

G. MARECHAL

Laboratoire de Physiologie Générale, U.C.L., Louvain, Belgique

Introduction

L'énergie mécanique et calorique que dégage un muscle en contraction doit nécessairement provenir d'une transformation de l'énergie potentielle chimique de certains substrats au contact de la structure protéique contractile. Il est aisé de donner à ce bilan une forme quantitative. Si l'on admet qu'une réaction chimique (i) libère une enthalpie molaire $-\Delta H_i$, la chaleur (Q) et le travail (W) produit dépendront des quantités m_i de substrats qui ont réagit :

$$Q + W = - \sum m_i \Delta H_i \quad (1)$$

Ce bilan pourra s'appliquer au muscle dans la mesure où il constitue un système fermé en équilibre stationnaire, ce qui est généralement vrai pour les expériences faites sur muscles isolés.

Cette équation résume aussi les problèmes que pose la production d'énergie par le muscle.

La mesure de Q et de W ne pose plus guère de problèmes difficiles. C'est du côté de l'autre membre de l'équation que les recherches récentes ont accumulé des difficultés susceptibles de mener à une révision des concepts actuels. La première est l'identification des réactions dont la contribution au bilan énergétique (c'est-à-dire le terme $m_i \Delta H_i$) est suffisamment importante. Dès Lundsgaard (1) et Lohmann (2), ce problème était résolu, au moins en ce sens que depuis lors aucune réaction énergétique n'a plus été identifiée, et que la théorie classique élaborée alors, est encore admise sans modification jusque maintenant, semblant rendre compte

de tous les faits connus. La mesure m_i des quantités qui ont réagit est un problème purement technique; les méthodes d'analyse enzymatique et de chromatographie en couches minces ont permis de mesurer avec précision les changements chimiques qui surviennent dans un muscle de quelques dizaines de milligrammes.

Les recherches de ces dernières années ont abouti à cette conclusion surprenante, qu'il est impossible d'établir un bilan énergétique équilibré entre la chaleur produite et les réactions chimiques observées. Il faut admettre l'existence d'un réservoir d'énergie chimique non identifié, dont la contribution à l'énergétique musculaire peut s'élever à 50 % dans un cas rapporté.

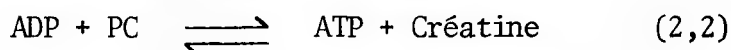
Ces observations sont faites dans le cas où le travail W est nul, c'est à dire, où la contraction est isométrique. La production de travail mécanique soulève aussi des difficultés, qui sont loin d'être résolues actuellement. Je limiterai cet exposé au cas de la contraction isométrique, où apparaît plus clairement la nécessité de renouveler la théorie classique de Lohmann.

La théorie classique

Il est sans doute utile de retracer très brièvement l'aspect énergétique des idées courantes sur la contraction du muscle. Les protéines contractiles possèdent une activité ATP-ase :

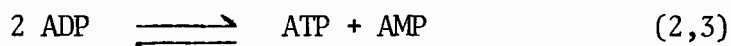


par laquelle elles catalysent l'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate inorganique (P_i). L'énergie libérée par cette réaction est considérable ($\Delta H_{\text{ATP}} = -11 \text{ kcal/mole}$), et peut être utilisée par les protéines contractiles pour produire chaleur et travail musculaire. Cependant, on n'observe aucune chute du taux d'ATP durant la contraction, si ce n'est pour des contractions prolongées (plus de 10 sec à 20°C p.ex. pour un sartorius de grenouille). Ce fait s'explique par l'intervention de réactions de restauration, qui rephosphorylent l'ADP en ATP. Une de ces réactions est extrêmement rapide, celle de Lohmann :

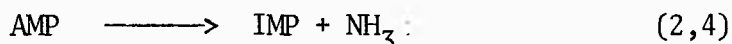


où la phosphorylcréatine (PC) se déphosphoryle en créatine.

Une deuxième réaction est aussi très rapide, c'est celle catalysée par la myokinase :



L'Adénosine monophosphate (AMP) produit, ne s'accumule pas, car il est promptement déaminé en inosine mophosphate (IMP) avec formation d'ammoniaque :



Classiquement, on considère que la déamination ne survient que dans des muscles épuisés. Cependant, Canfield et Maréchal (3) l'ont observée après un tétanos de quelques secondes seulement, à 20°C; la production d'IMP précède toujours l'accumulation d'AMP chez ces auteurs.

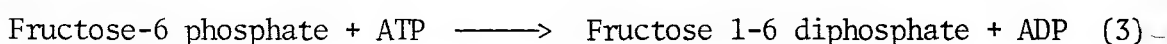
Enfin des réactions de restauration beaucoup plus tardives, parce que plus lentes, sont la glycolyse et les oxydations.

Les premières difficultés

Dès sa formation, la théorie classique a rencontré des objections, qui n'ont cependant jamais été assez puissantes que pour la mettre en doute.

Une des première difficultés fut l'observation de Lundsgaard (4) : un muscle dont la glycolyse est bloquée par intoxication à l'acide monoiodo-acétique hydrolyse de la phosphorylcréatine, non seulement pendant un tétanos (25 sec, 0°C, sartorius de grenouille), mais encore pendant les trois minutes qui suivent. A première vue, ce fait s'accorde avec la théorie classique, si l'on admet que la réaction de Lohmann (2,2) est tardive, et que la phosphorylcréatine hydrolysée après le tétanos sert à rephosphoryler l'ADP formée pendant le tétanos. Cette interprétation, quoique rejetée par Lundsgaard lui-même, fut soutenue par des mesures physiques, comme les variations de pH (5), par exemple, qui confirment l'existence d'une hydrolyse post-contractile de la phosphorylcréatine. Hill (6) fit remarquer que l'on n'avait jamais démontré que l'hydrolyse de l'ATP s'observe durant une contraction. Et de fait, les nombreuses tentatives faites durant les vingt années suivantes n'ont jamais pu établir qu'un fait : il n'y a pas d'hydroly-

se d'ATP pendant la contraction (pour une revue complète, consulter Mommaerts 1969 (7)). On se trouve dès lors en pleine contradiction : il est clair que l'hydrolyse post-contractile de la phosphorylcréatine ne peut pas s'expliquer par l'intervention de la réaction de Lohmann. Même l'observation que l'intoxication de l'enzyme de Lohmann par le fluorodinitrobenzène bloque l'hydrolyse de phosphocréatine durant une contraction et permet une hydrolyse d'ATP, bien que cette observation ait été considérée comme une confirmation des voies classiques (8), elle ne lève pas le problème posé par l'hydrolyse post-contractile de la phosphorylcréatine. On a naturellement songé à l'expliquer par la dépense d'énergie qu'exige "l'allumage" de la glycolyse par la réaction :



Spronck (9) a démontré que cette réaction survient effectivement après 5 secousses isométriques, mais ne contribue au maximum qu'à la moitié de la quantité de phosphorylcréatine hydrolysée.

Cependant, les faisceaux d'arguments indirects basés sur les protéines contractiles, solubilisées ou maintenues en structures organisées (p.ex. cas des "fibres glycérolées") restent tellement puissants que les difficultés auxquelles j'ai fait allusion n'ont jamais fait mettre en doute l'exactitude de la théorie classique.

L'impossible bilan

Le seul moyen de démontrer rigoureusement l'insuffisance de la théorie classique nous est donnée par le principe de la conservation de l'énergie. Si les réactions (2,1) et (2,2) sont les seules à fournir l'énergie nécessaire à la contraction, alors l'équation (1) stipule que (en condition isométrique ou $W \simeq 0$) :

$$Q = - m_{PC} \Delta H_{PC} - m_{ATP} \Delta H_{ATP} \quad (4)$$

où m_{PC} et m_{ATP} sont les quantités de phosphorylcréatine et d'ATP hydrolysés pendant la contraction, et ΔH_{PC} et ΔH_{ATP} sont leurs enthalpies molaires. Comme la variation d'ATP est nulle si les contractions sont de faibles durées le bilan se réduit à :

$$Q = - m_{PC} \Delta H_{PC} \quad \text{ou} \quad - \Delta H_{PC} = \frac{Q}{m_{PC}} \quad (5)$$

La valeur de ΔH_{PC} calculée par l'équation (5) à partir des grandeurs expérimentalement mesurées, Q et m_{PC} , varie de 7,5 kcal/mole (10) à 11 kcal/mole (11). L'étude détaillée de ce type de bilan a conduit à la conclusion générale résumée par Woledge (12) : "We have found no circumstances in which all the heat produced by a muscle can be convincingly accounted for".

Jusqu'alors il subsistait un doute, en ce sens que l'hydrolyse de la phosphorylcréatine rend compte de presque toute la chaleur dégagée, et que le solde est peut-être couvert par une hydrolyse de phosphorylcréatine.

Avec les expériences nouvelles de Gilbert et al. (13) et les nôtres (14), réalisées en même temps, plus aucun doute n'est permis. La Fig. 1 illustre leurs expériences. Des sartorius de grenouille sont stimulés à 0°C pendant 2 à 15 secondes. L'hydrolyse de phosphorylcréatine est proportionnelle à la durée du tétanos. La production de chaleur commence par une bouffée qui dure environ 2 secondes, après quoi elle augmente à une allure voisine de celle de la vitesse d'hydrolyse de la phosphorylcréatine. Ce parallélisme n'est pas le fruit du hasard; il est obtenu en exprimant la chaleur produite en "unité équivalente de PC détruite" c'est à dire en rapportant Q à ΔH_{PC} (= - 11 kcal/mole) en application de la formule (5). Cette manière d'exprimer les résultats a pour mérite de permettre une comparaison aisée entre les résultats chimiques et caloriques, mais elle a le désavantage de ne pas pouvoir s'étendre au cas où plusieurs réactions d'enthalpie différentes contribuent à la production de chaleur. Il vaut mieux changer diamétralement, et transformer chaque réaction chimique en son équivalent calorique. Si par exemple m_{ATP} mole d'ATP sont hydrolysées, la chaleur produite par cette réaction sera - $m_{ATP} \times 11$ kcal/mole. Si m_{PC} mole de phosphorylcréatine sont hydrolysées, on peut décomposer la réaction en deux étapes : m_{PC} mole de PC phosphorylent de l'ADP (avec une enthalpie de + 2 kcal/mole) puis l'ATP formé (soit m_{PC} mole) est hydrolysé (avec $\Delta H_{ATP} = - 11$ kcal/mole). Il est alors aisé de tenir compte de l'ensemble des réactions (2).

Pour utiliser ces principes, j'ai mesuré soigneusement l'avancement des réactions (2) en collaboration avec P. Canfield (3), et simultanément

J. Lebacqz a

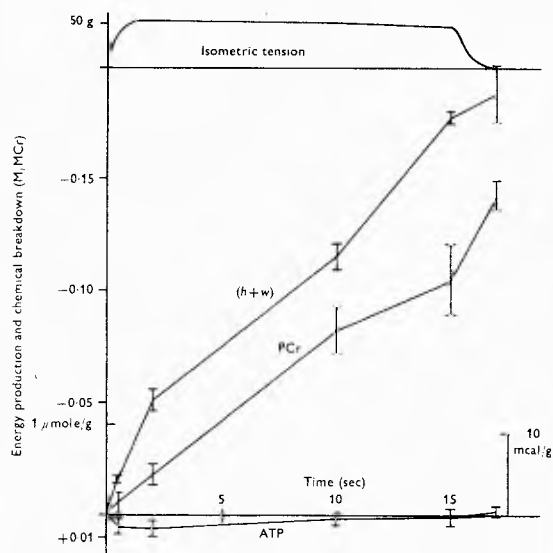


Figure 1. Dégagement de chaleur (réduit en "équivalent phosphorylcréatine", avec $\Delta H = -11$ kcal/mole) et variation de la phosphorylcréatine et de l'ATP durant un tétanos isométrique de 15 sec à 0°C d'un sartorius de grenouille.

déterminé la production de chaleur. Nous avons trouvé que l'ATP, la PC, la créatine, l'ADP et l'AMP sont dans l'équilibre prescrit par les réactions (2,2) et (2,3) (à condition que ces réactions soient rapides par rapport à (2,1)), avec des constantes d'équilibre de 0,44 (pour la myokinase) et de 22 (pour la réaction de Lohmann) qui sont en bon accord avec celles trouvées *in vitro* (3, 14). On peut dès lors calculer la chaleur produite par ces réactions, Q_e , qui est égal à (15):

$$Q_e = - \{m_{ATP} + m_{PC} + m_{AMP} + m_{IMP}\} \Delta H_{ATP} - m_{PC} \Delta H_{PC} \\ - (m_{AMP} + m_{IMP}) \Delta H_{AMP} - m_{IMP} \Delta H_{IMP}$$

où m_{ATP} et m_{PC} sont les diminutions d'ATP et de PC en fonction de la durée du tétanos, et m_{AMP} et m_{IMP} sont les accroissements d'AMP et d'IMP durant le tétanos.

Les autres réactions énergétiques étaient bloquées : la glycolyse parce que les sartorius (de grenouilles) étaient intoxiqués par l'iodoacétate (0,4 mM), les oxydations parce que les muscles étaient en azote. Pour stimuler le métabolisme, les expériences furent faites à 20°C. Les muscles étaient congelés par immersion brutale dans de l'isopentane refroidi à -160°C, avant qu'ils ne puissent se relâcher.

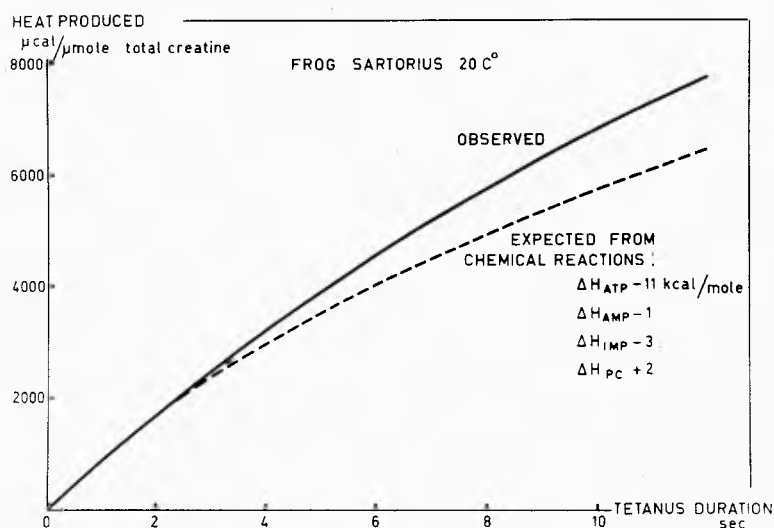


Figure 2. Dégagement de chaleur durant un tétanos de 12 secondes d'un sartorius de grenouille à 20°C, comparé à la chaleur calculée d'après les variations de phosphorylcréatine, ATP, ADP, AMP et inosine monophosphate.

La figure 2 montre que la chaleur calculée d'après les réactions chimiques correspond à celle observée, jusqu'à une durée de tétanisation d'environ 2 secondes. Par après, le muscle dégage plus de chaleur que prévu : l'excès de chaleur augmente progressivement, pour atteindre 30 mcal/g au bout de 12 secondes de tétanos. Ce chiffre est trois fois plus grand que celui trouvé par Gilbert et al. (13), mais ceux-ci stimulaient le muscle à 0°C, et localisaient l'excès de chaleur au début du tétanos seulement.

TABLEAU I

Substrats micromoles/g	O ₂	N ₂	Iodoacetate - N ₂	ΔH kcal/mole
Phosphorylcréatine	- 14	- 15	- 13	- 9
ATP	- 0.2	- 0.2	- 1.5	- 22
Lactate	+ 1.6	+ 2.0	+ 0.1	- 22
α glycéro-P	+ 1.2	+ 0.9	0	
Fructose 1-6 diP	+ 1.2	+ 1.1	+ 5.8	
Chaleur calculée (n = 18)	164	188	153	
Chaleur observée (n = 9)	355	322	287	

Les variations des principaux substrats énergétiques juste à la fin d'un tétanos de 12 sec à 20°C de sartorius de grenouille soumis à trois traitements différents. Elles sont statistiquement significatives, excepté les variations d'ATP en O₂ et N₂. La chaleur produite par les trois premières réactions est calculée, utilisant les enthalpies correspondantes. La chaleur de formation de l'α-glycérophosphate est incertaine; celle du fructose 1-6 diphosphate est à peu près égale à celle de l'hydrolyse de l'ATP utilisé simultanément, et est donc comptabilisé avec la phosphorylcréatine. Ces deux postes ne sont donc pas ajoutés au bilan. La chaleur ainsi calculée est finalement comparée à la chaleur mesurée expérimentalement à l'aide d'une thermopile du type Downing-Hill.

Il est clair que des réactions chimiques sont négligées dans le bilan, des réactions qui libèrent beaucoup d'énergie; puisque 30 mcal/g correspondent à l'énergie dégagée par 10 secousses de sartorius de grenouille à 0°C.

J'ai donc fait une nouvelle série d'expériences (en collaboration avec J. Lebacqz), dont les résultats sont résumés dans le tableau I. Des muscles sartorius de grenouille sont tétanisés isométriquement 12 secondes à 20°C. Dans un groupe, on mesure la production de chaleur; dans un deuxième groupe, on congèle rapidement les muscles avant le relâchement, et on analyse l'extrait perchlorique pour les substrats consignés au tableau. Certains muscles sont stimulés en atmosphère d'oxygène, d'autres en azote, d'autres encore en azote après intoxication à l'iodoacétate. La chaleur

produite par ces réactions (utilisant les variations d'enthalpie citées par Woledge (12)) est comparée à celle effectivement observée. L'excès de chaleur observée est énorme, à peu près égal à la chaleur calculée, et cela, que les oxydations et la glycolyse soient actives ou non.

La conclusion est inévitable : il existe dans le muscle un réservoir d'énergie qui n'est pas identifié. Ce réservoir n'est ni le système ATP-PC, ni la glycolyse, ni les oxydations. Il est sollicité pendant la contraction, de manière variable, mais qui peut atteindre 50 % des dépenses énergétiques. Ce réservoir est peut-être celui qui reçoit l'énergie libérée par l'hydrolyse post-contractile de la phosphorylcréatine. Son existence paraît certaine, par la démonstration de l'impossibilité d'établir un bilan énergétique équilibré particulièrement si les muscles sont tétanisés à 20°C.

Références

1. LUNDSGAARD, E. (1930). Biochem. Z. 217, 162
2. LOHMANN, K. (1934). Biochem. Z. 271, 264
3. CANFIELD, P. & MARECHAL, G. (1971). Abstract XXV Internat. Congr. Physiol.
4. LUNDSGAARD, E. (1934). Biochem. Z. 354, 286
5. DUBUISSON, M. (1939). J. Physiol. (London) 94, 461
6. HILL, A.V. (1950). Biochem. Biophys. Acta 4, 4
7. MOMMAERTS, W.F.H.M. (1969). Physiol. Rev. 49, 427
8. CAIN, D.F. & DAVIES, R.E. (1962) Biochem. Biophys. Res. Comm. 8, 361
9. SPRONCK, A.C. (1965). Arch. int. Physiol. Biochim. 73, 241
10. MARECHAL, G. (1964). "Le métabolisme de la phosphorylcréatine et de l'adénosine triphosphate durant la contraction musculaire" Ed. Arscia, Bruxelles pp.157
11. WILKIE (1968). J. Physiol. (London) 195, 157
12. WOLEDGE, R.C. (1971). Prog. Biophys. molec. Biol. 22, 37
13. GILBERT, C.I., KRETZSCHMAR, K.M., WILKIE, D.R. & WOLEDGE, R.C. (1971) J. Physiol. (London) 218, 163
14. MARECHAL, G. (1971) in "Physiological response to the onset of exercise" Toulouse, J. Durand Ed.
15. CANFIELD, P., LEBACQ, J. & MARECHAL, G. (1971). J. Physiol.(Paris) 63, 181A