ Kg/cm}^{-2}$ et une constante K qui représente la somme de K_1 et K_2 de $1,28 10^{-4} \text{ M}$. Connaissant la valeur de T_{max} théorique, il est possible d'étudier l'évolution de la contraction en fonction de $p\text{Ca}$ (Fig. 39) à l'aide de la relation de ASHLEY-MOISESCU et ainsi d'évaluer les valeurs de

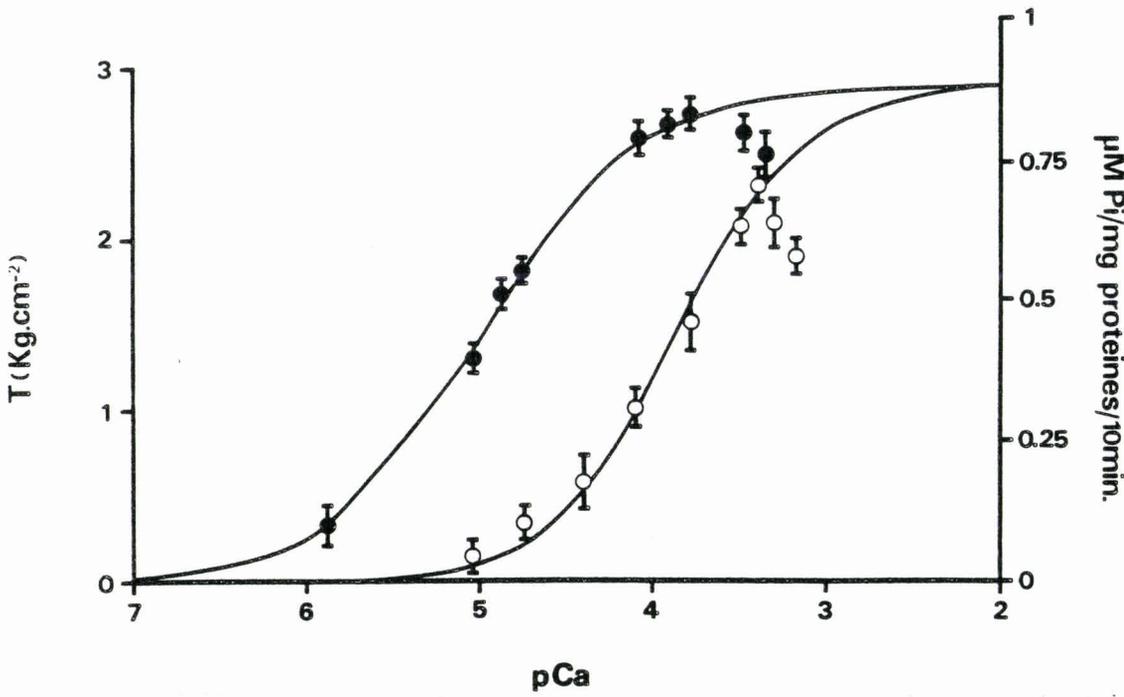


Figure 40

Tension mécanique développée par les myofilaments (Kg.cm⁻², ○) et taux de Pi libéré (µM Pi/mg.protéines/10 min., ●) en fonction de pCa.
 Chaque point pour la tension représente $m \pm \sigma$ (n = 8).
 Chaque point pour le taux de Pi représente $m \pm \sigma$ (n = 5).

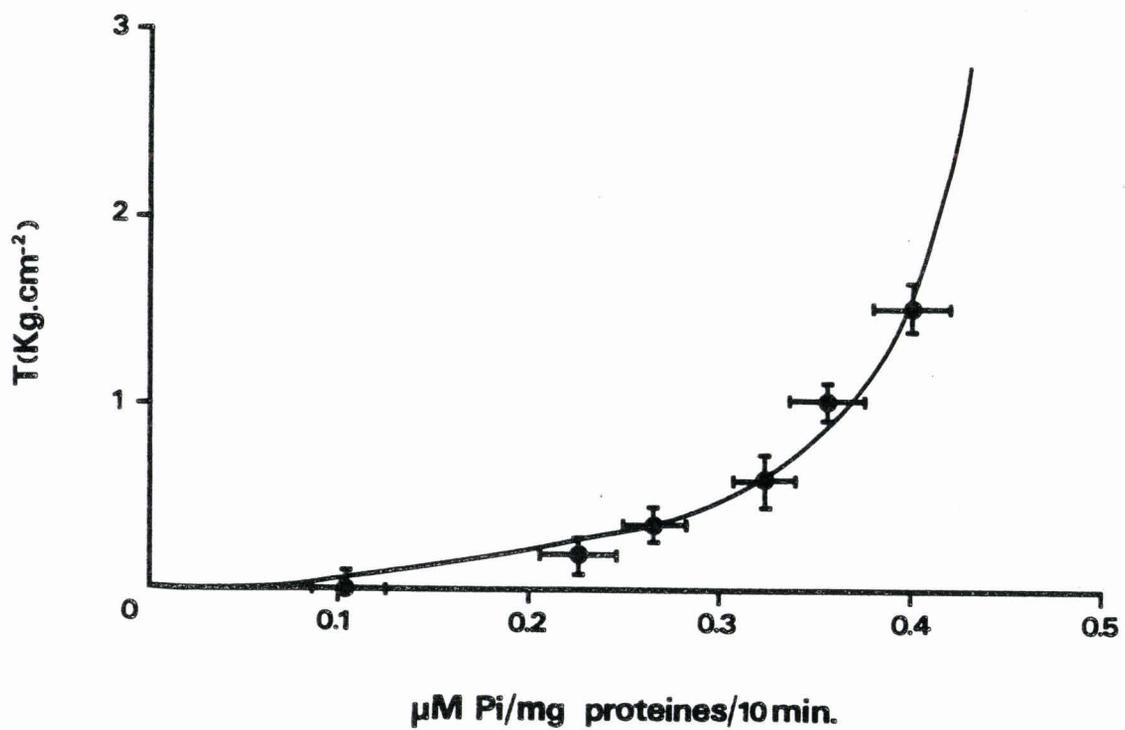


Figure 41

Relation liant la tension mécanique développée par les myofibrilles (Kg.cm⁻²) aux taux de Pi libéré (µM Pi/mg. protéines/10 min).
 Chaque point de la tension représente $m \pm \sigma$ (n = 8) et chaque point pour le taux de Pi libéré $m \pm \sigma$ (n = 5).



K_1 et K_2 . Comme dans tous les cas précédemment étudiés, la figure 39 montre une légère différence entre les relations déterminées à partir du schéma à double déplacement et à partir du schéma d'ASHLEY-MOISESCU. Cette dernière relation permet de déterminer une valeur de K_1 de $1,6 \cdot 10^{-5} M$ et de K_2 de $1,09 \cdot 10^{-4} M$. Ces constantes sont bien plus grandes que celles obtenues en conditions de référence, (respectivement $1,55 \cdot 10^{-6} M$ et $3,15 \cdot 10^{-5} M$). Comme pour l'activité ATPasique le maximum de tension atteint est le même que dans les conditions de référence, seule semble être affectée l'affinité des sites pour les ions Ca^{++} .

3-2-3- Corrélation entre l'activité ATPasique et la tension :

La figure 40 qui traduit la contraction des myofibrilles ainsi que leur activité ATPasique en fonction de la pCa, montre encore une évolution parallèle des 2 courbes avec un décalage de 2,1 unité pCa.

Il est donc encore possible de déterminer une relation entre l'activité ATPasique et la tension mécanique. Cette relation donnée à la figure 41 est hyperbolique puisqu'elle est établie à partir de l'équation linéaire :

$$V_o/T_o = 1,608 - 3,383 V_o \quad (r = .982)$$

En méthylsulfate, contrairement à ce qui était observé en présence d'acétate, il apparaît que la pente de la relation (-3,383) est peu différente de celle déterminée en conditions de référence (-2,973). Ce fait signifie que, pour une même tension, il faille autant d'ATP hydrolysé en présence d'ions $CH_3OSO_3^-$ qu'en présence d'ions Cl^- d'où un "rendement" mécanique comparable. Toutefois, il faut préciser qu'en présence de méthylsulfate, pour obtenir une activité ATPasique et une tension mécanique identiques à celles observées en présence de chlorure, il est nécessaire que l'activité de Ca soit beaucoup plus importante.

3-2-4- Conclusion :

Que ce soit sur des protéines stockées en solution de KCl 0,1 M ou



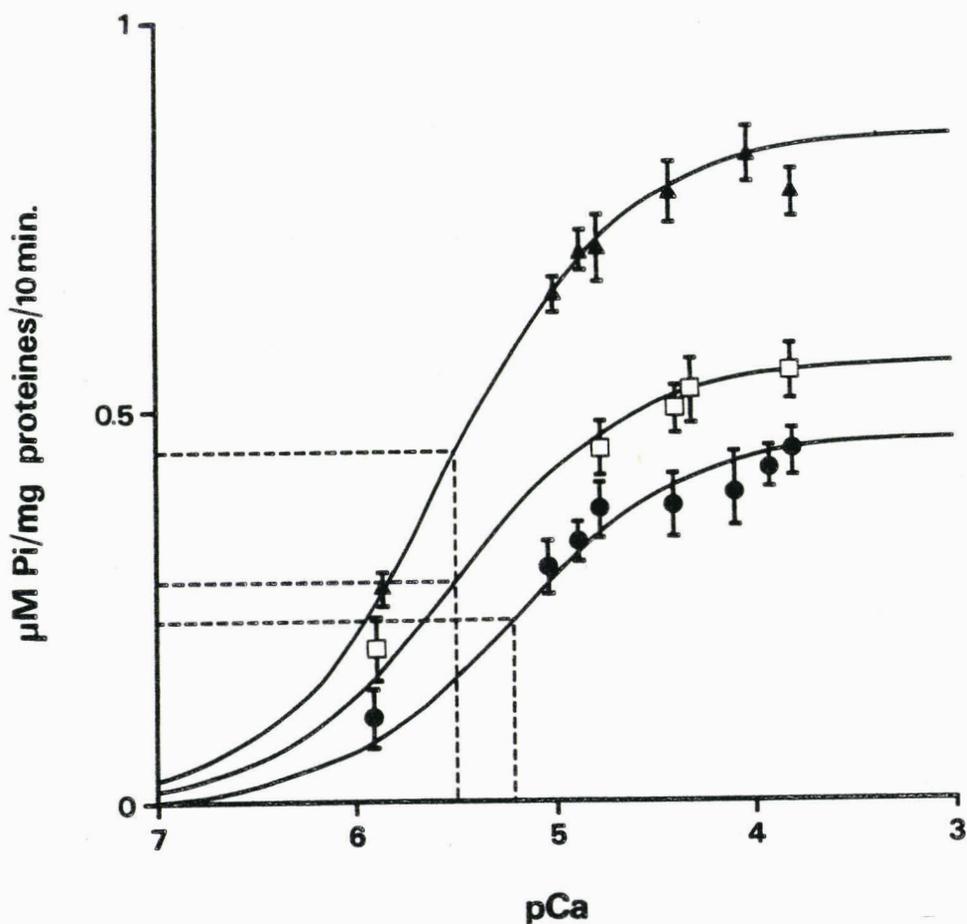


Figure 42

Taux de Pi libéré en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 40 min dans la solution de KCl 0,1 M) pour différentes concentrations de nitrate et de chlorure (▲, 172 mM Cl⁻, $n_H = 0,987$; □, 76 mM Cl⁻ et 98 mM NO₃⁻, $n_H = 0,811$; ●, 50 mM Cl⁻ et 122 mM NO₃⁻, $n_H = 0,862$).

Dans chaque cas n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).



de KCH_3OSO_3 0,1 M, les ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ n'agissent pas sur l'actomyosine en tant qu'activateur comme l'ion CH_3COO^- , mais en tant qu'inhibiteur "compétitif". De plus, le stockage des protéines dans la solution de méthylsulfate, ou l'absence de chlorure conduit à une diminution de 52 % de l'activité ATPasique.

L'isolement des myofibrilles à l'aide de solutions dont l'ion chlorure est remplacé par l'ion méthylsulfate permet le développement ultérieur d'une tension au plus égale à $0,3 \text{ kg.cm}^{-2}$. L'ensemble de ces résultats concernant les effets des ions $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ ne permet pas de conclure avec WARREN et al. (1966), SEIDEL (1969) que le groupement méthyl de l'acétate soit responsable de l'activation, puisque deux ions ayant en commun un groupement CH_3 se montrent, l'un activateur (CH_3COO^-) et l'autre, inhibiteur ($\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$).

3-3- Influence des ions NO_3^- :

Quelle que soit l'origine de l'ATPase, l'anion NO_3^- a toujours été considéré comme un inhibiteur (WARREN et al., 1966 ; SEIDEL, 1969 ; JACOBS et GUTHE, 1970 ; SANTIAGO, 1980 ; LOPEZ-ZABALZA et al., 1980).

Notre choix s'est donc porté sur l'étude de cet anion, d'une part parce qu'il est connu comme un agent potentiateur de la contraction sur la fibre squelettique et d'autre part, parce qu'il est généralement réputé, comme cela est précisé ci-dessous, comme un inhibiteur des ATPases. Si la contraction est proportionnelle à l'activité ATPasique, l'ion NO_3^- ne devrait pas être considéré comme un potentiateur direct de la tension mécanique mais indirect par le biais de changement de perméabilités ioniques membranaires.

3-3-1- Ions NO_3^- et activité ATPasique des myofilaments en fonction de la pCa :

a) Myofilaments stockés en solution de KCl 0,1 M

En présence de différentes concentrations d'ions NO_3^- , les relations sigmoïdes liant la vitesse d'hydrolyse d'ATP à pCa (Fig. 42), déterminées à partir de la relation linéaire de HAENES, montrent une augmentation de la valeur de la

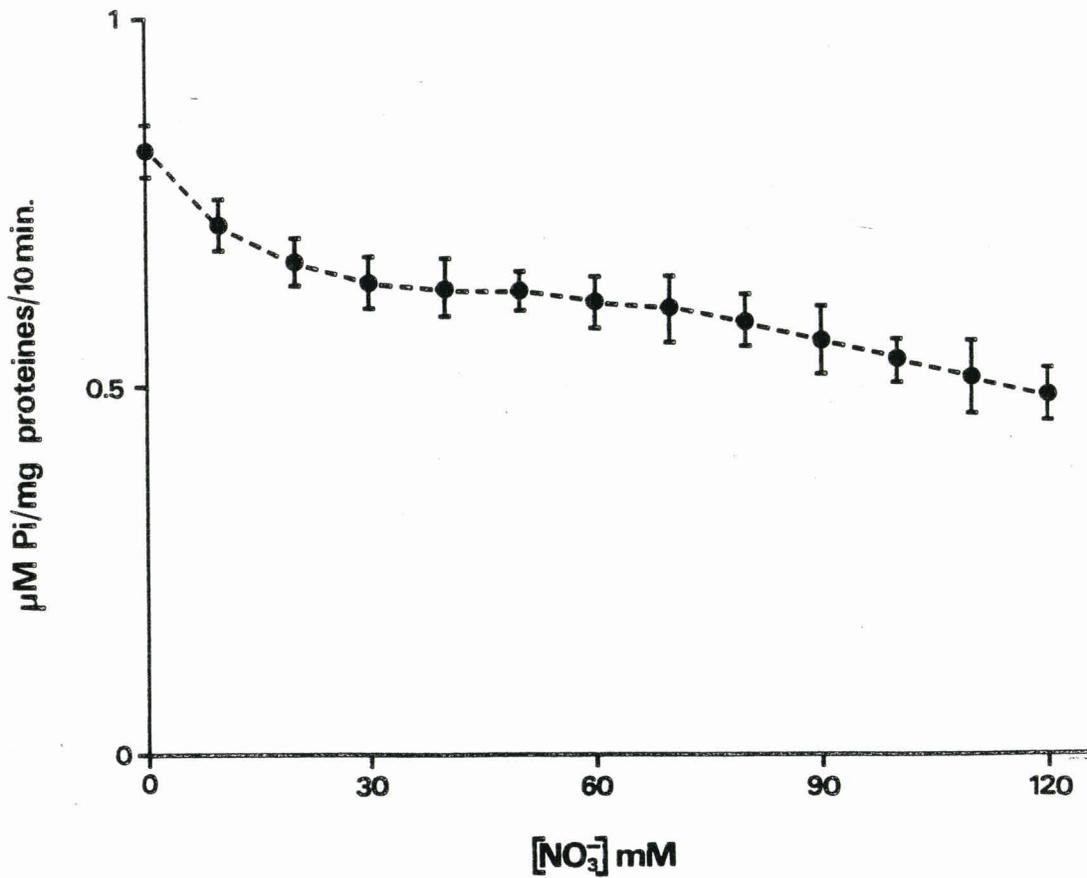


Figure 4 3

Relation liant le taux de Pi libéré à la concentration de NO₃⁻ (mM) pour une valeur de $a_{Ca^{++}}$ égale à $155 \cdot 10^{-6} M$. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCl 0,1 M pendant 40 min.

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

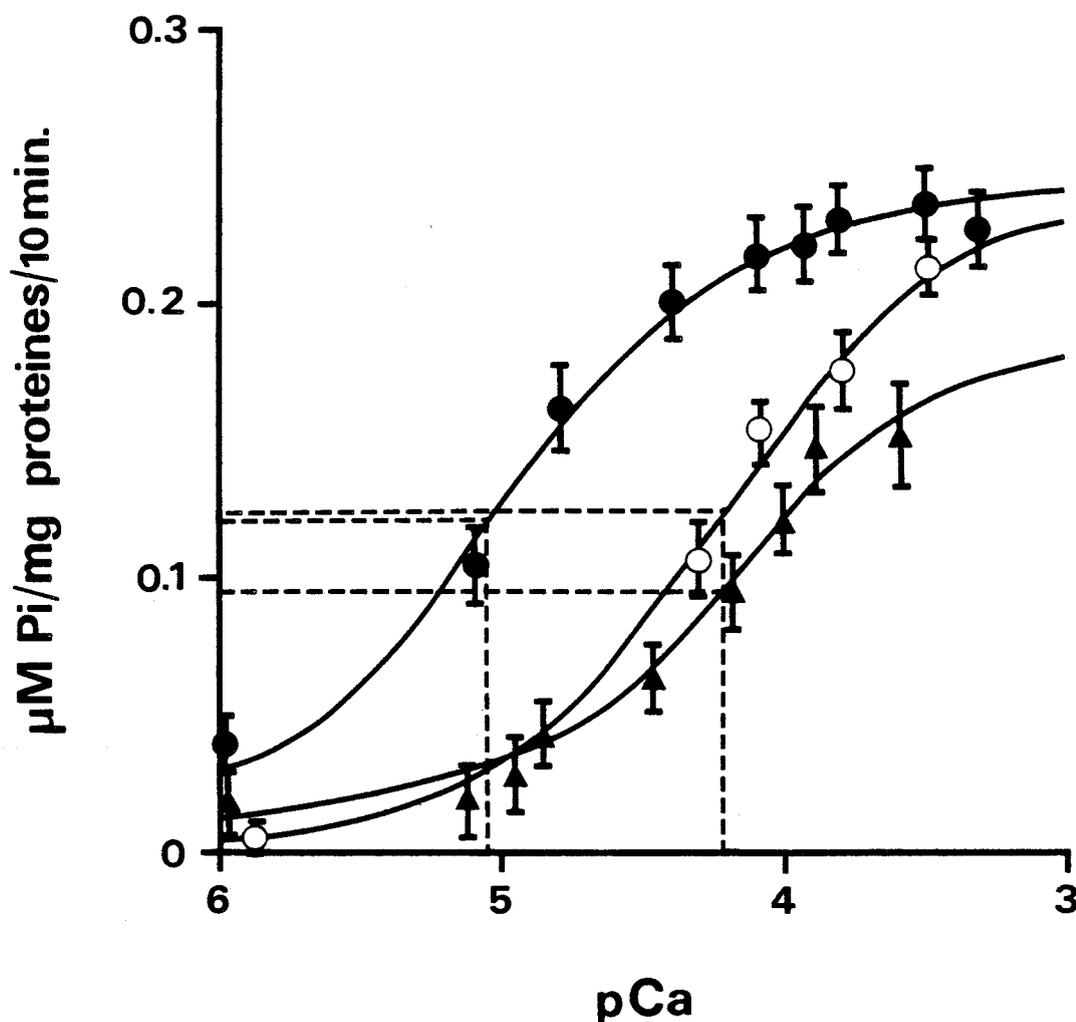


Figure 44

Taux de Pi libéré en fonction de pCa (protéines ayant été stockées 40 min dans la solution de KNO_3 0,1M) pour différentes concentrations de nitrate et de chlorure (●, 122 mM Cl^- et 50 mM NO_3^- , $n_H = 0,886$; ○, 76 mM Cl^- et 98 mM NO_3^- , $n_H = 1,03$; ▲, 172 mM NO_3^- , $n_H = 1,028$).

Dans chaque cas n_H représente la pente de la relation de HILL.

Chaque point des courbes représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

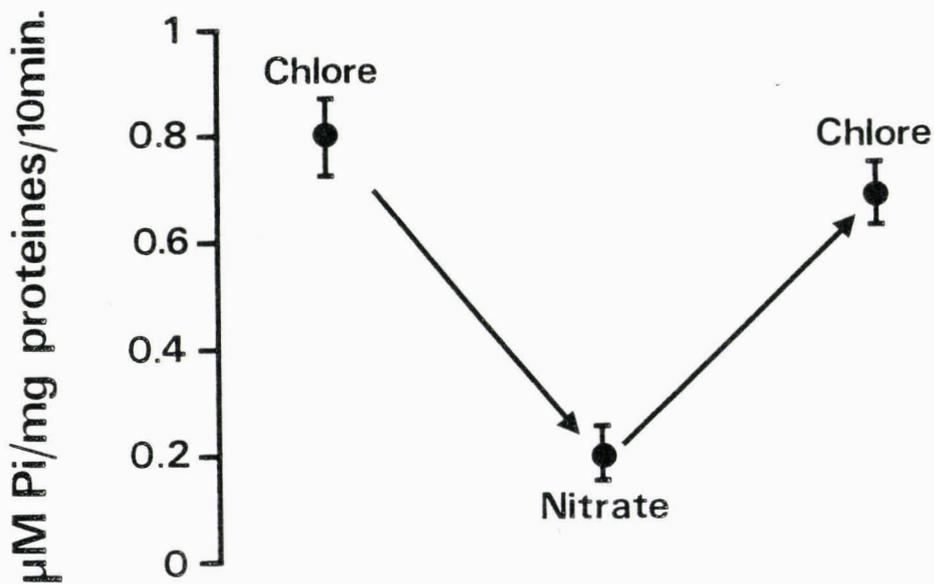


Figure 45

Quantité de Pi libéré en fonction de l'environnement anionique du milieu de réaction.

Les points marqués nitrate correspondent à l'activité ATPasique mesurée en présence de cet anion utilisé en remplacement des ions chlore.

Les dosages sont effectués à partir d'une même suspension myofibrillaire divisée en 2 parties (l'une d'entre elles étant lavée en milieu sans chlore).

La flèche dirigée vers le bas, après un passage de 40 min. en nitrate, indique que cette suspension est relavée en milieu de référence.

Chaque point de la figure représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

constante apparente de dissociation du complexe enzyme-calcium ainsi qu'une diminution de l'optimum d'activité ATPasique en fonction de l'augmentation de la concentration en nitrate. Ainsi, une élévation de la concentration en nitrate de 0mM à 122 mM. augmente la valeur de K_D de $3,05 \cdot 10^{-6} M$ à $6,07 \cdot 10^{-6} M$ et diminue l'activité ATPasique maximale théorique ($0,851 \mu\text{MPi}/\text{mg}$ protéines/10 min. à $0,469 \mu\text{MPi}/\text{mg}$ protéines/10 min.).

Ces résultats précisent, en ce qui concerne l'activité ATPasique, que l'ion NO_3^- intervient en tant qu'inhibiteur. Ce type d'inhibition ne peut être défini correctement puisque pour une faible concentration de NO_3^- ce n'est que la vitesse d'hydrolyse d'ATP qui est modifiée, alors que pour une forte concentration, c'est l'affinité d'un site pour le calcium qui est modifiée (Fig. 42). La figure 43 montre que le taux maximum d'ATP hydrolysé, à pCa constante (3,81) dépend de la concentration en ions NO_3^- . Pour une variation de la concentration en nitrate de 0mM à 120 mM, l'activité ATPasique diminue de l'ordre de 45 %.

b) Myofilaments stockés dans la solution de KNO_3 0,1 M

En présence de différentes concentrations d'ions NO_3^- , les relations sigmoïdes (Fig. 44) déterminées à partir de la relation linéaire de HAENES montrent que l'optimum d'activité ATPasique qui est par ailleurs plus faible que dans les conditions où les protéines sont stockées en solution de KCl 0,1 M, diminue d'autant plus que la concentration en ions NO_3^- est plus importante.

Par ailleurs, la constante apparente de dissociation augmente avec l'augmentation de la concentration en NO_3^- . Ces modifications dans l'affinité et dans l'efficacité ne sont pas imputables à une dénaturation de l'enzyme car la figure 45 montre que les effets des ions nitrate sont parfaitement réversibles en dépit d'un stockage de 40 min. des protéines dans une solution de nitrate.

En présence de NO_3^- la réaction enzymatique est toujours de type bimoléculaire puisque la valeur du coefficient de HILL donne toujours une valeur très proche de 1. Au vu de l'ensemble de ces résultats, il est difficile de définir un type bien précis d'inhibition. La figure 46 traduisant

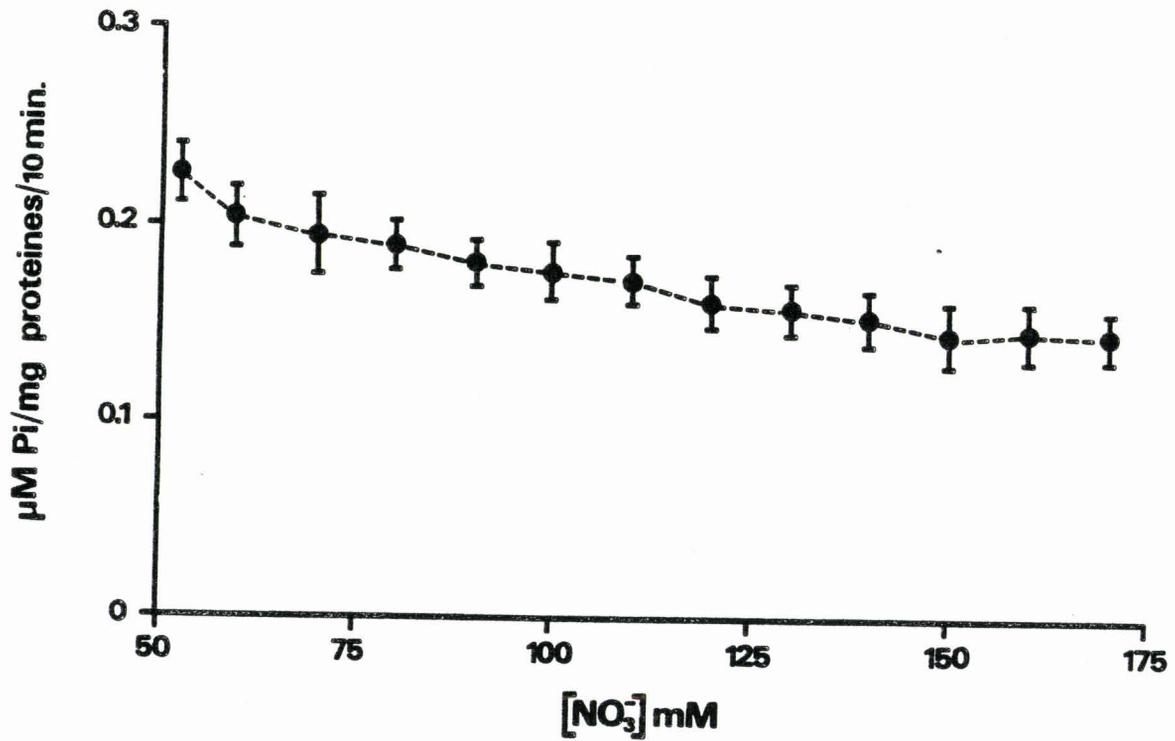


Figure 46

Relation liant le taux de Pi libéré à la concentration de NO_3^- (mM) pour une valeur de $a_{\text{Ca}^{++}}$ égale à $155 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KNO_3 0,1 M pendant 40 min.

Chaque point de la courbe représente $m \pm \sigma$ ($n = 5$).

le taux maximum d'ATP hydrolysé en fonction de la concentration en ions NO_3^- , pour une pCa constante (3.80), résume l'inhibition imposée par cet anion sur l'optimum d'activité ATPasique. Ainsi pour une variation de la concentration en nitrate de 50 mM à 172 mM, l'activité ATPasique diminue de l'ordre de 36 %.

3-2-2- Ion NO_3^- et contraction des myofibrilles en fonction de $a_{\text{Ca}^{++}}$:

Que ce soit à partir des myofibrilles isolées par l'intermédiaire de solutions ne contenant comme anions que des ions Cl^- ou NO_3^- , aucune tension mécanique de valeur supérieure à $0,09 \text{ kg.cm}^{-2}$ n'a pu être enregistrée ; les myofibrilles en place présentent une très grande fragibilité. De ce fait, aucune corrélation entre la tension mécanique et l'activité ATPasique n'a pu être effectuée.

3-3-3- Conclusion :

Que ce soit sur des protéines stockées en solution de KCl 0,1 M ou de KNO_3^- 0,1 M, le nitrate agit en tant qu'inhibiteur. Dans deux cas, aucun type bien précis d'inhibition ne peut être défini.

L'absence de résultats concernant la contraction des myofibrilles en présence d'ions NO_3^- montre bien que les ions NO_3^- , considérés dès 1950 par KAHN et SANDOW comme des potentiateurs de la contraction, n'augmentent la force contractile des myofibrilles, au niveau de la fibre musculaire intacte, que par le biais de leur influence sur les perméabilités ioniques membranaires.

RESUME
ET
CONCLUSION GENERALE

L'étude du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire striée de crabe a conduit à l'analyse de l'activité ATPasique et de la contraction des protéines de structure, et a révélé une parfaite corrélation entre ces deux phénomènes, que ce soit en présence d'ions Cl^- , CH_3COO^- ou d'une association Cl^- et $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$.

A - Activité ATPasique :

a) Protéines stockées dans une solution de KCl 0,1 M :

Dans les conditions de référence (172 mM de Cl^-), certaines caractéristiques de la réaction enzymatique tel que K_D et V_{max} ont pu être déterminées à partir de l'équation de MICHAELIS-MENTEN ($K_D = 3,05 \cdot 10^{-6} \text{ M}$; $V_{\text{max}} = 0,851 \text{ } \mu\text{MPi/mg}$ protéines/10 min.). Le remplacement de 122 mM de Cl^- par 122 mM de CH_3COO^- , de $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ ou de NO_3^- conduit à une modification soit de la valeur de K_D , donc de l'affinité des sites pour le calcium, soit de la valeur de V_{max} , ou des deux. En ce qui concerne l'acétate, que ce soit à partir de protéines ayant séjournées 40 ou 1020 min. dans la solution de KCl 0,1 M, seule V_{max} est modifiée (augmentation). Cela tend à prouver que, d'une part l'acétate intervient comme un activateur, et que d'autre part le stockage des protéines dans la solution de KCl 0,1 M n'a pas perturbé l'affinité de l'enzyme pour le Ca^{++} , puisque K_D même après 1020 min. conserve la même valeur. De plus, la représentation de LINEWEVEAR-BURK (Fig. 47) montre que l'ion chlorure vis-à-vis de l'ion acétate intervient en tant qu'inhibiteur non compétitif simple. Le rôle des ions chlorure serait donc de maintenir une certaine conformation de l'enzyme, conformation qui est modifiée en présence d'acétate en un état plus actif. En présence de 122 mM de méthylsulfate, seule la valeur de K_D augmente, ce qui traduit une perte d'affinité des sites pour les ions Ca^{++} . Ceci traduit le fait que l'ion méthylsulfate intervient en tant qu'inhibiteur compétitif (Fig. 47). La fixation du méthylsulfate sur l'ATPase s'accompagne d'un changement de conformation de

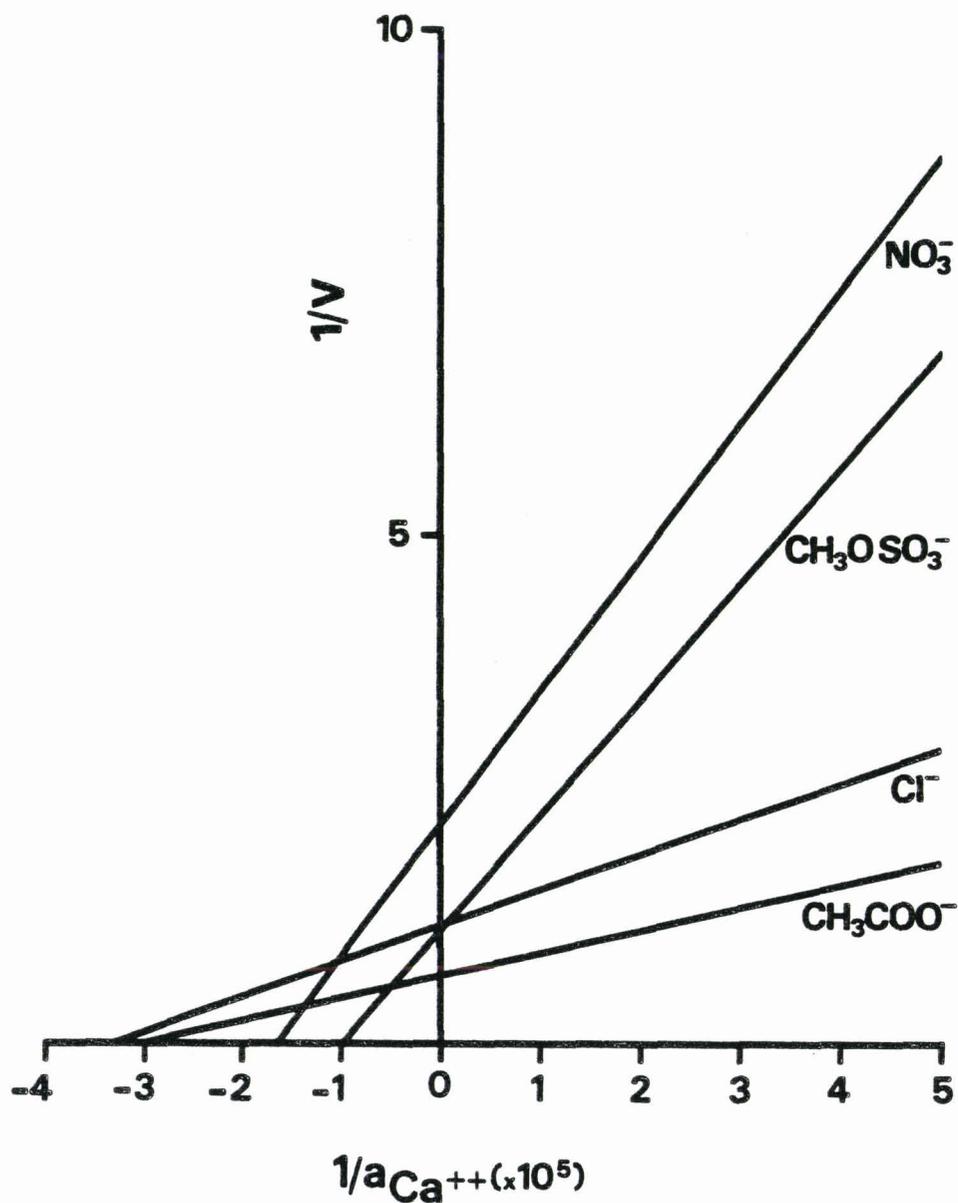


Figure 47

Représentation en double réciproque de $1/V$ en fonction de $1/a_{Ca^{++}}$ et en fonction de l'environnement anionique du milieu de réaction.

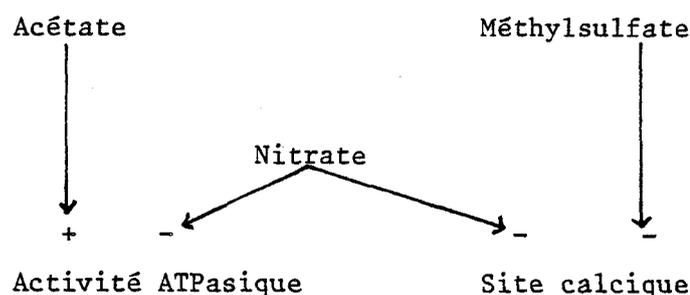
La droite marquée nitrate, méthylsulfate, ou acétate correspond à la relation déterminée pour l'activité ATPasique en présence de 122 mM de ces anions utilisés en remplacement des ions chlore. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution de KCl 0,1 M pendant 40 min.



l'enzyme; cette modification atteignant le site de fixation du calcium, défavoriserait la liaison du calcium sur son site, sans pour autant affecter le site d'hydrolyse de l'ATP puisque le taux d'hydrolyse maximal est comparable à celui de référence.

Par contre, en présence d'ions NO_3^- , si la réaction est encore de type bimoléculaire, des différences notables sont observées tant au niveau de la valeur de K_D qu'au niveau du taux maximal d'ATP hydrolysé (Fig. 47). En effet, la valeur de K_D est considérablement augmentée et est associée à une forte diminution de V_{max} . Dans ces conditions, comme le montre la figure 47, l'inhibition est complexe puisque l'ion NO_3^- affecte à la fois les valeurs de K_D , de V_{max} et de la pente de la droite correspondant à la représentation en double réciproque.

Les effets de ces différents anions CH_3COO^- , $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, NO_3^- au niveau de l'hydrolyse de l'ATP par l'actomyosine, peuvent finalement, au vu de nos résultats, être schématisés de la façon suivante :



b) Protéines stockées dans les solutions de KCH_3COO^- , $\text{KCH}_3\text{OSO}_3^-$
ou de KNO_3^- :

Quel que soit l'anion utilisé dans le milieu de stockage (CH_3COO^- , $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$, NO_3^-), la représentation de LINEWEVEAR-BURK (Fig. 48) montre que, par rapport au milieu de référence, il est impossible de définir un type bien précis d'inhibition.

Même après un stockage des protéines en milieu KCH_3COO 0,1 M, l'acétate tout en diminuant l'affinité des sites pour le Ca^{++} par rapport au milieu de référence, accroît cependant la valeur maximale du taux d'hydrolyse d'ATP. Le méthylsulfate affecte à la fois, comme d'ailleurs le nitrate, l'affinité du site pour le

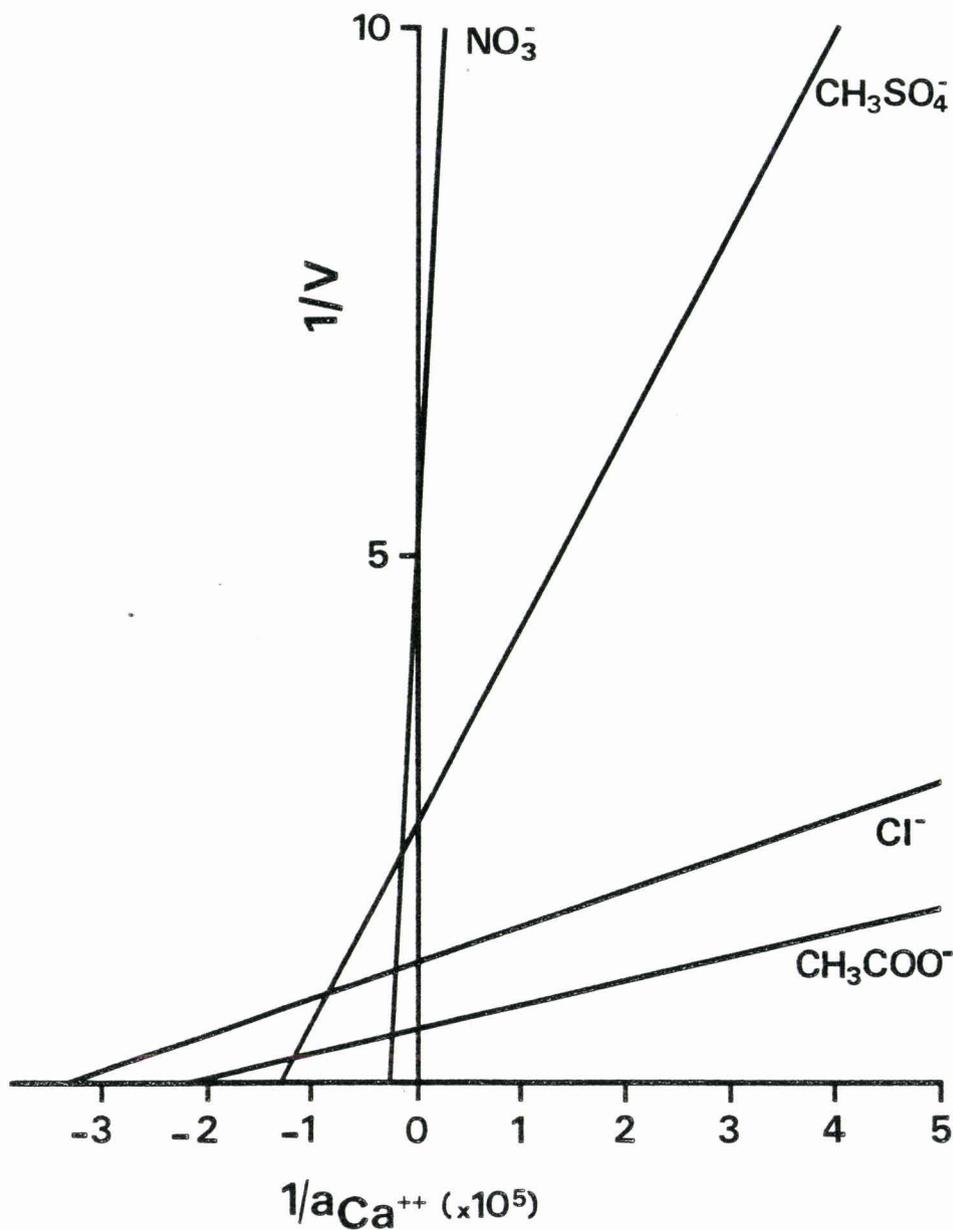
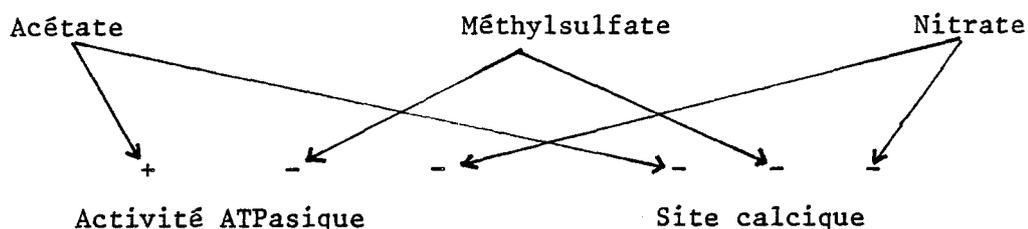


Figure 48

Représentation en double réciproque de $1/V$ en fonction de $1/a_{Ca^{++}}$ et en fonction de l'environnement anionique du milieu de réaction.

La droite marquée nitrate, méthylsulfate ou acétate correspond à la relation déterminée pour l'activité ATPasique en présence de 172 mM de ces anions utilisés en remplacement des ions chlore. Les myofilaments sont préalablement stockés dans une solution contenant l'anion à étudier.

calcium et l'hydrolyse d'ATP : là encore, il est possible de schématiser les effets de ces anions de la façon suivante :



Le stockage des protéines en présence de ces anions conduit à une modification de la conformation de l'enzyme qui affecte à la fois le site d'hydrolyse de l'ATP et le site liant les ions Ca^{++} .

En résumé, les anions apparaissent augmenter l'activité ATPasique de l'actomyosine du muscle strié squelettique de crabe suivant la série $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{CH}_3\text{OSO}_3^- > \text{NO}_3^-$. Des résultats "similaires" avaient été obtenus à partir de l'ATPase myofibrillaire du psoas de lapin par WARREN et al. (1969) et SEIDEL (1969). En accord avec ces auteurs, l'acétate intervient bien sur l'actomyosine comme un activateur. Ce rôle activateur pour ces auteurs serait dû à un changement de conformation de la protéine, changement imputable au groupement méthyl de l'acétate. Cependant, à l'encontre des auteurs cités ci-dessus, les effets activateurs ne semblent pas attribuables à la présence du groupement CH_3 puisque l'ion acétate et l'ion méthylsulfate conduisent l'un à un effet activateur, l'autre à un effet inhibiteur.

B- Tension mécanique :

De l'analyse des résultats exposés précédemment, il ressort que dans les conditions de référence, deux ions Ca^{++} sont requis pour le développement d'une tension. Ces deux ions Ca^{++} se fixent sur deux sites M_1 et M_2 avec des constantes K_1 et K_2 , constantes déterminées à partir de l'équation de ASHLEY-MOISESCU (1977).

Par rapport aux conditions de référence, l'acétate diminue à la fois la valeur

de K_1 et K_2 et donc, augmente l'affinité de ces sites pour les ions Ca^{++} tandis que le méthylsulfate augmentant les valeurs de K_1 et K_2 , diminue à l'inverse l'affinité de ces sites pour ces ions Ca^{++} .

De plus, en accord avec les travaux de JACOBS et GUTHE (1970), les ions CH_3COO^- renforcent la tension mécanique développée par les myofibrilles de l'ordre de 20 %. Pour ces auteurs, ce renforcement serait dû à une variation de pH qui, en modifiant la densité des charges des protéines, augmenterait l'amplitude de la contraction. Il ne semble pas que cette interprétation puisse être retenue puisque dans toutes nos conditions expérimentales, le pH des diverses solutions a été rigoureusement maintenu constant à une valeur de 6,8.

C - Relation entre Activité ATPasique-Tension :

Il est possible en présence d'ion d'acétate, méthylsulfate ou chlore, d'obtenir une bonne corrélation entre l'activité ATPasique et la tension mécanique, ceci permettant de mieux comprendre le rôle des anions dans le couplage mécano-chimique, mais surtout de montrer le rôle important joué par les ions Cl^- au niveau de ce couplage.

En effet, la suppression des ions Cl^- de la solution et leur remplacement par des ions CH_3COO^- conduit à une forte augmentation de l'activité ATPasique, alors que la contraction des myofibrilles n'est pas augmentée dans les mêmes proportions. Ceci montre que, tout au moins dans nos conditions expérimentales, l'énergie libérée par le clivage de l'ATP n'est pas totalement utilisée pour produire la tension mécanique. Il se dégage dès lors une notion de rendement, qui peut s'exprimer par le rapport de la tension mécanique sur le taux d'hydrolyse d'ATP. Il apparaît ainsi que suivant l'espèce anionique en présence, le rendement varie ; en présence d'ions Cl^- ou $CH_3OSO_3^-$ le rendement est identique, alors qu'en présence de CH_3OCO^- il est bien plus faible. Enfin, il est nécessaire de préciser que nos conditions d'isolement des myofibrilles sont différentes suivant que nous étudions leur activité ATPasique ou leur

contraction. Quoiqu'il en soit, une même relation hyperbolique liant la tension mécanique au taux d'hydrolyse d'ATP a été mise en évidence pour les différents anions.

L'ensemble de ces résultats tend donc à mettre en évidence le rôle régulateur des chlorure tant au niveau de l'activité ATPasique qu'au niveau de la tension. Son rôle serait de maintenir une conformation active de l'enzyme, afin d'obtenir une tension mécanique maximale avec une hydrolyse moindre d'ATP et, également de préserver l'affinité des sites liant le calcium.

Classiquement, les études entreprises jusqu'à maintenant concernant le couplage excitation-contraction, consistent à enregistrer deux phénomènes, à savoir : d'une part, le phénomène électrique, et d'autre part, le phénomène mécanique. Il apparaît, tout au moins pour la fibre de crustacé, qu'il soit très difficile de cerner à partir de l'enregistrement de ces deux paramètres, l'ensemble des étapes du couplage excitation-contraction. Il semble en effet, au vu de nos résultats, indispensable de bien connaître les diverses étapes correspondant à l'activité enzymatique des protéines contractiles. De plus, il est nécessaire lorsque le couplage excitation-contraction des fibres musculaires est étudié, de bien connaître les répercussions des modifications ioniques extracellulaires sur l'activité des ions intracellulaires qui, comme nous venons de le voir, retentit sur le taux d'hydrolyse d'ATP et aussi sur l'amplitude de la contraction.



BIBLIOGRAPHIE

- ADELSTEIN, R.S., EISENBERG, E. (1980)
Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction
Annu. Res. Biochem., 49, 921-956.
- ASHLEY, C.C., MOISESCU, D.G. (1977)
Effect of changing the composition of the bathing solutions upon the isometric tension pCa relationship in bundles of crustacean myofibril.
J. Physiol., London, 270, 627-652.
- AZUMA, N., ASAKURA, A., YAGI, K. (1975)
Myosin from Molluscan Abalone, *Haliotis discus*. Isolation and enzymatic properties.
J. Biochem., 77, 973-981.
- BÁRÁNY, M. (1967)
ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening.
J. Gen. Physiol., 50, 197.
- BENDALL, J.R. (1953)
Further observations on a factor (the "Marsh" factor) effecting relaxation of ATP-shortened muscle-fibre models, and the effect of Ca and Mg ions upon it.
J. Physiol., London, 259, 617.
- BOLZER, E. (1961)
Distribution of nonelectrolytes in muscle.
Amer. J. Physiol., 200, 651.
- BOWEN, W.I., MANDEL KERN, L. (1971)
Glycerinated muscle fibers : relation between isometric tension and adenosine triphosphate hydrolysis.
Science, 173, 239.
- BRÛLE, G., FALEMPIN, M., GUILBAULT, P. (1972)
Les ions potassium (K⁺), calcium (Ca⁺⁺) et sodium (Na⁺) dans le développement de la contracture potassique de la fibre striée phasique de crabe.
C.R. Acad. Sci. Paris, 275, 1649.
- BRÛLE, G., GUILBAULT, P. (1975)
Effets des cations sur la contraction des myofilaments de la fibre striée de crabe.
C.R. Acad. Sci. Paris, 280, 1269.
- BRÛLE, G. (1978)
Etude du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe.
Thèse Doctorat d'Etat, Univ. LILLE I.
- BRÛLE, G., WION, P., HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1980)
Rôle des anions sur l'Activité ATPasique des myofilaments de la fibre de crabe.
J. Physiol. Paris, 76, 44A.
- CASPAR, D.L.D., COHEN, C., LONGLEY, W. (1969)
Tropomyosin : crystal structure, polymorphism and molecular interactions.
J. Mol. Biol., 41, 87.
- COLLINS, J.H. (1974)
Homology of myosin light chains, troponin-C and parvalbumins deduced from comparison of their amino acid sequences.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 301.
- CORNELIUS, F. (1980)
The regulation of tension in a chemically skinned Molluscan smooth muscle. Effect of Mg⁻²⁺ on the Ca²⁺ activated tension generation.
J. Gen. Physiol., 75, 709.
- CUMMINS, P. (1979)
The homology of the α chains of cardiac and skeletal rabbit tropomyosine.
J. Mol. Cell. Cardiol., 11, 109-114.
- DABROWSKA, R., HARTSHORNE, D.S. (1978)
A Ca²⁺ and modulator-dependent myosin light chain kinase from non-muscle cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1352-1359.
- DANCKER, P. (1977)
Regulation of actin-myosin interaction
Basic. Res. Cardiol., 72, 118-123.
- DAWSON, M.J., GADIAN, P.G., WILKIE, D.R. (1978).
Muscular fatigue investigated by phosphorus nuclear magnetic resonance.
Nature (Lond.), 274, 861.
- DE VILLAFRANCA, G.W. (1971 a)
Properties of *Limulus* paramyosin.
J. Gen. Physiol., 57, 249.
- DE VILLAFRANCA, G.W. (1971 b)
Paramyosin from the horseshoe crab striated muscle.
Biophysical. J., 11, 109a.

- DE VILLAFRANCA, G.W., HAINES, V.E. (1974)
Paramyosine from Arthropod cross-striated muscle.
Comp. Biochem. Physiol., 47B, 9.
- DE VILLAFRANCA, G.W., FRIEDMAN, B.A. (1975)
Magnesium control of the calcium myosin and actomyosin ATPase of *Limulus polyphemus*.
Comp. Biochem. Physiol., 51B, 375.
- EATON, B.L., KOMINZ, P.R., EISENBERG, E. (1976)
Correlation between the inhibition of actoHMM ATPase and the binding of troponomyosin to F-actin.
Biochemistry, 14, 2718.
- EBASHI, S., ENDO, M. (1968)
Calcium ion and muscle contraction.
Prog. Biophys. Mol. Biol., 18, 123-183.
- EBASHI, S. (1976)
Excitation-contraction coupling.
Ann. Rev. Physiol., 38, 293.
- EBEL, R.E., LARDY, H.A. (1974)
Stimulation of rat liver mitochondrial adenosine triphosphatase by anions.
J. Biol. Chem., 250, 191.
- ENDO, M., KITAZAWA, T., YAGI, S., IINO, M., KAKUTA, Y. (1977)
Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers.
Excitation-Contraction Coupling in smooth muscle.
North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 199.
- ENGEIARDT, LUBIMOVA (1939)
Chemistry of muscle.
Nature, 144, 668-669.
- FATT, P., KATZ, B. (1953)
The electrical properties of crustacean muscle fibres.
J. Physiol., London, 120, 171.
- FENNER, C., MASON, D.T., ZELIS, R., WIKMAN-COFFELT, J. (1973).
Regulatory properties of myocardial myosin (ATPase activity/ K^+ / Ca^{++}).
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 70, 3205.
- FREARSON, N., PERRY, V. (1975)
Phosphorylation of the light-chain components of myosin from cardiac and red skeletal muscles.
Biochem. J., 15, 99.
- FUCHS, F. (1974)
Striated muscle.
Ann. Rev. Physiol., 36, 461.
- FUCHS, F. (1977)
Cooperative interaction between calcium-binding sites on glycerinated muscle fibers. The influence of cross-bridge attachment.
Biochim. Biophys. Acta, 462, 314.
- GAZITH, J., HIMMELFARB, S., HARRINGTON, W.F. (1970)
Studies on the subunit structure of myosin.
J. Biol. Chem., 245, 15-22.
- GOLDBERG, A., LEHMAN, W. (1978)
Troponin-like proteins from muscles of the scallop.
Aequipecten irradians. Biochem. J., 171, 413.
- GREENE, L.E., EISENBERG, E. (1980)
Dissociation of the actin subfragment one complex by 5'-adenylyl imidodiphosphate ADP and P_i.
J. Biol. Chem., 2, 255.
- HASELGROVE, J.C. (1972)
X-Ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 341.
- HASELGROVE, J.C. (1975)
X-Ray evidence for conformational changes in the myosin filaments of vertebrate striated muscle.
J. Mol. Biol., 92, 113.
- HATZE, H. (1973)
A theory of contraction and a mathematical model of striated muscle.
J. Theor. Biol., 40, 219.
- HELLMAN, D.C., PODOLSKY, R.J. (1969)
Force measurements in skinned muscle fibres.
J. Physiol. London, 200, 806.

- HO, S.M., CHAN, D.K.O. (1980)
Branchial ATPases and ionic transport in the EEL ANGUILLA JAPONICA - II Ca^{2+} -ATPase.
Comp. Biochem. Physiol., 67B, 639.
- HOTTA, K., BOWEN, W.J. (1970)
Contraction and ATPase activity of glycerinated muscle fibers and myofibrillar fragments.
Amer. J. Physiol., 218, 332.
- HUXLEY, H.E., (1972)
Structural changes in the actin and myosin containing filaments during contraction.
Cold spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 361.
- JACOBS, H.K., GUTHE, K.F. (1970)
Anions and the contraction of glycérol extracted muscle fibers.
Arch. Biochem. Biophys., 136, 36.
- KAHN, A.J., SANDOW, A. (1950)
Potentiation of muscular contraction by nitrate ion.
Science, 112, 647,649.
- LAEMMLI, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
Nature, 227, 680.
- LEBOWITZ, E., COOKE, R. (1979)
Phosphorylation of uterine smooth muscle myosin permits actin activation.
J. Biochem (Tokyo), 85, 1489-1494.
- LEHMAN, W., SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1975)
Regulation of Muscular Contraction Distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom.
J. Gen. Physiol., 66, 1-30.
- LEHMAN, W. (1977)
Ca ion dependent myosin from decapod crustacean muscle.
Biochem. J., 163, 291.
- LEVY, R.M., UNIAZUME, Y., KUSHMEARICK, M.J. (1976)
Ca⁺⁺ dependence of tension and ADP production in segments of chemically skinned muscle fibers.
Biochim. Biophys. Acta., 430, 352-365.
- LÓPEZ-ZABALZA, M.J., IRIARTE, A.J., HUAMÁN, J., LÓPEZ-MORATELLA, N., SANTAGIO, E. (1980)
Effect of bicarbonate and other anions on the oxidized and reduced forms of F₁-ATPase.
Rev. Esp. Fisiol., 36, 421.
- LOWEY, S., SLAYTER, H.S., WEEDS, A.G., BAKER, H. (1969)
Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation.
J. Mol. Biol., 42, 1.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951)
Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 193, 265.
- LYMN, R.W., TAYLOR, E.W. (1971)
Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin.
Biochemistry, 10, 4617.
- LYMN, R.W. (1974)
Actin activation of the myosin ATPase : a kinetic analysis.
J. Theor. Biol., 43, 313.
- MANNHERZ, H.G., GOODY, R.S. (1976)
Proteins of contractile systems.
Ann. Rev. Biochem., 45, 427-465.
- MARSTON, S., WEBER, A. (1975)
The dissociation constant of the actin-heavy meromyosin subfragment-1 complex.
Biochemistry, 14, 3868.
- MATHIEU, J. (1970)
Participation de la microscopie électronique dans la compréhension du couplage excitation-contraction.
D.E.A. Physiologie, Univ. LILLE I.
- Mc CUBBIN, W.D., KAY, C.M. (1968)
The subunit structure of fibrous muscle protein as determined by osmometry.
Biochem. Biophys. Acta, 154, 239.
- MORIMOTO, K., HARRINGTON, W.F. (1974)
Substructure of thick filament of vertebrate striated muscle.
J. Mol. Biol., 83, 83.

- NAIRN, A.C., PERRY, S.V. (1979)
Calmodulin and myosin light chain kinase of rabbit fast skeletal muscle.
Biochem. J., 179, 89-97.
- OFFER, G., BAKER, H., BAKER, L. (1972)
Interaction of monomeric and polymeric actin with myosin subfragment-1.
J. Mol. Biol., 66, 435.
- OHASHI, K., MARUYAMA, K. (1979)
A new structural protein located in the Z lines of chicken skeletal muscle.
J. Biochem., 85, 1103-1105.
- ORENTLICHER, M., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H., BRANDT, P.W. (1974)
Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibers.
J. Gen. Physiol., 63, 168.
- PENASSE, L. (1974)
Les enzymes : Cinétique et mécanisme d'action.
Edit. MASSON et Cie.
- PERRY, S.V., GREY, T.C. (1956)
A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factors on the magnesium-activated myofibrillar Adenosine Triphosphatase.
Biochem. J., 64, 184.
- PERRY, S.V., COLE, H.A., HEAD, J.F., WILSON, F.J. (1972)
Location and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 251.
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C., RUEGG, J.C. (1964)
The dependence of contraction and relaxation of muscle fibres from the crab, *Maia Squinado*, on the internal concentration of free calcium ions.
Biochem. Biophys. Acta, 759, 581-591.
- PORTZEHL, H., ZAORALEK, P., GAUDIN, J. (1969)
The activation by Ca^{++} of the ATPase of extracted muscle fibrils with variation of ionic strength, pH and concentration of MgATP.
Biochim. Biophys. Acta, 189, 440.
- POTTER, J.D., GERGELY, J. (1974)
Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca regulation of muscle contraction.
Biochemistry, 13, 2697.
- POTTER, J.D., GERGELY, J. (1975)
The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem., 250, 4628.
- RAPOPORT, S.I., FREYGANG, W.H., PEACHEY, L.D. (1968)
Swelling of transverse tubular system of frog sartorius.
Biophys. J., 8, 116A.
- REEDY, M.K., HOLMES, K.C., TREGEAR, R.T. (1965)
Induced changes in orientation of the cross bridges of glycerinated insect flight muscle.
Nature (London), 207, 1276.
- ROTHLEIN, J.E., PARSONS, S.M. (1980)
Bicarbonate stimulation of the Ca^{2+}/Mg^{2+} ATPase of *Torpedo* electric organ synaptic vesicles.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 95, 1869.
- SAIDA, K., NONOMURA, Y. (1978)
Characteristics of Ca^{2+} and Mg^{2+} induced tension development in chemically skinned smooth muscle.
J. Gen. Physiol., 72, 1.
- SANDOW, A. (1965)
Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.
Pharmacol. Rev., 17, 265.
- SANTIAGO, E., LÓPEZ-MORATALLA, N., LÓPEZ-ZABALZA, M.J., IRIARTE, A.J., CAMPO, M.L. (1980)
Effect of pH on the sensitivity of mitochondrial to free ATP, ADP and anions.
Rev. Esp. Fisiol., 36, 413.
- SEIDEL, J.C. (1969)
Effect of salts of monovalent ions on the adenosine triphosphatase activities of myosin.
J. Biol. Chem., 244, 1142.
- SLEEP, J.A., TAYLOR, E.W. (1976)
Intermediate states of actomyosin ATPase.
Biochemistry, 15, 5813.

- SLEEP, J.A., HUTTON, R.L. (1978)
Actin mediated release of ATP from a myosin ATP complex.
Biochemistry, 17, 5423.
- SOBIESZEK, A., SMALL, J.V. (1976)
Myosin-linked calcium regulation in vertebrate smooth muscle.
J. Mol. Biol., 101, 75.
- SOBIESZEK, A., SMALL, J.V. (1977)
Regulation of the actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle : Activation via a myosin light chain kinase and the effect of tropomyosin.
J. Mol. Biol., 112, 559-576.
- STEIN, L.A., SCHWARZ, R., CHOCK, P.B., EISENBERG, E. (1980)
The mechanism of the actomyosin ATPase : evidence that ATP hydrolysis can occur without dissociation of the actomyosin complex.
Biochemistry, 38, 3895.
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H., PROCHWIEWICZ, E., DRABIKOWSKI, W. (1978)
Interaction of actin with divalent cations : 1) the effect of various cations on the physical state of actin.
Eur. J. Biochem., 88, 219-227.
- STRZELECKA-GOLASZEWSKA, H., PROCHWIEWICK, E., DRABIKOWSKI, W. (1978)
Interaction of actin with divalent cations : 2) characterization of protein-metal complexes.
Eur. J. Biochem., 88, 229-237.
- SUZUKY., S. (1980)
Properties of mitochondrial Mg^{2+} - HCO_3^- stimulated and SCN^- inhibited ATPase in rat liver, kidney and small intestinal mucosa and some relationships between ATPase and supernatant carbonic anhydrase.
Comp. Biochem. Physiol., 67B, 277.
- SZENT-GYORGYI, A.G. (1975)
Calcium regulation of muscle contraction.
Biophys. J., 15, 707.
- TANAKA, H., TANAKA, M. (1979)
Dependence of tension development on calcium and magnesium Adenosine triphosphatase in chemically skinned molluscan smooth muscles fibers.
J. Biochem., 85, 713,717.
- TAWADA, K., KOUNOSU, S., OOSAWA, F. (1974)
An "active-enzyme" muscle model.
J. Theor. Biol., 45, 219.
- WANG, K., MC CLURE, J., TU, A. (1979)
Titin : major myofrillar components of striated muscle.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 76, 3698-3702.
- WARREN, J.C., STOWRING, L., MORALES, M.F. (1966)
The effect of structure-disrupting ions on the activity of myosin and other enzymes.
J. Biol. Chem., 241, 309.
- WEBER, A., MURRAY, J.M. (1973)
Molecular control mechanisms in muscle contraction.
Physiol. Rev., 53, 612-673.
- WEIHNING, R.R., KORN, E.D. (1972)
Acanthamoeba actin Composition of the peptide that contains 3- methylhistidine and a peptide that contains N-methyllysine.
Biochemistry, 11, 1538.
- WHITE, H.D., TAYLOR, E.W. (1976)
Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase.
Biochemistry, 15, 5818-5826.
- WION, P. (1980)
Rôle des anions dans le couplage mécano-chimique de la fibre musculaire squelettique de crabe.
D.E.A., Univ. LILLE I.

