



Pratique de l'exploration de la typologie musculaire chez le cheval par une méthode ELISA

Practice of the exploration of the fiber typing in horses by an Elisa method

Par, Valette J.P.^(*)
Barrey E.^(**)
Jouglin Maggy^(*)

()INRA, Ecole nationale vétérinaire - Unité de nutrition*

94704 Maisons-Alfort

*(**)INRA, SGQA, Unité Cheval - 78352 Jouy en Josas*

Résumé

Les biopsies musculaires sont obtenues par une technique peu traumatique au moyen d'aiguilles de petit diamètre (2 mm). Des échantillons de muscle de 10 à 100 mg sont prélevés à une profondeur de 5 à 8 cm. Le dosage par une méthode ELISA permet de déterminer la proportion de myosine lente (MHC 1, fibres de type 1) et d'étudier ainsi le rapport fibres lentes/fibres rapides du cheval. Par rapport aux méthodes histologiques, cette technique permet de travailler, rapidement, sur un échantillon plus représentatif (600 fois plus de muscle). Cette première étude montre la variabilité inter-musculaire. Les avantages par rapport aux méthodes histologiques sont nombreux : dosage sur des micro-prélèvements, simplicité, productivité et faible coût du dosage.

Mots-clés : Cheval, Biopsie, Typologie musculaire, Myosine lente, ELISA.

Summary

Muscular samples were obtained in horses by using a 2 mm human biopsy needle. Type I fibers were characterized in muscle by an ELISA method. Results showed the differences between the muscles. It is concluded that the biopsy technique caused no lesion to the horses and that the ELISA allowed the accurate measurement of a wide range of type I content in equine muscles. This technique is less time consuming and offers new applications for muscle fiber typing.

Key-words : Horse, Biopsy, Fiber typing, Myosin heavy chain, ELISA.

L'aptitude physique du cheval athlète dépend en partie de la nature des fibres musculaires qui composent les principaux muscles locomoteurs. Pour assurer leur fonctionnement, les fibres musculaires sont dotées d'un métabolisme énergétique à prédominance aérobie ou anaérobie en fonction de leur appartenance aux différents types de fibres selon la nomenclature conventionnelle (Brooke et Kaiser, 1970) :

- les fibres I, riches en myosine lente, aérobies, sont capables de se contracter longtemps à force modérée et favorisent l'effort long, d'endurance
- les fibres II, riches en myosine rapide, développent des forces élevées pendant un temps limité et permettent d'effectuer un travail en puissance et en résistance. Elles sont soit aéro-anaérobies (IIA), soit anaérobies (IIB).

Les études de physiologie musculaire chez l'homme et les autres espèces sportives ont nécessité la mise au point de techniques de prélèvement (Bergstrom, 1962; Lindohlm et Piehl, 1974 ; Snow et Guy, 1976)).

L'échantillon musculaire prélevé au moyen d'une aiguille à biopsie peut servir à des analyses métaboliques (activités enzymatiques, glycogène) ou au typage des fibres musculaires par différentes techniques. On distingue 3 principales techniques de typage : l'histo-enzymologie, l'électrophorèse et l'immuno-enzymologie. Historiquement, les premiers travaux et la plupart des études actuelles ont recours à l'histo-enzymologie, qui a l'avantage de donner de nombreuses caractéristiques sur les fibres musculaires mais est très longue à mettre en oeuvre. Les deux autres techniques sont plus récentes et doivent se développer pour les études où seul le dosage des différents types de fibres est nécessaire.

Le but de cette article est de présenter l'application de la méthode immuno-enzymologique (ELISA) sur des muscles de chevaux.

I - TECHNIQUE DE LA BIOPSIE MUSCULAIRE

1. Muscles

Les muscles retenus dans cette étude pour leur intérêt dans la locomotion sont le triceps brachial, le fessier moyen (gluteus medius), le semi-tendineux. Ces muscles sont décrits dans la littérature comme des muscles rapides. Des muscles de référence à teneurs élevées en fibres lentes, le masseter, et, à un degré moindre le diaphragme et le fascia lata ainsi qu'un muscle réputé comme étant entièrement composé de fibres rapides, le cutané (cutaneus troncis) ont été prélevés sur un cheval euthanasié pour coliques. Le masseter actionne la mâchoire inférieure pour la mastication des aliments et le cutané agit vivement le pli du grasset pour chasser les insectes.

2 - Prélèvement par biopsie

Les biopsies musculaires sont obtenues au moyen d'aiguilles à biopsies de faible diamètre (2 mm) identiques à celles utilisées en médecine humaine (Trucut 2*152 mm, Baxter S.A.). Cette technique n'est guère plus traumatisante qu'une injection intramusculaire et permet de prélever en toute sécurité des échantillons de muscle de 10 à 100 mg à une profondeur de 5 à 8 cm.

Sur le cheval, on effectue d'abord un nettoyage antiseptique sur la zone préalablement tondue, puis, 10 mn après une anesthésie locale sous cutanée, on pratique une petite incision cutanée

de 0.5 cm, qui permet de piquer directement le muscle sans avoir à transpercer la peau qui est très sensible chez cet animal. La biopsie ainsi réalisée n'est pas douloureuse, la cicatrisation est rapide et le cheval peut retravailler sans risque une heure après.

L'échantillon musculaire est transféré dans un tube cryogénique, congelé dans l'azote liquide et conservé au congélateur à -80°C jusqu'aux analyses.

II - METHODE DE DOSAGE DE LA MYOSINE LENTE

Les chaînes lourdes des myosines lente et rapide ont des propriétés antigéniques distinctes qui ont permis de fabriquer des anticorps monoclonaux anti-myosine lente ou anti-myosine rapide chez les volailles (Winkelman et al., 1983). L'emploi de ces anticorps, en association avec différents procédés de marquage, permet d'effectuer des dosages quantitatifs. Le dosage ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) permet d'effectuer une analyse quantitative de la proportion de fibres lentes contenue dans une biopsie. L'emploi d'anticorps monoclonaux dirigés contre la myosine lente donne un dosage très sélectif.

La technique ELISA de dosage de la myosine lente, utilisée depuis peu chez les bovins (Picard et al., 1993) et applicable au cheval (Barrey et al., 1994), est une méthode dite à un site avec immunodétection directe avec deux anticorps (figure I, empruntée à Paraf et Peltre, 1992). L'anticorps anti-myosine lente est préparé à partir de sérum humain (Leger et al., 1985).

Les échantillons congelés sont broyés puis soumis à une extraction spécifique des protéines myofibrillaires. Un dosage du taux de protéines par la méthode de Bradford (1976) permet de diluer les extraits pour travailler à concentration constante.

Le pourcentage de myosine lente contenu dans un échantillon est calculé par rapport à une gamme étalon. Cet étalonnage qui associait, dans un premier temps, le masseter et le cutané de boeuf, combine actuellement le masseter de cheval et la BSA (bovine serum albumine) pour obtenir une gamme linéaire entre 0% (BSA seule) et 100% (masseter seul) de myosine lente.

Pour chaque échantillon de muscle, 2 extraits sont dosés en protéine et chaque extrait est soumis à 3 dosages ELISA.

III - EXEMPLES DE TYPOLOGIE MUSCULAIRE

Pour un même cheval, les variations inter-musculaires sont fonction de la spécificité des muscles. La figure II présente des résultats d'analyse de différents muscles. On distingue deux compositions extrêmes selon le rôle moteur du muscle. Le muscle de la joue (masseter) est constitué à 100% de fibres lentes tandis que le muscle peaucier du grasset (cutané) est constitué à 100% de fibres rapides. Les muscles locomoteurs ont des compositions intermédiaires entre ces deux extrêmes. Parmi ceux-ci, le semi-tendineux (semitendinosus) et le fessier moyen (gluteus medius) sont les plus riches en fibres rapides.

Par ailleurs nos travaux montrent la variabilité intra-musculaire et la répartition non homogène des fibres à l'intérieur de chaque muscle (Valette et al., 1994).

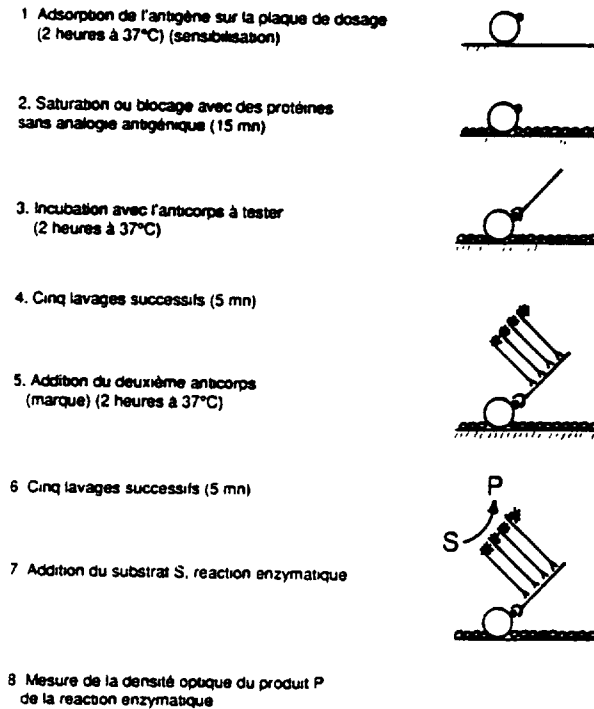
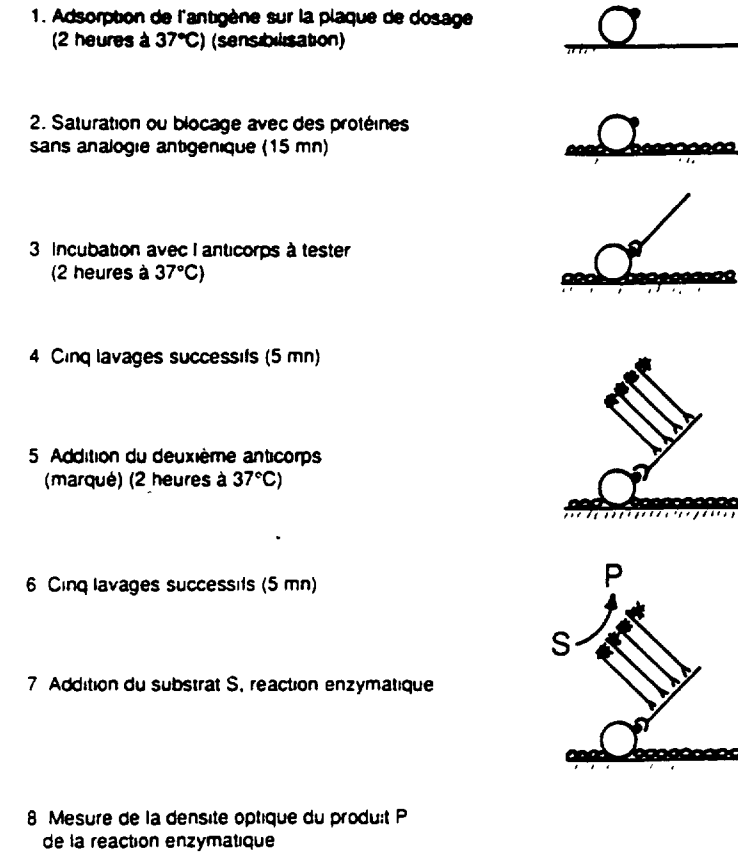


Figure I : Principe du dosage ELISA.
Principle of ELISA

Fig.II: Composition en fibres lentes (I)
de muscles équins dosés par ELISA

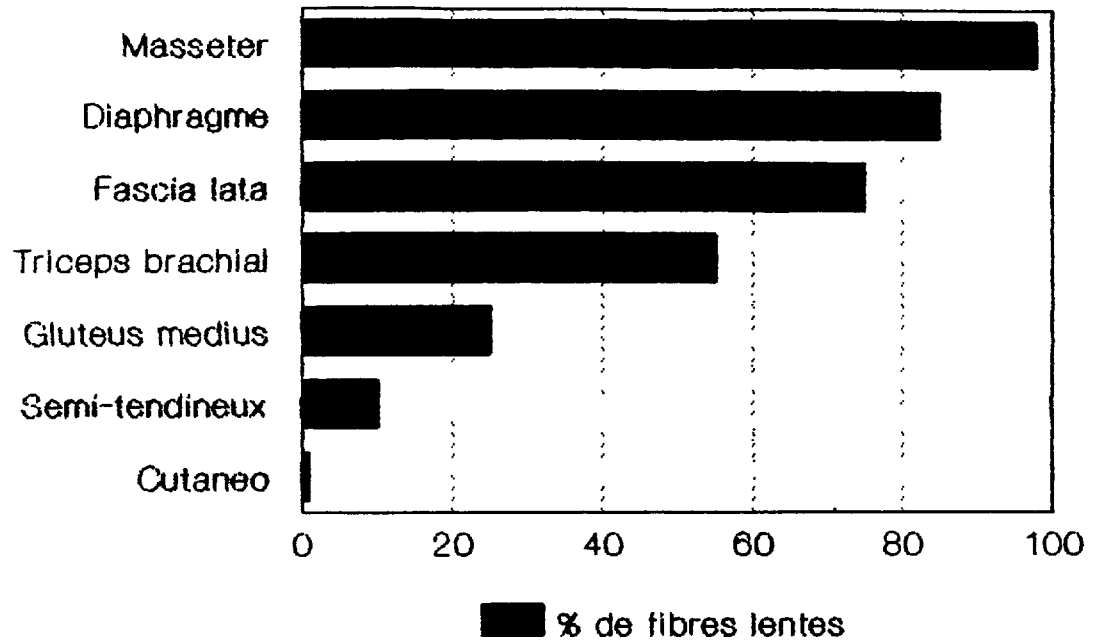
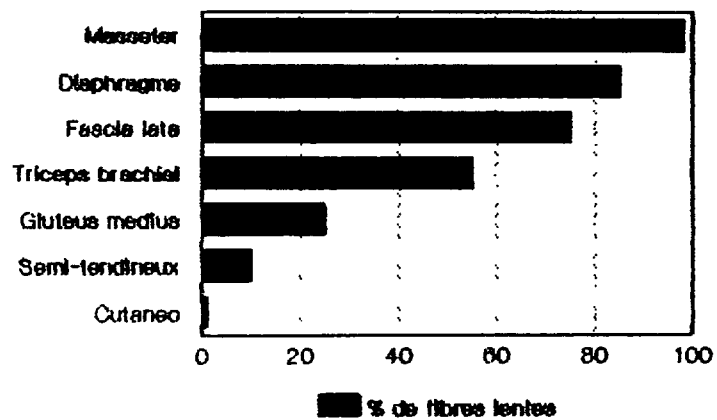


Figure II : Composition en fibres lentes (I) de muscles équins dosés par ELISA. Slow fibers (I) content in equine muscles obtained by ELISA.

Fig.II: Composition en fibres lentes (I)
de muscles équins dosés par ELISA



IV - INTERET PRATIQUE DE LA METHODE

La méthode ELISA pour le typage des fibres musculaires est moins informative que les techniques histologiques, car elle ne procure que le pourcentage de myosine lente sans information sur la distribution spatiale des fibres I, mais elle présente de nombreux avantages :

- 1 - le prélèvement par micro-biopsies n'entraîne aucune complication pour l'animal
- 2 - le dosage de la myosine n'implique pas le respect de l'orientation des fibres lors du prélèvement, ce qui limitait l'utilisation des biopsies (avec des aiguilles plus traumatisantes) destinées à l'histochimie
- 3 - la représentativité du dosage est meilleure puisque l'on travaille, malgré des prélèvements plus petits (10-100mg), sur une quantité de muscle très supérieure (multipliée par 600)
- 4 - le coût du dosage est moindre (40 F par analyse), compte tenu des investissements respectifs. De nombreux laboratoires sont équipés avec le matériel nécessaire destiné à des utilisations variées, essentiellement en sérologie
- 5 - la productivité de la technique permet de traiter 60 échantillons par semaine (400 analyses)
- 6 - l'affinité de l'anticorps choisi envers la myosine lente, l'extraction spécifique de la myosine et la procédure ELISA sont parfaitement contrôlées à chaque étape.

Le principe ELISA se prête bien aux analyses de grandes quantités d'échantillons et semble une méthode d'avenir, essentiellement en raison de son innocuité pour le cheval, de sa rapidité et de son coût économique, pour les analyses musculaires de routine en médecine du sport, comme analyse complémentaire des tests d'effort.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barrey E., Picard B., Geay Y., Valette J.P. (1994). Determination of the slow myosin heavy chain content in equine gluteus medius by an ELISA method. *Equine Vet. J.* (submitted).
- Barrey E. (1994). L'analyse de la typologie musculaire peut-elle constituer un critère de sélection ? CEREOPA (sous presse).
- Bergstrom J. (1975). Percutaneous needle biopsy of skeletal muscle in physiological and clinical research. *Scand. J.Clin. C Lab. Invest.*, 35, 609-616.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Brooke M.M., Kaiser K.K. (1970). Muscle fiber typing : how many and what kind ? *Arch. Neurol.*, 23, 369-379.

Leger J.O.C., Bouvagnet P., Pau B., Roncucci R., Leger J.J. (1985). Levels of ventricular myosin fragments in human sera after myocardial infraction determined with monoclonal antibody to myosin heavy chain. *Eur. J. Cell. Biol.*, 15, 422-429.

Lindohlm A, Piehl K. (1974). Fiber composition, enzyme activity and concentration of metabolites and electrolytes in muscles of Standardbred horses. *Acta Vet. Scand.*, 15, 287-309.

Paraf A., Peltre G. (1992). *Immuno-analyses pour l'agriculture et l'alimentation*. INRA Editions, Paris, 356 pages.

Picard B., Leger J.O.C., Robelin J. (1994). Quantitative determination of type I MHC in bovine muscle with anti-myosin monoclonal antibodies. *Meat Sci.* (in press).

Snow D.H., Guy P.S. (1976). Percutaneous needle biopsy in the horse. *Equine Vet. J.*, 8, 150-155.

Valette J.P., Barrey E., Jouglin M. (1994). Determination of slow myosin heavy chain content in various equine muscles by an ELISA method. *Proc. ICEEP 4*, 11-15th july, Brisbane, Australia.

Winkelman D.A., Lowey S., Press J.L. (1983). Monoclonal antibodies localize changes on myosin heavy chain isoenzymes during avian myogenesis. *Cell*, 34, 295-306.