

1334

9ème JOURNÉE D'ÉTUDE



9 mars 1983

124

EXPLORATION BIOCHIMIQUE ET MORPHOLOGIQUE DU TISSU MUSCULAIRE DU CHEVAL. APPLICATION À L'APTITUDE À L'EFFORT

Par G. MOUTHON,* J.M. MICHAUX,
B. ARDILLIER, M. LAUZE,
S. ROCHE-FONDEUR

* Service de Physique et Chimie
Biologiques et Médicales de
l'École Nationale Vétérinaire
d'Alfort

7, Av. du Gal de Gaulle
94700 MAISONS ALFORT

RESUME

L'exploration directe du tissu musculaire du cheval à partir de biopsies non traumatisantes est possible après analyse des images histo-enzymologiques par les techniques de microscopie quantitative et de morphométrie. La composition relative en fibres des types I et II et la surface de ces fibres apportent des informations sur l'adaptation à l'effort et sur l'effet de l'entraînement. L'influence de différents facteurs, en particulier génétiques, peut être facilement étudiée.

MOTS CLES

Tissu musculaire - biopsie - microscopie quantitative - fibres musculaires -

ABSTRACT

The direct exploration of horse muscular tissue from non traumatising biopsies is possible after analysis of histo-enzymologic image by technics of quantitative microscopy and of morphometry. The composition relative in fibers of types I and II and the surface of these fibers bring information on the adaptation to the effort and to effect of the training. The influence of different factors, in particular genetics, can be easily studied.

1334

RAPPEL SUR LA CONSTITUTION DU MUSCLE SQUELETTIQUE

Le muscle squelettique est formé de fibres, cellules multinuclées très longues limitées par une membrane plasmique ou sarcolemne, et par des éléments contractiles, les myofibrilles, disposées en groupes parallèles. Ces dernières sont entourées et noyées par le sarcoplasme, liquide intracellulaire du muscle qui contient du glycogène, les enzymes glycolytiques, la phosphocréatine, l'A.T.P., l'A.D.P. et l'A.M.P., des phosphates, des électrolytes inorganiques et des acides aminés en grand nombre.

Le réticulum endoplasmique appelé réticulum sarcoplasmique, est très différencié et son rôle est important dans les échanges nutritifs respiratoires.

Les myofibrilles sont minces et allongées. Elles sont striées transversalement tous les 2,5 μ environ par des unités structurales et sur toute leur longueur.

La cellule musculaire est capable de s'adapter aux différentes circonstances physiologiques en modifiant :

- sa longueur : la rétraction d'un muscle pendant une longue durée peut diminuer la taille des sarcomères,

- son diamètre : celui-ci peut augmenter en fonction de l'exercice physique et de l'âge, accompagné parfois d'une augmentation du nombre de myofibrilles.

La fibre musculaire est constituée de deux types de filaments qui sont des protéines très étirées :

- les filaments épais, constitués d'un ensemble de molécules de myosine disposées parallèlement. Cette myosine a deux propriétés biochimiques importantes : elle peut former des complexes avec l'actine et elle a une activité ATP asique élevée ;

- les filaments fins, contenant principalement l'actine.

Le déplacement des filaments épais et des filaments fins est permis par les propriétés de la myosine qui se combine avec l'actine (complexes actomyosine) puis par une mobilisation de ces filaments les uns par rapport aux autres avec transformation d'énergie chimique (l'ATP) en énergie mécanique.

La myosine est donc une ATPase.

Si la quantité d'ATP disponible est trop faible, les complexes actomyosine ne se rompent pas, la rupture nécessitant également de l'ATP. Ceci peut alors expliquer des ruptures fibrillaires au niveau de certaines stries aboutissant à la Dégénérescence Cirreuse de Zenker.

L'activité ATPasique de la myosine varie selon les fibres et entraîne des propriétés contractiles différentes :

- les fibres I ont une activité ATPasique faible et une vitesse de contraction lente. Leur métabolisme est surtout aérobie. Contenant beaucoup de mitochondries et de myoglobine, elles sont rouges on les appelle aussi ST (Slow twitch) ou R.

- les fibres II ont une forte activité ATPasique et une vitesse de contraction élevée. On peut les subdiviser en deux catégories :

- * les fibres II_a aussi nommées fibres intermédiaires car leur pouvoir oxydatif est élevé, (fibres F.T.H. , fast twitch high oxydative) ou R (= rapide, R = red) ;

- * les fibres II_b, pauvres en mitochondries qui sont de petite taille, à métabolisme anaérobie dominant (fibres F.T. = fast twitch). Ces fibres sont plus claires d'où leur appellation W (= rapide, W = white).

L'étude de la répartition de ces fibres est de toute première importance pour révéler les capacités particulières d'un muscle à tel ou tel type de contraction ou d'effort.

Ainsi, un effort violent, bref, de courte durée fera surtout appel aux fibres de type II en particulier II_b à métabolisme anaérobie. A l'inverse un effort de longue durée nécessitera un métabolisme aérobie et des contractions moins rapides : il fera surtout appel aux fibres de type I.

Les muscles de stature, qui doivent maintenir une tension souvent prolongée et non créer un mouvement ont une majorité de fibres "lentes".

Les muscles de mouvement auront par contre une majorité de fibres "rapides".

La proportion et la taille des différentes fibres revêt alors une importance considérable. La proportion varie d'un muscle à l'autre, et à l'intérieur d'un même muscle, des variations existent sur les extrémités ou à la périphérie.

Mais pour un même muscle, en zone profonde, elle est stable.

En revanche, la proportion et la taille des fibres sont susceptibles de varier sous l'influence de différents effecteurs et peuvent être reliés à la génétique, à l'âge, à l'alimentation, à l'entraînement, à des stimuli nerveux.

Grâce à cette composition en mosaïque des différents types de fibres, les muscles squelettiques peuvent répondre à des mobilisations variées.

L'augmentation de la proportion d'un type de fibres dans certains muscles peut favoriser la réalisation d'un type d'effort.

Chez l'homme, les meilleurs "sprinters" possèdent un haut pourcentage de fibres II dans les muscles directement impliqués dans le mouvement. La force maximale et la vitesse de raccourcissement sont directement reliées aussi bien au pourcentage qu'à la surface de ces fibres. Inversement, les meilleurs coureurs de fond, cyclistes, marathoniens ont un pourcentage plus élevé de fibres de type I.

La répartition des fibres est en partie dépendant de l'innervation comme l'a montré HOWALD. En effet, par stimulation continue d'un muscle à basse fréquence (10 impulsions par seconde pendant 10 semaines), on peut transformer pratiquement des fibres de type II en type I avec d'ailleurs augmentation de la densité capillaire, de l'activité oxydative, et une diminution de l'activité ATPasique de la myosine. Inversement, la stimulation à haute fréquence (40 impulsions par seconde) n'entraîne des transformations du type I en type II que si la stimulation basse fréquence due au nerf est supprimée.

Un bon coureur de longue distance ne sera jamais un bon "sprinter" alors que l'endurance d'un sprinter peut être plus facilement développée avec un entraînement approprié.

Il en ressort qu'en fait la proportion des fibres I et des fibres II doit être un bon témoin du patrimoine génétique chez l'individu jeune, permettant d'entrevoir des potentialités à tel ou tel type d'effort.

REALISATION ET TRAITEMENT HISTOENZYMOLOGIQUE DES BIOPSIES

1. PRELEVEMENT MUSCULAIRE ET SA CONSERVATION

Après anesthésie locale avec 2 ml de Xylocaïne à 2%, des trocarts de faible diamètre (2,1 mm) sont plongés dans le chef long postérieur du Triceps Brachial. Ce muscle a été choisi en raison de son intervention importante dans l'effort et aussi de la facilité du prélèvement. Le lieu d'élection de la biopsie est à un travers de mains au-dessus de la pointe du coude, au milieu de l'épaisseur du muscle.

Le prélèvement recueilli est de l'ordre de 20 mg et contient entre 50 et 120 fibres.

La biopsie n'est suivie d'aucun trouble : certains chevaux ont subi jusqu'à dix biopsies en deux jours sans en être affectés. Dans quelques cas, on a pu remarquer quatre à cinq heures après le prélèvement de plusieurs biopsies simultanées, une légère raideur du membre qui n'a jamais duré plus d'une dizaine d'heures.

La biopsie est ensuite collée sur un fragment de liège. cette phase nécessite une grande dextérité pour que le sens des fibres soit rigoureusement conservé. La biopsie et son support sont alors congelés pendant vingt secondes dans l'isopentane à -160°C puis placés dans un tube cryogénique et plongés dans l'azote liquide (-196°C).

2. LE TRAITEMENT HISTOENZYMOLOGIQUE

Des coupes sériées des biopsies sont réalisées au cryotome à congélation, perpendiculairement aux fibres, avec une épaisseur de 8 μ .

L'activité de l'ATPase myofibrillaire est mesurée par la transformation de l'ATP mis comme substrat en ADP avec libération d'acide phosphorique qui est transformé en phosphate de Calcium puis en phosphate de Cobalt, qui en présence de sulfure d'ammonium donne du sulfure de cobalt noir.

Les coupes sont préincubées à deux pH différents (9,4 et 4,35), puis incubées à pH 9,4 :

- L'activité ATPasique après une préincubation à pH 9,4 permet de différencier les fibres I à activité faible et qui apparaîtront claires et les fibres II qui au contraire seront sombres, ayant une forte activité,

- L'activité ATPasique après une préincubation à pH 4,35 est inversée : les fibres I ont une activité forte à ce pH alors que celle des fibres II est faible.

Nous nous sommes limités à étudier les ATPases à ces deux pH et à différencier les fibres I et II. Il était beaucoup plus aléatoire d'identifier les fibres II_a et II_b car le pH de préincubation permettant la séparation des trois types de fibres varie en fonction de l'animal et du muscle. Il faudrait faire une préincubation toutes les 0,05 unités pH entre 4,1 et 4,7 pour séparer les trois populations de fibres. Les données de HORWALD montre d'ailleurs que les fibres II_a et II_b varient de façon voisine sous l'influence d'un certain nombre d'effecteurs en particulier l'entraînement.

L'activité succino-déshydrogénase est mesurée par la fixation sur le bleu de nitrotétrazolium des atomes d'hydrogènes libérés au cours de la transformation de l'acide succinique donné comme substrat, en acide fumarique.

Les fibres I, à métabolisme oxydatif important, sont très colorées alors que les fibres II apparaissent plus pâles.

3. REALISATION DE LA MORPHOMETRIE ET DE LA MICROSCOPIE QUANTITATIVE

L'appareil utilisé est l'analyseur de texture T.A.S. LEITZ adapté sur un microscope orthoplan dont le faisceau lumineux est soit une lumière blanche, soit une radiation monochromatique.

L'image est filmée par une caméra de télévision donnant un signal analogique vidéo fréquence constituant une "fonction de gris" dans laquelle chaque point du champ est associé à une intensité lumineuse. Tout se passe comme si l'image était remplacée par une trame de points qui est ensuite traitée par ordinateur.

L'analyse d'image effectuée consiste en l'établissement :

- d'un histogramme de "transmittances" (moyennes des densités optiques) permettant de révéler les différentes populations des fibres et leur pourcentage.

- d'histogramme de répartition des surfaces pour l'ensemble des fibres comme pour chacun de leurs types.

RESULTATS OBTENUS

Bien que l'étude n'ait porté que sur 10 chevaux de concours complet et 8 chevaux de course, un certain nombre de résultats significatifs ont été observés.

- chez les chevaux observés avant l'entraînement, :

La moyenne des surfaces des fibres II est supérieure à celle des fibres I. Elles varient beaucoup d'un animal à l'autre :

- * Les répartitions en pourcentage des fibres I et II sont différentes d'un groupe de chevaux à l'autre. Chez les meilleurs chevaux de concours complet (épreuve de vitesse et d'endurance), le pourcentage de fibre II est élevé.

Ce pourcentage est encore plus élevé chez les chevaux de course.

- chez les chevaux à l'entraînement :

L'entraînement n'a pas modifié la répartition des fibres des deux types mais il est connu qu'un entraînement intensif et prolongé sur plusieurs années peut tout de même modifier la répartition.

Il augmente l'homogénéité des moyennes de surface des fibres aussi bien du type I que du type II et ce d'autant plus que les performances sont meilleures.

Les surfaces des fibres à métabolisme oxydatif sont supérieures chez les chevaux de concours complet à celles des chevaux de course.

L'entraînement augmente le pourcentage des fibres aérobies chez les chevaux de concours complet - d'autant plus d'ailleurs que le cheval est meilleur - alors qu'il le diminue chez les chevaux de course.

CONCLUSION

L'exploration biochimique et morphométrique du tissu musculaire du cheval à partir de biopsies est possible par histoenzymologie et analyse d'image. Elle permet une investigation des capacités musculaires à l'effort et peut être une certaine appréciation du génotype.

Il semble que la prédisposition à un type d'effort puisse être connue précocement. D'autre part, l'efficacité de l'entraînement peut être objectivée facilement par cette méthode qui maintenant est au point.

* * *

BIBLIOGRAPHIE

BROOKE M.H. et KAISER K.K.

Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase

J. Histochem. Cytochem.
1969, 17, 431, 432.

ESSEN B., LINDHOLM A. et THORNTON I.

Histochemical properties of muscle fibre types and enzyme activities in skeletal muscles of standard bred trotters of different ages.

Equine Veterinary Journal.
1980, 12, 4, 175, 180.

FARDEAU M.

Caractéristiques cytochimiques et ultrastructurales des différents types de fibres musculaires squelettiques extrafusales.

Annales d'anatomie pathologique.
1973, 18 (1) 7, 34.

HOWALD H.

Training-induced morphological and functional changes in skeletal muscle.

Int. J. Sports Med. 3, 1982, 1-12

LORRAIN E.

Mise au point d'un trocart simplifiant la biopsie musculaire chez le cheval de course.

Thèse Doc. Vet. E.N.V.L. 1978

MOUTHON G., LORRAIN E., COURSAT F.

Mise au point d'un trocart permettant la biopsie musculaire sans anesthésie chez le cheval de course.

Bull. Soc. Sci. Vet. et Med. comparée
LYON 1979, 81. n°3. 171.176

STAUB R., HOWALD H., HOPPELER H.

Recherches de base sur les muscles du cheval et application pratique
Médecine et Sports Equestres.

1er congrès européen
3ème congrès international
Saumur 18, 19, 20 sept. 1981