CEA-R 3106

HERZHERG (Max) -

Quelques techniques d'étude de l'actomyosine par microscopie électronique.-Saclay (Essome), Centre d'études nucléaires, Service de documentation du Commissariat à l'énergie atomique, 1966.-27 cm, 19 p., fig.

(Thèse D.E.S. Paris. 1966.)

CEA-R 3106 - HERZBERG Max QUELQUES TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTOMYOSINE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE Sommaire. - Une méthode d'ombrage par un alliage de platine et carbone a été mise au point et appliquée à l'étude de l'interaction de l'actomyosine et de son substrat l'ATP. Les résultats obtenus semblent pencher en faveur de la thèse d'une dissociation de l'actomyosine en ses deux constituants : l'actine et la myosine. Des images ont été obtenues montrant des particules dont l'identité avec la myosine non polymérisée reste à démontrer plus rigoureusement. 1967 - 21 p. Commissariat à l'Energie Atomique - France CEA-R 3106 - HERZBERG Max SOME TECHNIQUES FOR STUDYING ACTOMYOSIN BY ELECTRON MICROSCOPY Summary. - A method has been developed for shadowing using a platinumcarbon alloy ; it has been applied to the study of the interaction of actomysin with its substrate ATP. The results obtained seem to favour the hypothesis of a dissociation of the actomysin into its two components : actin and myosin. Pictures have been obtained showing pasticles resembling non-polymerized myosin but no rigorous proof of this exists. 1967 21 p. Commissariat à l'Energie Atomique - France

CEA-R 3106

COMMISSARIAT A L'ÉNERGIE ATOMIQUE

QUELQUES TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTOMYOSINE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

par

Max HERZBERG

Rapport CEA · R 3106

CENTRE D'ETUDES NUCLÉAIRES DE SACLAY

<u>1967</u> ва

Les rapports du COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE sont, à partir du nº 2200, en vente à la Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 31, quai Voltaire, PARIS VIIème.

The C.E.A. reports starting with nº 2200 are available at the Documentation Française, Secrétariat Général du Gouvernement, Direction de la Documentation, 31, quai Voltaire, PARIS VIIème.

**

- Rapport CEA-R 3106 -

Centre d'Etudes Nucléaires de Saclay Département de Biologie

QUELQUES TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTOMYOSINE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

par

Max HERZBERG

(Mémoire présenté à la Faculté des Sciences de Paris en vue de l'obtention du diplôme d'Etudes Supérieures de Sciences Naturelles)

HISTORIQUE

cette époque.

pelés actine et myosine A.

tine).

La myosine A qui au contraire était soluble dans les solutions salines, fut scindée en ses deux constituants par une légère digestion à la trypsine ; leur différence de vitesse de sédimentation à l'ultracentrifugation firent appeler l'une méromyosine H (H pour Heavy, lourd) et l'autre méromyosine L (L pour Light, léger). Un certain nombre d'autres constituants protéiniques furent révélés dans les années

50, citons pour mémoire la tropomyosine isolée et caractérisée par BAILEY en 1948, la paramyosine extraite par HODGE en 1952 et trouvée dans certains muscles spécialisés, la protéine delta caractérisée par AMBERSON en 1957, la contractine isolée en 1948 par DUBUISSON, la métamyosine isolée par RAEBER en 1955 et enfin la protéine X qui désigne l'ensemble des protéines des myofibrilles non caractérisées à ce jour.

QUELQUES TECHNIQUES D'ETUDE DE L'ACTOMYCSINE PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Le muscle strié contient un grand nombre de protéines, dont seules les protéines des myofibrilles proprement dites font l'objet de ce travail. La terminologie adoptée est celle de SZENT-GYORGYI A.G. [1] qui est actuellement la plus employée. Il est cependant nécessaire de souligner que les différences de vocabulaire rencontrées dans la littérature marquent des différences de conception ; c'est ainsi que jusqu'en 1942, on appelait myosine l'extrait protéinique total des myofibrilles : la différence entre actine et myosine A date de

En 1942 SCHRAMM et WEBER effectuant les premières ultracentrifugations de la "myosine", s'aperçurent que celle-ci possédait deux composants dont les constantes de sédimentation étaient très différentes. Dès 1941 BANGA et SZENT-GYORGYI A. étaient arrivés à des conclusions similaires à partir de mesures de viscosité ; ces deux composants furent ap-

L'actine fut isolée et caractérisée en 1943 par STRAUB, ce qui ouvrait la voie à l'étude des protéines myofibrillaires isolées. L'actine possédait la propriété d'être soluble dans l'eau, sous la forme de monomères globulaires (G-actine) et insoluble dans les solutions à forte concentration saline où elle se mettait sous la forme d'un polymère fibrillaire (F-ac-

L'interaction actine-myosine fut, dès leur isolement, un sujet d'étude du plus grand intérêt et en 1953 on montra que mis en présence en solution, ces deux composés formaient un complexe qu'on appela actomyosine dont la viscosité était plus importante que la somme des viscosités de ses constituants et le poids moléculaire très grand et variable selon les conditions expérimentales $(2.10^6 - 10^9)$.

Si les différents constituants protéiniques des myofibrilles furent isolés en un laps de temps relativement court, il n'en va pas de même de l'élucidation des mécanismes physiques et biochimiques mis en jeu lors de la contraction musculaire. Les études sur l'énergie nécessitée par la contraction musculaire entrent dans leur phase sérieuse en 1907 avec FLECHTER et HOPKINS qui montrent clairement que la fatigue musculaire s'accompagne d'une production d'acide lactique. Il faut attendre 1934 pour qu'on découvre le rôle de l'ATP (adénosine tri-phosphate) qui fut mis en évidence par LOHMAN, mais dès ce rôle reconnu. les choses s'accélèrent et on s'intéresse de très près à l'interaction de l'actomyosine avec l'ATP. En 1939 on découvrit que ce qu'on appelait alors myosine était une ATPase spécifique qui scindait l'ATP au niveau des groupements phosphoriques terminaux, lorsqu'elle était activée par certains ions divalents. SZENT-GYORGYI A. montra ensuite, en 1942, que l'ATP était capable de provoquer un changement spécifique dans les propriétés physiques de l'actomyosine et émit l'hypothèse qu'il existait un rapport direct entre ce changement de propriétés et la contraction musculaire proprement dite : une dissociation de l'actomyosine en actine et myosine ayant lieu en présence d'ATP ; un peu plus tard HUXLEY H.E. reprenant cette hypothèse, proposait sa célèbre thèse du glissement des particules. A peu près en même temps une autre Ecole faisait apparition sous la direction de MORALES M. et émit l'hypothèse que le changement de propriétés physiques, loin d'être dû à une dissociation du complexe d'actomyosine, était provoqué par un changement de forme du complexe (appelé myosine B) sans dissociation ; cette seconde hypothèse acquit rapidement une grande notoriété et ces deux tendances s'affrontent encore à l'heure actuelle. Il semble cependant que la majorité des auteurs admettent maintenant les idées de SZENT-GYORGYI et HUXLEY H.E. Il faut cependant souligner qu'aucune preuve formelle n'est venue confirmer ou infirmer l'une ou l'autre des thèses en présence. La microscopie électronique dans la mesure où elle permet de visualiser les molécules, permettra peut-être de trancher ou d'adopter une tierce position.

POSITION DU PROBLEME

Le travail que nous proposons a pour but l'étude et la mise au point d'une technique de visualisation par ombrage au microscope électronique, de molécules biologiques, et leur application à l'étude de l'actomyosine et de son substrat, l'adénosine tri-phosphate (ATP).

Actuellement les techniques les plus utilisées en biologie pour rendre visibles les macromolécules au microscope électronique sont :

- La coloration négative [2] [3] obtenue par dispersion des macromolécules dans une solution de sel de métal lourd avec laquelle elles n'ont pas d'affinité chimique de manière à ce qu'elles apparaissent en négatif,

tent [5].

leurs techniques.

MATERIEL ET METHODES

les deux cas. (KC1 0.6 M).

- 2 -

- L'ombrage qui sera décrit plus loin [3] [2] [4] [5],

- La coloration positive obtenue par dispersion des macromolécules dans une solution de sel de métal lourd avec laquelle elles ont une affinité chimique [2] [3] [4] [5]. (Nota : Un même sel peut donner lieu soit à la coloration positive, soit à la coloration négative lorsqu'on fait varier le pH et la concentration de sa solution).

La coloration négative semble jusqu'à présent donner les meilleurs résultats, la coloration positive est pratiquement abandonnée par suite des nombreux artefacts qui en résul-

L'ombrage par contre rermet théoriquement de mettre en évidence n'importe quelle particule, puisqu'il suffit d'un défaut de surface pour qu'il soit efficace. En particulier, dans le cas de l'actomyosine, il semble que seul l'onbrage permette jusqu'à présent un apport d'information sur l'ensemble de ses constituants. Toutefois, peu de recherches systématiques ont été entreprises [6] pour trouver les meilleures conditions techniques applicables à la biologie. Les métallographistes qui utilisent les techniques de repliques ombrées ont été amenés à étudier quels étaient les métaux ou alliages leur permettant d'observer les clivages ou les défauts de surface [4]. Il nous a semblé que leur problème était formellement identique au nôtre et c'est pourquoi nous avons tenté d'appliquer en les adaptant un certain nombre de

Matériel utilisé

L'actomyosine extraite des muscles postérieurs de rats par dissolution, précipitation et centrifugation (annexe I) est mise en solution et on apprécie sa pureté par ultracentrifugation analytique : seules les solutions ne possédant qu'un pic de sédimentation, c'est-àdire ne possédant qu'une seule sorte de constituants, sont utilisées (figure 1).

L'aptitude fonctionnelle est étudiée dans une solution 0,1 M de chlorure de potassium (KCl 0,1 M) [7] [8] et par ultracentrifugation analytique [9] en présence d'ATP dans

Les photographies sont obtenues au moyen d'un microscope Hitachi HS 6 dont les électrons sont accélérés par une différence de potentiel de 50 kV.

Les ombrages sont faits dans une installation à vide élevé Balzers Micro BA 3, comportant un dispositif d'incidence variable pour la projection des métaux. Les membranes de carbone sur les grilles porte-objets sont obtenues avec le même appareil. Tous les ombrages sont faits sur de l'actomyosine en solution dans le chlorure de potassium 0,6 M

- 3 -



- 4 -



Déplacement du pic de l'actomyosine au cours de l'ultracentrifugation. On appelle m le ménisque, p le pic et mp = x le déplacement du pic en fonction du temps

Méthodes expérimentales

I - Préparation des grilles porte-objets

Pour obtenir une bonne résolution, il est nécessaire d'étaler les particules sur une surface parfaitement plane et exempte d'impuretés. On utilise pour cela du mica récemment clivé [10].

La méthode classique [6] consiste à étaler la préparation directement sur le mica. d'ombrer, puis de déposer une membrane de carbone qui servira de support après décollement du mica.

Une variante de cette méthode a été mise au point et utilisée avec succès, tant pour la coloration négative que pour l'ombrage (schéma 1). Elle consiste à prendre une empreinte au collodion de la surface de mica : des lames de mica sont clivées et immédiatement immergées dans une solution de collodion puis séchées ; on décolle alors par flottation sur l'eau la membrane de collodion et on y dépose les grilles porte-objets. Ces grilles une fois extraites, on dépose la préparation sur la face qui était en contact avec le mica, on fait alors l'ombrage ou la coloration négative, puis on dépose sur l'ensemble une membrane de carbone qui servira de support après dissolution du collodion dans l'acétate d'isoamyle. On préfère en effet avoir un support de carbone plutôt que de collodion ou de Formvar, ceuxci étant très cassants.

Cette méthode, outre qui la est techniquement plus simple que la méthode classique (les membranes de carbone se cassant très souvent lors du décollement du mica) permet un meilleur étalement des particules car la surface de collodion est beaucoup plus miscible que la surface de carbone ; on évite ainsi les amas ou les gouttelettes qui donnent lieu à des artefacts souvent genants.



1. préparation de la



3. dépôt des grilles



5. évaporation de carbone



İmica

membrane de collodion



2. décollement par flottation





(extraction et retournement des grilles)







6. dissolution du collodion

Cependant c'est surtout du point de vue de la résistance mécanique des préparations que cette méthode est avantageuse : en effet, le carbone étant directement déposé sur les grilles porte-objets, il s'étend sur des surfaces très réduites (cnviron 30 μ^2) pai rapport à la méthode classique, d'où une résistance accrue pour une épaisseur de carbone faible, ce qui donne une meilleure luminosité aux forts grossissements.

II - Méthodes d'ombrages

L'ombrage consiste à vaporiser sous vide un métal lourd sur la préparation, sous une certaine incidence, de manière à déposer le métal sur un côté de la préparation et à projeter l'ombre des particules qui la constituent pour les rendre visibles au microscope. Malheureusement l'angle d'incidence ne peut être connu qu'à une quinzaine de degrés près : en effet, les préparations se trouvent assez proches d'une source de métal mal diaphragmée, or il est très difficile d'interposer un diaphragme suffisant entre la source et l'objet à ombrer, car le rendement en métal projeté devient très faible. Cependant, malgré les imperfections de cette technique pour connaître les dimensions exactes des particules, elle permet toujours leur mise en évidence, ce qui n'est pas le cas pour la coloration négative.

Le problème est de vaporiser suffisamment de métal pour que les particules soient rendues opaques aux électrons [10]. Une difficulté supplémentaire que nous avons tenté de résoudre vient du fait qu'il faut trouver un métal, un alliage ou plus généralement un matériau d'évaporation tel que son "grain" après évaporation soit suffisamment fin pour ne pas limiter la résolution et suffisamment inerte pour ne pas cristallise sur la préparation. C'est ainsi que l'or et le chrome qui étaient autrefois très utilisés, sont peu à peu abandonnés, car ils donnent lieu à des formations de cristaux d'oxyde dont la formation se poursuit lentement et fait évoluer l'image. Plus que la finesse du grain, c'est ce défaut qui fait qu'on leur préfère des métaux comme le platine ou le platine-iridium par exemple.

1 - Ombrages de platine pur

Un fil de platine de 0,5 mm de diamètre est enroulé autour d'un fil de tungstène de 1 mm de diamètre ; les meilleures conditions sont obtenues pour 1,5 cm de platine.

On fait passer un courant variable dans le fil de tungstène sous un vide compris entre 2 et 5, 10^{-5} torr et le platine est évaporé sur la préparation sous un angle de 65° + 15°,

2 - Ombrages de platine-iridium

Les conditions expérimentales sont les mêmes que pour l'ombrage de platine pur, mais on emploie un fil de platine-iridium à 20 pour cent de 0,1 mm de diamètre et 4,5 cm de longueur.

3 - Ombrages de carbone

Du carbone spectroscopiquement pur est évaporé scus un vide compris entre 2 et 5.10⁻⁵ torr, et l'épaisseur déposée est mesurée au moyen d'une lame de verre témoin sur de $65^{\circ} + 15^{\circ}$.

4 - Ombrages de platine-carbone

Des électrodes de graphite spectroscopiquement pur contenant un noyau de grains de carbone et de platine agglomérés sont évaporés sous un vide compris entre 2 et 5.10⁻⁵ torr. l'angle utilisé est de 65° + 15°, l'épaisseur déposée est mesurée au microdensimètre optique sur une lame de verre témoin.

Nous avons suivi pour la coloration négative, la méthode préconisée par HUXLEY [11] a l'acétate d'uranyle.

vide.

C'est cette seconde méthode que nous avons adoptée, les sels volatils ne s'évaporant pas toujours complètement et provoquant des artefacts assez nombreux. Cependant il est important de ne pas laisser sécher les grilles avant d'éliminer les sels, sinon la concentration en sels augmenterait considérablement au cours du séchage ce qui provoque la dénaturation des protéines. La méthode de préparation est donc la suivante :

- une ou deux gouttes (0,1 ml) d'actomyosine diluée dans une solution de KCl 0,6 M dans une proportion telle qu'on ait environ 2 mg par ml de protéines, sont déposées sur la grille porte-objets posée sur un papier filtre, puis la grille est lavée avec une vingtaine de gouttes de KCl 0,6 M pour éliminer le surplus de protéines, puis lavée à l'eau fraschement distillée et enfin ombrée.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

I - Introduction

Notre problème étant de trouver une technique pour étudier l'interaction de l'actomyosine avec son substrat l'ATP, nous avons d'abord procédé à un travail technologique pur. puis appliqué la meilleure méthode mise au point, au problème précis de l'interaction actomyosine-ATP.

- 6 -

laquelle le carbone déposé est mesuré au microdensimètre optique. L'angle d'incidence est

III - Méthodes de coloration négative

IV - Préparation des échantillons

Pour être observées en solution, les molécules d'actomyosine doivent être dans un milieu à concentration saline assez élevée (0,6 M) ce qui provoque des amas de sels sur la préparation. Pour éviter cela on a le choix entre deux solutions :

- soit diluer l'actomyosine dans une solution de sels volatils qui sera ensuite évaporée sous

- soit utiliser un sel classique qui sera éliminé par lavage à l'eau distillée.

II - Mise au point des techniques d'ombrage

.

.

L'utilisation du platine pur dans les conditions indiquées plus haut, donne en général un assez bon contraste (figure 2), cependant le grain de fond de la préparation est extrêmement épais et cette méthode ne semble pas pouvoir être utilisée pour la visualisation de détails fins, c'est pourquoi nous nous sommes adressés au platine-iridium, qui est conseillé par KLEINSCHMIDT [10].

- 8 -

Le platine-iridium donne de bien meilleurs résultats (figures 3 et 4), toutefois il ne nous a pas permis de mettre en évidence des détails de dimensions inférieurs à 50 Å.



- Fig. 2 -

Micrographie d'actomyosine en solution dans du chlorure de potassium 0,6 M (KCl 0,6 M) Ombrage au platine pur à 65°

Grossissement direct G_d =10000Grossissement total G_t =50000



- 9 -

- Fig. 3 -

Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M Ombrage au platine-iridium 65°

> $G_{d} = 10 000$ $G_{t} = 50 000$



- Fig. 4 -

Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M en présence d'adénosine tri-phosphate (ATP) Ombrage au platine-iridium

$$G_{d} = 10 \ 000$$

 $G_{t} = 50 \ 000$

Nous avons alors tenté d'utiliser le carbone comme matériau d'ombrage, mais le contraste de notre microscope étant très faible, l'opérateur était obligé de s'enfermer dans l'obscurité pendant 20 minutes avant de pouvoir procéder à la mise au point. Le grain obtenu s'est révélé excellent et il semble qu'un miscroscope électronique possédant un pouvoir contrastant élevé [12] pourrait être utilisé avec cette méthode qui s'est révélée encourageante (figure 5).

Nous nous sommes alors adressés à l'alliage de platine-carbone et c'est cette méthode qui nous a donné les meilleurs résultats, des détails de l'ordre de 20 Å ayant pu être mesurés (figures 6, 7 et 8).

Pour l'ensemble des méthodes d'ombrage et de coloration négative, l'utilisation d'une empreinte au collodion de la surface de mica donne toute satisfaction.

III - Etude de l'interaction de l'actomyosine avec l'ATP

Quoique le milieu physiologique soit à une concentration saline de KC1 = 0,15 M [7] [8], on a étudié l'interaction actomyosine-ATP à une concentration saline de KC1 = 0,6 M car c'est à cette concentration que les études employant d'autres techniques sont faites (diffusion de lumière, ultracentrifugation analytique, etc.) et il est intéressant de comparer les résultats de ces méthodes avec ceux de la microscopie électronique.

Des études systématiques ayant été faites montrant que l'action de l'actomyosine sur l'ATP se faisait au niveau des groupements phosphates terminaux [9] on utilise souvent le pyrophosphate de sodium dont la stabilité est de beaucoup supérieure à celle de l'ATP. Dans notre travail nous avons utilisé systématiquement les deux.



- Fig. 5 -

Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M Ombrage au carbone Les flèches montrent les filaments

$$G_{d} = 10 \ 000$$

 $G_{t} = 50 \ 000$



- Fig. 6 -

- 11 -

Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M Ombrage au platine-carbone

> $G_{d} = 10\ 000$ $G_{t} = 50\ 000$



- Fig. 7 -

Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M en présence d'ATP

 $G_{d} = 10 \ 000$ $G_{t} = 50 \ 000$

- 12 -

- Fig. 8 -

Microphotographie d'actomyosine KC1 0,6 M en présence d'ATP

 $G_d = 20\ 000$ $G_{+} = 300 \ 000$

Les flèches montrent les petites particules

1 - Etude de l'actomyosine sans ATP

En absence d'ATP, on observe de longs filaments d'environ 100 à 150 Å d'épaisseur et de longueur variable $(1 - 20 \mu)$ (photos 2, 3 et 6).

2 - En présence de pyrophosphate de sodium ou d'ATP

Par ombrage à l'alliage platine-carbone (20 pour cent de carbone) à une concentration saline de KCl = 0,6 M, on observe d'une part de longs filaments de 50 à 80 Å de diamètre et de longueur variable (1 - 20 μ) et d'autre part des particules ayant la forme d'une épingle dont la tête aurait 30 à 50 Å de diamètre et le corps de 15 à 25 Å d'épaisseur, de longueur variant entre 0,1 et 1 μ (photos 4, 7, 8).

INTERPRETATION DES RESULTATS

I - Résultats technologiques

L'utilisation d'une empreinte au collodion de la surface de mica permet un meilleur étalement des particules, celles-ci se dispersent beaucoup plus facilement que sur le carbone ; on obtient donc des images dont la définition et la finesse sont accrues.

Les meilleurs résultats pour l'ombrage sont obtenus au moyen d'alliages, et de l'alliage platine-carbone en particulier : ce fait peut se comprendre car le platine, métal à fort pouvoir contrastant, gagne en finesse par alliage avec le carbone. Cependant cette finesse de grain ne semble pas nuire au contraste ce qui est le cas pour le carbone seul dont le

. . .

grain est exceptionnel mais le contraste très faible et même dans une certaine mesure pour le platine-iridium. Il semble toutefois qu'il ne faille pas trop attendre des méthodes d'ombrages en général en ce qui concerne les études quantitatives ; cette méthode permet au maximum la mise en évidence de constituants et ne donne qu'une idée très vague des dimensions. Les mesures d'épaisseur sont en effet faites sur les photographies par la relation h = Ltg B où h est la longueur de l'ombre projetée, L l'épaisseur de la particule et B l'angle de projection ; or cet angle n'est connu qu'à 15° près d'où une source importante d'erreurs. Par ailleurs seuls les ombrages obliques monodirectionnels ont été employés et il serait intéressant d'utiliser les ombrages relatifs [10].

II - Etude de l'interaction de l'actomyosine avec l'ATP

La plupart des auteurs pensent que sous l'influence de l'ATP, l'actomyosine se dissocie en deux constituants : l'actine et la myosine A. Certaines études portant sur la reconstitution de l'actomyosine, à partir d'actine purifiée d'une part et de myosine purifiée d'autre part semblent confirmer ce résultat. Notre étude avait pour but de vérifier cette hypothèse en la prenant en sens inverse, c'est-à-dire d'essayer à partir d'un extrait protéinique total du muscle, de retrouver les constituants par l'action de l'ATP et par celle-là seule. Les images obtenues par coloration négative (figure 9) en l'absence d'ATP montrent bien l'image "en chevrons" caractéristique, trouvée par HUXLEY pour l'actomyosine reconstituée, ce qui nous permet de penser que notre actomyosine extraite est assimilable à l'actomyosine reconstituée.

En présence d'ATP, l'actomyosine en solution à KCl 0,6 M présente d'une part de longs filaments dont les dimensions sont celles généralement trouvées pour l'actine et d'autre part, occasionnellement, des particules dont les dimensions et la forme sont celles proposées par HUXLEY H.E. pour la myosine dépolymérisée [11] ; ces molécules individuelles ont été observées d'abord par RICE [6] puis par HUXLEY et collaborateurs [11] de manière occasionnelle par ombrage d'une solution de myosine pure dans une solution de sels volatils (figure 10).

penser (figure 11). constituants.

Toutefois, dans l'état actuel de notre travail, il est impossible d'identifier formellement les particules trouvées aux molécules de myosine, quoique le fait d'obtenir à la fois ces particules et des filaments de la dimension de l'actine, constitue une bonne raison de le

Il est cependant possible d'affirmer, qu'en l'absence d'ATP, on observe des filaments d'actomyosine de 100 à 150 Å d'épaisseur qui, en présence d'ATP, se trouvent réduits à 50-80 Å d'épaisseur sans que leur longueur en paraisse statistiquement affectée (1 à 20 μ). Ceci semblerait confirmer l'hypothèse d'une dissociation de l'actomyosine en deux

- 13 -



- 14 -

- Fig. 9 -

Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M obtenue par coloration négative à l'acétate d'uranyle Les flèches montrent la structure en chevrons

$$G_d = 10\ 000$$

 $G_t = 100\ 000$



Microphotographie d'actomyosine KCl 0,6 M en présence d'ATP Ombrage en platine-carbone





Particules expérimentales

- Fig. 10 -

Myosine A (HUXLEY H.E.)

 $G_t = 300 \ 000$

- Fig. 11 -

 $G_{d} = 20 \ 000$ $G_{t} = 150 \ 000$

• Les flèches montrent les deux sortes de particules

- 15 -

CONCLUSIONS

La mise au point de la technique d'ombrage au platine-carbone, nous a permis de visualiser des détails de l'ordre du pouvoir de résolution de notre microscope, et semble pouvoir être intéressante pour l'étude des macromolécules biologiques. Pour l'étude de l'interaction actomyosine-ATP, l'ensemble des résultats trouvés sont cohérents avec ceux de la littérature (tableau 1).

Il semble bien que l'hypothèse d'une dissociation du complexe d'actomyosine en présence d'ATP doit être retenue. La microscopie électronique appliquée à l'étude des macromolécules biologiques semble être en voie d'avenir, les méthodes utilisées jusqu'à présent sont en effet pour la plupart des méthodes "intégrantes" qui ne permettent d'atteindre qu'une propriété moyenne, "statistique", de ces molécules. Par contre, la microscopie électronique permettant de visualiser qualitativement les phénomènes, peut sans doute nous donner une idée du comportement vrai des systèmes biologiques. Des études d'enzymologie pourraient ainsi être entreprises dont le contrôle ne serait plus une cinétique mais une visualisation des phénomènes, les différents stades de la réaction enzyme-substrat pouvant être contrôlés au microscope et les changements de morphologie accompagnant ces réactions pouvant donner des détails supplémentaires sur la structure moléculaire.

4	T.	A	B	L	E.	A	U	Ι	-
---	----	---	---	---	----	---	---	---	---

	Résultats de la lit	térature	Résultats obtenus	
Actomyosine	diamètre	160 Å	120 - 150 Å	
	distance entre les chevrons	360 Å	410 450 Å	
Actine	diamètre	70 Å	50 - 80 Å	
Myosine	tête	40 Å	35 - 55 Å	
	queue	20 Å	20 - 30 Å	

[1] SZENT-GYORGYI A.G. Proteins of the myofibrils in Structure and Function of Muscle Acad. Press, 1960, p. 1-49 [2] SIEGEL B. M. Modern developments in electron microscopy Acad. Press, 1964, 432 p. [3] HEIDENREICH R.D. Fundamentals of transmission electron microscopy Interscience Publishers, 1966, 414 p. Proc. European Reg. Conf. on Electron Microscopy, Delft, 1960, 2 vol., 1078 p. Proc. 5 th Inter. Congr. for Electron Microscopy, Philadelphia, 1962, p. A₁ à YY₁₂ [6] RICE R.V. Conformation of individual Macromolecules particles from Myosin Biochim. et Biphys. Acta, 1961, <u>53</u>, p. 29-33 SZENT-GYORGYI A. Chemical Physiology of Contraction in Body and Heart Muscle Acad. Press, 1953, 133 p. MARNYAMA K., GERGELY G. Interaction of Actomyosine with adenosine triphosphate at low ionic strenght J. Biol. Chem. 1962, 237, p. 1095-1105 PINSET-HARSTROM I. L'influence de l'ATP et du pyrophosphate de sodium sur diverses caractéristiques des protéines contractiles du muscle en solution J. Chim. Phys. Phys. Chim. Biol., 1961, 58, p. 366-371 LANG D., KLEINSCHMIDT A.K., ZAHN R.K. Elektronenmikroskopische Darstellung, Längenverteilung und Konfiguration einsträngiger Desosxyribonucleinsäure im Cytochrom-c-Film Biophysik, 1964, 2, p. 73-78 HUXLEY H.E. Electron microscope studies on the structure of naturel and synthetic Protein Filaments from striated Muscle J. Mol. Biol., 1963, 7, 281-308 FAGET J. Microscopie électronique à contraste de phase Proc. 5 th Intern. Cong. for Electron Microscopy Philadelphia, 1962, p. A₇ PINSET-HARSTRÖM I. Résultate en cours de publication Ultrastruct Research, 1966

- [4]
- [5]
- [7]
- [8]
- [9]
- [10]
- [11]
- [1**2**]
- [13]

- 16 -

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXE I

METHODE D'EXTRACTION DES PROTEINES

Pour 20 g de muscle :

- Broyer dans 50 ml de solution I, ajouter 50 ml et laisser sur de la glace pendant 4 heures en agitant toutes les 30 minutes.

1

- Centrifuger 15 minutes à 1 800 t/m.
- Précipiter le surnageant avec le double de son volume d'eau glacée. Ceci amène la molarité en KCl à environ 0,25.
- Centrifuger 10 minutes à 1 800 t/m et éliminer le surnageant.
- Dissoudre le précipité en ajoutant progressivement la solution I à raison de 2,5 ml/g.
- Laisser sur de la glace pendant 12 heures, puis centrifuger pendant 1 heure.
- Reprécipiter la solution avec le double de son volume d'eau glacée.
- Centrifuger 10 minutes à 1 800 t/m et dissoudre le précipité par la solution II en utilisant 3 ml par gramme afin d'amener la molarité du KCl à 0,6.

SOLUTIONS UTILISEES

Solution I : pour KC1 0,8 M 0,01 M MgCl, Tampon à pH 6,7 0,02 M ajuster le pH à 6

Solution de dilutio

KC1 0,06 M MgCl₂ 0,001 M Tampon tris Mall 0,02 M

ajuster pH à 6,8

ANNEXE II

1 litre	Solution]	II: pour 1 lit	re			
I 56,9 g	KC1	0,8 M	59,6 g			
I 2 g	MgCl ₂	0,001 M	0,2 g			
7 100 ml tris Malleate	Tampon t	ris Malleate 0,02 M	100 ml			
5,8	ajuster le pH à 6,8					
on KCl simple, pour 1 litre 44,7 g	Avec pyro KC1	ophosphate (Na 0,6 M	a ₂ P ₂ 0 ₇), pour 1 litre 44,7 g			
M 1 ml sol. M	MgCl ₂	0,001 M	1 ml sol. M			
leate 100 ml	Tampon tris Malleate 100 ml 0,02 M					
J	Pyrophosphate 0,005 M 2,23 g					
	ajuster pl	H & 6,8				

Manuscrit reçu le 26 septembre 1966

- 19 -