

1463



### HISTOBIOCHIMIE DU MUSCLE ET ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE À L'EFFORT

Par G. MOUTHON, S. ROCHE-FONDEUR,  
C. PAYEN-MEYRAN, K. KHERBANI,  
B.ZOUMBI, B.APFELKALIK

Avec la collaboration technique  
de V. LAINE, C. ACHOUR, M. LOUBOU  
Laboratoire de Physique et  
Chimie Biologiques et Médicales  
I.N.R.A.  
E.N.V. D'ALFORT

7, Av. du Gal de Gaulle  
94704 MAISONS ALFORT CEDEX

RESUME

L'investigation directe du muscle à partir de biopsies traitées par analyses histo-chimique et histo-enzymologique est de grande importance pour l'étude et la compréhension des mécanismes de résistance à l'effort.

L'évaluation quantitative de glycogène par l'acide périodique - Schiff (P.A.S.) dans les différents types de fibres est essentielle et devient possible par analyse d'images sur des coupes sériées.

La révélation des types collagéniques est originale. Une méthode vient d'être mise au point pour les quantifier.

MOYS-CLÉS : Cheval, muscle, biopsie, glycogène, collagène, effort, analyse d'images.

SUMMARY

The direct investigation of muscle from the biopsy which is treated by histochemical and histo-enzymological analysis has a large importance for the stud and the understanding of the effort-resistance mechanisms.

The quantitative evaluation of glycogen by the periodic acid - Schiff (P.A.S.) in the different fibers types are essential and can be possible by the picture analysis on cuttings in steps.

The revelation of the different kinds of collagen is new and a method is just given for quantification.

KEY WORDS : Horse, muscle, biopsy, glycogen, collagen, effort, picture-analysis

### INTRODUCTION

L'investigation directe du tissu musculaire par biopsie avec analyse histo-chimique et histo-enzymologique est maintenant utilisée par divers auteurs pour étudier les capacités à l'effort du cheval (LINDHOLM et coll., 1982, ESSEN-GUSTAVSSON et coll., 1982 ; KAI, 1984 ; MOUTHON et coll., 1983, 1985).

Les mesures portent habituellement sur les ATPases permettant de révéler les différents types de fibres, de calculer leurs pourcentages et leur taille.

Certains substrats ou enzymes sont désormais mesurés directement par densitométrie, en particulier le glycogène dont la teneur dans les différents types de fibres varie avec l'effort (HODGSON et coll., 1982).

Mais un autre facteur jusqu'alors non mesuré devrait jouer également un rôle important dans la résistance à l'effort : les collagènes des membranes musculaires. En effet, la résistance de ces membranes sera fonction de la qualité et de la quantité de ces molécules tissant un réseau plus ou moins dense et dont l'intervention dans la contraction du muscle doit être essentielle.

C'est pourquoi nous nous sommes attachés à mettre au point d'une part une quantification du taux de glycogène dans les différents types de fibres par analyse d'images, d'autre part, une révélation des différents types collagéniques et une méthode quantitative de la densité du réseau membranaire et de son épaisseur également par analyse d'images.

### I - PRELEVEMENTS

Les auteurs utilisent généralement le muscle gluteus. Nous avons étudié, pour des raisons pratiques, le triceps brachial qui nous semble préférable :

- . facilité d'accès
- . représentativité du travail musculaire général,
- . homogénéité dans la répartition des fibres.

Ces prélèvements sont effectués à titre d'essai sur des animaux d'abattoir.

Les fragments musculaires sont collés sur support de liège et congelés immédiatement dans l'isopentane refroidi à environ - 160°C dans les vapeurs d'azote liquide, puis conservés le temps du transport au laboratoire dans la glace carbonique.

59hr

Plusieurs tests de conservation ont été étudiés (azote liquide, congélateur à - 80°C, congélateur à - 30°C), et la révélation du glycogène après 2 mois 1/2 de conservation en comparaison avec des prélèvements analysés immédiatement nous a permis de fixer une seule méthode : conservation au congélateur à - 80°C.

Pour l'évaluation des collagènes, les fragments de biopsie peuvent être conservés dans l'azote liquide.

Avant coloration, on procède à des coupes sériées à l'aide d'un cryotome à - 24°C (épaisseur de coupe 6 µm).

## II - GLYCOGENE MUSCULAIRE

Le taux de glycogène musculaire est un facteur essentiel dans l'étude de la capacité et de la résistance à l'effort (HODGSON et coll., 1982).

En cas d'effort violent et bref, ce sont les fibres de type II b (à métabolisme anaérobie) qui ont une activité optimale (production d'acide lactique).

Si l'effort se prolonge, le muscle consomme son glycogène par voie anaérobie mais également et surtout ses acides gras (oxydation) avec un rendement bien supérieur.

D'autre part, la sécrétion d'androgènes autorise une glycogénogénèse pendant l'effort et donc une augmentation des capacités énergétiques du muscle.

L'entraînement vient quant à lui augmenter le taux de glycogène musculaire, diminuer la consommation de glycogène pendant un effort long, enfin augmenter la capacité d'oxydation des acides gras.

Ceci entraîne la restauration d'un stock de glycogène utilisable par les fibres Iib pour un effort supplémentaire de courte durée et de grande intensité pendant un effort long.

Il est donc absolument nécessaire d'étudier sur l'animal vivant les possibles variations de pourcentage du glycogène musculaire.

### REVELATION DU GLYCOGENE

Les lames sont fixées pendant 30 minutes dans le liquide de Carnoy puis subissent une coloration à l'acide périodique - Schiff (P.A.S.). Après montage, les lames sont examinées au microscope. Les mesures sont ensuite effectuées avec l'analyseur d'images (T.A.S.).

### LECTURE T.A.S.

Par comparaison avec les mêmes sites observés sur des lames de la même série ayant subi d'autres colorations (en particulier ATPase), on mesure les quantités relatives de glycogène dans les fibres identifiées par leur type métabolique (I, Iia, II b).

## RESULTATS

En coloration PAS, les fibres I apparaissent claires et correspondent aux fibres foncées sur les lames colorées par réaction ATPasique à pH 4,35.

## III - COLLAGENE MUSCULAIRE

Dans le cadre de l'étude de la résistance à l'effort intervient l'analyse des types de collagène musculaire.

L'existence de plusieurs types de structures chimiques différentes entraîne :

- des propriétés antigéniques différentes, ce qui permet de les distinguer par des méthodes immunologiques appropriées (immunofluorescence, immunopéroxydases),
- des propriétés physiques différentes (résistance à la tension, à la pression et à la chaleur, teneur en eau) d'où les rôles distincts au sein des tissus.

Les principaux types de collagène présents dans le muscle sont (DUANCE V.C. et coll., 1977) :

- Collagène de Type I  $\{\alpha_1(I)\}_2 \alpha_2$
- Collagène de Type III  $\{\alpha_1(III)\}_3$
- Collagène de Type IV  $\alpha_1(IV)$  et  $\alpha_2(IV)$

dont les anticorps polyclonaux correspondants seront les immunomarqueurs cellulaires ou membranaires.

La révélation sur coupe histologique des collagènes du tissu conjonctif musculaire a d'abord utilisé les techniques classiques d'immunofluorescence.

Actuellement est mise au point la technique à l'immunopéroxydase qui donne une coloration plus stable que la fluorescence.

Ultérieurement, l'analyse d'image sera appliquée à la mesure des surfaces colorées correspondant à la quantité relative de chaque type collagénique.

## METHODES

Les premiers essais sont effectués sur des chevaux à l'abattoir. Le même protocole peut être appliqué chez l'animal vivant à partir de biopsies musculaires.

Les anticorps testés par des gammes de dilutions dont on retient celles de 1/5è, 1/20è, 1/50è, 1/100è sont mis en contact pendant 30 minutes à température ambiante en chambre humide.

Pour chaque série d'animaux les lames témoins sont incubées avec un sérum de lapin non immun au 1/40è et subissent les mêmes traitements.

Les observations au microscope optique de la fluorescence révèlent avec précision et finesse les sites des différents types de collagène dans le tissu musculaire.

L'immunofluorescence indirecte permet la sélection des anticorps les mieux adaptés à cette étude et leur utilisation aux dilutions optimales pour le marquage en immunopéroxydase.

MARQUAGE PAR IMMUNOPEROXYDASE

La technique de marquage par immunopéroxydase consiste à révéler l'activité péroxydasique du complexe Péroxydase-Anti-Péroxydases (Coffret P.A.P. Biolyon) pour un chromogène (réactif à base de diaminobenzidine) préparé extemporanément.

On hydrate d'abord les coupes dans un tampon PBS, puis on leur fait subir une oxydation dans l'eau oxygénée à 3% pour inhiber les péroxydases endogènes. Les lames sont ensuite trempées dans une solution de sérum-albumine bovine à 2% ce qui masque les sites non spécifiques.

Elles sont ensuite incubées en chambre humide avec un premier anticorps. Après rinçage, les coupes sont mises en contact avec le deuxième anticorps puis avec la P.A.P. de lapin. Celle-ci se fixe sur le deuxième fragment Fab et est mise en évidence au contact du chromogène. Notre étude permet une coloration très stable des structures collagéniques reconnues en un brun durable.

ANALYSES DES COUPES

Après montage des lames colorées dans une résine stable, on fait simultanément, pour chaque lame les prises de vue (diapositives) et les observations sur microscope Leitz orthomat aux objectifs 10 et 25.

RESULTATS

Comme dans les autres espèces étudiées ; homme (HANTAI D. et Collab., 1985), bovin (DUANCE V.C. et coll., 1977).

- Le type I occupe chez le cheval, l'endomysium et toute l'épaisseur du périnysium.
- Le type IV est repérable juste au contact de la membrane basale des cellules musculaires.

CONCLUSION

Dans l'étude de la résistance à l'effort, l'investigation directe du tissu musculaire à partir de biopsies permet d'évaluer les pourcentages de fibres, leur morphométrie et un certain nombre de substrats dans la contraction.

Après révélation des types de fibres par leur activité ATPasique, il est possible de mesurer, sur des coupes sériées colorées au P.A.S., les quantités relatives de glycogène par analyse d'image et éventuellement de suivre sa consommation dans différents types d'efforts.

L'immunofluorescence permet de révéler les types de collagènes et la méthode à l'immunopéroxydase permet d'envisager une quantification de la densité du réseau et de son épaisseur par analyse d'images.

D'autre part, l'estimation de la résistance physique de l'enveloppe conjonctive des fibres dont le rôle doit être déterminant dans l'adaptation à l'effort apparaît possible.

\* \* \*

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Centre de Radio-Analyse de l'Institut Pasteur de Lyon (D. HARTMANN) pour la fourniture des anticorps et la R.C.P. C.N.R.S. 814 (D. HERBAGE) pour sa participation à ce travail.

## BIBLIOGRAPHIE

DUANCE (V.C.), RESTALL (D.J.), BEARD (H.), BOURNE (F.J.), BAILEY (A.J.) - The location of the three collagen types in skeletal muscle.  
*Febs letters*, 1977, 79 - 2, 248-252

ESSEN-GUSTAVSSON (B.), LINDHOLM (A.), MacMIKEN (D.), PERSSON (S.G.B.) and THORNTON (J.) - Skeletal muscle characteristics of young Standardbreds in relation to growth and early training.  
*Equine exercise physiology*, 1982, 200-210

KAI (M.) - Distribution of fiber types in equine middle gluteal muscle.  
*Bull. Equine Res. Inst*, 1984, 21, 46-50

HANTAI (D.), LABAT-ROBERT (J.), GRIMAUD (J.A.), FARDEAU (M.) - Fibronectine, laminin, type I, III and IV collagens in Duchenne's muscular dystrophy, congenital muscular dystrophies and congenital myopathies : an immunocytochemical study.  
*Int. Rev. Connective Tissue Res.*, 1985, 13, 273-281

HODGSON (D.R.), ROSE (R.J.) and ALLEN (J.R.) - Muscle glycogen depletion and repletion patterns in horses performing various distances of endurance exercise.  
*Equine exercise physiology*, 1982, 229-236

LINDHOLM (A.), ESSEN-GUSTAVSSON (B.), MacMIKEN (D.), PERSSON (S.) and THORNTON (J.R.) - Muscle histochemistry and biochemistry of Thoroughbred horses during growth and training.  
*Equine exercise physiology*, 1982, 211-217

MOUTHON (G.), ARDILLER (B.), ROCHE-FONDEUR (S.), COLIN (M.) - Exploration des capacités et de la résistance à l'effort chez le cheval par examen histochimique et morphométrique de biopsies musculaires.  
*Le CHEVAL*, I.N.R.A., 1981, 447-461

MOUTHON (G.), ARDILLER (B.), MICHAUX (J.M.), ROCHE-FONDEUR (S.), GIRARD (P.) - Biochimie de la résistance à l'effort musculaire chez le cheval.  
*C.E.R.F.O.P.A.*, 1981, 92-103

MOUTHON (G.), MICHAUX (J.M.), ARDILLER (B.), ROCHE-FONDEUR (S.), COLIN (M.), HERVY (Y.) - L'exploration biochimique histométrique du tissu musculaire du cheval : application à l'aptitude à l'effort.  
*Sci. Vet. Med. Comp.*, 1983, 85 - 4-5, 179-182

MOUTHON (G.), LEVEQUE (P.), MESTIRI (A.), COLIN (M.), ROCHE-FONDEUR (S.), ROMDHANE (N.) - Essai de mise en évidence chez le cheval des effets du trophobolène par histoenzymologie du tissu musculaire et analyse d'image.  
*C.E.R.F.O.P.A.*, 1985, 145-147