

## La microbiopsie musculaire : un nouvel outil pour le suivi sportif et la détection précoce des dysfonctions musculaires

Par :

▪ D.-M. Votion<sup>1</sup>, A. Fraipont<sup>2</sup>, C. Robert<sup>3</sup>, C. Leleu<sup>4</sup>, A. Courouce-Malblanc<sup>5</sup>, E. van Erck<sup>2,6</sup>, A.G. Goachet<sup>7</sup>, A. Niesten<sup>8</sup>, A. Mouithys-Mickalad<sup>8</sup>, J. Ceusters<sup>8</sup>, T. Franck<sup>8</sup>, G. de la Rebière de Pouyade<sup>8</sup>, C. Sandersen<sup>9</sup>, JP. Lejeune<sup>1</sup>, D. Serteyn<sup>8,9</sup>

▪ <sup>1</sup>Centre Européen du Cheval de Mont-le-Soie, Université de Liège, Belgique ;  
<sup>2</sup>Centre de Médecine sportive, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique ;

<sup>3</sup>Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, France ;

<sup>4</sup>EQUI-TEST, Courtison, Villiers Charlemagne, France ;

<sup>5</sup>Unité de Nutrition et Endocrinologie, ENVN, Atlanpôle, France ; <sup>6</sup>Centre d'Imagerie et de Recherche sur les Affections locomotrices équine (CIRALE), France ;

<sup>7</sup>Etablissement national d'Enseignement supérieur agronomique de Dijon (ENESAD), France ;

<sup>8</sup>Centre de l'Oxygène, Recherche et Développement, Université de Liège, Belgique ;

<sup>9</sup>Clinique équine, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique.

### Résumé

L'objectif de cette étude était de confirmer l'intérêt pratique de la respirométrie à haute résolution (RHR) appliquée aux microbiopsies pour définir le niveau d'entraînement d'un cheval et sa capacité athlétique ainsi que pour la détection précoce de dysfonctions musculaires. Matériel et méthodes – La respiration mitochondriale musculaire a été déterminée par RHR chez 20 chevaux d'endurance et 10 trotteurs prélevés au niveau du *triceps brachii* à différentes étapes de leur entraînement. Résultats – L'entraînement augmente la respiration mitochondriale ; en outre, les meilleurs performers avaient les plus hauts taux de respiration. Un trotteur avait des niveaux de respiration mitochondriale musculaire anormalement bas pour son niveau d'entraînement. Ce cheval a présenté plusieurs épisodes de rhabdomyolyse au cours de sa saison de course. Discussion – La microbiopsie est aisément réalisable dans des conditions de terrains. Cette étude montre que la capacité athlétique des chevaux est étroitement liée à la respiration musculaire et suggère le caractère prédictif des performances sportives de la RHR. En outre, la RHR a la capacité de mettre en évidence des dysfonctions mitochondriales potentiellement responsables de myopathies associées à l'exercice.

**Mots clés : performance, muscle, microbiopsie, mitochondrie**

### Summary

The objective of this study was to confirm the practical value of high-resolution respirometry (HRR) applied to biopsies to determine, in horses, the level of training, their athletic ability and for the early detection of muscular dysfunction. Materials and methods – The muscle mitochondrial respiration was determined by HRR in 20 endurance horses and 10 trotters sampled at the triceps brachii at different stages of their training. Results – Training increases mitochondrial respiration, in addition, the best performers had the highest rate of respiration. A trotter had abnormally low levels of muscle mitochondrial respiration for its level of training. This horse has presented several episodes of rhabdomyolysis during its racing season. Discussion – The biopsy is easily achievable by the attending veterinarian. This study shows that the athletic ability of horses is closely linked to respiratory muscle function, and suggests the value of HRR for performance prediction. In addition, the RHR has the ability to demonstrate mitochondrial dysfunction potentially responsible for exercise-induced rhabdomyolysis.

**Key-words: performance, muscle, microbiopsy, mitochondria**

## Introduction

La performance sportive nécessite un système musculaire intègre et parfaitement adapté aux différentes disciplines équestres. Pour tout effort réalisé, la contraction musculaire nécessite de l'énergie apportée par la dégradation d'une molécule particulière, l'adénosine triphosphate (ATP). Pour qu'un effort physique perdure, l'ATP doit être constamment reconstituée à partir de substrats dits « énergétiques » (Votion *et al.*, 2007). Ces substrats sont de différentes natures (carbohydrates, lipides, ...). En condition aérobie, ils vont être dégradés au sein de la cellule musculaire en fournissant des intermédiaires permettant la production d'ATP au niveau de la mitochondrie (une organelle contenue en grande quantité dans les muscles). La synthèse d'ATP via la « respiration » mitochondriale est la voie métabolique la plus efficace pour régénérer l'ATP. Quel que soit le type d'effort réalisé (course de vitesse ou d'endurance, saut d'obstacles, dressage, ...), la production d'énergie via la respiration mitochondriale est essentielle. L'incapacité à produire de l'ATP en suffisance au cours d'un effort génère de la fatigue voire des myopathies (Testa *et al.*, 2005).

Récemment, il a été démontré que la respiration mitochondriale du muscle équin pouvait être déterminée par respirométrie à haute résolution (RHR) à partir de microbiopsies (Votion *et al.*, 2009). Cette technique offre l'opportunité d'étudier la fonction mitochondriale *in situ* à partir d'une faible quantité de tissu (*i.e.* < 2 mg). La RHR mesure la consommation d'oxygène d'un échantillon ainsi que l'influence d'activateurs et d'inhibiteurs spécifiques sur différentes phases de la respiration mitochondriale. La capacité oxydative des muscles correspond à la capacité mitochondriale à assurer la synthèse d'ATP, via le système de transfert d'électrons (STE), en présence d'oxygène.

## 1. Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude était de confirmer l'intérêt pratique de la RHR appliquée aux microbiopsies pour définir le niveau d'entraînement d'un cheval, sa capacité athlétique ainsi que pour la détection précoce de dysfonctions musculaires. En outre, cette étude propose une méthodologie peu invasive pour le prélèvement et le conditionnement des échantillons musculaires par microbiopsie.

## 2. Sujets, matériel et méthodes

### 2.1. Chevaux

Vingt chevaux d'endurance (7 entraînés pour participer à des courses de 120 km [G1] et 13 chevaux de l'équipe de France d'endurance entraînés pour 160 km ; [G2]) et 10 trotteurs [G3] ont été prélevés par microbiopsie. Les chevaux du G1 ont été prélevés avant (G1A) et après (G1B) 10 semaines d'entraînement tandis que les chevaux du G2 et du G3 ont été prélevés après entraînement mais avant leur première course. Dix des 13 chevaux prélevés du G2 ont participé à une même course de 160 km (CEIO\*\*\* de Compiègne), 1 mois après la biopsie.

### 2.2. Prélèvements et conditionnement

Les chevaux ont été prélevés par microbiopsie ( $\pm 20$  mg de tissu obtenus par ponction) à 5 cm de profondeur à l'aide d'une aiguille 14G montée sur un pistolet Pro-Mag™ Ultra Biopsy Needles ; Angiotech, Danemark) au niveau du chef long du *triceps brachii* selon une technique récemment décrite (Votion *et al.*, *soumis pour publication*). Les échantillons ont été immédiatement transférés dans une solution de préservation (BIOPS) dans laquelle ils ont été conservés, à 4°C, jusqu'à leur préparation pour analyse.

### 2.3. Evaluation de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale a été mesurée par RHR à l'aide d'un oxymètre à haute résolution (Oxygraph-2k, Oroboros, Autriche). Brièvement, les microbiopsies ont été transférées dans une boîte de Pétri où les fibres musculaires ont été perméabilisées mécaniquement par dissection puis chimiquement avec de la saponine diluée dans du BIOPS (50  $\mu\text{g/ml}$ ) pendant 30 minutes. Ensuite, les fibres ont été rincées dans une solution permettant l'étude de la respiration mitochondriale (MiRO5), à 4°C, pendant 10 min. Les fibres musculaires, ainsi préparées, étaient placées dans les chambres de l'oxygraphe (2 mg/chambre) contenant 2 ml de MiRO5 maintenu à 37°C. De l'oxygène était ajouté dans les chambres afin d'atteindre une concentration de 500 nmol  $\text{O}_2/\text{ml}$ . La consommation de l'oxygène par l'échantillon, en fonction du temps, était mesurée grâce à un capteur connecté aux chambres fermées hermétiquement. Au cours de l'expérimentation, différents substrats ont été successivement ajoutés dans les chambres afin

de déterminer la consommation en oxygène en présence d'ADP. La respiration mitochondriale comprend différentes étapes au sein du STE. Dans le protocole utilisé, la respiration mitochondriale maximale (OXPHOS<sub>max</sub>) a été induite grâce à l'administration de substrats (*i.e.* malate, glutamate et succinate) permettant de reconstituer les différentes étapes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Dans ces conditions, de l'ATP est produite proportionnellement à la consommation en oxygène. Cette respiration mitochondriale maximale est limitée par un rétrocontrôle exercé par la phase finale de la respiration mitochondriale (*i.e.* la synthèse d'ATP). En inhibant ce rétrocontrôle (grâce à un inhibiteur spécifique ajouté dans les chambres à un moment précis du protocole), la capacité maximale du STE a été obtenue (V<sub>max</sub>). Le rapport entre OXPHOS<sub>max</sub> et V<sub>max</sub> (*P/E*) exprime la limitation exercée par l'étape produisant l'ATP sur l'OXPHOS (lorsque le *P/E* = 1, il n'y a aucune limitation).

## 2.4. Préservation des échantillon

Les chevaux ont été prélevés sur leur site d'hébergement (en France) tandis que les échantillons ont été analysés dans un laboratoire situé en Belgique. Les échantillons ont été traités dans un délai variant de 1 à 3 jours.

Lorsqu'une mitochondrie est altérée, sa membrane externe devient perméable ce qui permet la fuite de différents constituants inclus dans l'espace intermembranaire mitochondrial (la paroi mitochondriale est formée de deux membranes) dont le cytochrome *c*. Au cours du protocole de mesure de la respiration mitochondriale par RHR, la préservation des échantillons a été testée en ajoutant du cytochrome *c* réduit dans le milieu. Lorsque la membrane est préservée, le cytochrome *c* ajouté reste en dehors de la mitochondrie et n'influence pas la respiration. Dans le cas contraire, il pénètre dans l'espace intermembranaire où il active la respiration (augmentation de la respiration > 15%).

## 2.5. Analyses statistiques

La comparaison des OXPHOS<sub>max</sub> et V<sub>max</sub> avant et après entraînement au niveau du *triceps brachii* pour les chevaux du G1 a été déterminée à l'aide d'un test de *t* pour données appariées tandis que la comparaison entre groupes a été effectuée à l'aide d'un test de *t* pour données non appariées. Une valeur de *p* < 0,05 était considérée comme significative.

## 3. Résultats

Les résultats sont exprimés en moyennes ± SD et sont repris dans le tableau 1. Après ajout de cytochrome *c*, la respiration n'a pas été significativement augmentée. Avant entraînement, l'OXPHOS<sub>max</sub> et la V<sub>max</sub> étaient, respectivement, de 98±32 et de 108±30 pmol.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> pour les chevaux du G1. L'entraînement a augmenté l'OXPHOS<sub>max</sub> et la V<sub>max</sub> de 36% (*p* < 0,02). Le *P/E* n'était pas modifié par l'entraînement. Ces deux paramètres (après entraînement) n'étaient pas significativement différents de ceux du G2. Néanmoins, lorsque le G2 était subdivisé sur base des résultats de la course de 160 km (en isolant, parmi les chevaux qualifiés, les 5 chevaux les plus rapides [G2A] des 4 autres [G2B] ; (NB : un cheval a été disqualifié)), une différence significative était observée : les chevaux du G2A avaient un OXPHOS<sub>max</sub> (+29% ; *p* < 0,02) et une V<sub>max</sub> plus élevés (+25% ; *p* < 0,005) que les chevaux du G1B. Au sein du G2, les chevaux du G2A avaient un OXPHOS<sub>max</sub> (+49% ; *p* < 0,005), une V<sub>max</sub> (+33% ; *p* < 0,005) plus élevé que ceux du G2B et un *P/E* ratio de 0,92 vs. 0,83 ; *non significatif*)).

Parmi les chevaux du G3, les plus faibles valeurs d'OXPHOS<sub>max</sub> et de V<sub>max</sub> ont été observées chez un trotteur qui a présenté plusieurs épisodes de rhabdomyolyse (G3<sub>Rhab</sub>) induits par l'exercice au cours de la période de course qui a suivi le prélèvement. Les valeurs les plus élevées ont quant à elles été observées chez les meilleurs performers.

## 4. Discussion

La microbiopsie a été bien tolérée par tous les chevaux ; elle n'a nécessité aucune contention particulière lorsque la peau était désensibilisée après anesthésie locale. Dans le cas contraire (*e.g.* les prélèvements ont été réalisés sans anesthésie locale chez les trotteurs), la pose d'un tord-nez a parfois été requise. Ces différentes études ont montré que la microbiopsie est une technique de prélèvement musculaire aisément réalisable dans des conditions de terrains par les vétérinaires traitants. En effet, des kits de prélèvements (BiopTis, Belgique) contenant des aiguilles à microbiopsie à utilisation unique et du BIOPS sont commercialement disponibles. L'absence d'effets secondaires (vérifiée lors des prélèvements réalisés sur le G1) a permis de considérer cette technique sur des chevaux de haut niveau, en compétition (G2 et G3).

Tableau 1 – Respiration mitochondriale maximale (OXPHOS<sub>max</sub>), capacité maximale du système de transport des électrons (V<sub>max</sub>) et leur rapport (P/E)  
*Maximal mitochondrial respiration (OXPHOS<sub>max</sub>) and maximal capacity of the electron transport system (V<sub>max</sub>) and their ratio (P/E)*

Groupes	n	OXPHOS <sub>max</sub>	V <sub>max</sub>	P/E
<b>G1A</b>	<b>7</b>	<b>98</b>	<b>108</b>	<b>0,90</b>
SD		32	30	0,07
<b>G1B</b>	<b>7</b>	<b>133*</b>	<b>148*</b>	<b>0,90</b>
SD		16	15	0,03
<b>G2</b>	<b>13</b>	<b>136</b>	<b>156</b>	<b>0,86</b>
SD		36	29	0,09
<b>G2A</b>	<b>5</b>	<b>171<sup>¥</sup></b>	<b>185<sup>¥¥</sup></b>	<b>0,92</b>
SD		30	21	0,09
<b>G2B</b>	<b>4</b>	<b>115<sup>†</sup></b>	<b>139<sup>†</sup></b>	<b>0,83</b>
SD		9	13	0,06
<b>G3</b>	<b>10</b>	<b>123</b>	<b>146</b>	<b>0,84</b>
SD		22	21	0,10
<b>G3<sub>Rhabd</sub></b>	<b>1</b>	<b>81</b>	<b>119</b>	<b>0,68</b>

**Légende :** G1A : groupe 1 avant entraînement ; G1B : groupe 1 après entraînement (entraînés pour 120 km) ; G2 : chevaux de l'équipe nationale française d'endurance (entraînés pour 160 km) ; G2A : les 5 meilleurs chevaux de l'équipe de France selon leur résultat lors des qualifications au CEIO\*\*\* de Compiègne ; G2B : les 4 autres chevaux de l'équipe de France qualifiés au CEIO\*\*\* de Compiègne ; G3 : trotteurs ; G3<sub>Rhabd</sub> : trotteur ayant présenté divers épisodes de rhabdomyolyses induites par l'exercice  
 (\*) : significativement différent de G1A ( $p < 0,02$ ) ; (¥) : significativement différent de G1B ( $p < 0,02$ ) ; ¥¥ : significativement différent de G1B ( $p < 0,005$ ) ; (†) : significativement différent de G1B ( $p < 0,005$ )

**Legend:** G1A: group 1 before training; G1B: group 1 after training (trained for 120 km) G2: horses of the French national team endurance (trained for 160 km); G2A: the 5 best horses of the national endurance team of France according to their results in qualifying at CEIO \*\*\* Compiègne; G2B: the other 4 horses of the national endurance team of France qualified at the CEIO \*\*\* of Compiègne; G3: trotters; G3<sub>Rhabd</sub>: trotter who presented several episodes of rhabdomyolysis induced by exercise (\*) : significantly different from G1A ( $p < 0,02$ ); (¥): significantly different from G1B ( $p < 0,02$ ); ¥¥: significantly different from G1B ( $p < 0,005$ ); (†): significantly different from G1B ( $p < 0,005$ )

Cette étude montre que la capacité athlétique des chevaux est étroitement liée à la respiration musculaire, *i.e.* les meilleurs performers avaient les plus hautes respirations mitochondriales. En outre, le P/E ratio était plus élevé (*i.e.* la respiration maximale approche la capacité maximale du STE). Ces résultats suggèrent une valeur prédictive des performances sportives à partir de la mesure de la respiration mitochondriale par RHR. Néanmoins, le suivi de l'effet de l'entraînement sur le G1 et le suivi de la respiration mitochondriale au cours de la saison des chevaux du G2 et du G3 (*données non montrées*) indiquent que les niveaux de respiration individuels ne sont pas fixes : ils sont étroitement liés au degré d'entraînement celui-ci pouvant augmenter certaines étapes de la respiration mitochondriale de plus de 60%.

Le lien apparent entre une basse respiration et les épisodes de myopathie (postérieurs au prélèvement) associés à l'exercice montre que la RHR pourrait être utilisée pour la détection précoce des dysfonctions mitochondriales potentiellement responsables de myopathies associées à l'exercice.

## Conclusions et perspectives

Moyennant un conditionnement adapté des échantillons (milieu spécial et température contrôlée), la respiration mitochondriale peut être déterminée par un laboratoire spécialisé afin de contrôler le niveau d'entraînement et de détecter précocement toute dysfonction mitochondriale qui pourrait réduire les performances sportives voire induire des myopathies.

## Remerciements

Les auteurs remercient les cavaliers et les propriétaires des chevaux de l'Equipe de France ainsi que les propriétaires des trotteurs qui ont accepté que des prélèvements soient réalisés sur leurs chevaux. Cette étude a été subventionnée par le COST (Comité d'Orientation Scientifique et Technique) des Haras nationaux (France). Les auteurs remercient également le « Ministère de l'Agriculture et de la Ruralité de la Région wallonne » (Belgique) pour leur soutien financier.

## Bibliographie

Testa, M., Navazio, F.M., Neugebauer, J., 2005. Recognition, diagnosis, and treatment of mitochondrial myopathies in endurance athletes. *Current Sports Medicine Reports* 4, 282-287.

Votion, D.M., Navet, R., Lacombe, V.A., Sluse, F., Esseén-Gustavsson, B., Hinchcliff, K.W., Rivero, J.L.L., Serteyn, D., Valberg, S.J., 2007. Muscle energetics in exercising horses. *Equine and Comparative Exercise Physiology* 4, 105-118.

Votion, D., Fraipont, A., Franck, T., Goachet, A.G., Julliand, V., Mouihys-Mickalad, A., Robert, C., Van Erck, E., Serteyn, D., 2009. Effet de l'entraînement sur la fonction mitochondriale musculaire du cheval d'endurance. In *Proceedings: 35<sup>ème</sup> journée d'étude des Haras nationaux*, Paris, France, février, pp 113-121.

Votion, D.-M., Gnaiger, E., Lemieux, H., Mouihys-Mickalad, A., Serteyn, D. Qualitative and quantitative assessment of the equine muscle mitochondrial function with high-resolution respirometry. *Soumis pour publication*.