

50376
1994
355

50376
1994
355

Université des Sciences et Technologies de LILLE I

THESE

présentée par

Corinne CORDONNIER

pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de LILLE I

en "Sciences de la Vie et de la Santé"

RELATION STRUCTURE-FONCTION DE FIBRES ISOLEES DE MUSCLES SQUELETTIQUES

Soutenue le 19 Décembre 1994 devant le jury composé de :

M. MARECHAL G.	Professeur, Université catholique de Louvain, Bruxelles (Belgique)	Rapporteur
Mme MOUNIER Y.	Professeur, Université de Lille I	Directeur
Mlle SPIK G.	Professeur, Université de Lille I	Examineur
M. SUAREZ-KURTZ G.	Professeur, Université de Rio de Janeiro (Brésil)	Examineur
M. VASSORT G.	Directeur de recherche INSERM, Montpellier	Rapporteur

Travail réalisé au Laboratoire de Physiologie des Structures Contractiles de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I.

SCD LILLE 1



D 030 259460 6



Madame le Professeur Y. Mounier m'a témoigné une grande confiance en m'accueillant dans son laboratoire, en me proposant le sujet de cette thèse, et en dirigeant mon travail. De plus, en m'autorisant à effectuer plusieurs stages dans des universités étrangères, elle m'a permis de découvrir de multiples aspects du monde de la recherche tout en approfondissant mes connaissances. Je l'en remercie vivement.

La présence de Madame le Professeur G. Spik au jury de cette thèse me fait grand plaisir. Je suis très sensible à l'attention dont elle m'a fait preuve depuis l'époque de mon second cycle. Je lui suis très reconnaissante de participer à ce jury.

Monsieur le Professeur G. Maréchal me fait un grand honneur en rapportant sur ce travail. Je lui exprime ici ma sincère gratitude.

Mes remerciements vont à Monsieur le Professeur G. Suarez-Kurtz pour les discussions enrichissantes et encourageantes qui nous ont souvent réunis et pour la sympathie qu'il m'a toujours témoignée. Il a accepté de participer au jury de cette thèse, je lui en suis très reconnaissante.

Monsieur Guy Vassort, Directeur de recherche INSERM, a suivi pas à pas l'évolution de mon travail. Les encouragements et les conseils qu'il m'a prodigués m'ont aidé dans la réalisation de cette thèse. Il a confirmé l'intérêt qu'il lui portait en acceptant d'être rapporteur, je lui exprime ma profonde gratitude.

Les Professeurs Salviati, Betto et Moss m'ont considérablement influencée par leurs travaux et m'ont fait l'honneur de m'accueillir dans leur laboratoire. Ils m'ont apporté les connaissances, en particulier techniques, nécessaires à la réalisation de ce travail. Il m'est aujourd'hui très agréable de les remercier.

Le Professeur Schiaffino m'a aidé à terminer une partie de ce travail en me fournissant les anticorps indispensables et en me soutenant de ses vifs encouragements. Je l'en remercie chaleureusement.

Le Professeur Pette m'a fourni les anticorps anti-troponine C que Monsieur J. Mazurier, Directeur de Recherche CNRS, et les membres du laboratoire du Professeur Spik, m'ont appris à les utiliser. Je leur exprime toute ma reconnaissance.

Toute ma gratitude va également aux techniciens, chercheurs et stagiaires du laboratoire qui m'ont aidé à réaliser cette thèse. Ils m'ont apporté compétence et disponibilité.

Je remercie également le Centre National d'Etudes Spatiales et la région Nord-Pas de Calais pour l'allocation de recherche dont j'ai bénéficiée.

Enfin, je ne saurai terminer sans remercier mes proches et mes amis qui m'ont apporté un soutien affectif, mais également actif, pour toutes les étapes de la réalisation de cette thèse.

50376
1994
355

50376
1994
355

Université des Sciences et Technologies de LILLE I

THESE

présentée par

Corinne CORDONNIER

pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de LILLE I

en "Sciences de la Vie et de la Santé"



RELATION STRUCTURE-FONCTION DE FIBRES ISOLEES DE MUSCLES SQUELETTIQUES

Soutenue le 19 Décembre 1994 devant le jury composé de :

M. MARECHAL G.	Professeur, Université catholique de Louvain, Bruxelles (Belgique)	Rapporteur
Mme MOUNIER Y.	Professeur, Université de Lille I	Directeur
Mlle SPIK G.	Professeur, Université de Lille I	Examineur
M. SUAREZ-KURTZ G.	Professeur, Université de Rio de Janeiro (Brésil)	Examineur
M. VASSORT G.	Directeur de recherche INSERM, Montpellier	Rapporteur

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I - STRUCTURE DU MUSCLE	4
A - Le muscle	
B - La fibre musculaire	
C - La myofibrille	
D - Le filament épais	
E - Le filament fin	
II - L'ACTIVATION ET LE MECANISME DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE	9
A - Le couplage excitation-contraction	
1 - Phénomènes électriques de membrane	
2 - Couplage électrocalcique	
3 - Couplage calcium-contraction	
B - La création de la force musculaire	
III - L'HETEROGENEITE MUSCULAIRE	14
IV - LES PROTEINES CONTRACTILES ET LEUR POLYMORPHISME	15
A - Les protéines du filament épais : la myosine	
1 - Les chaînes lourdes de la myosine	
2 - Les chaînes légères de la myosine	
3 - Les isozymes de la myosine	
B - Les protéines du filament fin	
1 - L'actine	
2 - La tropomyosine (Tm)	
3 - La troponine C (TnC)	
4 - La troponine T (TnT)	
5 - La troponine I (TnI)	
C - Les autres protéines myofibrillaires	
1 - L' α actinine	
2 - La bande M	
3 - La protéine C	
4 - Les protéines H et X	
5 - La titine et la nébuline	

V - LES INTERACTIONS ENTRE LE CALCIUM ET LES PROTEINES CONTRACTILES	35
A - La relation tension/taux de calcium	
B - Mise en évidence du rôle de la TnC dans la régulation de la relation T/pCa	
1 - Expériences d'extraction	
2 - Echanges des isoformes de la TnC	
3 - Mutagenèse dirigée sur les sites calciques de la TnC	
C - Mise en évidence du rôle de la MLC2 dans la relation T/pCa	
1 - Expériences d'extraction	
2 - Phosphorylation de la MLC2	
D - Mise en évidence du rôle de la protéine C dans la relation T/pCa	
E - Influence de la composition du complexe Tm-TnT sur la relation T/pCa	

VI - L'ACTIVATION PAR LE STRONTIUM	44
A - Données générales	
B - La base moléculaire de la différence de sensibilité au strontium	
1 - Activation par le strontium de systèmes myofibrillaires reconstitués	
2 - Expériences d'extraction-remplacement de la TnC	
3 - D'autres protéines sont-elles impliquées dans la sensibilité au strontium ?	

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE	49
A - Animaux	
1 - Rats	
2 - Singes rhésus	
B - Conditions de microgravité imposées aux rats	
1 - Conditions de microgravité réelle	
2 - Conditions de microgravité simulée	
C - Caractéristiques des muscles étudiés	
1 - Le soleus	
2 - Le vastus intermedius	
3 - L'extensor digitorum longus	
4 - Le diaphragme	
D - Prélèvements	
1- Rats	
2- Singes	
 II - PELAGE ET ISOLEMENT DES FIBRES MUSCULAIRES	 52
A - Principe du pelage	
B - Technique utilisée : pelage chimique à l'EGTA	
C - Isolement de la fibre	

III - ETUDES DES PROPRIETES CONTRACTILES ET MESURE DE LA VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT DE LA FIBRE MUSCULAIRE ISOLEE	53
A - Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques	
B - Dispositif de mesure de la vitesse maximale de raccourcissement	
C - Solutions	
D - Protocoles expérimentaux	
1 - Mesure des tensions isométriques	
2 - Mesure de la vitesse maximale de raccourcissement	
E - Expression des résultats	
1 - Relation tension relative/pCa (pSr)	
2 - Vitesse maximale de raccourcissement	
F - Analyse statistique des résultats	

IV - ANALYSE DE LA COMPOSITION EN PROTEINES MYOFIBRILLAIRES	61
A - Electrophorèses	
1 - Séparation des chaînes lourdes de myosine (MHC)	
2 - Séparation des chaînes légères de myosine (MLC) et des isoformes de protéines régulatrices	
3 - Préparation des échantillons	
4 - Coloration des gels	
B - Immunoblotting	

RESULTATS

PREMIERE PARTIE :

ETUDE DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DE FIBRES MUSCULAIRES DE RAT : RELATION AVEC LEUR COMPOSITION EN PROTEINES MYOFIBRILLAIRES

I - FIBRES N'EXPRIMANT QU'UN TYPE D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES	65
A - Description du profil électrophorétique	
B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium	
1 - Fibres de type 1	
2 - Fibres de type 2A	
C - Conclusions	
1 - Influence du muscle d'origine des fibres	
2 - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le calcium	
3 - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le strontium	

II - FIBRES CO-EXPRIMANT LES DEUX TYPES D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES : FIBRES HYBRIDES

82

A - Description du profil électrophorétique

B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium des fibres hybrides

1 - Fibres de type HF du soleus

2 - Fibres de type HF du vastus intermedius

3 - Comparaison des fibres de type HF des muscles soleus et vastus intermedius

C - Conclusions

1 - Influence du muscle d'origine des fibres

2 - Influence de la composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le calcium

3 - Influence de la composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le strontium

DEUXIEME PARTIE :

MISE EN EVIDENCE D'UNE ISOFORME DE CHAINE LOURDE DE LA MYOSINE CARACTERISTIQUE DES MUSCLES RAPIDES, LA MHC2B, DANS LE MUSCLE SOLEUS SOUMIS A LA MICROGRAVITE. CONSEQUENCES SUR LES PROPRIETES FONCTIONNELLES DES FIBRES EXPRIMANT CETTE ISOFORME

I - MISE EN EVIDENCE ET IDENTIFICATION DE LA MHC2B SUR COUPES DE SOLEUS DE RATS SOUMIS A 10 OU 14 JOURS DE MICROGRAVITE SIMULEE

93

A - Description du profil électrophorétique

B - Identification de la "bande de MHC" intermédiaire par les anticorps monoclonaux

C - Conclusions

II - EXPRESSION DE LA MHC2B DANS LES FIBRES DE SOLEUS DE RAT SOUMIS A 14 JOURS DE MICROGRAVITE REELLE

97

A - Description du profil électrophorétique

B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium

1 - Différence de sensibilité au calcium et au strontium

2 - Comparaison de l'activation par le calcium des fibres de ce groupe et des fibres de type 1, 2A et HF du soleus

3 - Comparaison de l'activation par le strontium des fibres de ce groupe et des fibres de type 1, 2A et HF du soleus

C - Conclusions

TROISIEME PARTIE :

**PROPRIETES FONCTIONNELLES DE FIBRES ISOLEES DE SOLEUS DE SINGE RHESUS :
ETUDE DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DE QUATRE POPULATIONS DE FIBRES
DIFFERENTES PAR LEUR COMPOSITION EN ISOFORMES DE PROTEINES CONTRACTILES**

I - DESCRIPTION DU PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES 4 POPULATIONS	103
II - PROPRIETES D'ACTIVATION PAR LE CALCIUM ET LE STRONTIUM	103
A - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'affinité relative au calcium et au strontium	
B - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le Ca	
1 - Fibres n'exprimant qu'un type d'isoformes de protéines myofibrillaires	
2 - Fibres hybrides	
III - MESURE DE VMAX	108
IV - CONCLUSION	110

QUATRIEME PARTIE :

**ETUDE DE LA RELATION ENTRE L'EXPRESSION DES ISOFORMES LENTES ET RAPIDES DES
CHAINES LOURDES ET LEGERES DE LA MYOSINE DANS LES FIBRES HYBRIDES.**

I - PRELIMINAIRE METHODOLOGIQUE	111
II - QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION RELATIVE DES ISOFORMES LENTES ET RAPIDES DE LA MYOSINE DANS LES FIBRES HYBRIDES	113
III - CONCLUSION	116

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

I - LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DE FIBRES N'EXPRIMANT QU'UN TYPE D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES	118
A - Les propriétés d'activation par le calcium	
B - Les propriétés d'activation par le strontium	
C - La différence d'activation par le calcium et le strontium	

II - LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DE FIBRES CO-EXPRIMANT DEUX TYPES D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES : LES FIBRES HYBRIDES	123
A - La composition myofibrillaire des fibres hybrides	
B - Les propriétés fonctionnelles des fibres hybrides	
1 - Activation par le calcium et le strontium	
2 - Vitesse maximale de raccourcissement	
III - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE L'ISOFORME 2B DE LA MHC DANS LE MUSCLE SOLEUS DE RAT SOUMIS A LA MICROGRAVITE ET RELATION STRUCTURE-FONCTION DES FIBRES EXPRIMANT LA MHC2B	129
A - L'expression de la MHC2B dans le muscle soleus de rat soumis à la microgravité	
B - Les propriétés d'activation par le calcium et le strontium des fibres de soleus exprimant l'isoforme MHC2B	

CONCLUSION	132
-------------------	------------

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE RECAPITULATIVE DES FIGURES

Fig. 1 : Organisation du muscle squelettique strié (d'après Sheeler et Bianchi dans "Cell biology : structure biochemistry and function", Ed. J. Wiley et sons, 1980)	5
Fig. 2 : Les myofibrilles, le réticulum sarcoplasmique et les tubules transverses (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)	6
Fig. 3 : Organisation des molécules d'actine et de myosine dans le sarcomère (d'après Alberts et coll., dans "Biologie moléculaire de la cellule", Ed. Flammarion, 1990)	6
Fig. 4 : La myosine A - Structure (d'après Pollack, dans "Muscles and molecules", Ed. Ebner et sons, 1990) B - Le filament épais (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)	8
Fig. 5 : Le filament fin (d'après Moss et coll. 1986a)	10
Fig. 6 : Modèle de régulation de la contraction musculaire squelettique montrant les interactions entre les sous-unités de troponines, la tropomyosine, l'HMM et l'actine à concentration calcique élevée ($10^{-5}M$) et à concentration calcique faible ($10^{-7}M$) (d'après El Saleh et coll. 1986)	10
Fig. 7 : La création de la force musculaire (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)	13
Fig. 8 : La tête S1 de la myosine et ses sous-domaines (d'après Vibert et Cohen 1988)	17
Fig. 9 : Illustration schématique des mobilités électrophorétiques des isoformes des chaînes lourdes de la myosine de muscle squelettique de rat (d'après Termin et coll. 1989)	19
Tab. 1 : Isoformes des chaînes lourdes de la myosine identifiées dans les muscles squelettiques de Mammifères (d'après Pette et Staron 1990)	19
Fig. 10 : Corrélation entre la vitesse maximale de raccourcissement et l'activité ATPasique, la composition en chaînes lourdes de myosine et la composition en chaînes légères de la myosine, de fibres musculaires isolées	21
Fig. 11 : Structure de la troponine C (d'après Potter et Johnson 1982)	27
Fig. 12 : Illustration schématique de la coexistence des isoformes de troponines T et de MHC dans les fibres isolées	30
Tab. 2 : Polymorphisme des protéines contractiles des muscles striés de Mammifères	32
Fig. 13 : Autres protéines de structure du sarcomère (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)	34
Fig. 14 : Illustration schématique de la relation entre la tension développée par une fibre musculaire isolée et le taux de calcium	37
Fig. 15 : Identification d'une fibre de type lent et d'une fibre de type rapide par le test strontium (d'après Takagi et Endo 1977)	46
Fig. 16 : A - Schéma du dispositif de montage d'une fibre musculaire B - Principe de mesure de la longueur des sarcomères	54
Fig. 17 : Exemple d'un cycle expérimental de mesure de la tension isométrique d'une fibre isolée	58
Fig. 18 : Détermination de la vitesse maximale de raccourcissement d'une fibre isolée (d'après Reiser et coll. 1985)	60

Fig. 19 : Profil électrophorétique des fibres de types 1 et 2A de soleus de rat	66
Fig. 19bis : Profil électrophorétique des fibres de types 1 et 2A de vastus intermedius de rat	67
Fig. 20 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 du soleus de rat	68
Tab. 3 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 1 du soleus de rat	69
Fig. 21 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 du vastus intermedius de rat	71
Tab. 4 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 1 du vastus intermedius de rat	72
Fig. 22 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 2A du soleus de rat	74
Tab. 5 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 2A du soleus de rat	75
Fig. 23 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 2A du vastus intermedius de rat	76
Tab. 6 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 2A du vastus intermedius de rat	77
Fig. 24 : Comparaison de l'activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 et de type 2A du soleus de rat	79
Fig. 25 : Comparaison de l'activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 et type 2A du vastus intermedius de rat	80
Fig. 26 : Profil électrophorétique des fibres de type HF de soleus de rat	83
Fig. 26bis : Profil électrophorétique des fibres de type HF de vastus intermedius de rat	84
Fig. 27 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type "hybride fast" du soleus de rat	86
Tab. 7 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type "hybride fast" du soleus de rat	87
Fig. 28 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type "hybride fast" du vastus intermedius de rat	89
Tab. 8 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type "hybride fast" du vastus intermedius de rat	90
Fig. 29 : Mise en évidence et identification de la MHC 2B sur coupes de soleus de rat soumis à 10 et 14 jours de microgravité	95
Fig. 30 : Profil électrophorétique des fibres 2B de soleus de rat soumis à 14 jours de microgravité réelle	98
Fig. 31 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 2B du soleus de rat	99
Tab. 9 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 2B du soleus de rat	100
Fig. 32 : Profil électrophorétique des 4 populations de fibres définies dans le soleus de singe rhésus	104

Fig. 33 : Relations T/pCa établies pour les 4 populations de fibres isolées du soleus de singe rhésus	106
Tab.10 : Caractéristiques d'activation par le Ca des 4 types de fibres déterminés dans le soleus de singe rhésus	107
Fig. 34 : Distribution des valeurs de Vmax, en longueur de fibre par seconde, mesurées sur des fibres isolées de soleus de singe rhésus	109
Fig. 35 : Profil électrophorétique des fibres isolées de soleus (types 1 et HF) et d'EDL (type 2A-2B) de rat	112
Fig. 36 : Profil obtenu par analyse densitométrique de la zone de migration des chaînes lourdes de la myosine, sur gel 6%, et des chaînes légères de la myosine, sur gel 10-20%, de fibres du soleus de rat	114
Tab. 11 : Expression relative des isoformes lentes et rapides des chaînes lourdes et légères de la myosine dans les fibres hybrides de soleus de rat et de singe rhésus	115
Fig. 37 : Relation entre les proportions d'isoformes rapides des chaînes lourdes et légères de la myosine dans les fibres de type hybride du soleus de rat	117

LISTE DES ABREVIATIONS

ATP : adénosine triphosphate

m ATP ase : actomyosine adénosine triphosphatase

EDL : extensor digitorum longus

FF : "fast" fatigable

FG : "fast twitch" glycolytique

FOG : "fast twitch" oxydative glycolytique

FR : "fast" fatigue - résistant

HF : hybride "fast"

HMM : méromyosine lourde

HS : hybride "slow"

LF/s : longueur de fibre par seconde

LMM : méromyosine légère

MHC : chaîne lourde de la myosine

MLC : chaîne légère de la myosine

SO : "slow twitch" oxydative

Tm : tropomyosine

Tn : troponine

T/pCa : relation tension concentration en calcium

T/pSr : relation tension concentration en strontium

Vast. Int. : vastus intermedius

V max : vitesse maximale de raccourcissement

INTRODUCTION GENERALE

Le mouvement est la manifestation la plus visible de la vie animale. Les muscles des Vertébrés qui constituent, avec le squelette, la masse pondérale prédominante, sont considérés comme la "machine à produire le mouvement". L'élément de base de l'activité motrice est la fibre musculaire : elle est composée de structures permettant d'assurer l'apport énergétique nécessaire à la contraction, et de protéines spécifiques regroupées en myofibrilles. Ces protéines (myosine, actine, tropomyosine, et troponines) constituent le support de la contraction musculaire.

Les formes et les vitesses d'exécution du mouvement sont très variables. Un tel spectre de mouvements, de lents à rapides, est possible grâce à l'existence de caractéristiques variables selon les muscles : depuis très longtemps, une différence de couleur entre certains muscles de Mammifères est observée (Lorenzini 1678, voir Ciaccio 1898). De plus, l'aspect microscopique des fibres constituant ces muscles varie (Ranvier 1873). La diversité du muscle squelettique est en fait liée à sa composition en fibres musculaires : aucun muscle squelettique n'est identique à un autre et des muscles homologues montrent des différences de composition en fibres selon les espèces. Dès 1919, Bullard décrivait l'existence de trois types de fibres dans un même muscle (Gauthier 1970).

Il existe cependant une unité dans la diversité : dans tous les muscles, la contraction résulte d'une interaction entre l'actine et la myosine, contrôlée, avec plus ou moins de précision selon le muscle, par la concentration calcique interne. Ce mécanisme de contrôle par le calcium est si important pour la contraction musculaire qu'il a été conservé au cours de l'évolution depuis plus d'un milliard d'années. Par contre, les mécanismes fins de contrôle de la concentration calcique intracellulaire, les protéines "cibles" de l'ion calcium et la manière selon laquelle les ions calciques activent le système contractile sont, quant à eux, très divers.

Les travaux du laboratoire de St Gyorgii sur la myosine et l'actine, de Bailey sur les tropomyosines et d'Ebashi sur les troponines ont ouvert l'ère "biochimique" de l'étude du muscle squelettique. L'appareil contractile est ainsi "décortiqué" et les histologistes, puis les biophysiciens dont A. Huxley, parviendront à expliquer dans un schéma unitaire le mécanisme moléculaire de la contraction.

L'hétérogénéité du tissu musculaire reflète son haut degré de spécialisation fonctionnelle et représente la base de sa plasticité. En effet, les caractéristiques des muscles peuvent se modifier : elles évoluent de la période embryonnaire jusqu'à l'état adulte. De plus, une adaptation du système musculaire à des modifications de son

environnement est classiquement décrite. La découverte du polymorphisme des protéines contractiles est à l'origine du concept de plasticité musculaire. Par les techniques électrophorétiques (Hoh 1978, Billeter et coll. 1981, Salviati et coll. 1982) et immunochimiques (Gauthier et Lowey 1979), il fut démontré que la pluralité des types de fibres musculaires dérivait, en partie, de l'existence d'un polymorphisme des myosines. La diversité des isoformes des protéines myofibrillaires, dont la myosine, serait responsable de la diversité structurale et fonctionnelle des muscles squelettiques. L'étendue de cette hétérogénéité commence seulement à être appréhendée. Les protéines responsables de la contraction existent donc sous de nombreuses isoformes qui peuvent coexister dans la même cellule musculaire (Pette et Staron 1990, pour revue). Cependant, la signification fonctionnelle de l'existence de ces isoformes de protéines contractiles n'est pas vraiment déterminée.

Le propos de notre étude était de corrélérer les propriétés fonctionnelles de fibres musculaires isolées aux isoformes de protéines contractiles. Il est bien connu que les fibres musculaires squelettiques peuvent être caractérisées par leur propriétés histochimiques, biochimiques, mais également physiologiques (Burke et coll. 1974). Les différences de propriétés contractiles entre les fibres de type lent et rapide sont généralement attribuées à la différence de composition en protéines myofibrillaires. Les différences d'activation de la contraction par le calcium et les différences de vitesse de contraction sont rapportées à ces variations de la structure des fibres musculaires. Un autre cation divalent, le strontium, peut être utilisé pour induire la contraction. La sensibilité au strontium, très différente entre les fibres musculaires rapides et lentes, permet de les distinguer. Notre étude a consisté en l'analyse des propriétés d'activation par le calcium et le strontium des fibres musculaires isolées et, pour certaines d'entre elles, de leur vitesse de contraction. Les protéines myofibrillaires les plus impliquées dans la détermination de ces caractéristiques fonctionnelles sont la myosine et la troponine C. Nous avons donc focalisé notre travail sur la composition en isoformes de myosine et de troponine C des fibres musculaires dont les propriétés physiologiques étaient déterminées.

Pour établir une relation structure-fonction, il est nécessaire d'observer soit une variation de la structure, soit une variation de la fonction. L'hétérogénéité de la composition myofibrillaire est liée à une variation de la structure des fibres. L'analyse de la fonction de ces fibres, différentes par leur structure, nous permet donc d'analyser la relation structure-fonction.

De plus, l'expression phénotypique des différentes isoformes de la myosine dans le muscle adulte semble être contrôlée par une interaction complexes de facteurs nerveux, hormonaux et mécaniques (Swynghedauw 1986, pour revue). L'activité mécanique est le principal facteur environnemental du muscle. En particulier, le maintien du phénotype lent semble très dépendant de la charge imposée au muscle. En supprimant

l'activité de support du poids corporel aux muscles lents, une conversion du phénotype "lent" vers un phénotype "rapide" de ces muscles posturaux, et en particulier du soleus, fut décrite dans de nombreuses études (Thomason et Booth 1990, pour revue). L'étude de l'influence de la fonction "support du poids corporel" sur les propriétés des muscles lents s'est particulièrement développée avec la multiplication des missions spatiales. En effet, un séjour dans l'espace, où l'attraction terrestre est quasiment nulle, entraîne sur les Vertébrés des altérations du système musculaire strié squelettique. L'absence de charge sur les muscles antigravitaires constitue le facteur causal clef de ces altérations. Des modèles permettant de simuler la microgravité, comme le modèle du "rat suspendu" de Morey (1979) miment au sol ces effets, et ont permis d'étudier l'influence de la charge imposée au muscle.

Par ce travail, nous avons tenté d'établir la relation entre la structure (composition protéique myofibrillaire) et la fonction (propriétés d'activation et vitesse de contraction) de fibres musculaires isolées, en utilisant les variations de structure liées à l'hétérogénéité musculaire ou en les induisant par des facteurs exogènes (effet de la microgravité sur un muscle postural).

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I - STRUCTURE DU MUSCLE

La contraction musculaire est réalisée par un mécanisme protéique intracellulaire sophistiqué. Au cours de l'évolution des cellules musculaires, certaines structures du cytosquelette furent très développées et spécialisées afin de rendre l'appareil contractile du muscle particulièrement stable et efficace. La dénomination de muscle squelettique "strié" réfère à la striation régulière de la fibre musculaire observée au microscope (Fig. 1). Cette striation montre combien le degré d'organisation de cet appareil est élevé ; elle résulte de l'organisation des protéines contractiles en deux types de filaments.

A - Le muscle

Le muscle est constitué de faisceaux de fibres musculaires (Fig. 1), entourés par des réseaux de tissu conjonctif et de vaisseaux sanguins. Les réseaux de tissu conjonctif s'unissent à chaque extrémité du muscle pour constituer les tendons. Ces structures assurent les insertions du muscle sur l'os et transmettent la force produite par la contraction musculaire. Le réseau d'artérioles et de veinules se subdivise en capillaires qui entourent les fibres musculaires et transportent l'oxygène et les métabolites nécessaires à la fonction des cellules.

B - La fibre musculaire

La fibre musculaire est l'unité cellulaire de contraction. Cette cellule géante, polynucléée, est limitée par une membrane, le sarcolemme. Son cytoplasme est essentiellement constitué de myofibrilles, éléments cylindriques de 1 à 2 μm de diamètre, souvent aussi longs que la cellule musculaire elle-même (plusieurs cm). Les myofibrilles confèrent à la fibre musculaire son aspect strié. Les fibres contiennent également d'autres structures intracellulaires : les mitochondries et le réticulum sarcoplasmique. Nous développerons plus particulièrement la description des myofibrilles, puisque ces éléments constituent le support de l'activité contractile.

Chaque myofibrille est entourée par un système complexe de membranes constitué du sarcolemme s'invaginant en un système tubulaire transverse (système T) et d'une structure intracellulaire fermée, le réticulum sarcoplasmique (Fig. 2). Le réticulum sarcoplasmique constitue une réserve de calcium et permet, par sa fonction de pompage et de libération de cet ion, de réguler la concentration calcique intracellulaire. La juxtaposition des membranes du système T avec deux éléments de réticulum

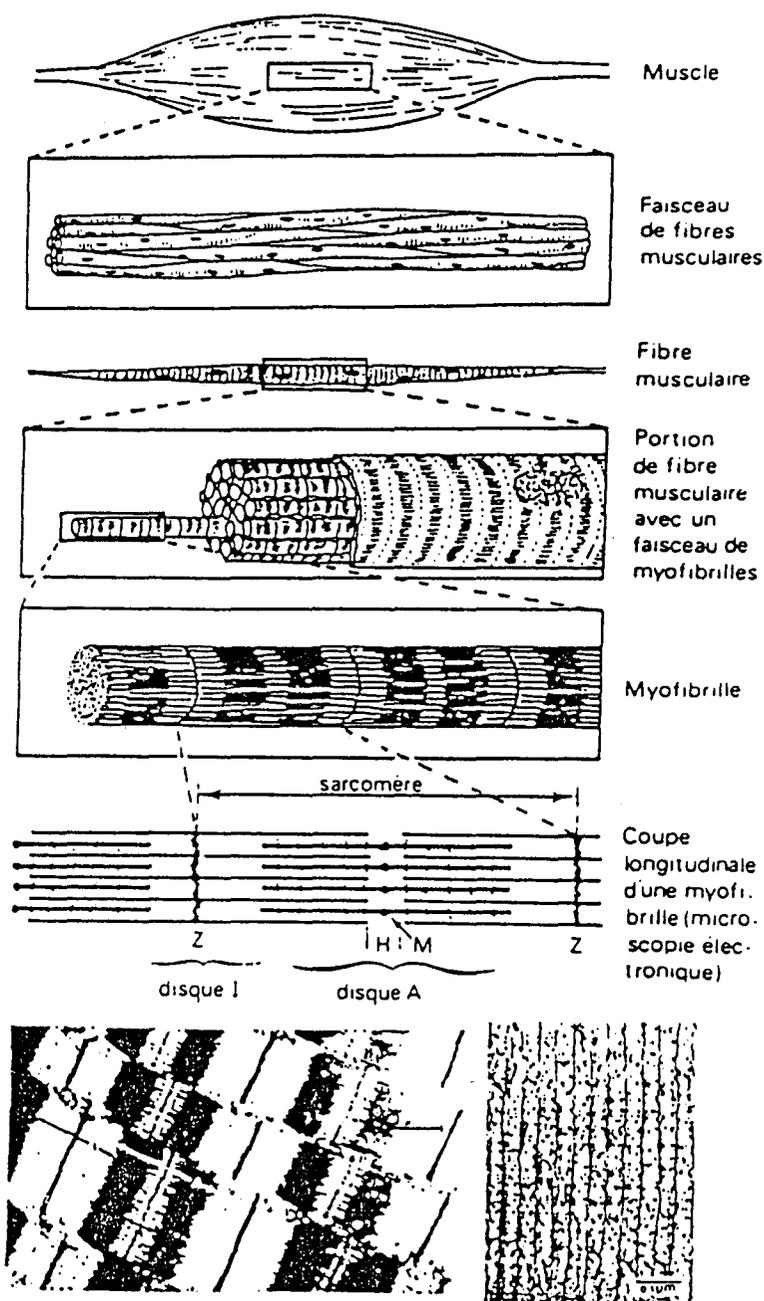


Figure 1 : Organisation du muscle squelettique strié (d'après Sheeler et Bianchi dans "Cell biology : structure biochemistry and function", Ed. J. Wiley et sons, 1980). La microphotographie en bas à gauche montre une coupe longitudinale de fibre (Huxley dans "The cell" Ed. Brachet et Minsky, N.Y. Academic Press, 1962). La photographie en bas à droite montre, en microscopie à balayage, les myofilaments fin et épais d'une bande A (Franzini-Armstrong et coll. 1988)

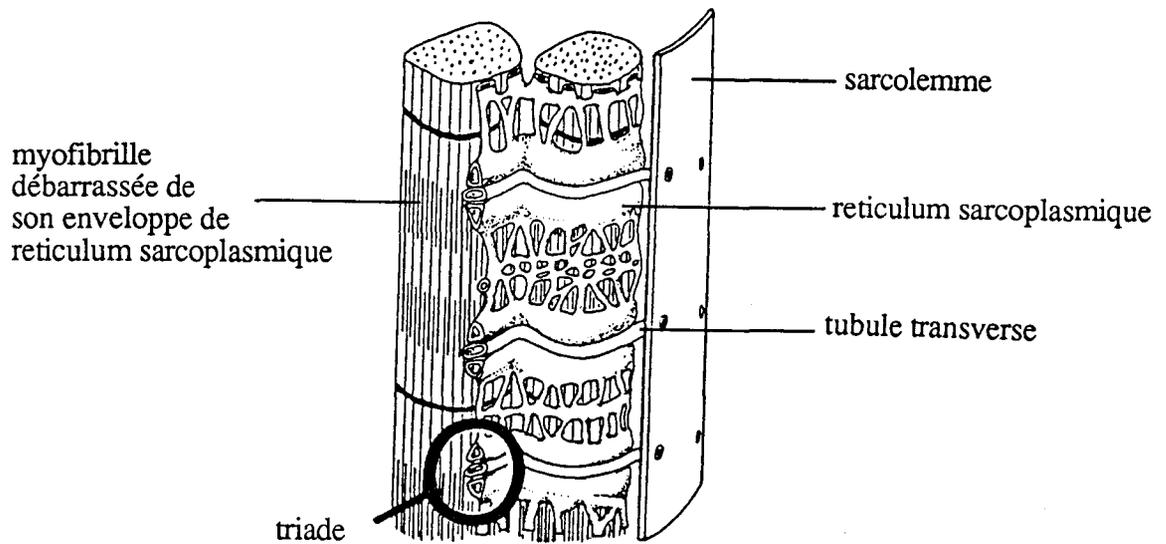


Figure 2 : Les myofibrilles, le réticulum sarcoplasmique et les tubules transverses (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)

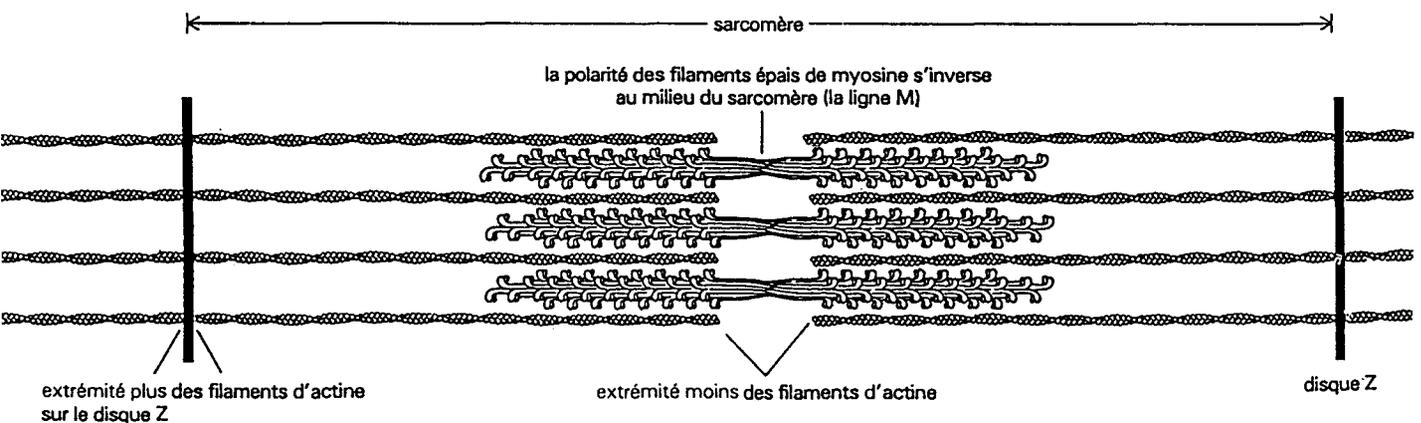


Figure 3 : Organisation des molécules d'actine et de myosine dans le sarcomère (d'après Alberts et coll., dans "Biologie moléculaire de la cellule", Ed. Flammarion, 1990)

sarcoplasmique forme les triades, considérées comme des "synapses" intracellulaires (Fig. 2).

C - La myofibrille

La myofibrille apparaît comme une succession de bandes sombres (anisotropes, bandes A) et de bandes claires (isotropes, bandes I). Généralement, le centre de la bande A est marqué par une zone plus claire, la zone H, et celui de la bande I par une ligne dense, la strie Z (Fig. 1). Cette structure est due à l'arrangement des myofilaments, fins et épais, constitués par l'organisation macromoléculaire des protéines contractiles. L'isotropie de la bande I est associée à la présence d'un seul type de filament, le filament fin. La partie dense de la bande A contient à la fois les filaments fins et épais, alors que la zone H ne contient que les filaments épais. La strie Z constitue le point d'ancrage des filaments fins et est donc responsable du maintien de ce réseau. Deux stries Z délimitent l'unité contractile du muscle : le sarcomère (Fig. 3).

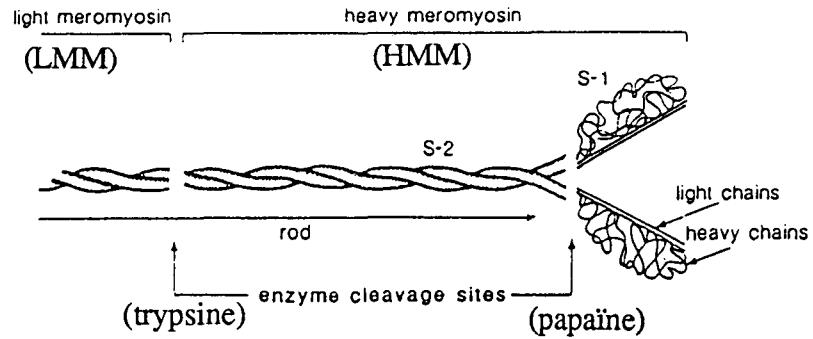
D - Le filament épais

Il est essentiellement constitué de myosine : c'est une molécule hexamérique formée par l'assemblage de 2 chaînes peptidiques identiques, les chaînes lourdes (PM=200kD) et de 4 chaînes légères (PM=20kD chacune) (Lowey et coll. 1969 ; Lowey et Risby 1971 ; Weeds et Lowey 1971).

Les premières études de la myosine utilisaient les coupures enzymatiques par la trypsine (Lowey et coll. 1969). Ce clivage sépare la myosine en deux parties, la "queue" fibrillaire ou méromyosine légère (LMM) et une partie plus courte globulaire, la méromyosine lourde (HMM). L'action de la papaïne scinde la HMM en 2 parties : le fragment S1 constitué de 2 têtes globulaires et le fragment S2, zone située entre les têtes globulaires et la "queue" de la myosine (Fig. 4A). Les fragments S1 ou "têtes" de myosine sont responsables de la fixation de la myosine sur le filament fin et assurent l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (activité ATPasique de la molécule). Le fragment S2 constitue la zone charnière flexible de la molécule. L'assemblage antiparallèle des "queues" de myosine permet l'arrangement supramoléculaire en filaments épais (Fig. 4B).

Nous décrirons plus précisément la structure des chaînes légères et les isoformes de la myosine au chapitre IV-A.

A



B

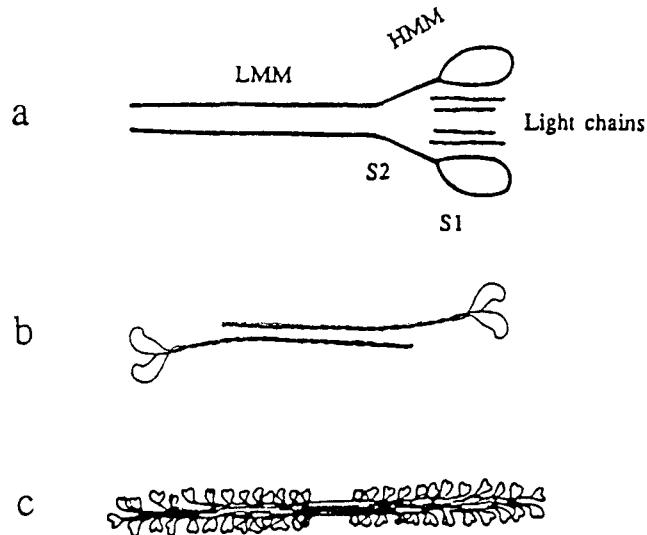


Figure 4 : La myosine

A - Structure (d'après Pollack, dans "Muscles and molecules", Ed. Ebner et sons, 1990)

B - Le filament épais (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)

a) représentation schématique de la myosine

b et c) organisation en filament épais

E - Le filament fin

Il est constitué d'actine et d'un complexe de protéines régulatrices.

L'actine est une protéine globulaire (actine G, PM=42000 D) qui se polymérise (actine F) en une hélice serrée, qui apparaît comme une structure en double brin (Cohen et Vibert 1987, pour revue).

La tropomyosine (Tm) et les troponines (Tn) sont responsables de la régulation de l'activation de la contraction (Ebashi 1963 ; Ebashi et Endo 1968 ; Ebashi 1980).

La tropomyosine est une molécule allongée (41nm) et rigide qui possède une forte affinité pour l'actine. Elle est constituée de 2 chaînes s'enroulant l'une autour de l'autre dans le sillon créé par les 2 brins du filament d'actine (Leavis et Gergely 1984 ; El-Saleh et coll. 1986).

La troponine est un complexe de 3 polypeptides : les troponines T, I et C (Greaser et Gergely 1973). Les initiales utilisées pour dénommer ces protéines correspondent à leur activité de liaison à la Tropomyosine, d'Inhibition et de liaison du Calcium. Ce complexe est localisé le long du filament fin à intervalle régulier de 7 monomères d'actine (tous les 40nm) (Fig. 5).

La structure de ces protéines et leur polymorphisme seront détaillés au chapitre IV-B.

II - L'ACTIVATION ET LE MECANISME DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

Le système contractile s'active lorsque la concentration calcique intracellulaire passe de 0,1 μM à 1 ou 10 μM (Heilbrunn et Wiercinski 1947).

La création de la force musculaire résulte d'un ensemble de processus : phénomènes électriques de membrane, couplage électrocalcique suivi du couplage calcium-contraction, et enfin la contraction musculaire.

A - Le couplage excitation-contraction

1 - Phénomènes électriques de membrane

La motilité est sous le contrôle du système nerveux qui communique avec la cellule musculaire par la jonction neuromusculaire. Les influx nerveux atteignant cette zone entraînent la libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons nerveuses. La fixation de ce neurotransmetteur sur ses récepteurs du sarcolemme induit une petite

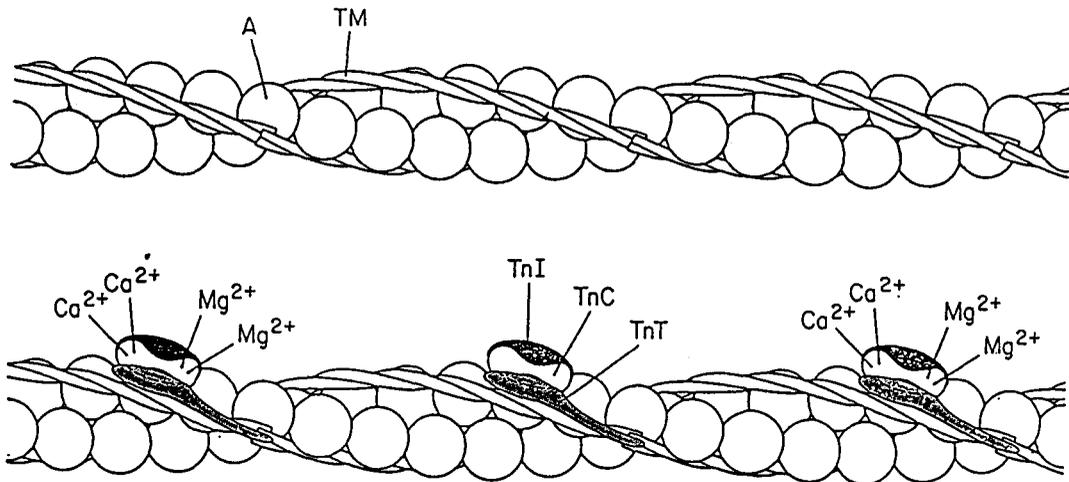


Figure 5 : Le filament fin (d'après Moss et coll. 1986a)

- a) structure
b) modèle d'activation

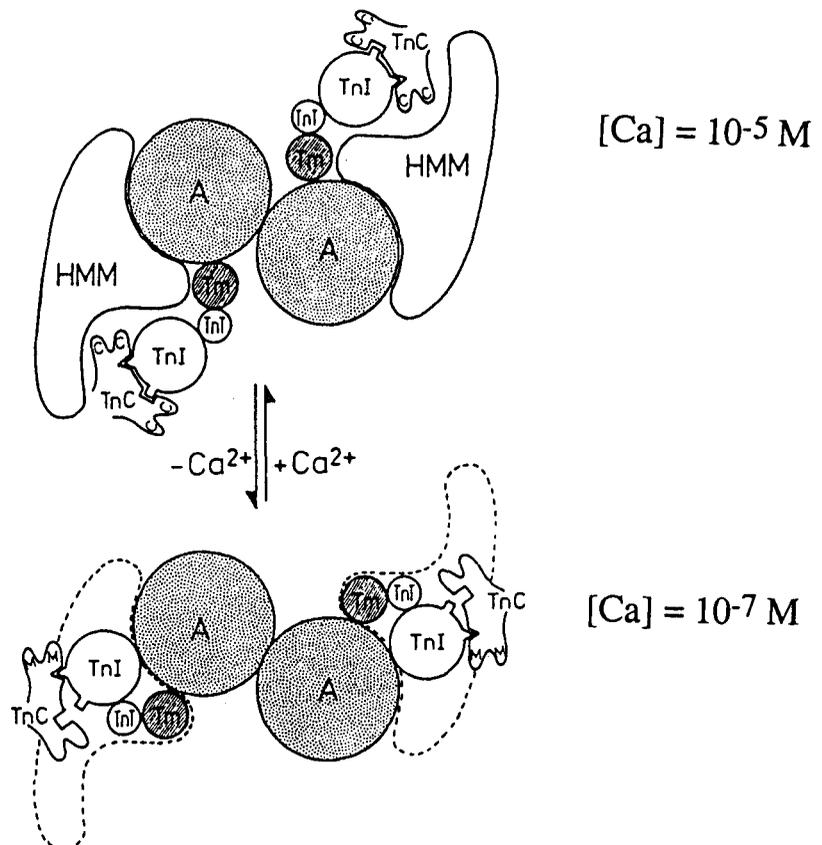


Figure 6 : Modèle de régulation de la contraction musculaire squelettique montrant les interactions entre les sous-unités de troponines, la tropomyosine, l'HMM et l'actine à concentration calcique élevée ($10^{-5}M$) et à concentration calcique faible ($10^{-7}M$) (d'après El Saleh et coll. 1986)

variation de potentiel de membrane, qui, à son tour, déclenche un potentiel d'action musculaire.

2 - Couplage électrocalcique

Le potentiel d'action membranaire se propage le long des tubules transverses jusqu'aux zones de triades. L'excitation transmise provoque la libération du calcium (Ca) stocké dans le réticulum sarcoplasmique vers le cytoplasme. La contraction est alors déclenchée par la fixation du Ca sur la troponine C, qui autorise l'attachement des "ponts" de myosine sur l'actine (voir paragraphe suivant). Le relâchement est assuré par la capture du Ca, essentiellement par le réticulum sarcoplasmique, et le détachement des ponts. Nous détaillerons plus précisément les mécanismes se rapportant aux étapes suivantes de la contraction, donc aux mécanismes de fonctionnement des protéines des filaments fins et épais. En effet, notre étude fut réalisée sur des fibres dont les structures membranaires internes étaient détruites.

3 - Couplage calcium-contraction

Les études d'Ebashi et Endo (1968), puis de Potter et Gergely (1974) ont mis en évidence le contrôle de la contraction par la tropomyosine (Tm) et les troponines (Tn), réagissant à une augmentation du Ca intracellulaire. Selon le modèle de Potter et Johnson (1982), lorsque la fibre musculaire est au repos (concentration en Ca faible), le filament de Tm masque, par encombrement stérique, le site de liaison de l'actine pour la myosine. Cette position de la Tm est maintenue par la TnT qui possède un site de liaison avec la Tm. La TnI, associée à la fois à l'actine, à la TnT et à la TnC, a une action inhibitrice sur la myosine ATPase et empêche l'interaction actine-myosine. La fixation de Ca sur la TnC entraîne un resserrement des interactions TnI-TnC et diminue l'affinité de la TnI pour l'actine. Le complexe Tm-TnT, qui occupait une position périphérique, s'enfonce plus profondément dans la gorge, entre les brins d'actine. Cette position de la Tm correspond à sa position d'activation, et autorise l'attachement de la myosine à l'actine. La figure 6 illustre les modifications des interactions entre ces protéines lors de la variation de la concentration en Ca libre.

B - La création de la force musculaire

La contraction musculaire peut se développer grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP. Selon la théorie des filaments glissants (Huxley 1957), la contraction et la création de force sont générées par le raccourcissement des fibres musculaires, résultat du glissement relatif des filaments fins par rapport aux filaments épais. Ce glissement s'effectue par l'intermédiaire de ponts entre l'actine et la myosine, qui se

forment et se détruisent cycliquement (durée d'un cycle : 1/10 à 1/100 s). Le déroulement de ces phénomènes est couplé à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par cycle.

Chaque cycle comporte les étapes suivantes (Fig. 7A) :

(i) - La tête S1 de la myosine se lie à une molécule d'actine pour laquelle elle a, sous cette forme, une grande affinité. La stœchiométrie est de 1 pont par molécule d'actine globulaire. L'angle formé entre S1 et l'actine est de 90°. La myosine forme un complexe tertiaire à "haute énergie" avec les produits de l'hydrolyse de l'ATP (myosine-ADP-Pi).

(ii) - Libération de l'un des produits de la réaction (Pi), qui fournit environ 50% de l'énergie de coupure de l'ATP. L'énergie libérée est transformée en travail mécanique : la rotation de la tête S1 pour former un angle aigu de 45°. Cette rotation est possible grâce à la structure flexible du fragment S2. La myosine étant toujours liée à l'actine, cette rotation entraîne le déplacement du filament d'actine. Ceci se traduit par un raccourcissement du sarcomère de l'ordre de 10 nm.

(iii) - Après cette rotation de S1, la molécule d'ADP est libérée.

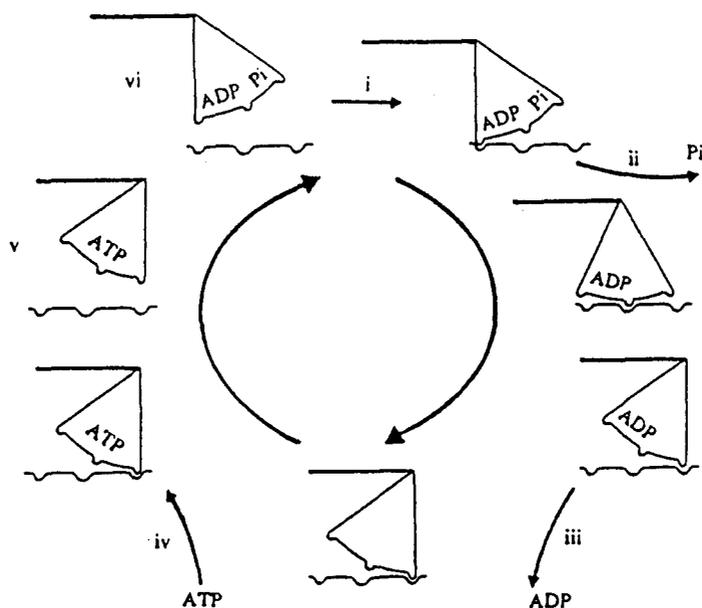
(iv) - Une molécule d'ATP vient se lier à la tête de myosine. Cette liaison diminue l'affinité de la myosine pour l'actine et permet le détachement (v).

(vi) - L'hydrolyse de l'ATP permet de repositionner la tête S1 selon son angle initial (90°). Les produits de la réaction ne sont pas libérés. Le dispositif est donc prêt pour accomplir un nouveau cycle.

D'autres modèles de contraction sont décrits. Le glissement des filaments pourrait mettre en jeu une augmentation des forces électrostatiques de répulsion entre les filaments fins et épais. Un autre modèle évoque la modification de la conformation (en double hélice α) de la tête S2 de la myosine. Toutefois, la théorie de Huxley est la plus reconnue.

L'activité ATPasique de la tête S1 de la myosine (Fig. 7B) est dépendante de la présence de calcium, de magnésium et d'actine ; elle constitue la source immédiate d'énergie permettant la contraction. La teneur du muscle en ATP doit donc être régénérée rapidement. L'une des voies la plus rapide est assurée par la dégradation de la créatine phosphate (créatine phosphate + ADP + Pi \rightarrow ATP + créatine, réaction catalysée par la créatine phosphokinase). Les autres sources d'ATP proviennent du glycogène, par l'intermédiaire de la glycogénolyse puis de la glycolyse. Cette production d'énergie peut s'effectuer en anaérobiose (3 ATP/glucose), ou en aérobie (39 ATP/hexose) en passant par le cycle de Krebs.

A



B

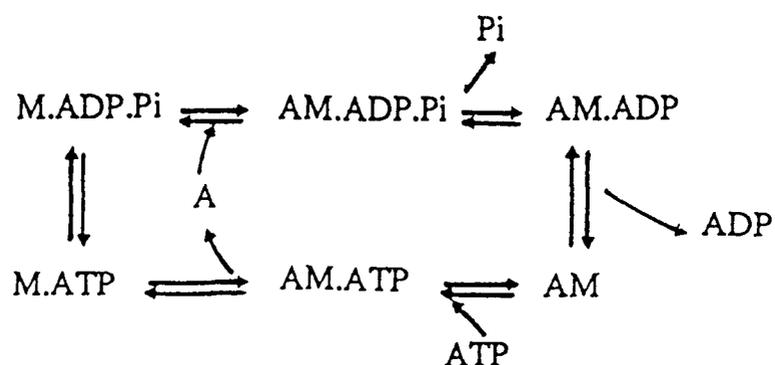


Figure 7 : La création de la force musculaire (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)

A - Un cycle de liaison actine-myosine et l'hydrolyse de l'ATP

B - L'activité ATPasique de la tête S1 de la myosine (M), activée par l'actine (A), pendant un cycle

III - L'HETEROGENEITE MUSCULAIRE

L'hétérogénéité musculaire fut remarquée dès 1873, quand Ranvier distingua les muscles "blancs" des muscles "rouges". Depuis, de nombreuses classifications des fibres musculaires ont été proposées.

Deux approches histochimiques permettent de séparer différents types de fibres :

La technique de mesure de l'activité de l'actomyosine ATPase (mATPase) (Padykula et Herman 1955) permet de distinguer 2 types de fibres, les fibres de type I et les fibres de type II (Engel 1962). L'autre technique de distinction entre les types de fibres musculaires est basée sur les réactions histochimiques mettant en évidence l'activité des enzymes du métabolisme aérobie et anaérobie. La succinate déshydrogénase (SDH), la cytochrome oxydase et la phosphorylase furent les plus utilisées (Ogata 1958, a b, c). Ces critères d'activité enzymatique ont abouti à la classification des fibres en 2 types principaux (Dubowitz et Pearse 1960) : I (riche en SDH et pauvre en phosphorylase) et II (pauvre en SDH et riche en phosphorylase).

Les relations entre l'activité de la mATPase et celles des enzymes du métabolisme oxydatif aérobie ou glycolytique anaérobie furent mises en évidence par Barnard et coll. (1971) et Peter et coll. (1972). Les différences histochimiques de l'activité de la mATPase furent également corrélées à des différences de propriétés contractiles (Close 1967, 1972 ; Barnard et coll. 1971). La combinaison d'une étude histochimique basée sur l'étude simultanée des enzymes du métabolisme de la mATPase, a permis de classer des fibres musculaires en trois groupes (Barnard et coll. 1971 ; Peter et coll. 1972) : SO (pour "slow twitch" oxydative), FOG (pour "fast twitch" oxydative glycolytique) et FG (pour "fast twitch" glycolytique). Une autre classification, utilisant la déplétion glycogénique des unités motrices des fibres musculaires, a mis en évidence la relation entre les propriétés métaboliques et la fatigabilité : les unités motrices FF ("fast" fatigable) sont composées de fibres FG, les unités motrices FR ("fast", fatigue-résistant) de fibres FOG et les unités motrices S ("slow", fatigue-résistant) de fibres SO (Edström et Kugelberg 1968 ; Burke et coll. 1973). La classification des fibres musculaires la plus utilisée actuellement est celle de Brooke et Kaiser (1974). Cette nomenclature repose sur l'étude fine des activités des mATPases en fonction de leur stabilité à différents pH : type I (activité ATPase faible, SDH élevée) ; type IIA (activité ATPase élevée, SDH élevée) ; type IIB (activité ATPase élevée, SDH faible).

Si trois types principaux de fibres sont généralement proposés, de nombreux auteurs décrivent des types intermédiaires de fibres. Le développement des techniques basées sur l'activité de la mATPase (Schiaffino et Pierobon-Bormioli 1973 ; Staron et Pette 1986) a confirmé et multiplié les sous-types de fibres rapides (II), permettant une classification plus fine. De plus, les techniques immunologiques ont été développées

après la mise en évidence de différences immunologiques entre les myosines extraites de muscles squelettiques lents et rapides.

L'avènement des techniques immunohistochimiques a permis de mettre en évidence un nouveau type de fibre ; le type IIX (Schiaffino et coll. 1985, 1989 ; Gorza 1990) dans les muscles de petits Mammifères. Son activité mATPase est proche de celle de la IIB selon le protocole de Brooke et Kaiser (1974), mais peut être distinguée néanmoins. Son métabolisme oxydatif aérobie est intermédiaire entre celui des fibres IIB et IIA (Schiaffino et coll. 1985, 1989 ; Gorza 1990).

L'histochimie basée sur la mATPase montre un continuum entre les trois principaux types de fibres (Staron et coll. 1983) et suggère des différences de composition en myosine parmi ces fibres.

La description détaillée des protéines myofibrillaires (structure, fonction et polymorphisme) fera l'objet du chapitre suivant.

IV - LES PROTEINES CONTRACTILES ET LEUR POLYMORPHISME

L'actine et la myosine jouent un rôle central architectural, enzymatique et mécanique dans la contraction, alors que les troponines et la tropomyosine ont un rôle de régulation, contrôlant et modulant la contractilité en utilisant le signal calcium. Les propriétés fonctionnelles des différents muscles dérivent essentiellement de leur composition en protéines structurales et régulatrices. Ces protéines sont donc en rapport avec les différences de propriétés contractiles observées dans les fibres musculaires lentes ou rapides. La description de la structure, des sites fonctionnels puis du polymorphisme des principales protéines contractiles fait l'objet de ce chapitre.

Beaucoup de protéines existent sous différentes isoformes. Ce terme désigne des protéines originaires du même génome, d'activité biologique identique mais différentes par leur structure primaire. Une approche directe pour étudier ce polymorphisme est l'analyse électrophorétique en milieu dénaturant des protéines de fibres musculaires (Salviati et coll. 1982, 1984), qui permet de mettre en évidence les différentes isoformes de ces protéines. Une autre technique électrophorétique, en milieu non dénaturant, permet d'étudier le polymorphisme de la myosine sous sa forme native, donc sous sa forme hexamérique (chaînes légères + chaînes lourdes), (D'Albis et Gratzner 1973 ; Hoh 1975 ; Whalen et coll. 1981).

A - Les protéines du filament épais : la myosine

La myosine est une protéine asymétrique, hexamérique, composée de 4 chaînes légères (MLC) et de 2 chaînes lourdes (MHC) (Lowey et Risby 1971 ; Lowey et coll. 1979).

1 - Les chaînes lourdes de la myosine

a) *Structure et fonction*

L'association antiparallèle des "queues" de myosine (extrémité C-terminale de la protéine) permet l'organisation macromoléculaire en filaments épais (voir chapitre I-D). Les extrémités N-terminales des MHC (têtes S1) sont les sites de l'activité ATPasique et de la liaison à l'actine. Par protéolyse, des sous-domaines des régions S1 et S2 ont été définis : la taille de ces domaines est de 50, 25 et 20 kD (Fig. 8).

Le site de liaison de l'ATP se situe à la jonction des domaines 25 et 50 kD. Ce site a une structure en feuillet β et comprend une boucle d'acides aminés riche en résidus de glycine, comme la plupart des sites de liaison de nucléotides définis dans les ATPases et les kinases. Le (ou les) site(s) de liaison à l'actine implique(nt) les domaines de 50 et 20 kD. Le domaine de 20 kD, étendu et flexible, contient les sites de liaison des MLC et apparaît essentiel pour la fonction de la myosine et sa régulation (Cohen et Vibert 1987, pour revue).

b) *Polymorphisme*

Jusqu'aux années 70, deux isoformes de MHC étaient décrites dans les muscles squelettiques adultes : une lente et une rapide (Lowey et Risby 1971). Dans les années 80, l'analyse protéolytique des MHC de fibres isolées (Billeter et coll. 1981 ; Salviati et coll. 1982, 1984) et des études immunologiques (Billeter et coll. 1980) ont mis en évidence des isoformes de MHC distinctes dans des fibres de type différent (I, IIA, IIB). L'existence de ces trois isoformes de MHC (la MHC1 lente et les MHC2A et 2B rapides) fut confirmée par l'utilisation d'anticorps spécifiques (Danieli-Betto et coll. 1986 ; Schantz et Dhoot 1987). A ce jour, 9 isoformes de MHC ont été décrites dans le muscle squelettique de Mammifère : 5 isoformes rapides, 2 lentes et 2 "développementales". La migration électrophorétique des principales isoformes est schématisée à la figure 9.

• Les isoformes rapides

Les isoformes MHC2A et MHC2B sont exprimées dans de nombreuses espèces (Billeter et coll. 1981 ; Danieli-Betto et coll. 1986 ; Staron et Pette 1987b). Suite à la mise en évidence de fibres de type "2X" par immunohistochimie (Schiaffino et coll. 1985, 1989 ; Gorza 1990) l'isoforme de MHC spécifique de ces fibres, la MHC2X, a été identifiée par Schiaffino et coll. (1989) et Gorza (1990). Indépendamment, Bär et Pette (1988) avaient mis en évidence par analyse électrophorétique une isoforme de MHC particulièrement exprimée dans le diaphragme et donc dénommée MHC2D. Les MHC2X

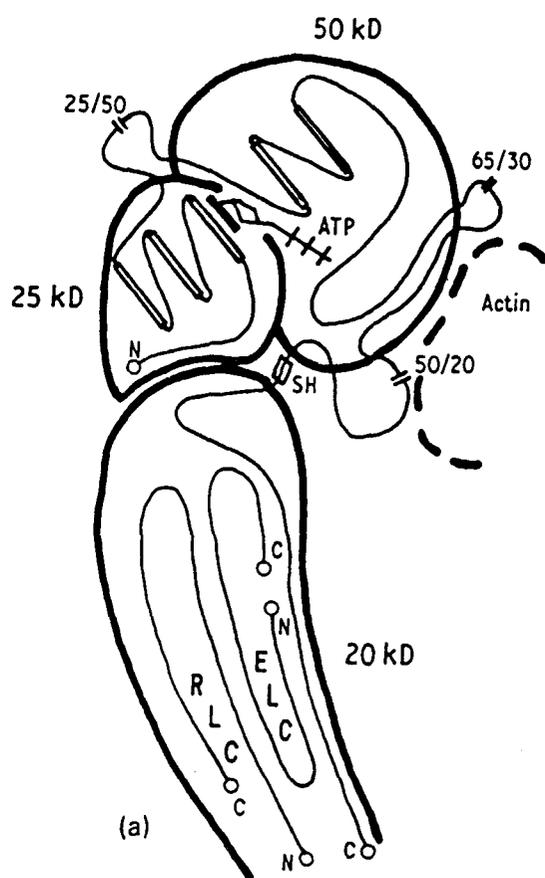


Figure 8 : La tête S1 de la myosine et ses sous-domaines (d'après Vibert et Cohen 1988)

et 2D présentent une mobilité électrophorétique similaire, intermédiaire entre celle de la MHC2B et celle de la MHC2A (Termin et coll. 1989 ; La Framboise et coll. 1990 ; Aigner et coll. 1993). L'identité de ces isoformes est fortement probable et en général acceptée.

Deux isoformes rapides additionnelles, très spécifiques, sont décrites dans certains muscles : une MHC "super rapide" présente dans les muscles maxillaires de carnivores (Rowlerson et coll. 1981 ; Mascarello et coll. 1982, 1983 ; Hoh et coll. 1988), et une MHC spécifique des muscles extraoculaires (MHCeom) (Wieczorek et coll. 1985 ; Sartore et coll. 1987).

- L'isoforme lente

Les fibres de type lent contiennent la MHC1 (Weeds et Burridge 1975 ; Gauthier et Lowey 1979 ; Pierobon-Bormioli et coll. 1980) identique à l'isoforme β cardiaque (Mahdavi et coll. 1987). Une isoforme additionnelle, la MHC1ton, est présente dans les fibres lentes toniques des muscles extraoculaires et des fibres intrafusales (Pierobon-Bormioli et coll. 1980 ; Mascarello et coll. 1982, 1983 ; Sartore et coll. 1987).

- Les isoformes exprimées au cours du développement

Deux isoformes sont exprimées au cours du développement, l'isoforme embryonnaire (MHCemb) et la néonatale (MHCnéo) (Whalen et coll. 1979, 1981 ; Carraro et Catani 1983 ; Butler-Browne et Whalen 1984). Ces isoformes sont encore exprimées dans certains muscles de Mammifères adultes [muscle extra oculaire (Wieczorek et coll. 1985 ; Sartore et coll. 1987), masséter murin (D'Albis et coll. 1986)], et lors de pathologies musculaires [muscle en régénération (Carraro et coll. 1983), dénervés (Schiaffino et coll. 1988), dystrophiques, fibres intrafusales et rhabdomyosarcomes (Schiaffino et coll. 1986a,b)]. Les différentes isoformes de MHC sarcomériques sont codées par une famille multigénique très liée (Mahdavi et coll. 1986). Sept membres de cette famille ont été mis en évidence chez le rat, ils codent pour la α MHC cardiaque, la β MHC cardiaque ou MHC1, la MHCemb, la MHCnéo, la MHC2A, la MHC2B et la MHCeom. Le niveau de conservation de la structure de ces gènes et leurs liaisons proches sur le même chromosome suggèrent que l'origine de ces différents gènes est liée à la duplication d'un gène ancestral commun. Plus récemment, De Nardi et coll. (1993) ont montré que la MHC2X était également le produit d'un gène spécifique.

L'expression de ces gènes est régulée de manière "tissu" spécifique et "développement" spécifique. Il a été démontré qu'elle était également sensible aux hormones thyroïdiennes et à différents facteurs tels que l'innervation, l'exercice, l'inactivation musculaire.

Le type de MHC exprimé dans une fibre musculaire est corrélé à l'activité de la mATPase mesurée par les techniques histochimiques (Staron et Pette 1986 ; Termin et coll. 1989). En effet, les MHC jouent un rôle majeur dans la vitesse d'hydrolyse de

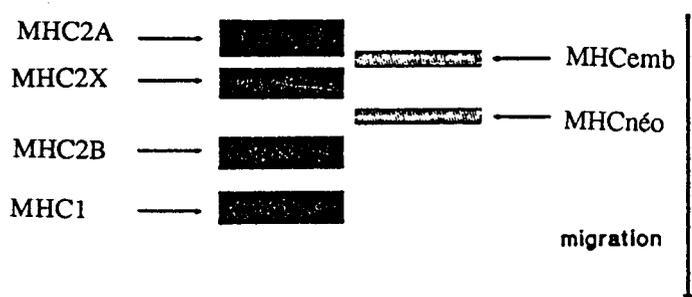


Figure 9 : Illustration schématique des mobilités électrophorétiques des isoformes des chaînes lourdes de la myosine de muscle squelettique de rat : MHC embryonnaire (MHCemb), MHC néonatale (MHCnéo), isoformes rapides d'adulte (MHC2A, 2X, 2B), isoformes lentes (MHC1) (d'après Termin et coll. 1989)

Designation	Nomenclature	Distribution ^a
Embryonic	HC _{emb}	Myotubes, extraocular muscle fibers, intrafusal fibers, regenerating fibers
Neonatal	HC _{neo}	Neonatal muscles, extraocular muscles, masseter, intrafusal fibers, regenerating fibers
Fast-twitch	HCIIb	IIB, IIBD and IIAB fibers
Fast-twitch	HCIIa	IIA, IIAB, IIDA, IIC, IC fibers
Fast-twitch	HCIIx (HC2x)	IID (2X), IIBD, IIDA fibers
Fast-twitch	HC _{eon}	Super-fast fibers in extraocular muscles
Fast-twitch	HCII _m	Super-fast fibers in muscles derived from the 1st branchial arch (identified in carnivores and primates)
Slow-twitch	HCI (β HC _{card})	Type I, IC, IIC fibers
Slow-tonic	HC _{ton}	Slow-tonic fibers in extraocular and tensor tympani muscles and intrafusal fibers

Tableau 1 : Isoformes des chaînes lourdes de la myosine identifiées dans les muscles squelettiques de Mammifères (d'après Pette et Staron 1990)

l'ATP, et cette activité ATPasique n'est pas identique pour les différentes isoformes de MHC.

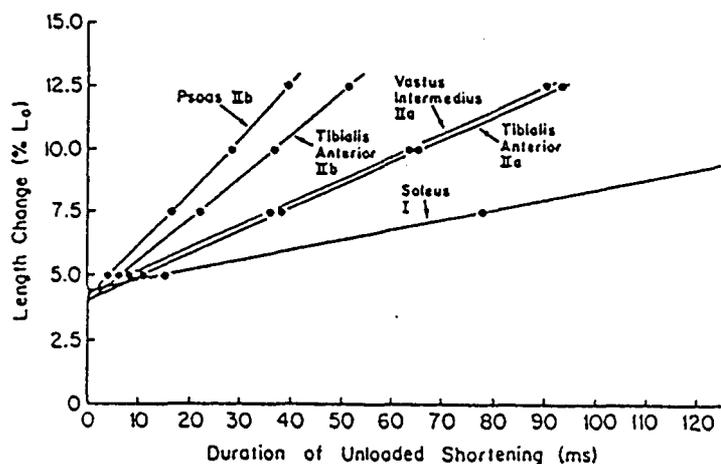
Généralement, une fibre musculaire exprime une isoforme de MHC correspondant à son typage histochimique. Le tableau 1 résume la distribution des différentes isoformes de MHC. Néanmoins, la co-expression de deux MHC ou plus a été mise en évidence dans certaines fibres (Danieli-Betto et coll. 1986 ; Salviati et coll. 1986 ; Staron et Pette 1987a,b ; Biral et coll. 1988). Ceci résulte en une multiplication des types de fibres.

Le pourcentage de fibres hybrides, fibres co-exprimant 2 types de MHC ou plus, est variable selon les espèces et est augmenté dans des conditions de transformation musculaire (Staron et coll. 1987).

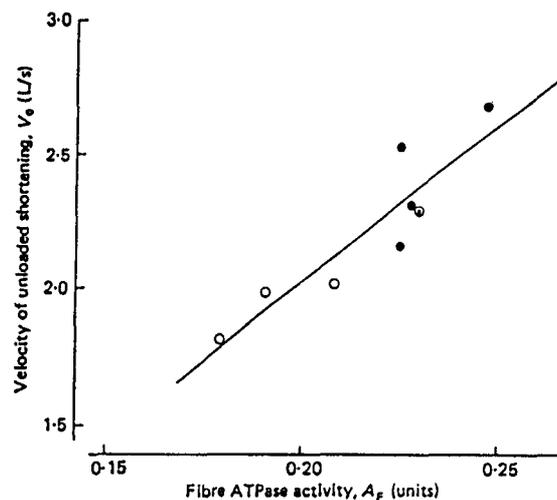
Au niveau du typage des fibres par les techniques histochimiques, cette co-expression se traduit par l'existence de fibres intermédiaires : la population IIAB quand les isoformes 2A et 2B sont exprimées, et la population C qui correspond aux fibres co-exprimant les isoformes 2A et 1 (Staron et Pette 1986). La population C est elle-même subdivisée en fonction du contenu relatif en isoformes : les fibres IC expriment surtout la MHC1 et un peu de MHC2A, les IIC expriment une quantité équivalente de MHC1 et de MHC2A, les IIAC expriment majoritairement la MHC2A avec un peu de MHC1. Selon l'analyse des isoformes de MHC, les fibres apparaissent comme un continuum, plutôt que comme 3 ou 4 types discrets définis selon les analyses histochimiques de l'activité de la mATPase.

L'activité mATPasique d'une fibre musculaire (Fig. 10A et B), ainsi que le type de MHC exprimé par cette fibre, sont corrélés à sa vitesse de contraction (Reiser et coll. 1985 ; Edman et coll. 1988 ; Sweeney et coll. 1988). Des études sur fibres isolées de rat et de lapin ont montré que les fibres de type 2B présentaient une vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}) significativement supérieure à celle de type 2A (Sweeney et coll. 1986, 1988 ; Eddinger et Moss 1987). Des études plus récentes ont permis de déterminer l'évolution croissante des vitesses en fonction de l'isoforme de MHC exprimée par la fibre : $1 < 2A < 2X < 2B$ (Bottinelli et coll. 1991). La corrélation entre la V_{max} et la composition en MHC a été également démontrée pour les fibres de la population C dans le soleus de rat (Reiser et coll. 1987a) dans l'ordre des vitesses croissantes $I < IC < IIC < IIAC < IIA$. L'augmentation de la V_{max} semble donc liée à la quantité de MHC2A présente dans la fibre (Fig. 10C).

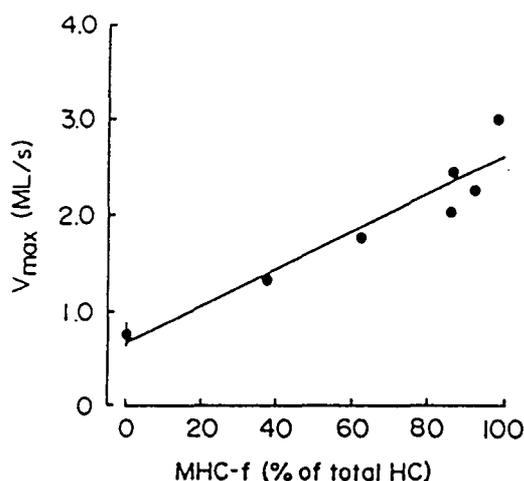
A



B



C



D

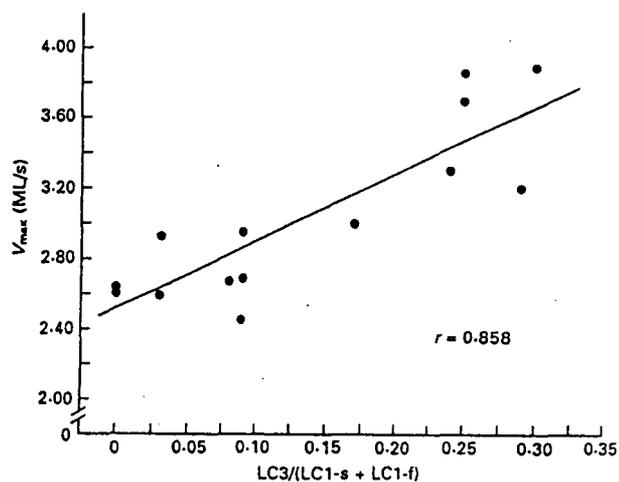


Figure 10 : Corrélation entre la vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}) et l'activité ATPasique (en A et B), la composition en chaînes lourdes de myosine (MHC, en C) et la composition en chaînes légères de la myosine (MLC, en D), de fibres musculaires isolées

A - Mesure de la V_{max} de fibres de typage histochimique différent, isolées de muscles de la patte postérieure de lapin (d'après Sweeney et coll. 1988)

B - Relation entre la V_{max} et l'activité ATPasique de fibres isolées de tibialis antérieur de *Rana temporaria*. (●) fibres à faible activité ATPasique, lentes et (○) fibres à forte activité ATPasique, rapides (d'après Edman et coll. 1988)

C - Relation entre la V_{max} de fibres isolées de soleus de lapin et la quantité relative de l'isoforme rapide de MHC (MHCf) (d'après Reiser et coll. 1985)

D - Relation entre la V_{max} de fibres isolées de plantaris de lapin et la quantité relative de MLC3 (d'après Greaser et coll. 1988)

2 - Les chaînes légères de la myosine

a) Structure et fonction

Quatre MLC sont associées aux 2 têtes de la MHC de manière non covalente.

Elles sont constituées :

- d'une paire de MLC phosphorylables ou régulatrices, les MLC2 ou RLC, encore dénommées "DNTB LC" en raison de leur dissociation des MHC par la 5-5'-dithiobis(2 nitro benzoic acid) ou DNTB.

- d'une paire de MLC non phosphorylables ou essentielles (ELC), encore dénommées "alkali light chains" en raison de leur dissociation des MHC en milieu alcalin (pH 11). Deux types d'ELC sont décrits : les MLC1 et MLC3.

A chaque tête de myosine sont associées une RLC (MLC2) et une ELC (MLC1 ou MLC3) dans le sous-domaine de 20kD (Fig. 6). Sur la base des homologues de séquences, les deux types de MLC appartiennent à la famille des protéines régulatrices liant le Ca, comprenant également la TnC et la calmoduline (Baba et coll. 1984). Elles contiennent 4 sous-domaines de liaison du Ca qui ont perdu leur fonctionnalité. Cependant, pour les RLC, un sous-domaine (le sous-domaine 1) a gardé son affinité pour les cations divalents. Ce sous-domaine liant le Ca et le Mg est nécessaire à la structure et à la fonction de la MLC2 (Goodwin et coll. 1990). Les MLC sont reliées par leur extrémité N-terminale à la jonction "tête-queue" des MHC (Yamamoto et coll. 1985). Une liaison entre l'extrémité C-terminale de la MLC1 et l'actine est également évoquée.

Le rôle des MLC est encore mal défini (Kunz et coll. 1985). Leur localisation sur les MHC suggère cependant qu'elles pourraient avoir un rôle modulateur sur les interactions entre l'actine et la myosine (Moss et coll. 1982 ; Schaub et coll. 1986). Lowey et coll. (1993) ont récemment étudié la mobilité *in vitro* et l'activité ATPasique de molécules de MHC reconstituées avec l'un des deux types de MLC (ELC ou RLC), ou les 2. Selon ces auteurs, la tête de myosine isolée fonctionnerait comme une ATPase actine-activée et fournirait un travail mécanique minimum. L'interaction entre les MLC et les têtes de myosine serait nécessaire pour la conversion de l'énergie chimique produite par l'hydrolyse de l'ATP en un mouvement rapide.

Il semble que les RLC n'aient pas un rôle essentiel dans les muscles squelettiques, contrairement à leur rôle prépondérant dans l'activation et la régulation de la contraction des muscles lisses (Persechini et coll. 1985). Cependant, ces RLC influenceraient les propriétés mécaniques des fibres musculaires, notamment la vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}), selon Moss et coll. (1982). La phosphorylation de la RLC n'est pas nécessaire pour obtenir une contraction, mais interviendrait dans sa régulation. Une "light chain kinase" spécifique, activée par le complexe Ca/calmoduline, assure la phosphorylation de la MLC2, qui dépend donc de la concentration en Ca, mais également de la fréquence de stimulation du muscle. L'effet de la phosphorylation des MLC2 sur la mATPase est encore controversé (Crow et Kushmerick 1982 ; Butler et

coll. 1983) et ne semble pas modifier la V_{max} (Sweeney et coll. 1993). De récentes observations montrent que la phosphorylation de la MLC2 entraîne un changement de la conformation de cette MLC et de celle des MHC. Cette altération de la conformation faciliterait le mouvement des têtes de myosine sur le filament d'actine. Il est également proposé que la phosphorylation de la MLC2 entraîne une augmentation de la tension en augmentant la sensibilité du système contractile au Ca (Sweeney et coll. 1993). Ce point sera détaillé au chapitre V-C-2.

Le rôle des ELC serait plus structural : il assure le maintien de la conformation des têtes de la myosine (Lowey 1986). Une corrélation entre la V_{max} et la composition en ELC, dans les muscles rapides, est également suggérée (Sweeney et coll. 1988 ; Greaser et coll. 1988 ; Moss et coll. 1990) (Fig. 10D).

b) Polymorphisme

Les muscles rapides contiennent chez l'adulte 2 types d'ELC rapides (MLC1f-MLC3) et un type de RLC rapide : la MLC2f. Les muscles lents contiennent les isoformes lentes : un type d'ELC, la MLC1s, et un type de RLC, la MLC2s (Lowey et Risby 1971 ; Weeds et Lowey 1971). Les différentes isoformes de MLC sont codées par une famille multigénique (Barton et Buckingham 1985, pour revue) dont l'expression est régulée selon le tissu et le stade de développement. Les MLC1f et MLC3f sont codées par le même gène dont les transcrits subissent un épissage différent (Barton et Buckingham 1985). Les MLC1s et MLC2s sont identiques aux MLC ventriculaires cardiaques (Lowey et Risby 1971 ; Dalla Libera 1988). La MLC1 ventriculaire et la MLC1s sont codées par un seul gène chez le rat (Periasamy et coll. 1989).

Dans certaines espèces, deux ELC ont été identifiées : la MLC1sa et la MLC1sb (Weeds 1976 ; Schachat et coll. 1980 ; Biral et coll. 1982). Elles diffèrent légèrement par leur poids moléculaire et leur pH_i sont distincts. Les quantités de MLC1sa et la MLC1sb varient entre les muscles homologues de différentes espèces (Carraro et coll. 1981a), entre différents muscles d'une même espèce (Schachat et coll. 1980 ; Biral et coll. 1982) et même entre fibres de typage histochimique similaire (Salviati et coll. 1982 ; Staron et Pette 1987a,b). La séparation électrophorétique des MLC a permis de décrire un grand nombre de variants pour toutes leurs isoformes chez l'adulte (Pernelle et coll. 1986, 1988). De plus, une ELC embryonnaire a été mise en évidence chez le rat (Whalen et coll. 1978, 1982) et chez l'homme (Biral et coll. 1984).

En général, les MLC rapides sont présentes dans les fibres rapides et les MLC lentes dans les fibres lentes (Pette et coll. 1979 ; Schachat et coll. 1980 ; Billeter et coll. 1982 ; Salviati et coll. 1982, 1984). Cependant, un spectre d'isoformes de MLC particulier ne se combine pas forcément avec un type spécifique de MHC (Staron et Pette 1986, 1987a) : la coexistence de MLC lentes et rapides fut observée dans des fibres ne contenant qu'un type de MHC, lente ou rapide. La myosine, sous sa forme hexamérique,

peut donc exister sous de nombreuses formes, les isomyosines, selon les différents assemblages de MLC et MHC.

3 - Les isozymes de la myosine

Des techniques d'électrophorèses réalisées dans des conditions non dénaturantes ont permis de détecter les isomyosines, correspondant aux isoformes de la structure hexamérique de la myosine (D'Albis et Gratzner 1973 ; Hoh 1975). Chaque isomyosine contient 2 MHC combinées avec 2 RLC et 2 ELC.

Pour les fibres rapides, sur la base de la composition en MLC, 3 isomyosines sont décrites : la FM1 $[2(\text{MHCf})+2(\text{MLC2f})+2(\text{MLC3f})]$; la FM2 $[2(\text{MHCf})+2(\text{MLC2f})+(\text{MLC1f}+\text{MLC3f})]$; la FM3 $[2(\text{MHCf})+2(\text{MLC2f})+2(\text{MLC1f})]$ (D'Albis et coll. 1982). Pour les fibres lentes, l'isoforme lente de la chaîne lourde MHC1 s'associe à 2 ELC différentes (MLC1sa et MLC1sb) pour former : la SM1 $[2(\text{MHC1})+2(\text{MLC2s})+2(\text{MLC1sa})]$; la SM2 $[2(\text{MHC1})+2(\text{MLC2s})+(\text{MLC1sa}+\text{MLC1sb})]$ et la SM3 $[2(\text{MHC1})+2(\text{MLC2s})+2(\text{MLC1sb})]$ (Maréchal et coll. 1989 ; Termin et coll. 1990).

Une isomyosine intermédiaire rapide, IM, de mobilité électrophorétique intermédiaire entre les isomyosines lentes et la FM3 a été décrite (D'Albis et coll. 1982 ; Fitzsimons et Hoh 1983). Cette isomyosine est présente dans les muscles contenant des fibres de type IIA. L'isomyosine IM de soleus de rat contiendrait $[2(\text{MHC2A})+2(\text{MLC2f})+(\text{MLC1s}+\text{MLC1f})]$, alors que l'IM de muscle rapide contiendrait $[2(\text{MHC2A})+2(\text{MLC2f})+2(\text{MLC1f})]$ (Fitzsimons et Hoh 1983 ; Maréchal et coll. 1989). Pour chaque type d'isoforme de MHC, 3 isomyosines basées sur les MLC peuvent donc être décrites dans le muscle adulte. De plus, des isomyosines spécifiques des stades embryonnaires et néonataux sont décrites. Elles correspondent aux différentes associations des MHC embryonnaires et néonatales avec les MLC embryonnaires et les MLCf adultes (Hoh et Yeoh 1979).

La coexistence de myosines lentes et rapides dans une fibre isolée multiplie le nombre théorique d'isozymes possibles. Le nombre d'isozymes détectées par électrophorèse est de plus en plus grand (Maréchal et coll. 1984 ; D'Albis et coll. 1988 ; Termin et coll. 1990).

B - Les protéines du filament fin

1 - L'actine

a) *Structure et fonction*

L'actine est l'un des principaux composants du filament fin. Les molécules d'actine globulaire (actine G, 375 acides aminés) se polymérisent pour former les longs filaments d'actine F. La polymérisation de l'actine ne nécessite pas d'énergie et peut être

induite *in vitro* par une augmentation de la concentration saline jusqu'à un niveau proche du niveau physiologique. L'actine stimule l'activité mATPasique. Chaque molécule d'actine possède un site de liaison pour la tête S1 de la myosine. L'actine est donc un élément architectural essentiel de la contraction.

L'actine est une protéine présente à la fois dans les tissus musculaires et non musculaires. La séquence en acides aminés de cette protéine varie très peu entre les différentes sources (Vandekerkhove et Weber 1979). Cette nature conservative de l'actine montre l'importance de ses capacités de liaison avec de nombreuses autres protéines (Obinata et coll. 1981).

b) Polymorphisme

L'actine musculaire existe sous 2 isoformes : l' α actine cardiaque et l' α actine squelettique (Whalen et coll. 1976 ; Vandekerkhove et Weber 1979). Malgré la grande homologie de ces isoactines, il semble que leur différence soit localisée sur un peptide essentiel se liant spécifiquement à la myosine (Sutoh 1982). Les 2 gènes de l' α actine sont exprimés aux stades initiaux du développement musculaire, alors que chez l'adulte l' α actine squelettique est prédominante (Buckingham et coll. 1984 ; Hayward et Schwartz 1986). Les isoformes d' α actine des différents types de fibres de muscles de Mammifères adultes semblent identiques (Billeter et coll. 1982).

2 - La tropomyosine (Tm)

a) Structure et fonction

La Tm est une protéine composée de 2 sous-unités (PM = 2x33 kD, 284 acides aminés) (Woods 1967). Chacune d'elle, enroulée en hélice α , correspond à la répétition d'une séquence de 7 acides aminés. Deux types de sous-unités différentes mais présentant une grande similitude ont été isolés : l' α Tm et la β Tm (Cummins et Perry 1973). La Tm existe donc sous forme d'homodimères (α/α et β/β) ou d'un hétérodimère (α/β). Les dimères de Tm s'associent en une organisation supramoléculaire : un filament de 40nm. Cette auto-association est réalisée par le recouvrement "tête-queue" (sur 8 ou 9 acides aminés) des Tm ; elle est facilitée par la présence de TnT. Les séquences N et C-terminales sont particulièrement importantes pour la polymérisation "tête-queue" des molécules de Tm. La tropomyosine est donc en contact avec 7 monomères d'actine. Le rôle de la Tm a été décrit au chapitre II-A-3. Dans le muscle squelettique et cardiaque, la Tm possède les sites de fixation à l'actine mais également 2 domaines de liaison à la TnT. La séquence complète des Tm des muscles striés est très conservée (plus de 85%) (Lees-Miller et Helfman 1991, pour revue)

b) Polymorphisme

Le rapport des sous unités α/β apparaît être spécifique de l'espèce (Cummins et Perry 1973) et du muscle (Roy et coll. 1979 ; Cararro et coll. 1981b). Le rapport α/β serait de 4 dans les muscles rapides et de 1 dans les muscles lents. Dans les muscles

rapides, les combinaisons de sous-unités les plus exprimées sont l'homodimère α/α et l'hétérodimère α/β (Brown et Schachat 1985). Des études sur fibres isolées ont montré une prédominance de la sous-unité β dans les fibres lentes et de la sous-unité α dans les fibres de type IIB (Salviati et coll. 1982). Deux isoformes (lentes et rapides) de la sous-unité α ont été identifiées (Bronson et Schachat 1982 ; Salviati et coll. 1982 ; Heeley et coll. 1983). La complexité du système de Tm peut être encore plus importante puisque des sous-unités différentes ont été détectées dans les muscles squelettiques de lapin (Heeley et coll. 1983). Des techniques électrophorétiques à haute résolution ont séparé les sous-unités de Tm de muscle de lapin en 6 composants (Pernelle et coll. 1986). Cependant, aucun effet des différentes isoformes sur les propriétés fonctionnelles des muscles n'a été montré.

De plus, ces nombreuses combinaisons semblent être co-exprimées avec des isoformes spécifiques de TnT (Schachat et coll. 1985a, 1987), ce qui donne une dimension supérieure à la complexité du système.

Les sous-unités de la Tm sont codées par 2 gènes différents. Le gène de l' α Tm est le plus complexe et contient 15 exons chez le rat, dont 5 seulement sont communs à tous les mRNA exprimés (Wieczorek et coll. 1988). Le mRNA de la sous-unité α existe sous 6 isoformes "tissu" spécifiques (Ruiz-Opazo et Nadal-Ginard 1987). La spécificité tissulaire de l' α et β Tm ainsi que les différentes isoformes de la sous-unité α sont obtenues par épissage alternatif.

3 - La troponine C (TnC)

La TnC est une protéine monocaténaire de 160 acides aminés (PM=18,5 kD), très acide (pHi de 4,1 à 4,4), sensible à la concentration de Ca libre (Greaser et Gergely 1973). Elle appartient à la famille multigénique des protéines liant le Ca (calmoduline, parvalbumine, MLC...).

a) Structure et fonction

La TnC du muscle squelettique rapide possède 4 sites de liaison du Ca (de I à IV en partant de l'extrémité N-terminale) (Fig. 11). Chaque domaine de liaison est une boucle de 12 acides aminés, flanquée de deux hélices α , identique au domaine liant le Ca de la parvalbumine (Kretzinger 1980). Cette boucle est riche en résidus d'acides aminés responsables de la coordination de ce cation (Zot et coll. 1983)

Dans la TnC, 2 classes de sites de liaison du Ca ont été différenciées, selon leur affinité et leur sélectivité : 2 sites N-terminaux (I et II) spécifiques du Ca, à faible affinité et 2 sites C-terminaux (III et IV) liant le Ca et le Mg mais à forte affinité (Potter et Gergely 1975).

Des données biochimiques et cinétiques montrent que seuls les sites à faible affinité interviendraient dans le déclenchement de la contraction musculaire (Johnson et

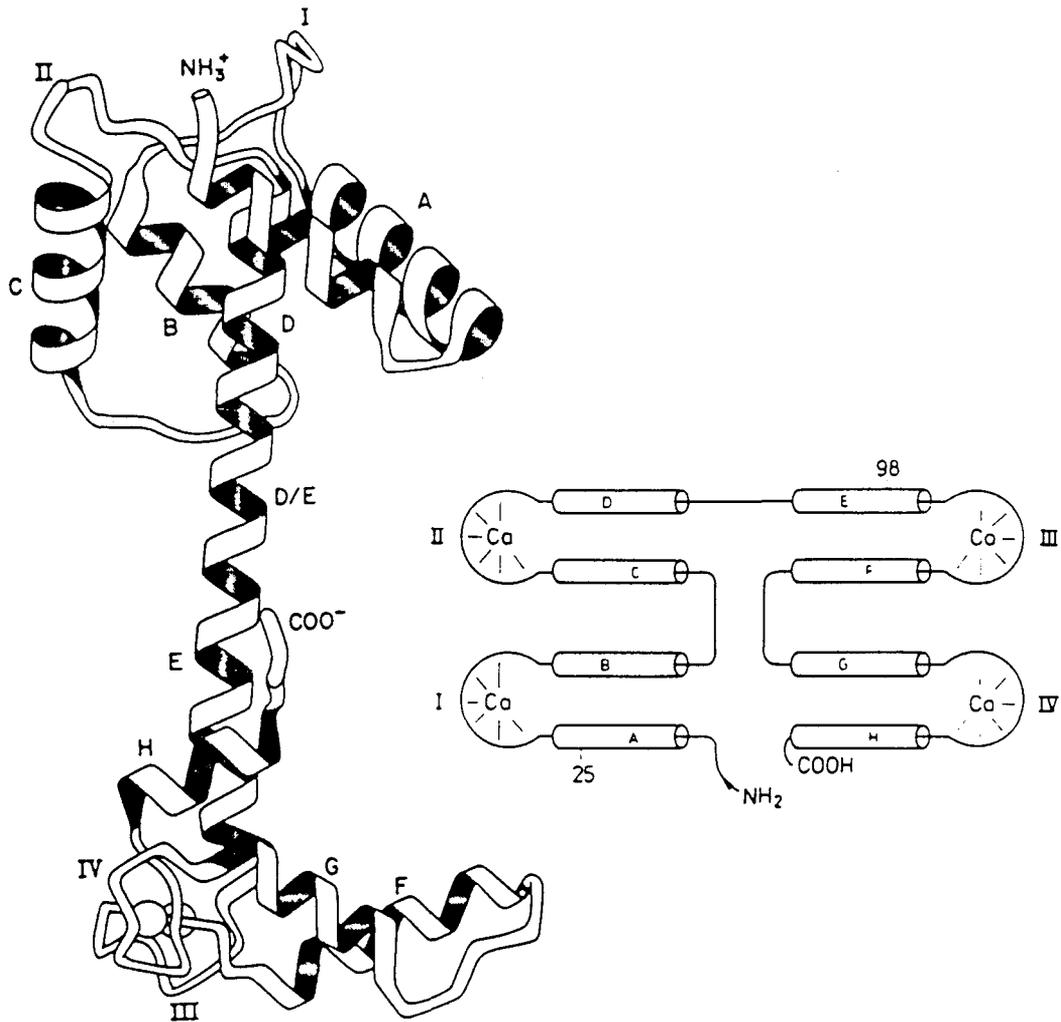


Figure 11 : Structure de la troponine C (d'après Potter et Johnson 1982)

coll. 1979 ; Robertson et coll. 1981) alors que les sites Ca-Mg à haute affinité joueraient un rôle structural pour la maintien de l'intégrité de la molécule de Tn (Zot et Potter 1982). En effet, la fixation du Ca aux sites Ca-Mg nécessite de déplacer le Mg occupant ces sites dans le muscle au repos. La dissociation lente du Mg et la fixation du Ca sur les sites III et IV ne peut donc rendre compte de la cinétique de développement et de relaxation de la contraction.

Les études de liaison du Ca et d'autres ions aux sites de la TnC ont montré que le Ca pouvait être déplacé par d'autres cations divalents, dont l'efficacité, dans l'ordre décroissant est Cd>Sr>Pb>Mn (Fuchs 1971). L'activation par le Sr sera détaillée au chapitre VI.

Le rôle de la TnC dans le mécanisme de contraction est important, comme l'indique le degré de conservation de la structure de cette protéine au cours de l'évolution.

b) Polymorphisme

La TnC existe sous 2 isoformes : la TnC rapide (TnCf, pour TnC fast) et la TnC lente (TnCs, pour TnC slow). La TnC lente est identique à la TnC cardiaque (Wilkinson 1980 ; Gahlmann et coll. 1988). Ces 2 isoformes de TnC sont codées par 2 gènes distincts, ces gènes étant 2 copies d'un gène unique (Parmacek et Leiden 1989, 1991). L'expression de ces gènes est spécifique du tissu et du stade de développement.

Les TnCf et TnCs sont distinctes mais très proches structurellement. Une substitution de nucléotides dans le gène de la TnCs, dans la région codant pour le site I, rend ce site non fonctionnel (Holroyde et coll. 1980 ; Johnson et coll. 1980). La TnCs ne possède donc qu'un seul site spécifique à faible affinité correspondant au site II de la TnCf. Des mutants de TnC ont été construits par des techniques de biologie moléculaire pour étudier l'implication des sites I et II dans la contraction musculaire. Ils ont permis de montrer que ces sites ne sont pas équivalents : une TnC dont le site I est fonctionnel et le site II non fonctionnel ne joue plus son rôle dans le déclenchement de la contraction. Dans la TnC lente, le site I ne fixerait pas le Ca mais modulerait les interactions du Ca avec le site II et serait donc indispensable pour déterminer les propriétés fonctionnelles de la molécule (Sweeney et coll. 1990 ; Gulati et coll. 1992).

4 - La troponine T (TnT)

a) Structure et fonction

La TnT est la plus grande des trois molécules de troponines (13nm, PM 31 kD), elle est composée d'une chaîne mono-peptidique de 259 acides aminés en forme d'épingle à cheveux (Pearlstone et Smillie 1976). Dans le complexe natif, la TnT est phosphorylée sur l'un de ses trois sites phosphorylables. Le rôle physiologique de cette phosphorylation n'est pas déterminé. La TnT possède des liaisons fortes avec la Tm et la TnI, mais des interactions entre la TnT et la TnC sont possibles. La partie N-terminale de

la TnT est fonctionnellement importante puisqu'elle est responsable de la liaison avec la tropomyosine, elle stabilise donc l'interaction du complexe régulateur Tm-Tn.

b) Polymorphisme

Six isoformes rapides (TnTf) et deux isoformes lentes (TnTs) ont été identifiées dans les muscles de Mammifères (Briggs et coll. 1987 ; Härtner et coll. 1989). Les isoformes rapides majeures dans les muscles de Mammifères sont la TnT1f, TnT2f, TnT3f et TnT4f. Les TnT5f et TnT6f sont deux isoformes mineures. Les isoformes lentes sont la TnT1s et la TnT2s (Schmitt et Pette 1988). Les différents états de phosphorylation des TnT augmentent le nombre d'isoformes lentes et rapides (Briggs et coll. 1987 ; Härtner et coll. 1989 ; Schachat et coll. 1990).

L'expression d'un grand nombre de TnT rapides est le résultat d'un épissage alternatif des transcrits primaires de mRNA (Wilkinson et coll. 1984 ; Smillie et coll. 1988). La distribution de ces différentes isoformes de TnT rapides semble être dépendante de la composition en sous-unités de Tm. La TnT1f est préférentiellement combinée à l'hétérodimère de la Tm α/β , la TnT2f à l'homodimère α/α , la TnT3f à l'hétérodimère α/β ou à l'homodimère β/β (Moore et Schachat 1985). Les combinaisons TnTf/Tm semblent exprimées selon un continuum, et selon Schachat et coll. (1990) ne sont pas corrélées avec les sous-types de fibres rapides chez le lapin. Les fibres lentes contiennent presque exclusivement les isoformes TnT1s et TnT2s, alors que ces isoformes peuvent être trouvées dans les fibres rapides (Moore et coll. 1987).

Une corrélation entre la distribution des isoformes des TnT et des MHC a été établie. La MHC2B est co-exprimée avec la TnT2f, et la 2A avec la TnT3f (Fig. 12). La MHC 2X coexiste avec la TnT3f et la TnT4f. Les fibres contenant la MHC1 expriment la TnT1s et une faible quantité de TnT2s (Schmitt et Pette 1990). Ces isoformes diffèrent en partie par leur extrémité N-terminale (Briggs et Schachat 1989). Une relation entre la sensibilité au Ca et les différentes isoformes de TnT et de Tm a été observée (Schachat et coll. 1987, 1990 ; Greaser et coll. 1988).

5 - La troponine I (TnI)

a) Structure et fonction

La TnI est une protéine globulaire de PM 23kD. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 179 acides aminés (dont 44 résidus basiques et 35 résidus acides). Son pHi est de 9,3 (Wilkinson 1974).

Deux séries de résidus comprenant beaucoup d'acides aminés basiques correspondent aux sites d'interactions avec les autres protéines du filament fin. Dans chaque site de liaison (à la TnC et à la Tm), un résidu est phosphorylable par une enzyme musculaire (Syska et coll. 1976). Kobayashi et coll. (1991) ont mis en évidence une interaction entre les extrémités N et C-terminales de la TnC et le site inhibiteur de la TnI.

Ces interactions sont très importantes puisqu'elles sont le siège de modification quand la TnC est occupée par le Ca. La TnI est inhibitrice de la mATPase et de l'interaction entre l'actine et la myosine. Cette action inhibitrice ne peut être levée qu'en présence de TnC et de Ca (Hartshorne et coll. 1969).

b) Polymorphisme

Deux isoformes, une lente et une rapide, ont été décrites dans le muscle squelettique (Härtner et Pette, 1990). Seule l'isoforme rapide semble phosphorylable. La partie de la molécule de TnI impliquée dans l'interaction entre la TnC et l'actine est la plus conservée structurellement alors que le reste de la molécule présente de fortes variations entre les isoformes (Wilkinson et Grand 1978). La TnI est partiellement phosphorylée dans la Tn fraîchement isolée de muscle squelettique rapide. Un rôle fonctionnel de cette phosphorylation est donc envisageable. La phosphorylation d'un site de l'isoforme cardiaque de la TnI diminue la sensibilité de la mATPase au Ca (Solaro et coll. 1976) ; mais un tel rôle n'a pas été mis en évidence sur la TnI de muscle squelettique.

Le tableau 2 résume le polymorphisme des principales protéines contractiles.

C - Les autres protéines myofibrillaires

D'autres protéines accessoires maintiennent l'architecture de la myofibrille et lui procurent son élasticité. La localisation de la majorité de ces protéines fut déterminée par des méthodes immunocytochimiques.

1 - L' α actinine (Fig. 13)

a) Structure et fonction

L' α actinine (α act) est une protéine d'ancrage à l'actine, organisée en un dimère de sous-unités de 95 kD chacune (Langner et Pepe 1980). Le domaine de liaison à l'actine est très conservé et présente des homologies avec celui de la spectrine et de la calmoduline (Baron et coll. 1987). Cette protéine, constituant majeur du disque Z, relie les filaments d'actine en faisceaux parallèles dans cette région (Takahashi et Hattori 1989).

b) Polymorphisme

Des études ultrastructurales ont montré que l'arrangement et l'épaisseur du disque Z variaient en fonction du type de fibre (Eisenberg et Salmons 1981). 3 isoformes de l' α actinine ont été décrites et sont spécifiques du muscle : 2 isoformes rapides (α act 1f et 2f) et une isoforme lente (α act s) (Kobayashi et coll. 1984). Schachat et coll. (1985b) ont mis en évidence l'identité entre l' α act 1f et l' α act s. Il apparaît que l'expression des isoformes de l' α act est liée à celle des complexes Tm/TnT. Cette relation

MHC	MLC		Tn			Tm	Actine
	ELC	RLC	TnC	TnI	TnT		
α	MLC1f	MLC2f	TnCf	TnIf	TnTf	α	α squelettique
$\beta/1$	MLC3	MLC2s	TnC _{s/c}	TnI _s	TnT _s	β	α cardiaque
1ton	MLC1emb=MLC1A	MLC2A=MLC2V		TnI _c			
2A	MLC1sa=MLC1V						
2B	MLC1sb						
2X							
eom							
super fast							
emb							
neonat							

Tableau 2 : Polymorphisme des protéines contractiles des muscles striés de Mammifères

Abbréviations :

MHC : chaînes lourdes de la myosine - MLC : chaînes légères de la myosine

ELC : chaînes légères essentielles - RLC : chaînes légères régulatrices

Tn : troponine - Tm : tropomyosine

1ton : 1 tonique - eom : muscle extraoculaire - emb : embryonnaire - neo : néonatale

"f" : fast - "s" : slow - "c" : cardiaque - "A" : atriale - "V" : ventriculaire

a été particulièrement démontrée entre l'expression de l' α actinine et des TnT rapides (Schachat et coll. 1985b). Le disque Z des fibres exprimant l' α act 1f/s est plus épais que ceux des fibres exprimant l' α act 2f.

2 - La bande M (Fig. 13)

Elle est constituée de 3 protéines : la protéine M (PM 165 kD), la myoméline (185 kD) et la MM créatine kinase.

La myoméline réticule les filaments de myosine adjacents au niveau de la ligne M pour produire un assemblage hexagonal. Des isoformes de la protéine M ont été détectées par l'analyse électrophorétique de fibres isolées (Salviati et coll. 1982 ; Staron et Pette 1987a) et seraient responsables des différences observées sur l'ultrastructure de la bande M (Thornell et coll. 1987, 1990).

3 - La protéine C

C'est une protéine de liaison de la myosine présente de part et d'autre de la ligne M du filament épais (Fig. 13). Des expériences d'extraction spécifique dans des fibres isolées montrent que cette protéine pourrait intervenir sur la vitesse de contraction à des concentrations calciques faibles, en agissant comme une contrainte limitant la zone d'interaction des ponts actine-myosine. Deux isoformes de la protéine C furent mises en évidence dans les fibres de muscle squelettique adulte : une lente et une rapide (Yamamoto et Moos 1983 ; Takano-Ohmuro et coll. 1989). Leur distribution ne semble pas suivre le type histochimique des fibres et ces 2 isoformes peuvent être exprimées dans les fibres rapides (Dhoot et coll. 1985). Des isoformes supplémentaires et "développementales" ont été décrites plus récemment (Takano-Ohmuro et coll. 1989).

4 - Les protéines H (PM 74 kD) et X (PM 135 kD)

Elles ont été isolées dans le muscle squelettique et localisées dans le filament épais. La distribution des protéines C, H et X et leur quantité relative semblent dépendre du type de fibre (Starr et coll. 1985).

5 - La titine et la nébuline

Des protéines cytosquelettiques de haut poids moléculaire ont été isolées : la titine (Wang et coll. 1979) ou connectine (Maruyama et coll. 1981) et la nébuline (Wang et Williamson 1980). Ces protéines architecturales très insolubles, se présentent sous forme de filaments et sont localisées à l'extérieur et dans le sarcomère (Pierobon-Bormioli et coll. 1989). La titine est une protéine myofibrillaire de PM 2800kD. Cette molécule est orientée parallèlement aux filaments fins et épais et s'étend de la ligne M au disque Z (Fig. 13).

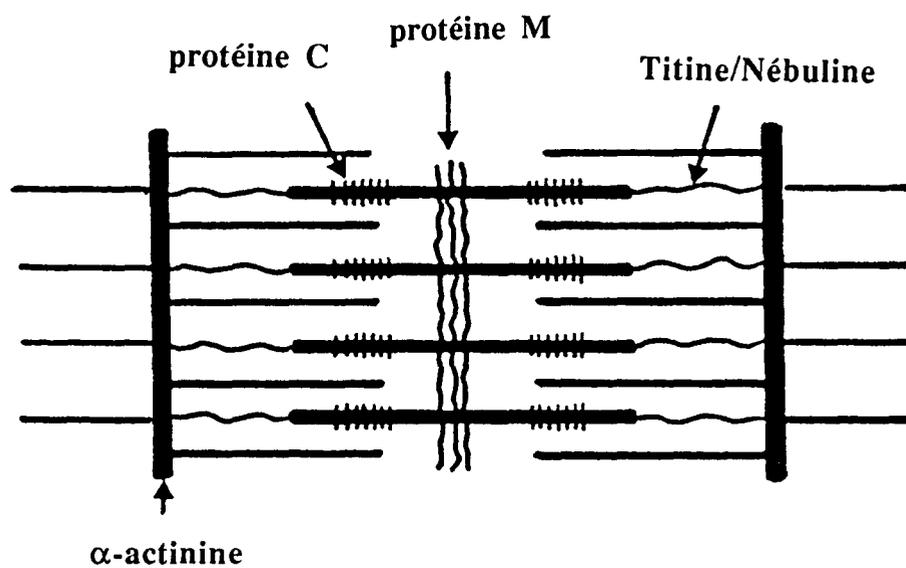


Figure 13 : Autres protéines de structure du sarcomère (d'après Jones et Round dans "Skeletal muscle in health and disease" Ed. Manchester Univ. Press, 1990)

Ces 2 protéines sont impliquées dans l'élasticité passive de la myofibrille (Wang 1984) et contrôlent la position du filament épais durant la contraction (Horowitz et Podolsky 1987). Elles servent de guide pour l'assemblage et la régulation de la longueur des filaments fins et épais (Wang et Wright 1988).

V - LES INTERACTIONS ENTRE LE CALCIUM ET LES PROTEINES CONTRACTILES

L'augmentation du calcium libre intracytoplasmique induit la contraction de la machinerie contractile. L'ablation du sarcolemme (ou pelage) des fibres musculaires permet d'isoler cette machinerie contractile, qui devient directement accessible aux ions. La concentration du Ca libre dans le milieu environnant la fibre peut donc être maîtrisée ; l'étude de la réponse contractile en fonction d'une concentration de Ca fixée est alors possible.

A - La relation tension/taux de calcium

Les premiers "pelages" de fibres ont été réalisés mécaniquement par Natori en 1954. Depuis, des méthodes de pelage chimique utilisant des chélateurs du Ca ont été développées et permettent d'obtenir plus facilement des fibres dont la membrane est perméabilisée (Wood et coll. 1975).

Le milieu environnant les fibres musculaires pelées doit contenir de l'ATP, puisque ces fibres sont incapables d'en synthétiser en l'absence de substrats ajoutés. Il doit également ressembler le plus possible au myoplasme puisque le pH, la concentration en magnésium, la force ionique et la température affectent la réponse de la structure contractile au Ca (Ashley et Moisescu 1977 ; Godt et Lindley 1982). Dans les premières expériences réalisées sur fibres pelées, il était difficile d'établir rapidement une concentration calcique importante dans la fibre, puisque la diffusion du calcium est lente par rapport au phénomène existant in vivo. Ashley et coll. (1974) ont résolu ce problème de diffusion en utilisant un "tampon calcium" constitué d'un mélange de calcium et d'un chélateur du calcium (EGTA). Le gradient de concentration de ce tampon calcique entre "l'intérieur" et "l'extérieur" de la fibre étant très important, les échanges se font rapidement et atteignent la vitesse d'échange existant in vivo. Grâce à cette technique, les fibres perméabilisées de muscles striés constituent un outil de première importance pour étudier la régulation de la tension et de la vitesse de raccourcissement musculaire.

Les premiers pas vers la compréhension de l'importance du rôle des différentes protéines contractiles dans la régulation de la concentration ont été réalisés par des

expériences permettant l'extraction sélective de certaines protéines et leur remplacement par des isoformes de ces protéines ou des protéines modifiées.

Il a été également montré que la sensibilité au Ca des fibres isolées, étudiées par la relation entre la tension et la concentration en Ca libre, était différente dans les fibres squelettiques lentes et rapides (Stephenson et Forrest 1980 ; Laszewski-Williams et coll. 1989 ; Eddinger et Moss 1987 ; Mounier et coll. 1989). Des différences similaires furent mises en évidence dans les fibres cardiaques ventriculaires (rapides) et atriales (lentes) (Morano et coll. 1988). Ce comportement différent a été surtout attribué à leur composition spécifique en protéines myofibrillaires. Sur la base de cette différence de réactivité au Ca des différents types de fibres et du développement des techniques d'extraction-remplacement de molécules endogènes par leurs isoformes, de nombreuses hypothèses sur le rôle des protéines dans la régulation entre la relation tension développée par les fibres et le taux de Ca ont été émises.

Le type de la relation existant entre l'amplitude de contraction de la fibre musculaire et la concentration calcique du milieu a fait l'objet de nombreuses études. Cette relation est classiquement nommée Tension/pCa (T/pCa) (Fig. 14).

En pratique, la tension isométrique développée par la fibre pelée, activée par une concentration calcique connue, est mesurée. Une gamme de concentrations croissantes en Ca libre est appliquée à la fibre. La relation entre la tension relative et la concentration en Ca ($pCa = -\log[Ca]$) est établie en rapportant les tensions sous maximales (P) développées par la fibre à la valeur de tension maximale (P_0) obtenue pour une pCa saturante.

Zot et coll. (1985, 1986) ont mesuré simultanément la liaison du Ca et la génération de force dans les fibres pelées, en remplaçant la troponine endogène par de la troponine marquée au dansylaziridine (Danz). Cette molécule émet de la fluorescence lorsqu'elle est liée au Ca. La relation linéaire entre les deux paramètres mesurés permet d'en déduire que la relation T/pCa traduit directement la relation entre la TnC et la fixation du calcium. L'allure sigmoïde de cette relation indique un phénomène de coopérativité, dont les mécanismes moléculaires sont encore mal connus.

La relation T/pCa obtenue expérimentalement est classiquement ajustée par l'équation suivante (Hill et coll. 1980) :

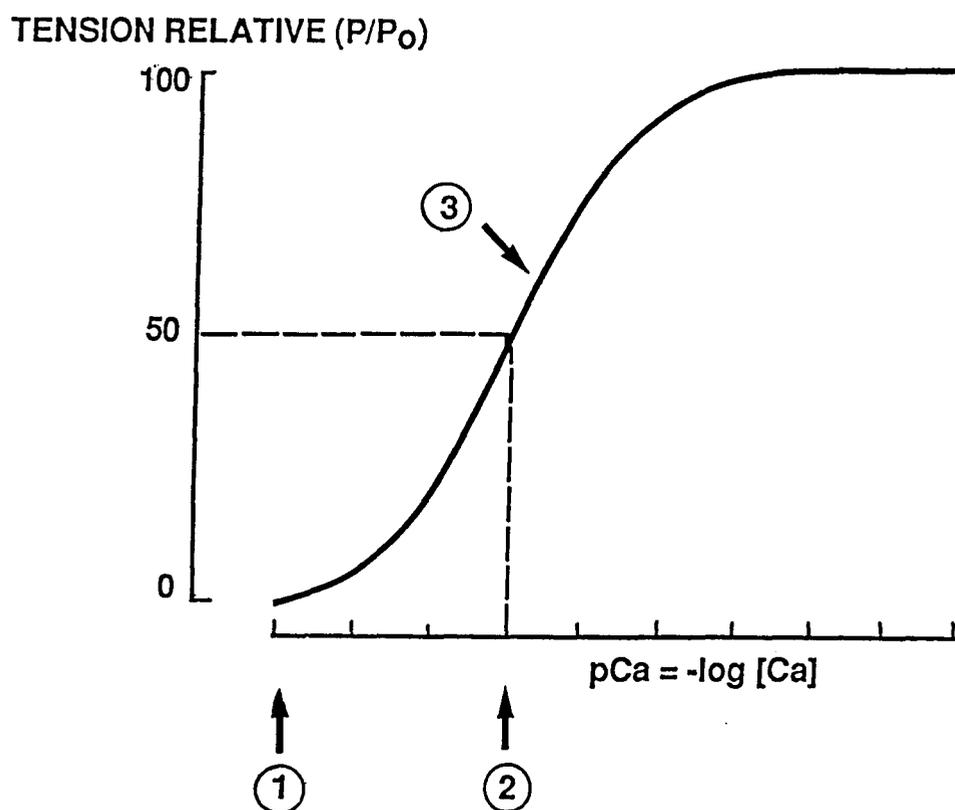
$$P/P_0 = \frac{([Ca^{2+}] / K_d)^n}{1 + ([Ca^{2+}] / K_d)^n}$$

où : P/P_0 = tension normalisée

$[Ca^{2+}]$ = concentration calcique

n = coefficient de Hill

K_d = constante de dissociation apparente



- 1 = Seuil d'activation**
- 2 = pCa_{50} : affinité calcique du système contractile**
- 3 = Pente de la relation : le coefficient de Hill correspond à la pente de la relation linéarisée**

Figure 14 : Illustration schématique de la relation entre la tension développée par une fibre musculaire isolée et le taux de calcium. 1, 2 et 3 : paramètres caractéristiques du fonctionnement des protéines

Cette relation permet d'accéder à certaines caractéristiques de fonctionnement des protéines contractiles et régulatrices. En effet, il est possible de déterminer :

- le seuil d'activation, qui traduit la sensibilité au Ca de ces protéines.
- la valeur de pCa (pCa_{50}) induisant le développement d'une tension égale à 50% de la tension maximale. La pCa_{50} traduit l'affinité calcique du système contractile.

- le coefficient de Hill (n) correspondant à la pente de la relation linéarisée. Moss et coll. (1983) ont montré que la détermination de 2 coefficients (n_1 pour $P/P_0 > 50\%$ et n_2 pour $P/P_0 < 50\%$) permet une meilleure adéquation des points expérimentaux avec la courbe théorique décrite par l'équation de Hill. Ce coefficient est un indicateur du niveau de coopérativité mis en jeu. Nous décrirons le phénomène de coopérativité ci-dessous.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, dans les conditions physiologiques, le Ca se lierait aux sites de faible affinité de la TnC, rendant possible l'interaction entre la myosine et l'actine (Leavis et Gergely 1984, pour revue). La TnC joue donc un rôle clef dans le développement de la contraction. Cependant, la régulation par le Ca des propriétés contractiles du muscle est modulée par de nombreux autres facteurs tels que les interactions coopératives entre les protéines du filament fin, la liaison des "ponts" sur le filament fin, les protéines accessoires du filament épais (MLC), la phosphorylation des protéines des filaments fins et épais, et même le développement de la tension.

Nous allons donc décrire les principaux résultats concernant l'implication des protéines myofibrillaires dans la régulation de la relation T/pCa. De nombreux résultats furent obtenus par l'extraction sélective de ces protéines. Le principe de ce type d'expérience consiste à affaiblir la liaison de la protéine concernée et le myofilament, en minimisant la perte des autres protéines ou en remplaçant les protéines co-extraites. Les expériences d'extraction-remplacement sont facilitées sur les fibres pelées, puisque la rupture de la membrane rend possible le passage des ions et des protéines vers l'intérieur et/ou l'extérieur du filament. Le taux d'extraction et de recombinaison des protéines est toujours vérifié par l'analyse électrophorétique de segments de fibres : la composition myofibrillaire est analysée avant et après l'extraction puis le remplacement de la protéine.

B - Mise en évidence du rôle de la TnC dans la régulation de la relation T/pCa

1 - Expériences d'extraction

Le mécanisme de l'extraction de la TnC repose sur la chélation des cations divalents, donc sur la dissociation du Mg des sites à haute affinité de la TnC. La déstabilisation engendrée permet la dissociation de la TnC du complexe de Tn.

L'extraction de la TnC des fibres isolées entraîne une diminution de la tension maximale développée par la fibre (P_0), un déplacement vers la droite de la relation T/pCa et une diminution de la coopérativité traduite par la valeur plus faible du coefficient de Hill, n (Brandt et coll. 1984 ; Moss et coll. 1985, 1986b ; Babu et coll. 1986, 1989 ; Gulati et coll. 1988,1989). Ces modifications sont plus marquées lorsque la quantité de TnC extraite est plus importante. Elles sont réversibles par la réaddition de l'isoforme de la TnC endogène. Ces effets sont plus importants dans les fibres squelettiques rapides que dans les fibres lentes ou les cardiomyocytes (Sweitzer et Moss 1990).

La chute de P_0 et le déplacement vers la droite de la relation T/pCa sont liés à une diminution de la sensibilité calcique du développement de la tension (Moss et coll. 1985). L'extraction de la TnC induit une forte diminution de la coopérativité ; ainsi Brandt et coll. (1984) ont montré que l'extraction de 5% de TnC entraînait déjà une diminution de " n ". Cet effet ne peut être explicable par la seule intervention de la coopérativité des sites de liaison du Ca de la TnC. Cette étude suggère donc que la régulation de la tension implique un phénomène de coopérativité le long du filament fin. Ils proposent également que le filament fin activé fonctionne comme une unité. Ces mêmes auteurs (en 1987) considèrent que la diminution de " n " due à l'extraction de la TnC est le résultat du blocage de la progression de la coopérativité le long du filament fin par la présence de groupes fonctionnels inactifs. En effet, un "trou" dans la chaîne des unités régulatrices se constituerait dans ces conditions. De fait, la TnC joue un rôle essentiel dans la transition coopérative de l'état inactif à l'état actif du filament fin. Ses 2 fonctions sont donc : (i) la liaison du Ca permettant l'activation de la tension et (ii) un rôle direct dans la coopérativité puisqu'elle serait un élément de la chaîne moléculaire permettant de transmettre le signal de coopérativité (Brandt et coll. 1990).

La transmission de proche en proche du signal de coopérativité nécessite l'intervention d'autres protéines du filament fin. En particulier, les régions de recouvrement des extrémités des molécules de Tm adjacentes (Pan et coll. 1989) seraient des moyens de communication par lesquels l'état d'activation d'un complexe Tm-Tn pourrait influencer la sensibilité au Ca des complexes voisins (Eisenberg et Salmons 1981 ; Briggs et coll. 1984). Des expériences biochimiques (Grabarek et coll. 1983) confirment le phénomène de coopérativité entre les complexes de Tn. Cette assertion est également vérifiée par des expériences d'extraction du complexe de Tn (Moss et coll. 1986a) : l'extraction partielle de ce complexe montre que la sensibilité au Ca de la tension régulée par les groupes fonctionnels (7 monomères d'actine+1Tn+1Tm) où la Tn est encore liée, est augmentée. Ceci met donc en évidence de grandes zones d'interaction entre les groupes fonctionnels.

Une activation de la coopérativité du filament fin par les "ponts" de myosine liés à l'actine est également évoquée : l'affinité de la liaison du Ca à la TnC serait accrue par les "ponts" générateurs de travail mécanique (Guth et Potter 1987).

De plus, Brenner (1988) a montré une influence directe de la vitesse d'attachement et de détachement des "ponts" actine-myosine sur la pente de la relation T/pCa. Comme nous le décrirons un peu plus loin dans ce chapitre, les isoformes de Tm et TnT influenceraient également la coopérativité de cette relation.

2 - Echanges des isoformes de la TnC

Les relations T/pCa des fibres musculaires rapides et lentes ou cardiaques peuvent être distinguées par leur seuil d'activation, leur pCa_{50} et leur pente : l'affinité pour le Ca est plus élevée pour les fibres lentes et cardiaques, et la pente de la relation plus faible que pour les fibres rapides (Stephenson et Forrest 1980 ; Eddinger et Moss 1987 ; Laszewski-Williams et coll. 1989 ; Mounier et coll. 1989 ; Danieli-Betto et coll. 1990). Les TnC lentes et rapides diffèrent en particulier par leur nombre de sites de liaison au Ca (voir chapitre IV-B-3).

Deux équipes (Moss et coll. et Babu et coll.) ont étudié l'influence du type d'isoforme de TnC sur la T/pCa, par des techniques d'échanges.

L'extraction de la TnCs dans les fibres cardiaques entraîne les effets décrits au paragraphe précédent. La substitution de la TnCs par la TnCf, comme la réintroduction de la TnCs dans ces fibres permet une récupération complète de la tension maximale (Babu et coll. 1986, 1987, 1989 ; Gulati et coll. 1988). La différence entre les 2 isoformes n'est donc pas importante pour la récupération de la tension dans les fibres cardiaques. Par contre, les mêmes auteurs montrent que l'introduction de la TnCs dans une fibre rapide fortement déficiente en TnCf ne permet pas de récupérer cette tension : une valeur comprise entre 0 et 10% de la P_0 contrôle est obtenue. L'absence de liaison du Ca sur le site I de la TnCs ne permet donc pas l'activation de la tension dans les fibres rapides. Cette absence d'activation de la tension dans les fibres rapides en présence de TnCs peut être liée à un signal incomplet délivré par la liaison du Ca ou à un mauvais ajustement de la TnCs avec les isoformes rapides des autres sous-unités de Tn (Babu et coll. 1989). Des résultats différents furent obtenus par Moss et coll. (1986b) : une diminution de P_0 ($P_0=30\%$ de la valeur contrôle) est liée à l'extraction de la TnCf et l'addition de TnCs permet de récupérer une P_0 égale à 90% de la valeur contrôle.

L'introduction de la TnCs dans une fibre squelettique rapide est responsable d'un déplacement de la relation T/pCa vers la gauche quand $P/P_0 < 20\%$. Pour les tensions relatives plus élevées, la relation T/pCa est décalée vers la droite, ce qui indique une diminution de l'affinité calcique apparente. L'affinité plus faible pour le Ca du site I de la TnCs en serait la cause (Moss et coll. 1986b). L'influence du changement d'isoforme induit également une diminution des 2 coefficients (n_1 et n_2) de pente de la relation T/pCa. La fibre rapide acquiert donc des paramètres de relation T/pCa plus caractéristiques des fibres lentes ou cardiaques. La forme de la relation T/pCa serait dépendante du nombre et de l'affinité des sites de liaison du Ca de la TnC. Les

Les différences de résultats obtenus entre les deux équipes citées peuvent être liées à la quantité de TnCs endogène non extraite, et les relations T/pCa obtenues pour les fibres rapides additionnées de TnCs traduiraient peut-être une activation "composite" résultant de l'activité coordonnée des TnC lentes et rapides.

Des expériences inverses (introduction de TnCf dans une fibre cardiaque déficiente en TnCs) ont montré que la relation T/pCa des cardiomyocytes se modifiaient vers celle de fibres rapides : la pCa₅₀ est décalée de 0,14 unité pCa vers la droite et le coefficient n augmente de 58% (Gulati et coll. 1988). La sensibilité au Ca est donc diminuée et la variation de la pente montre l'importance de la TnC dans la coopérativité.

Le type de TnC influence donc très fortement la relation T/pCa, mais d'autres études montrent que la TnC ne serait pas seule responsable des différences entre ces relations obtenues pour les fibres de muscles rapides et celles de muscle lent ou cardiaque.

3 - Mutagenèse dirigée sur les sites calciques de la TnC

Des expériences récentes, utilisant l'introduction de mutants de la TnC (mutation qui rendent le site I de la TnCs fonctionnel ou le site II non fonctionnel) dans les fibres pelées ont aidé à la détermination plus précise du rôle des différents sites calciques dans l'activation des fibres et la relation T/pCa (Sweeney et coll. 1990 ; Gulati et coll. 1992). L'activation du site I de la TnCs lui confère des propriétés proches de celles de la TnCf. Par contre l'inactivation du site II ne permet pas le développement de tension dans les fibres lentes. Ces 2 sites ont donc des fonctions différentes, et seule la liaison du Ca sur le site II peut induire une contraction des fibres lentes et cardiaques. La destruction des sites I et II (à faible affinité) rend les TnC non fonctionnelles, dans les fibres rapides comme dans les lentes (Gulati et coll. 1992).

C - Mise en évidence du rôle de la MLC2 dans la relation T/pCa

1 - Expériences d'extraction

Hofmann et coll. (1990) ont extrait la MLC2 de fibres pelées de psoas de lapin (muscle rapide). L'extraction de 20 à 40% de la MLC2 ne modifie pas la tension maximale développée par la fibre, alors que les tensions sous-maximales sont augmentées. L'augmentation de la sensibilité de la fibre au Ca se traduit par un décalage vers la gauche de la pCa₅₀. Le coefficient de pente n₁ (P/P₀>0,5) est inchangé alors que n₂ (P/P₀<0,5) est diminué de moitié. De plus, aux concentrations calciques faibles, une augmentation de la raideur de la fibre proportionnelle à l'augmentation de la tension fut observée. Ces résultats sont explicables par une diminution de la dépendance calcique de l'activation coopérative du filament fin. L'extraction de la MLC2 entraînerait un

accroissement du nombre de ponts de myosine attachés à l'actine, qui, à son tour, pourrait accroître la liaison du Ca à la TnC (Guth et Potter 1987). La MLC2 modulerait donc le nombre de ponts formés pendant l'activation calcique et interviendrait sur la contraction en modifiant la conformation de la région S1-S2 de la MHC.

2 - Phosphorylation de la MLC2

Comme nous l'avons indiqué au chapitre IV-A-2, la RLC de muscle de Vertébré est phosphorylable. Une influence de la phosphorylation de cette RLC sur les ponts de la myosine a été révélée récemment dans les fibres pelées squelettiques et cardiaques (Persechini et coll. 1985 ; Morano et Rüegg 1986). Ces expériences concernant la phosphorylation ont été réalisées en introduisant autour des fibres pelées de la calmoduline et de la "myosin light chain kinase". En effet, la plupart du système phosphorylant diffuse en dehors de la fibre pelée après quelques lavages (Stephenson et Stephenson 1993).

La phosphorylation de la MLC2 entraîne un décalage vers la gauche de la relation T/pCa ainsi qu'une diminution de la coopérativité (Sweeney et Stull 1986), mais ne modifie pas la tension maximale développée par la fibre. Ces résultats sont similaires dans les fibres rapides de psoas de lapin (Persechini et coll. 1985 ; Sweeney et Stull 1986 ; Metzger et coll. 1989) et dans les fibres pelées cardiaques (Morano et Rüegg 1986). Comme lors de l'extraction de la MLC2, une augmentation de la raideur proportionnelle à l'augmentation de la force fut observée. L'accroissement de la tension aux faibles niveaux de Ca serait liée à une augmentation de la constante de vitesse de l'étape de formation des "ponts" générateurs de force. Les "ponts" de myosine où la MLC2 serait phosphorylée se trouveraient plus rapprochés du filament fin et la sensibilité calcique de la génération de force serait donc augmentée (Sweeney et coll. 1993). Néanmoins, le phénomène de phosphorylation est trop lent pour être un mécanisme obligatoire de la contraction, mais jouerait un rôle modulateur. Ce mécanisme interviendrait beaucoup plus dans les fibres rapides que dans les fibres lentes où la kinase est 3 fois moins active alors que la phosphatase est 4 fois plus active (Moore et Stull 1984, étude sur des fibres de rat).

D - Mise en évidence du rôle de la protéine C dans la relation T/pCa

Des extractions partielles (60 à 70%) de protéine C furent réalisées sur des cardiomyocytes ventriculaires de rat et des fibres rapides de psoas de lapin. Dans les 2 types de fibres, l'extraction de cette protéine n'entraîne pas de modification de la tension maximale alors que les niveaux des tensions sous-maximales sont augmentés : la pCa₅₀ est décalée de 0.36 unité pCa vers la gauche. De plus, la pente de la relation T/pCa est

diminuée. Cet effet sur la pente ne semble pas lié à une rupture de l'activation coopérative du filament fin puisque les effets de l'extraction de la protéine C sont identiques dans les cardiomyocytes "contrôle" et les cardiomyocytes déficients en TnC (Hofmann et coll. 1991). La protéine C modulerait l'amplitude des mouvements de myosine et son extraction entraînerait une augmentation de la probabilité de liaison de la tête S1 à l'actine. L'effet de la protéine C sur la relation T/pCa serait peut-être lié à une interaction avec la MLC2 : les effets de l'extraction de la protéine C sont comparables à ceux de l'extraction de la MLC2. De plus, la protéine C n'active la mATPase qu'en présence de MLC2 liée à la myosine. La capacité de liaison des ponts de myosine à l'actine serait donc limitée par la protéine C et/ou la MLC2 quand l'activation par le Ca est sous-maximale (Moss 1992).

E - Influence de la composition du complexe Tm-TnT sur la relation T/pCa

Les isoformes de protéines régulatrices influencent la forme de la relation T/pCa. Les différences entre les relations T/pCa de fibres rapides et lentes peuvent être attribuées à l'isoforme de TnC présente dans ces fibres. Néanmoins, ces différences peuvent aussi être liées aux interactions avec différentes isoformes spécifiques de TnT. L'intervention des isoformes de TnT sur la relation T/pCa fut étudiée sur les fibres rapides dont la composition en TnT est bien déterminée.

Brandt et coll. (1984) décrivent des valeurs de pente de la relation T/pCa (n) égales à 5 pour les fibres rapides de psoas de lapin alors que ces valeurs sont faibles pour des fibres rapides d'autres muscles. La comparaison des valeurs de n pour ces différentes fibres et de la composition de leur complexe Tm-TnT (TnT1f - $\alpha\beta$ Tm, TnT2f - α 2Tm et TnT3f - $\alpha\beta$ Tm) a permis de montrer que les fibres dont le complexe Tm-TnT était de la forme TnT2f- α 2Tm présentaient le plus grand n , quel que soit le muscle d'origine. Lorsque la proportion relative de ce complexe TnT2f - α 2Tm diminue, la pente de la relation T/pCa et la pCa_{50} diminuent également (Schachat et coll. 1987). Il a été vérifié que la coopérativité moins importante dans les fibres contenant la TnT1f, la TnT3f ou l' $\alpha\beta$ Tm n'était pas liée à une déplétion en TnC (Brandt et coll. 1987). Ces différences ont également été observées sur les fibres de poulet (Reiser et coll. 1987b).

Il est difficile de déterminer, par ces analyses, si les différences d'isoformes de Tm et de TnT interviennent dans la modulation de la relation T/pCa dans les fibres rapides. Néanmoins, la comparaison des relations T/pCa de fibres contenant la même isoforme de Tm indique que le type de TnT est important (Schachat et coll. 1987). De plus, la corrélation entre la présence de TnT2f- α 2Tm et la valeur de n n'est une relation causale que si l'on admet que la relation T/pCa n'est pas affectée par les isoformes de myosine. Divers arguments montrent que la myosine ne régule pas de façon essentielle la relation T/pCa. Les différentes isoformes de TnT présentes seraient donc responsables de

la sensibilité calcique plus importante dans certaines fibres rapides (Schachat et coll. 1987 ; Greaser et coll. 1988).

Reiser et coll. (1987b) ont étudié les relations T/pCa des fibres de muscles de poulet à différents stades du développement et à l'âge adulte. Entre les stades néonataux et adultes des fibres des 2 muscles rapides considérés, aucune différence d'isoformes de TnT et TnI n'est observée. De plus, les variations de Tm n'interviennent pas aux stades choisis dans cette étude. Le décalage de la relation T/pCa observé entre les fibres rapides des deux muscles, aussi bien aux stades néonataux que chez l'adulte, est donc dû à la présence de TnT différentes.

Les isoformes de TnT diffèrent par leur séquence N-terminale (Briggs et coll. 1987), partie de la protéine qui recouvre les extrémités N- et C-terminales des Tm adjacentes.

Les différentes isoformes de TnT et de Tm jouent donc un rôle sur la coopérativité intrinsèque du filament fin. La plus grande coopérativité observée dans les fibres où l' $\alpha 2Tm$ et la TnT2f sont présentes indique donc une plus grande désinhibition du filament fin à une concentration calcique donnée, comparée à celle obtenue avec les autres isoformes de TnT. La tension isométrique obtenue est donc plus importante, ce qui se traduit par un décalage de la relation T/pCa vers la gauche (Greaser et coll. 1988).

VI - L'ACTIVATION PAR LE STRONTIUM

A - Données générales

Des cations divalents de la famille du Ca peuvent se lier à la TnC : le Sr, Cd, Ba, Pb... Les travaux Ebashi et coll. (1968) ont montré que le Sr peut réguler la contraction musculaire, mais à des concentrations supérieures aux concentrations calciques nécessaires. Ebashi et Endo (1968) furent les premiers à mettre en évidence des différences de sensibilité à l'ion Sr entre les tissus musculaires cardiaques et squelettiques rapides. Leur étude consistait à évaluer les activités de la mATPase par des mesures de superprécipitation en fonction de la concentration en Sr ou en Ca. De nombreuses expériences réalisées sur les myofibrilles cardiaques et squelettiques confirmèrent ces résultats (Kohama 1979 ; Yamamoto 1983 ; Morimoto et Ohtsuki 1987).

L'activation par le Sr fut donc mise en évidence dans les études biochimiques (Ebashi et Endo 1968 ; Ebashi et coll. 1968) mais également physiologiques (Donaldson et Kerrick 1975 ; Kitazawa 1976 ; Takagi et Endo 1977). Les relations T/pCa des fibres rapides et des fibres lentes ou cardiaques sont distinctes. Cependant, une différence plus

importante de la sensibilité au strontium entre les fibres rapides et les fibres lentes ou cardiaques a été observée (Kitasawa 1976 ; Takagi et Endo 1977). Des premiers travaux, sur fibres pelées glycélinées, ont mis en évidence que la sensibilité au Sr des fibres lentes et cardiaques était supérieure à celle des muscles rapides. Depuis, il fut décrit que les fibres cardiaques et lentes étaient 5 à 10 fois plus sensibles au Sr que les rapides (Kerrick et coll. 1980, 1985 ; Babu et coll. 1987). Ces différences d'activation de la tension par le Sr ont donc été exploitées pour identifier les types de fibres musculaires par une technique physiologique. De nombreuses études réalisées sur des fibres pelées de muscles de différentes espèces animales montrent que les fibres cardiaques et lentes présentent une sensibilité comparable au Ca et au Sr, alors que les fibres rapides sont beaucoup plus sensibles au Ca qu'au Sr (Kerrick et coll. 1976, 1980 ; Takagi et Endo 1977 ; Takagi et coll. 1978 ; Fink et coll. 1986 ; Ruff et Whittlesey 1991 ; Stevens et coll. 1993). La figure 15 illustre ces différences d'activation par le Ca et le Sr. L'affinité relative des fibres est traduite par la différence (pCa_{50} - pSr_{50}).

B - La base moléculaire de la différence de sensibilité au strontium

1 - Activation par le strontium de systèmes myofibrillaires reconstitués

Dès 1968, Ebashi et coll. montraient que le rapport d'affinité Sr/Ca pour la Tn isolée de muscles rapides était de 1/27, alors qu'il n'était que de 1/3 pour la Tn isolée de cœur. Ces auteurs ont évalué les sensibilités au Sr et au Ca de préparations d'actomyosines squelettiques (rapides) et cardiaques reconstituées avec des complexes (Tm-Tn) issus des mêmes sources. Les deux préparations d'actomyosines présentaient une plus grande sensibilité au Sr lorsqu'elles étaient associées à la Tn cardiaque. Ils en concluaient donc que la différence d'activation par le Sr entre les muscles rapides et cardiaques était liée à une plus grande affinité relative de la TnC cardiaque pour le Sr. Ces résultats ont été confirmés ensuite par Kohama (1979) qui montrait que le complexe lent de Tn était 9 fois plus sensible au Sr que le complexe rapide. Yamamoto (1983), en utilisant des complexes hybrides de Tn a également montré que la sensibilité au Sr de l'actomyosine ATPase était plus importante quand la TnC lente faisait partie du complexe de Tn.

2 - Expériences d'extraction-remplacement de la TnC

Ces expériences ont été réalisées sur des systèmes myofibrillaires où la sensibilité au Sr était mesurée par l'activation de la mATPase (Morimoto et Ohtsuki 1987, 1988). D'autres auteurs ont réalisé ces expériences sur fibres pelées (Kerrick et coll. 1985 ; Babu et coll. 1987). Babu et coll. ont extrait la TnC cardiaque de cardiomyocytes pelés de ventricule de hamster et l'ont remplacée par de la TnC rapide. Les relations T/pSr

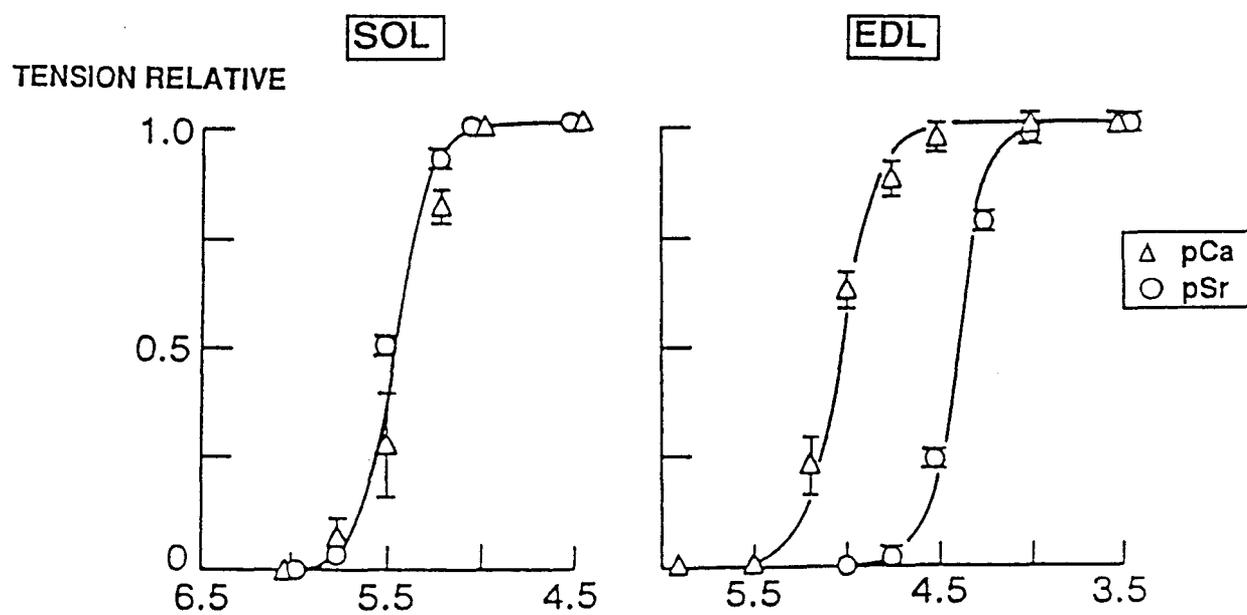


Figure 15 : Identification d'une fibre de type lent (SOL) et d'une fibre de type rapide (EDL) par le test strontium (d'après Takagi et Endo 1977)

des fibres cardiaques reconstituées avec de la TnC rapide étaient décalées vers la droite par rapport à celles des fibres cardiaques "contrôle", et leur positionnement était typique de la T/pSr de fibres rapides. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus sur les systèmes myofibrillaires après le même type d'échange de TnC (Morimoto et Ohtsuki 1987). La TnC jouerait donc un rôle clef dans les caractéristiques d'activation par les cations divalents. La différence de sensibilité au Ca et au Sr traduirait donc le phénotype de la TnC (Babu et coll. 1987,1989 ; Morimoto et Ohtsuki 1987). Les TnC lentes et rapides diffèrent essentiellement par le site I. Gulati et coll. (1992) ont remplacé la TnC native de fibres cardiaques de rat ou de hamster par des TnC "mutantes", TnC rapide dont le site I correspondait à celui de la TnC lente. Ils ont particulièrement étudié les relations T/pCa et T/pSr développées par ces fibres cardiaques dans lesquelles la TnC "mutante" était introduite. La différence de sensibilité pour le Ca et le Sr ($pCa_{50}-pSr_{50}$) de ces fibres était identique à celle des fibres cardiaques natives, soit $pCa_{50}-pSr_{50}=0,2$. Les acides aminés de l'extrémité N-terminale de la TnC gouverneraient donc la sensibilité différentielle pour ces 2 ions. Le site I serait prédominant dans la détermination du phénotype lent, même s'il n'est pas fonctionnel pour lier le Ca.

3 - D'autres protéines sont-elles impliquées dans la sensibilité au strontium ?

Kerrick et coll. (1980) ont répété les expériences d'Ebashi et Endo (1968) en mesurant l'activité mATPase de l'actomyosine de muscle rapide reconstituée avec les complexes de Tm-Tn lents et rapides, en fonction de la concentration en Ca et en Sr. Leurs résultats sont très différents puisqu'ils trouvent peu de différences entre les effets régulateurs des (Tm-Tn) lentes et rapides. L'activité de l'actomyosine répond toujours à l'activation par le Sr avec des caractéristiques de type rapide, quel que soit le complexe (Tm-Tn) présent.

Des auteurs de la même équipe ont réalisé des expériences d'extraction-remplacement de TnC sur des fibres pelées de muscles cardiaques et squelettiques. Leurs résultats concernant le remplacement de la TnC native par la TnC rapide dans les fibres cardiaques (Hoar et coll. 1988) sont proches de ceux de Babu et coll. (1987,1989). Par contre, les résultats sont différents lorsque la TnC rapide est extraite de fibres rapides puis remplacée par la TnC cardiaque (Kerrick et coll. 1985) : contrairement aux résultats de Babu et coll. (1987, 1989), ces auteurs parviennent à restituer la tension en réponse à une activation par le Ca ou le Sr dans les fibres rapides reconstituées avec de la TnC lente. De plus, ils n'observent pas de différence dans la relation T/pSr de la fibre squelettique après addition de la TnC lente ou rapide. Selon leur interprétation, l'affinité de la TnC lente pour le Sr serait modifiée par l'environnement du système régulateur. Les interactions protéines-protéines détermineraient donc les propriétés d'activation par le Sr dans les fibres musculaires. En effet, le changement d'un acide aminé de l'actine ou l'interaction de la myosine avec le filament fin peuvent entraîner des modifications de

l'actomyosine ATPase par le complexe Tm-Tn. L'actine et la myosine existent sous différentes isoformes dans les différents types de fibres. Les différences d'affinité pour le Sr observées quand la TnC lente est dans une fibre cardiaque ou dans une fibre rapide peuvent donc être expliquées par l'effet de l'environnement par les différentes isoformes de protéines myofibrillaires.

Wilson et Stephenson (1990) émettent l'hypothèse de l'intervention d'autres protéines myofibrillaires dans la différence d'activation des fibres lentes et rapides par le Sr, même si l'isoforme de TnC joue un rôle majeur. Selon ces auteurs, le typage des fibres par leur propriétés physiologiques (T/pCa-T/pSr) serait basé sur l'ensemble des caractéristiques de l'appareil contractile et du système régulateur, plutôt que sur les propriétés spécifiques de protéines constitutives isolées comme l'isoforme de TnC.

Même si la différence de sensibilité au Sr des 2 isoformes de TnC est bien établie et que plusieurs démonstrations, par des techniques d'échange de TnC, tendent à montrer sa responsabilité dans le positionnement de la relation T/pSr, l'hypothèse de l'intervention d'autres isoformes de protéines myofibrillaires ne peut être rejetée (Kerrick et coll. 1985 ; Morimoto et Ohtsuki 1988 ; Wilson et Stephenson 1990).

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

A - Animaux

Des muscles de rats Wistar et Sprague-Dawley, ainsi que des singes rhésus (*Macaca Mulatta*) ont été utilisés pour cette étude.

1 - Rats

Une partie de ce travail est réalisée sur des fibres musculaires isolées de rats "contrôle" et de rats exposés à la microgravité réelle. Les biopsies musculaires de rats Sprague-Dawley proviennent de la NASA (National Aeronautics and Space Administration). Des rats issus de 2 groupes sont utilisés dans le cadre de notre étude : les rats "synchrone" et les rats "vol". Les rats "synchrone" sont soumis aux mêmes conditions que les animaux du vol à l'exception de la microgravité. Ils seront dénommés "contrôle" dans la suite de notre exposé.

Une autre partie de ce travail est réalisée sur des muscles soleus de rats Wistar soumis à la microgravité simulée. Des rats adultes, de poids moyen de 250 g, sont séparés en trois groupes : "contrôle" (n=5), rats soumis au modèle de microgravité simulée pendant 10 jours (n=5) et rats soumis à ce modèle durant 14 jours (n=10). Les conditions de température (22-24°C), d'éclairage (cycle jour/nuit 12h-12h) sont identiques pour tous les rats, isolés dans des cages individuelles.

2 - Singes rhésus

Des biopsies musculaires de soleus de singes rhésus proviennent de la NASA et du CNES (Centre National d'Etudes Spatiales). Les singes utilisés sont 5 adultes mâles, de poids variable entre 14 et 16 kg, isolés en cages individuelles. Ils n'ont subi aucun traitement particulier.

B - Conditions de microgravité imposées aux rats

1 - Conditions de microgravité réelle

Notre étude est réalisée sur des rats embarqués à bord de la navette américaine pour la mission SLS2 (Space Lab Sciences 2) d'une durée de 14 jours (du 18.10.1993 au 1.11.1993).

2 - Conditions de microgravité simulée

Le modèle utilisé, simulant les effets de la microgravité, est le modèle de suspension de Morey (1979). Les rats sont suspendus durant 10 ou 14 jours selon la technique décrite par Stevens et coll. (1990) : la moitié proximale de la queue est recouverte de sparadrap, ce qui permet d'y fixer un crochet, lui-même attaché au sommet de la cage. Les pattes postérieures de l'animal ne supportent alors plus le poids du corps. Ce type de suspension permet au rat de se déplacer sur ses pattes antérieures et donc d'avoir libre accès à l'eau et à la nourriture. Deux durées de suspension ont été réalisées sur deux groupes de rats : 10 et 14 jours. Ces deux groupes d'animaux seront dénommés "rats suspendus" dans la suite de notre exposé.

C - Caractéristiques des muscles étudiés

1 - Le soleus

Le soleus est un muscle lent, extenseur de la cheville, impliqué dans le maintien de la posture et particulièrement résistant à la fatigue. Selon le typage histochimique, le soleus est composé de 2 types de fibres : les fibres de type SO (ou type I), majoritaires et les fibres de FOG (ou type IIA). Les fibres de type I représentent 87% des fibres du soleus de rat Wistar (Armstrong et Phelps 1984) et 90% des fibres du soleus de singe rhésus (Roy et coll. 1991).

2 - Le vastus intermedius

Le vastus intermedius (Vast. Int.) est un muscle lent, extenseur du genou ; il est également impliqué dans le maintien de la posture et résistant à la fatigue. Selon le typage histochimique, la composition du Vast. Int. du rat Wistar est plus mixte que celle du soleus : 59% de fibres de type SO (ou type I), 40% de fibres de type FOG (ou type IIA) et 1% de fibres de type FG (ou type IIB) (Armstrong et Phelps 1984).

3 - L'extensor digitorum longus

L'extensor digitorum longus (EDL) est un muscle rapide, fléchisseur de la cheville. Il est antagoniste du soleus, et, selon le typage histochimique, est l'un des muscles les plus rapides de la patte postérieure du rat : 56% de fibres de type FG (ou type IIB), 42% de fibres de type FOG (ou type IIA) et 2% de fibres de type SO (ou type I) (Armstrong et Phelps 1984). Ce muscle est utilisé dans cette étude comme témoin rapide, permettant de déterminer la migration des isoformes rapides des protéines myofibrillaires par les techniques électrophorétiques utilisées dans ce travail.

4 - Le diaphragme

Le diaphragme est un muscle mixte, impliqué dans la respiration. Ses caractéristiques sont intermédiaires entre celles des muscles lents et rapides (Kelly et coll. 1984). C'est un muscle très résistant à la fatigue. Il est composé de 50% de fibres de type FOG (ou type IIA), 25% de fibres de type SO (ou type I) et de 25% de fibres de type FG (ou type IIB) selon le typage histochimique (Tamaki 1985). Ce muscle fut utilisé dans cette étude comme témoin de migration de la MHC2X (ou 2D) (voir chapitre résultats, 2^{ème} partie). En effet, le diaphragme est le muscle où l'isoforme de la MHC2X (ou 2D) est la plus exprimée (Bar et Pette 1988 ; Schiaffino et coll. 1989) : les isoformes de MHC sont réparties en 53% d'isoformes de MHC2X (ou 2D), 32% d'isoformes de MHC2A, 14% d'isoformes de MHC1 et 1% d'isoformes de MHC2B (Bar et Pette 1988).

D - Prélèvements

1- Rats

a) microgravité réelle

Tous les prélèvements ont été effectués sur les animaux "vol" quelques heures après l'atterrissage et sur les animaux "synchrone" le même jour. Après le sacrifice des animaux, les muscles sont prélevés. Ils sont ensuite découpés, dans le sens des fibres, en plusieurs fragments et placés dans la solution de "pelage" (voir chapitres "protocole de pelage" II-B" et solutions" II-C).

b) microgravité simulée

Après 10 ou 14 jours, les animaux "contrôle" et "suspendus" sont sacrifiés. Le muscle soleus, ainsi que l'extensor digitorum longus (EDL) et le diaphragme des rats "contrôle" sont prélevés puis placés dans l'azote liquide. Tous les échantillons sont conservés à -80 °C jusqu'à leur analyse.

2- Singes

Les singes sont anesthésiés par l'halothane. Les biopsies de soleus sont prélevées au niveau du tiers médian du muscle, selon son axe longitudinal, dans sa partie profonde. Elles sont ensuite découpées selon l'orientation des fibres puis placées dans la solution de "pelage".

II - PELAGE ET ISOLEMENT DES FIBRES MUSCULAIRES

A - Principe du pelage

Le "pelage" des fibres musculaires permet d'exposer le système contractile à diverses substances, en éliminant le compartiment extracellulaire. Ce pelage peut être réalisé mécaniquement ou chimiquement par hyperperméabilisation de la membrane. Le pelage chimique présente un double intérêt par rapport au pelage mécanique : le traitement est réalisable sur l'ensemble de la biopsie, plusieurs centaines de fibres sont donc traitées simultanément ; l'isolement des fibres est réalisé ultérieurement, lorsque le pelage est effectif et les fibres moins adhérentes entre elles. Cette technique est donc applicable aux fibres de petit diamètre, telles que les fibres musculaires squelettiques de Mammifères (Wood et coll. 1975).

B - Technique utilisée : pelage chimique à l'EGTA

La biopsie est traitée par l'acide éthylène glycol bis (β aminoéthylether)NNN'N' tétra acétique (EGTA). Ce chélateur du calcium perméabilise la membrane sarcolemmique des fibres musculaires sans altérer la structure du système contractile sous-jacent (Eastwood et coll. 1979). De plus, aucune variation de la sensibilité des protéines contractiles au Ca n'est observée après ce traitement (Reuben et coll. 1977).

Le protocole de pelage utilisé au laboratoire est une version simplifiée (Mounier et coll. 1989) de la technique de Wood et coll. (1975). Immédiatement après le prélèvement, la biopsie musculaire est placée à 0°C dans une solution de pelage (ou relaxante, R) contenant 5 mM d'EGTA. Quatre heures plus tard, la biopsie est rincée plusieurs fois dans de la solution R fraîche puis replacée à 0°C. Vingt-quatre heures après le prélèvement, la biopsie est transférée dans une solution de conservation contenant la même quantité d'EGTA et 50% (v/v) de glycérol. Le glycérol permet de conserver la biopsie à -20°C pendant plusieurs mois (Wood et coll. 1975). La composition de ces solutions de pelage (ou relaxante, R) et de conservation sera détaillée au chapitre "solutions".

C - Isolement de la fibre

Au moment de l'expérimentation, une fibre musculaire est isolée de la biopsie ainsi traitée. L'isolement de la fibre est réalisé sous loupe binoculaire, à l'aide de pinces fines.

III - ETUDES DES PROPRIETES CONTRACTILES ET MESURE DE LA VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT DE LA FIBRE MUSCULAIRE ISOLEE

A - Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques

La technique utilisée est celle décrite par Mounier et coll. (1989), Stevens et coll. (1990), Holy et Mounier (1991), Stevens et coll. (1993).

Un fil de soie tressée (Ethicon, Ethnol S.A. Paris) est noué à chaque extrémité de la fibre isolée. La fibre est ensuite fixée, par l'intermédiaire de ces nœuds, entre une pince (point fixe) et un crochet (relié au capteur de force) dans la cuve expérimentale contenant de la solution R. Un système d'aspiration sous vide permet l'évacuation rapide des solutions de la cuve expérimentale (Fig. 16A).

La longueur de repos et le diamètre de la fibre sont mesurés grâce à un oculaire micrométrique. La fibre est ensuite étirée, tout en mesurant la variation de la longueur de sarcomère. Cette mesure est obtenue par la diffraction d'un rayon laser dirigé perpendiculairement à l'axe longitudinal de la fibre ; le sarcomère étant assimilé à une fenêtre de diffraction. Un rayon est délivré par un laser He-Ne (Spectra-Physics) et le réseau de diffraction est recueilli sur un écran (Fig. 16B). La longueur du sarcomère (LS) est donnée par l'équation suivante :

$$LS = \lambda / \sin \vartheta \quad \begin{array}{l} \lambda = \text{longueur d'onde du laser (632 nm)} \\ \vartheta = \text{angle de diffraction} \end{array}$$

La distance (d) entre la fibre et l'écran étant connue, et la distance entre le centre et la première frange de diffraction (x) mesurée, $LS = \lambda / [\sqrt{(d^2 + x^2)} / x]$.

La tension isométrique développée par la fibre est mesurée par un capteur de force BG10 (sensibilité 0,7 V/g, Kulite semiconductor products). La réponse est amplifiée (10 V/g) puis enregistrée sur papier (Gould 2200). En parallèle, en sortie de l'amplificateur, la tension est enregistrée par un ordinateur PC, après numérisation par une carte de conversion analogique/digitale (PC-LPM 16-National Instruments).

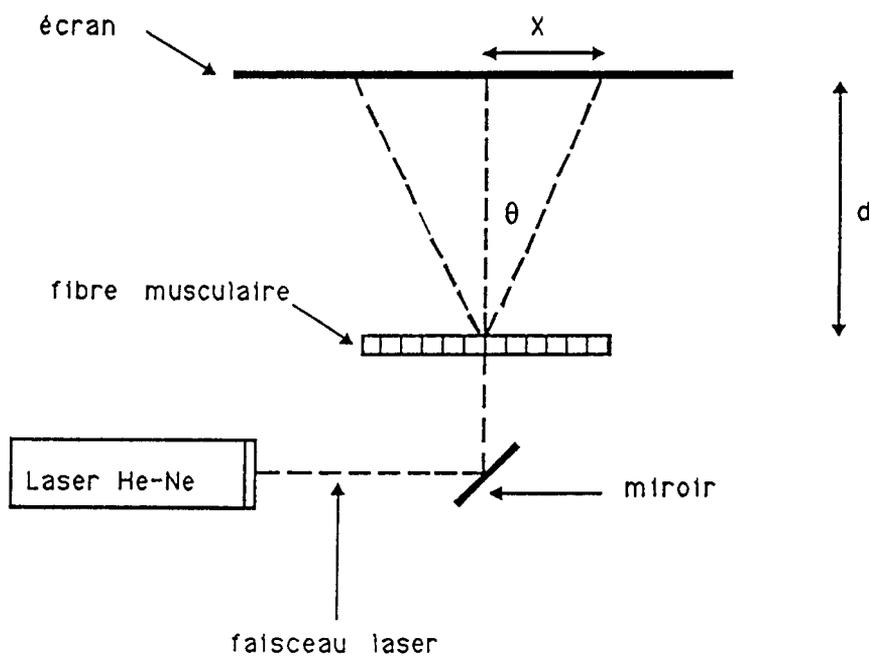
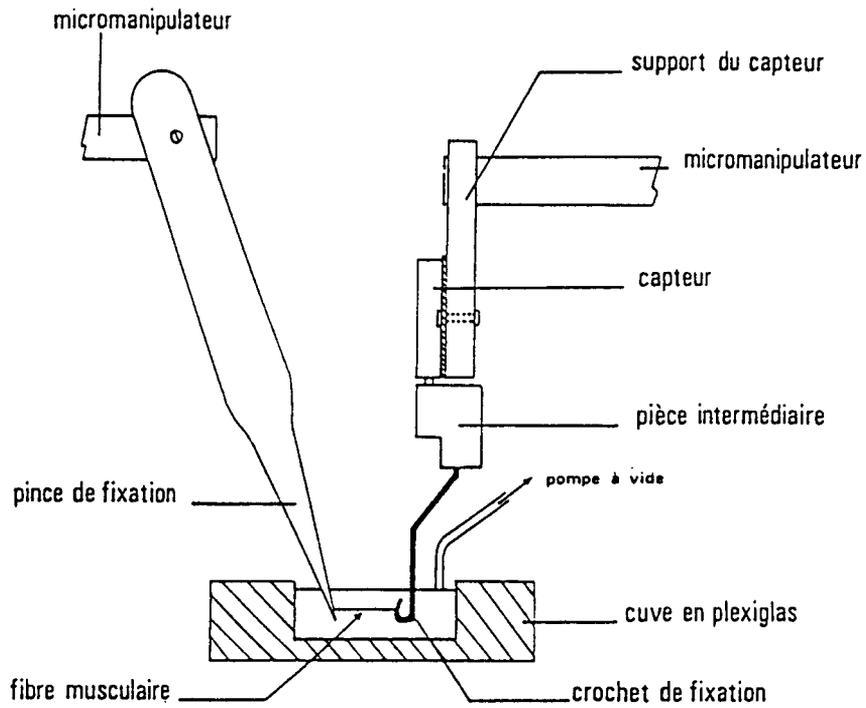


Figure 16 : A - Schéma du dispositif de montage d'une fibre musculaire
B - Principe de mesure de la longueur des sarcomères

Le traitement informatique de ces données est réalisé par un logiciel approprié, développé au sein du laboratoire (en collaboration avec l'EUDIL).

B - Dispositif de mesure de la vitesse maximale de raccourcissement

La fibre est collée entre 2 crochets par de l'acétate de cellulose dissous dans l'acétone. L'un des crochets est relié au capteur de force et l'autre à la partie mobile d'un vibreur électromagnétique. La longueur de repos et le diamètre de la fibre sont mesurés grâce à un oculaire micrométrique. Un dispositif de mesure de la diffraction d'un laser He-Ne, identique à celui décrit précédemment (Fig. 16B), permet de fixer et de contrôler la longueur de sarcomère.

Le capteur de force, qui mesure la tension développée par la fibre, est de type AE801 (Sensoror a.s., Horten, Norway). Son étendue de mesure est de ± 1 g, sa sensibilité de 0,10 V/g et sa fréquence de résonance d'environ 7 kHz. Ce capteur présente un double avantage par rapport au capteur BG10 : la sensibilité est plus importante et la fréquence de résonance est plus élevée, ce qui permet d'enregistrer les réponses occasionnées par des perturbations rapides. Par le vibreur électromagnétique, de type GWV2 (Gearing et Watson, Electronics Ltd), des perturbations rapides (<1,5 ms) de longueur et d'amplitude contrôlées sont imposées à la fibre. Une diode émettrice de lumière est fixée sur la partie mobile du vibreur : ses déplacements sont captés par une photodiode (PIN LSC/5D, modèle 1238 UDT) ; ceci permet d'apprécier les changements de longueur de la fibre. L'ensemble vibreur-capteur de déplacement est relié à un système d'asservissement. Les signaux sont amplifiés, enregistrés dans un oscilloscope (Gould 1604) et transcrits sur papier (enregistreur Gould 2200). Ce dispositif permet également d'enregistrer les tensions isométriques, en suivant le protocole décrit à la partie D-1. Le vibreur électromagnétique est alors utilisé comme point fixe.

C - Solutions

Tous les produits chimiques entrant dans la composition des solutions proviennent de Sigma Chemical (St Louis, MO, USA). La composition de toutes les solutions utilisées est déterminée à l'aide du programme de Fabiato (1988) avec les constantes d'association données par Orentlicher et coll. (1977). La force ionique de toutes les solutions est fixée à 200 mM et le pH ajusté à $7,00 \pm 0,02$ (à l'aide de potasse ou d'acide propionique). La concentration d'adénosine triphosphate (ATP) est constante dans toutes les solutions (2,5 mM).

Les compositions (en mM) des solutions de pelage (ou relaxante, R) ; de conservation et de lavage (W) sont les suivantes :

	Solution de pelage ou relaxante (R)	Solution de conservation	Solution de lavage (W)
Propionate de potassium	170	170	185
Acétate de magnésium	2,5	2,5	2,5
K ₂ EGTA	5	5	-
MOPS*	20	20	20
ATP	2,5	2,5	2,5
Glycérol	-	50% (v/v)	-

* Acide 3(Morpholino) propane sulfonique

Les solutions pCa ($pCa = -\log[Ca^{2+}]$) sont confectionnées avec les mêmes composants que ceux de la solution de lavage (W). Le calcium libre est tamponné par 5 mM d'EGTA provenant du Ca-EGTA et du K₂-EGTA mélangés en proportions adéquates pour obtenir les différentes valeurs de pCa (de 7,0 à 4,2).

Les solutions pSr ($pSr = -\log[Sr^{2+}]$) sont obtenues en ajoutant à la solution W du Sr-EGTA et du K₂-EGTA, comme pour les solutions pCa. Les constantes d'association du strontium avec l'EGTA et l'ATP utilisées pour déterminer la composition de ces solutions sont celles indiquées par Moisescu et Thieleczek (1979).

La solution Brij est de la solution R contenant 2% (v/v) de détergent Brij 58. Un traitement par cette solution rend le réticulum sarcoplasmique non fonctionnel et permet d'étudier exclusivement le fonctionnement des protéines contractiles (Orentlicher et coll. 1974).

D - Protocoles expérimentaux

1 - Mesure des tensions isométriques

La fibre isolée est laissée pendant 20 mn dans la solution Brij. Elle est rincée plusieurs fois dans de la solution de lavage W puis replacée dans la solution R. La fibre est ensuite étirée à une longueur à 120% de sa longueur de repos, ce qui permet le développement d'une tension optimale. La longueur de sarcomère correspondant à cet étirement sera mesurée (elle est de 2,6 μ m pour les fibres isolées des muscles du rat et de 2,8 μ m pour les fibres isolées de soleus de singe rhésus) et vérifiée pendant toute la durée de l'expérience. Après le retrait de la solution R, la fibre est rincée par la solution W qui élimine toute trace d'EGTA provenant de la solution relaxante (R). Une contraction

maximale d'amplitude P_0 est induite par une solution calcique de pCa 4,2 ($pCa = -\log[Ca^{2+}]$) permettant de saturer tous les sites calciques libres impliqués dans le développement de la contraction. Le relâchement de la fibre est obtenu par le retour à la solution R.

Après chaque relâchement par la solution R, la fibre est lavée par la solution W. Elle est ensuite activée par l'application d'une solution à concentration calcique définie, suivie immédiatement de la solution de pCa 4,2 qui induit la contraction maximale. Ceci permet de comparer facilement le niveau de tension (P) obtenu pour cette solution de pCa à la tension maximale (P_0) et de normaliser la tension (P/P_0). Cette procédure permet de s'affranchir de l'éventuelle diminution de P_0 au cours de l'expérience pour une même fibre, ainsi que de la variabilité de P_0 entre les différentes fibres grâce à la normalisation de la tension. La figure 17 récapitule un cycle expérimental (les déflexions transitoires correspondent aux changements de solutions).

L'application des solutions de concentration calcique croissante (pCa 7,0 à 4,2) permet d'établir la relation tension relative (T)/pCa. La même procédure est réalisée pour obtenir les propriétés d'activation de la fibre par le strontium, mais la contraction maximale est obtenue par une solution de pSr 3,4.

Ce protocole est également réalisé sur les fibres dont la vitesse maximale de raccourcissement est mesurée, mais l'étude de l'activation de la fibre par le Sr est plus succincte afin d'éviter une diminution trop importante de la tension maximale. Trois concentrations de Sr ont été choisies, après l'analyse de quelques relations T/pSr : ces pSr induisent un développement de tension tel que la tension relative soit située dans la partie linéaire de la T/pSr . Ce protocole permet donc de déterminer la pSr_{50} .

2 - Mesure de la vitesse maximale de raccourcissement

Les mesures de la vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}) sont effectuées selon la méthode du "slack test" (Edman 1979 ; Moss et coll. 1986b).

La fibre est activée de façon maximale par la solution de pCa 4,2. Quand l'amplitude est stabilisée, un relâchement rapide ($<1,5$ ms), d'amplitude ΔL est imposé à la fibre de façon à annuler cette tension. Ce relâchement est maintenu pendant environ 100 ms. Un redéveloppement de tension est observé (encart de la Fig. 18) et le temps de latence (Δt) entre le début du relâchement et le redéveloppement de la tension est mesuré. La fibre est ensuite relâchée par de la solution R. Sur chaque fibre, environ 6 ΔL d'amplitude variable (entre 100 et 500 μm) sont imposés : plus ΔL est élevé, plus le temps Δt nécessaire au redéveloppement d'une tension est long.

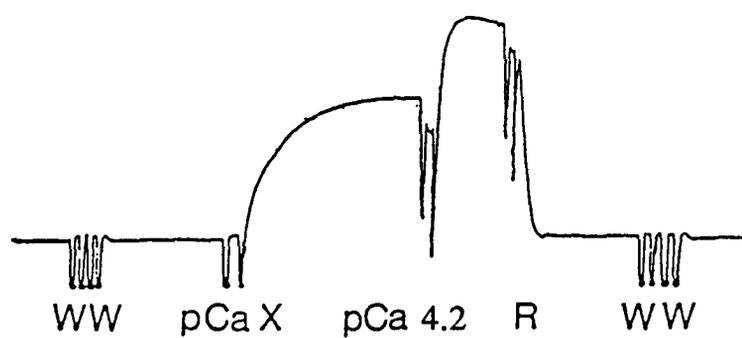


Figure 17 : Exemple d'un cycle expérimental de mesure de la tension isométrique d'une fibre isolée

E - Expression des résultats

1 - Relation tension relative/pCa (pSr)

La caractérisation de la relation T/pCa est décrite dans le chapitre V-A des "données bibliographiques". Les paramètres caractéristiques du seuil, de l'affinité et de la pente de la T/pCa sont dérivés de l'équation théorique de Hill. Le coefficient de Hill est calculé selon l'expression suivante $P/P_0 = \frac{[Ca^{2+}]/K_d^n}{1 + [Ca^{2+}]/K_d^n}$ où P/P₀ représente la tension relative, n le coefficient de Hill et K_d la constante de dissociation apparente ($pK_d = -\log K_d = pCa_{50}$). Selon Moss et coll. (1983) la relation T/pCa est mieux décrite par deux coefficients : n₁ (n dans l'équation) calculé pour P/P₀ > 0,50 et n₂ (n dans l'équation) pour P/P₀ < 0,50. Ces paramètres peuvent également être obtenus à partir de la relation T/pSr. Les relations T/pCa (et T/pSr), pour chaque groupe de fibres, sont représentées graphiquement en reportant les valeurs moyennes de la tension relative ± l'erreur standard à la moyenne de chaque groupe en fonction de la concentration en Ca (Sr). La différence entre les paramètres caractéristiques de l'affinité des protéines contractiles pour le Ca et le Sr permet de définir de manière physiologique le type de la fibre. De plus, une procédure simplifiée est utilisée pour définir au début de chaque manipulation le type de la fibre étudiée : une même concentration de Ca et de Sr (pCa et pSr 5,2) est appliquée à la fibre. Cette concentration fut choisie après l'analyse de quelques relations T/pCa et T/pSr : si une tension beaucoup plus faible est développée en pSr 5,2 qu'en pCa 5,2, la fibre est de type rapide, alors que si les tensions sont équivalentes, la fibre est de type lent (voir le chapitre VI-A des "données bibliographiques").

2 - Vitesse maximale de raccourcissement

L'expression des amplitudes de relâchement (ΔL) en fonction du temps nécessaire au redéveloppement d'une tension (Δt) se matérialise par une droite dont la pente, calculée selon une méthode de régression linéaire, est l'expression de la Vmax (Fig. 18). Celle-ci est ensuite normalisée à la longueur de la fibre étirée dans la solution R. Vmax est donc exprimée en longueur de fibre par seconde (LF/s).

F - Analyse statistique des résultats

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes, affectées de leur erreur standard à la moyenne ($\bar{X} \pm E.S.M.$). Les différences statistiques entre les moyennes sont estimées par le test *t* de Student appliqué aux faibles effectifs, $p \leq 0,05$ étant choisi comme seuil de signification.

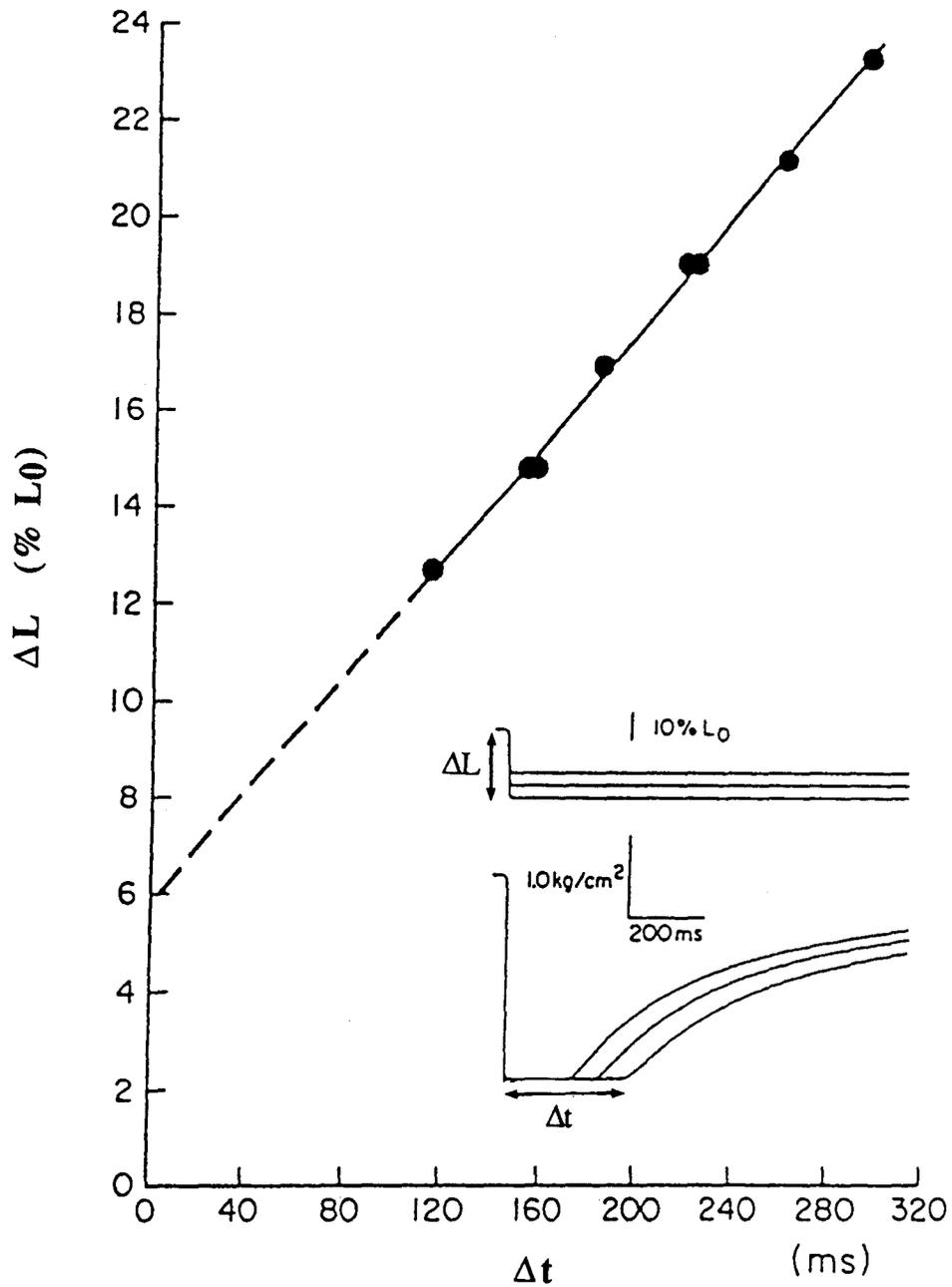


Figure 18 : Détermination de la vitesse maximale de raccourcissement d'une fibre isolée (d'après Reiser et coll. 1985)

IV - ANALYSE DE LA COMPOSITION EN PROTEINES MYOFIBRILLAIRES

A - Electrophorèses

La composition en protéines myofibrillaires est déterminée par électrophorèse monodimensionnelle sur gels de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) selon la technique de Laemmli (1970).

La séparation des isoformes des protéines contractiles est effectuée sur deux gels de concentrations différentes en raison de l'importante différence de masse moléculaire entre les chaînes lourdes (≈ 200 kD) et légères (16 à 20 kD) de myosine.

Les gels utilisés ont une dimension de 160 x 180 x 0,75 mm. Les électrophorèses sont réalisées à température constante dans une cuve Hoeffler model SE600 (San Francisco, Californie).

1 - Séparation des chaînes lourdes de myosine (MHC)

Les isoformes de MHC sont séparées sur un gel de concentration 3,5% suivi d'un gel de séparation à 6%, selon la méthode de Carraro et Catani (1983), améliorée par Danieli-Betto et coll.(1986). Cette amélioration consiste en l'addition de 40% de glycérol dans les gels et permet une bonne séparation des isoformes de MHC. Le tampon de migration a une composition de 32,5 mM Tris, 288 mM Glycine et 0,1% SDS (p/v). La migration électrophorétique est réalisée à 250 V, avec une intensité maximale de 13 mA/plaque, durant 6 h.

L'identification des différentes isoformes de MHC fut réalisée par comparaison de la migration d'isoformes lentes (provenant du soleus) et d'isoformes rapides (provenant de l'EDL) et par immunoblotting (voir chapitre "résultats", 2^{ème} partie, I et II).

2 - Séparation des chaînes légères de myosine (MLC) et des isoformes de protéines régulatrices

La séparation des isoformes de MLC et de protéines régulatrices est réalisée sur un gel de séparation à 12% et un gel de concentration à 3,5% (Giulian et coll. 1983). Le tampon de migration a une composition de 65 mM Tris, 576 mM Glycine et 0,1% SDS. La migration électrophorétique est réalisée à 350 V, avec une intensité maximale de 16 mA/plaque, durant 5 h.

L'identification des différentes isoformes de MLC fut réalisée grâce à la co-migration de marqueurs de poids moléculaires. La migration des isoformes de TnC fut vérifiée par la co-migration d'isoformes de TnC purifiées et par immunoblotting .

3 - Préparation des échantillons

a) Fibre musculaire isolée

Après les mesures physiologiques, la fibre est solubilisée dans le tampon d'échantillon de Laemmli puis stockée à -20°C. La composition de ce tampon est la suivante : 62,5 mM Tris (pH 6,8), 1% (p/v) SDS, 15% (v/v) glycérol et 5% (v/v) β mercaptoethanol. Une partie de cet échantillon est utilisée pour l'analyse des MHC et le reste pour l'analyse des MLC.

b) Coupes de muscles entiers

Les sections cryostatées sont traitées selon la méthode décrite par Carraro et Catani (1993). Environ 10 sections musculaires de 20 μ m d'épaisseur sont utilisées. Elles sont lavées deux fois à 4°C par une solution de KCl 50mM contenant 1 μ g/ml de pepstatine et 70 μ g/ml de PMSF. Le précipité est resuspendu dans 100 μ l de tampon de Laemmli. Cette opération permet une extraction grossière des protéines contractiles.

4 - Coloration des gels

a) Electrophorèses de fibres isolées

La quantité de protéines contenues dans un segment de fibre musculaire est peu importante. La technique de coloration utilisée est donc une coloration à l'argent très sensible, décrite par Giulian et coll. en 1983.

Après la migration, le gel est fixé pendant 30 mn dans une solution à 33% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique. Il est ensuite transféré dans une solution à 10% (v/v) glutaraldéhyde et laissé sous agitation pendant 15 h. Cette étape permet une meilleure fixation des protéines, en particulier des troponines. Un rinçage de 5 h sous eau distillée est nécessaire pour éliminer le film de glutaraldéhyde déposé à la surface du gel. Le gel est ensuite coloré pendant 5 mn par une solution d'argent ammoniacale. Après deux rinçages à l'eau distillée, la révélation est réalisée par une solution acide acétique/formaldéhyde.

Un densitomètre laser (Quantiscan Microvial Systems, Biosoft, U.K) est utilisé pour déterminer la proportion relative des isoformes de MHC et MLC exprimées dans les fibres de soleus de singe rhésus.

b) Electrophorèses de coupes de muscles

Ces électrophorèses sont colorées au bleu de Coomassie. Après la migration, le gel est laissé sous agitation pendant 3 h dans une solution à 40% (v/v) éthanol, 5% (v/v) acide acétique et 1% (p/v) bleu de coomassie R250. La décoloration est effectuée par plusieurs bains dans une solution à 40% (v/v) méthanol et 7% (v/v) acide acétique.

B - Immunoblotting

Le transfert des protéines du gel de polyacrylamide sur la membrane de nitrocellulose est réalisé selon la méthode de Towbin et coll. (1979) à ampérage constant de 250 mA durant 12 h. Après le transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée pendant 1 h à température ambiante dans une solution tampon A (50 mM Tris HCl, 2 mM CaCl₂, 85 mM NaCl, pH 8,0) contenant 3% (p/v) de sérum-albumine bovine (BSA) qui sature les sites libres de la membrane. La nitrocellulose est ensuite incubée avec le premier anticorps dilué dans ce tampon de saturation, pendant 2 h à température ambiante. Trois lavages sont ensuite réalisés avec la solution A, contenant 0,1% (p/v) de BSA et 0,2% (v/v) de détergent Nonidet P40. L'incubation avec le second anticorps et les lavages successifs sont identiques à ceux décrits pour le premier anticorps, mais le temps d'incubation est fixé à 1 h. La révélation est réalisée par le 3'-3' diaminobenzidine, 10mM d'imidazole sont ajoutés à cette solution de révélation afin d'augmenter l'intensité de la réaction (Trojanowski et coll. 1983).

La première incubation a été réalisée avec les anticorps monoclonaux RT-D9 et BF-32 qui nous ont été gracieusement fournis par le Professeur Schiaffino. L'anticorps RT-D9 est dirigé contre les isoformes de MHC 2X et 2B, le BF-32 contre les MHC 1 et 2A. Ils ont été incubés à la dilution de 1/500. Le second anticorps utilisé, dilué au 1/1000, est dirigé contre les IgG de souris, conjugué à la peroxydase (Sigma). Un témoin "blanc" a été réalisé en incubant directement cet anti-IgG de souris sur une portion de la membrane après transfert.

PREMIERE PARTIE

Etude des propriétés fonctionnelles de fibres musculaires de rat : relation avec leur composition en protéines myofibrillaires

La première partie de ce travail décrit les propriétés fonctionnelles de fibres isolées de deux muscles de la patte postérieure du rat : le soleus, muscle lent, et le vastus intermedius, muscle mixte. Comme cela est décrit dans le chapitre "matériels et méthodes", deux groupes de rat ont fait l'objet de cette étude : des rats "contrôle" et des rats exposés à 14 jours de microgravité réelle. Les fibres étudiées ont été regroupées selon leur composition en protéines contractiles, et plus particulièrement selon leur composition en chaînes lourdes de la myosine. Certains types de fibres ont été observés à la fois dans les muscles "contrôle" et dans les muscles de rats soumis à la microgravité. Pour ces fibres, la comparaison des propriétés fonctionnelles que nous étudions a montré qu'elles étaient identiques, que le rat ait été ou non exposé à la microgravité. Les fibres présentant un même profil électrophorétique ont donc été regroupées, quel que soit le groupe d'origine du rat. Les propriétés fonctionnelles étudiées sont les propriétés d'activation de la tension par le calcium et le strontium. Pour chaque groupe de fibres, les résultats seront présentés selon la même organisation : les T/pCa et T/pSr des fibres de chaque groupe sont illustrées par la partie A de la figure "X". Ces courbes correspondent à l'activation par le Ca et le Sr des mêmes fibres. La représentation des données expérimentales suivant la forme linéarisée de l'équation de Hill est donnée à la partie B de la même figure. Les pentes des droites correspondent aux coefficients n_1 et n_2 , comme définis dans le chapitre V-A des données bibliographiques. L'intersection de ces droites avec l'axe des abscisses correspond à la pCa_{50} ou la pSr_{50} selon les données considérées. Tous les paramètres caractéristiques de l'activation par le Ca et le Sr sont regroupés dans le tableau suivant immédiatement la figure "X". Des données complètes (propriétés fonctionnelles et composition en protéines) ont été obtenues sur 46 fibres de soleus et 20 fibres de vastus intermedius (Vast. Int.). Cependant, 10 fibres de soleus soumis à 14 jours de microgravité présentaient une composition en MHC particulière, jamais observée dans le soleus "contrôle". L'étude de ces fibres sera reportée dans la deuxième partie du chapitre "résultats".

I - FIBRES N'EXPRIMANT QU'UN TYPE D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES

A - Description du profil électrophorétique

Les figures 19 et 19bis illustrent les profils électrophorétiques obtenus par SDS PAGE de fibres isolées de soleus et de vastus intermedius. Deux types de MHC sont détectés : une bande de haute mobilité électrophorétique, la MHC1, isoforme lente, et une bande de mobilité plus réduite, la MHC2A, isoforme rapide. A ces 2 isoformes de chaînes lourdes de la myosine, correspondent 2 types de profil de migration de protéines myofibrillaires de poids moléculaires plus faibles. Les isoformes lentes de MLC1 (MLC1s), MLC2 (MLC2s) et TnC (TnCs) sont associées à la MHC1. Par contre, dans les fibres dont l'isoforme de MHC est la MHC2A, les isoformes rapides des chaînes légères (MLC1f, MLC2f, MLC3) et de la TnC sont exprimées.

Les isoformes rapides de MLC1 et MLC2 migrent plus loin que les isoformes lentes ; la MLC3 est une isoforme spécifiquement rapide. La TnC_f migre entre la MLC1f et la MLC2f, alors que la TnC_s est située sous la MLC2s, au niveau de la MLC2f, dans ce système électrophorétique. La position des TnC_s et TnC_f est vérifiée par co-migration d'isoformes de TnC purifiées (Fig. 19 et 19bis).

B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium

1 - Fibres de type 1

Selon notre critère de classification, les fibres de type 1 n'expriment que l'isoforme lente de MHC. De plus, comme l'illustrent les figures 19 et 19bis, le profil électrophorétique des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire révèle la présence d'isoformes lentes exclusivement. Les profils électrophorétiques sont identiques pour les fibres de soleus et de vastus intermedius (Vast. Int.).

a) Fibres de type 1 du soleus

Les fibres de type 1 isolées d'un muscle typiquement lent, le soleus, sont un peu plus sensibles au Ca qu'au Sr, comme le montrent la figure 20A et le tableau 3. En effet, même si les seuils d'activation sont identiques pour les 2 ions, les concentrations en Ca nécessaires pour obtenir 50% de la tension maximale et pour obtenir la tension maximale sont significativement moins élevées que les concentrations en Sr permettant d'obtenir ces deux valeurs de tension caractéristiques (Tableau 3).

De plus, les coefficients de Hill sont légèrement plus élevés pour l'activation par le Ca que pour l'activation par le Sr (Fig. 20B). Cette variation dans les pentes des T/pCa

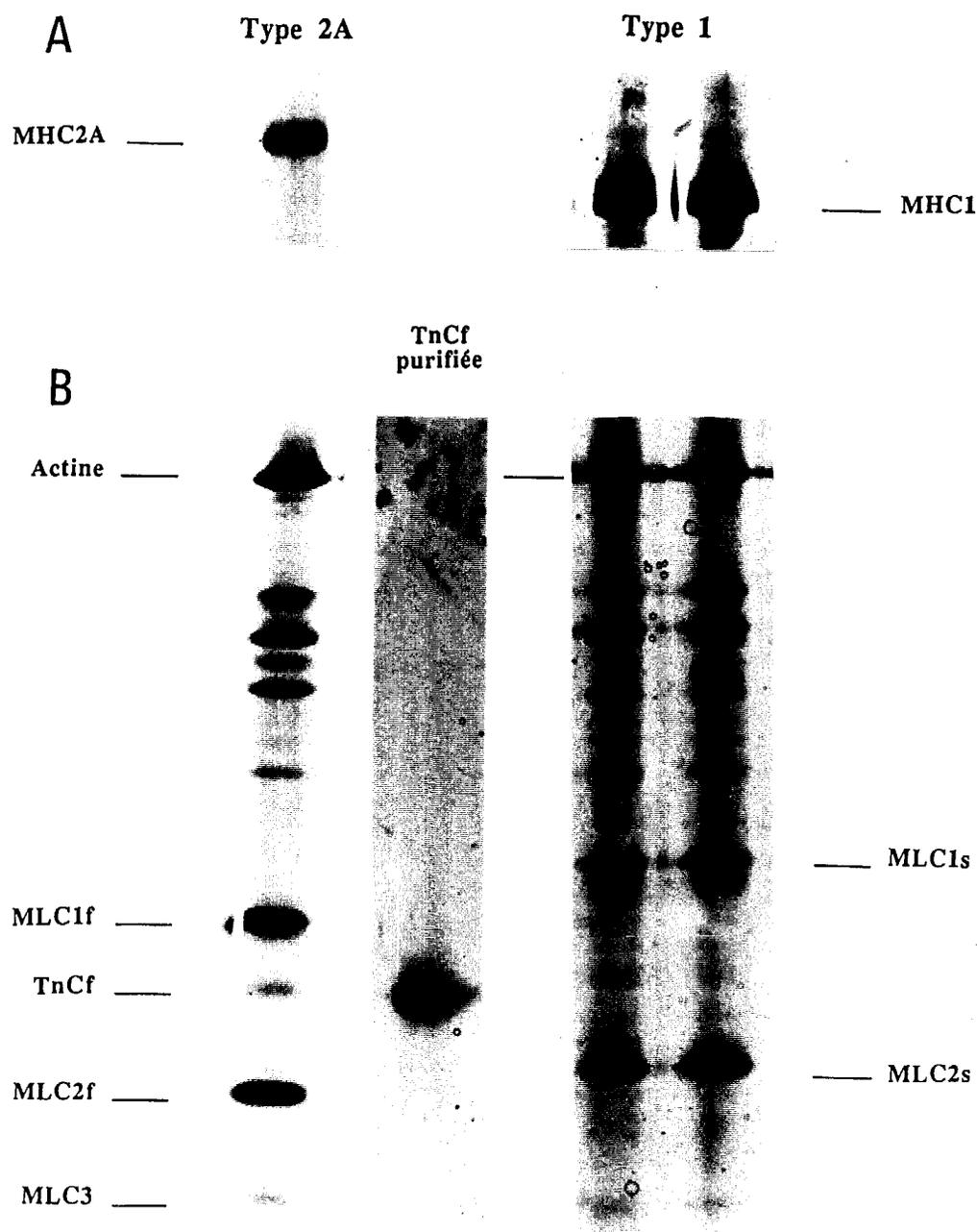


Figure 19 : Profil électrophorétique des fibres de types 1 et 2A de soleus de rat
 A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%
 B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 12%

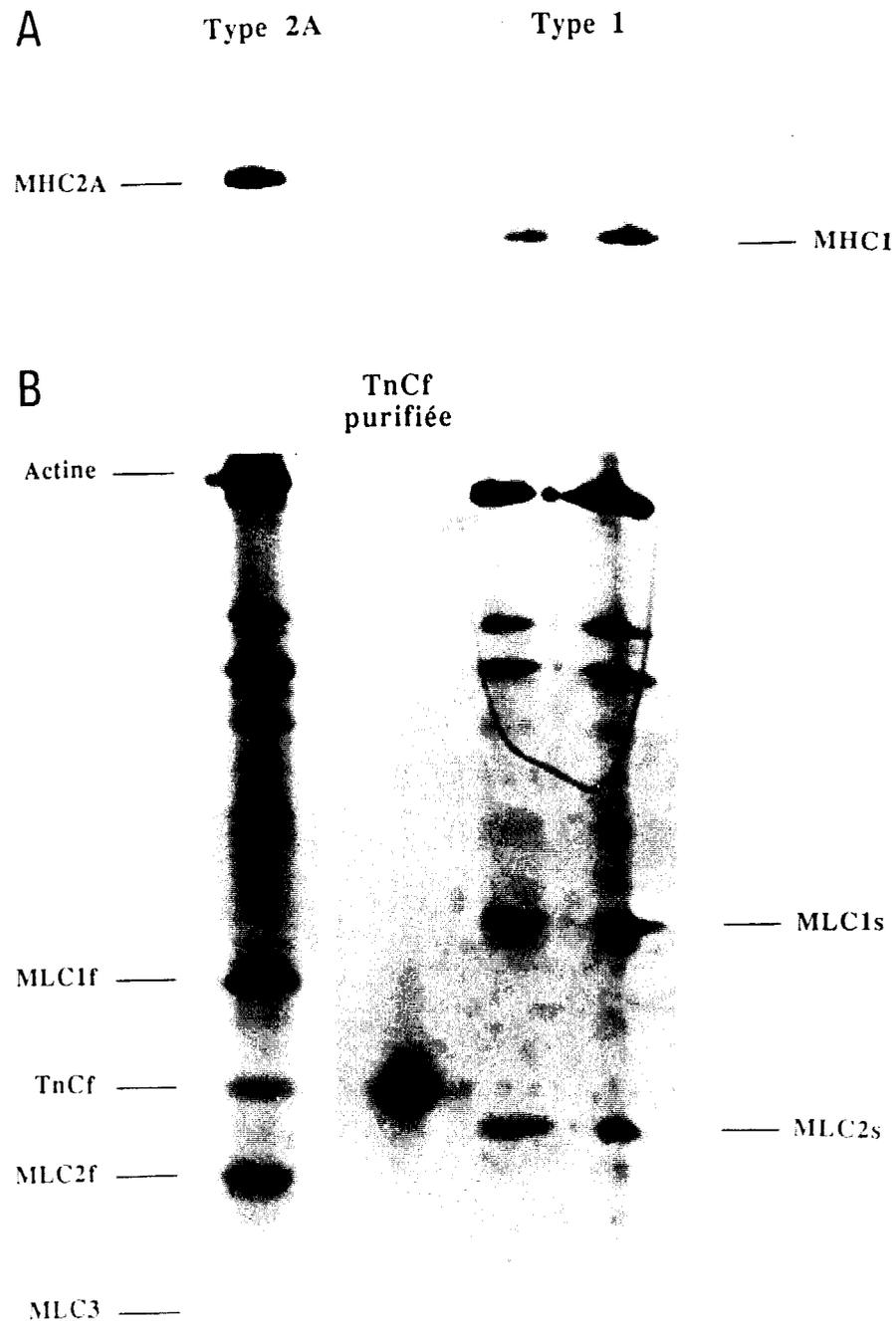


Figure 19bis : Profil électrophorétique des fibres de types 1 et 2A de vastus intermedius de rat
 A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%
 B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 12%

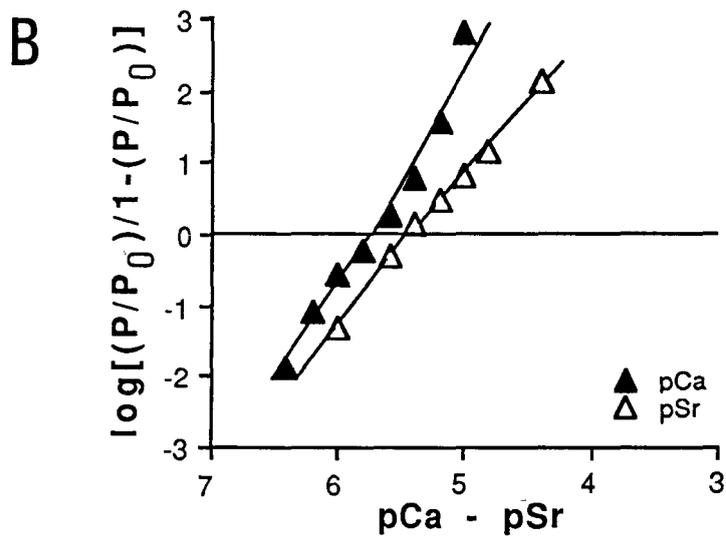
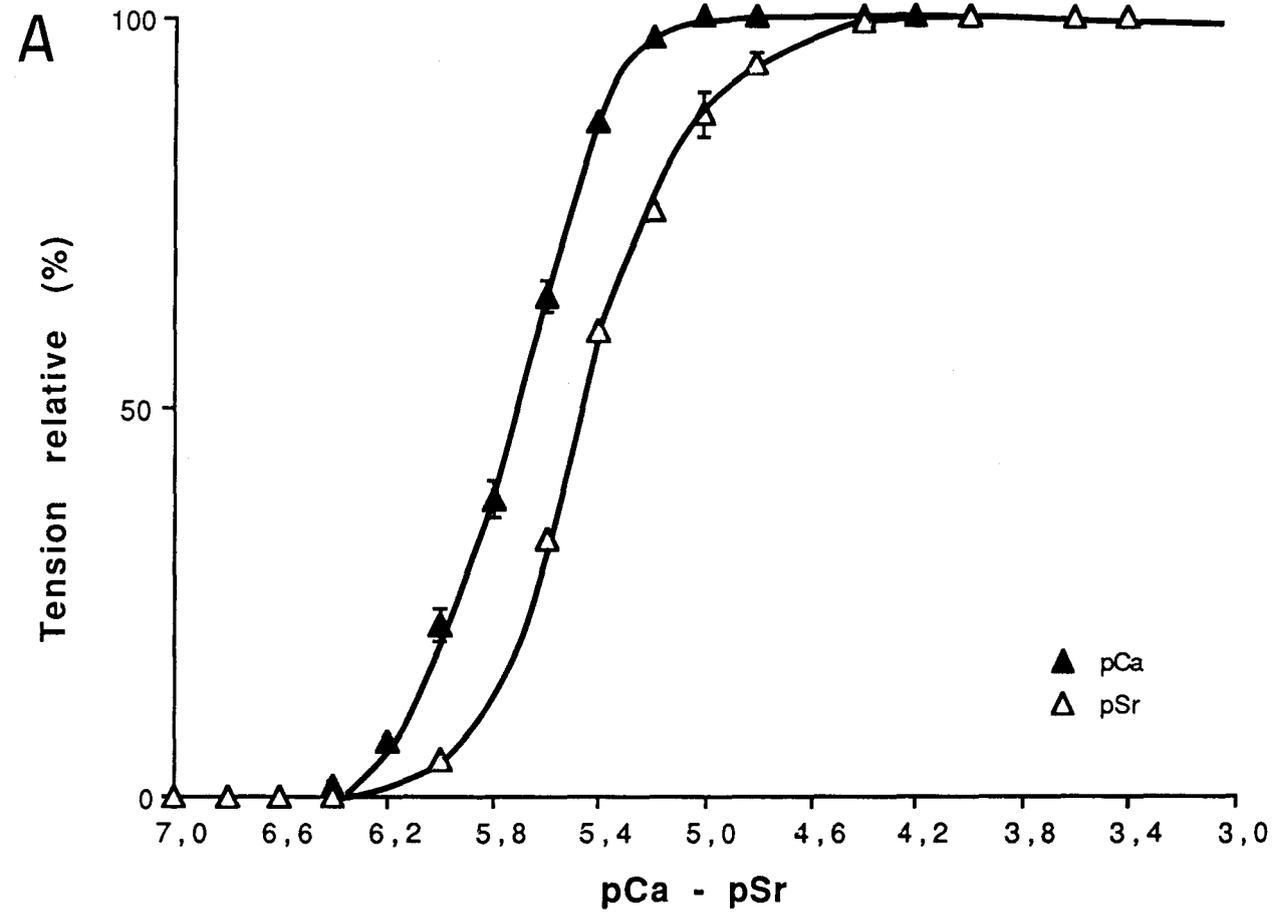


Figure 20 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 du soleus de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de type 1 de soleus

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa ₅₀ ou pSr ₅₀	n ₁	n ₂	n
Ca	6,68 ± 0,04 (n = 20)	4,79 ± 0,03 (n = 20)	5,74 ± 0,02 (n = 20)	2,99 ± 0,18 (n = 18)	2,37 ± 0,14 (n = 16)	2,49 ± 0,09 (n = 18)
Sr	6,61 ± 0,06 (n = 18)	4,27 ± 0,06 (n = 18)	5,45 ± 0,02 (n = 18)	2,04 ± 0,22 (n = 16)	2,28 ± 0,16 (n = 9)	2,07 ± 0,13 (n = 18)
Δ	0,09 ± 0,07 (n = 18)	0,52 ± 0,08 (n = 18)	0,30 ± 0,01 (n = 18)			

Tableau 3 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 1 du soleus de rat (illustrées à la figure 20)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

** et *** : Différences significatives à p<0,01 et p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

et T/pSr rend compte de la non-uniformité du décalage entre les 2 courbes, mesuré par la différence entre les seuils, les pCa_{50} et pSr_{50} , et les pCa et pSr activant la fibre de façon maximale (valeurs de Δ du tableau 3). La valeur de la concentration en cation activateur nécessaire pour obtenir 50% de la tension maximale est en général considérée comme critère de sensibilité de la fibre à ce cation. Pour les fibres de type 1, la différence de sensibilité selon ce critère ($pCa_{50}-pSr_{50}$) est de $0,30 \pm 0,01$ ($n=18$). Les fibres de type 1 du soleus sont donc 2 fois moins sensibles au Sr qu'au Ca.

b) Fibres de type 1 du vastus intermedius

Comme pour les fibres lentes du soleus, ces fibres de type 1, isolées d'un muscle mixte, le vastus intermedius, sont plus sensibles au Ca qu'au Sr (Fig.21A ; Tableau 4). Les valeurs de pCa_{50} et de pCa permettant d'obtenir la tension maximale sont significativement plus élevées que les valeurs de pSr correspondantes. Une concentration en Ca plus faible que la concentration en Sr est suffisante pour obtenir une tension, mais cette différence entre les seuils d'activation par le Ca et le Sr n'est pas significative. Les valeurs des coefficients de Hill sont, comme pour les fibres de type 1 du soleus, plus faibles, mais de manière non significative, pour la T/pSr que pour la T/pCa (Fig. 21B). L'absence de différence statistique entre ces paramètres peut être liée à la taille plus petite de l'échantillon représentant les fibres de type 1 du Vast. Int.

Selon les valeurs de la pCa_{50} et de la pSr_{50} , les fibres de type 1 du Vast. Int. sont également deux fois plus sensibles au Ca qu'au Sr.

c) Comparaison des fibres de type 1 des muscles soleus et vastus intermedius

- différence de sensibilité au calcium et au strontium

Les fibres de type 1 des 2 muscles présentent des différences d'activation par le Ca et le Sr identiques : ces fibres ont la même différence de sensibilité au Ca par rapport au Sr comme l'indiquent les valeurs de (pCa seuil- pSr seuil) ; ($pCa_{50}-pSr_{50}$) ; (pCa d'activation max- pSr d'activation max) (voir Tableaux 3 et 4).

- sensibilité au calcium

Certaines caractéristiques d'activation de la tension par le Ca sont identiques pour les fibres 1 des deux différents muscles : la pCa_{50} , la pCa nécessaire pour l'activation maximale et la pente correspondant à la partie inférieure de la T/pCa (n_2). Une différence significative à $p<0,05$ est observée pour le seuil d'activation et les coefficients n_1 et n . Les fibres de Vast. Int. développent une tension pour une valeur de pCa de $6,86 \pm 0,08$ ($n=9$), alors que les fibres de même type du soleus répondent aux pCa supérieure ou égale à $6,68 \pm 0,04$ ($n=20$). La pente de la partie supérieure de la T/pCa (n_1) est plus faible pour les fibres 1 du Vast. Int. ; ce phénomène est également traduit par la différence de la pente globale (n) de la T/pCa entre les fibres de type 1 du Vast. Int. et du soleus.

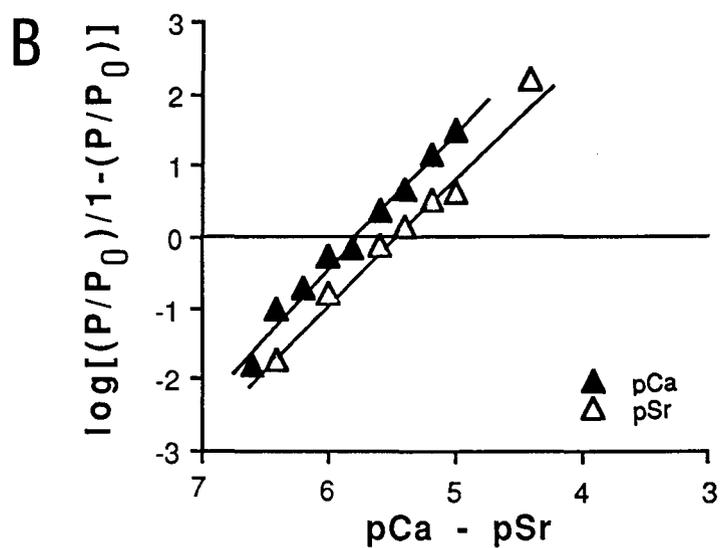
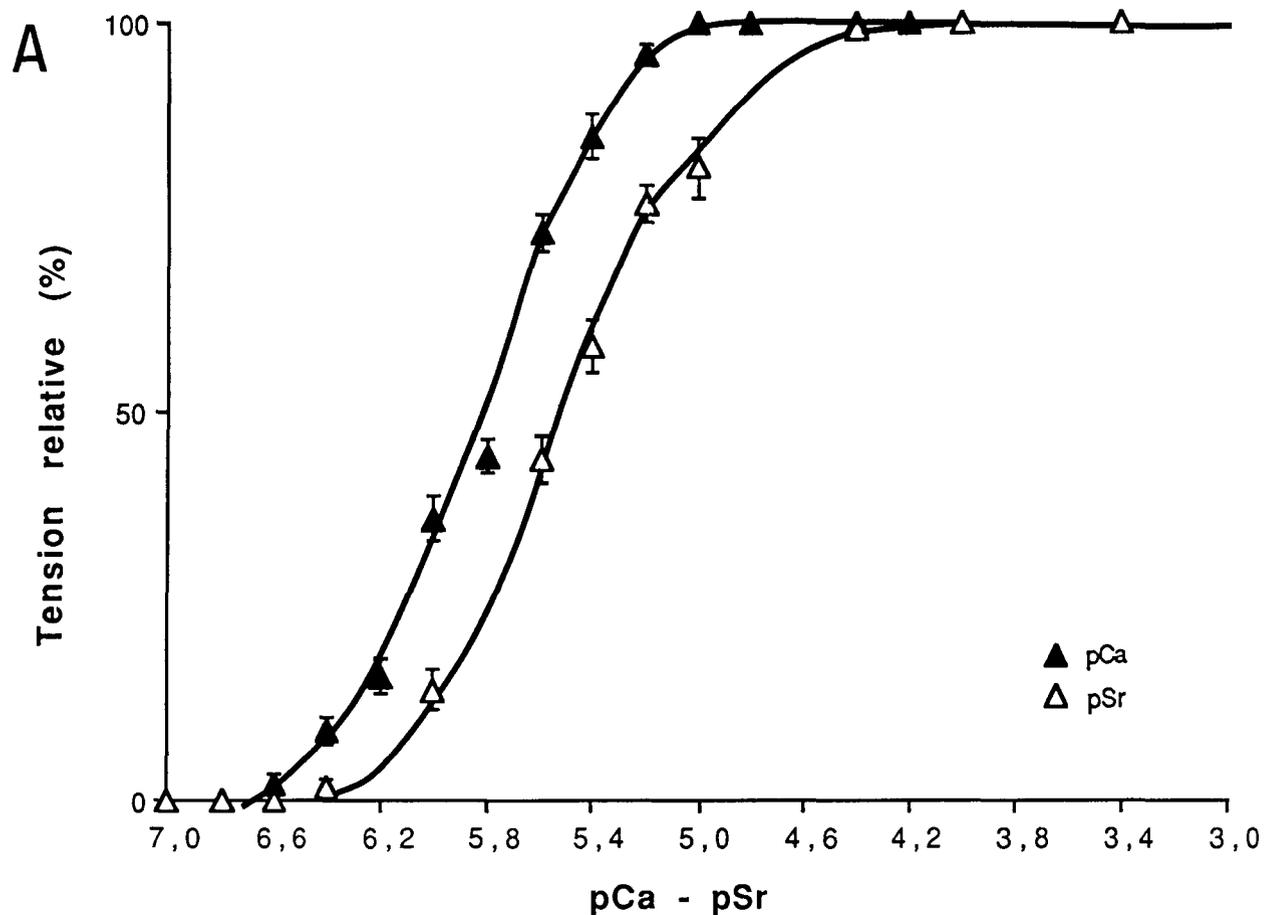


Figure 21 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 du vastus intermedius de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de type 1 de vastus intermedius

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa ₅₀ ou pSr ₅₀	n ₁	n ₂	n
Ca	6,86 ± 0,08 (n = 9)	4,66 ± 0,07 (n = 9)	5,81 ± 0,03 (n = 9)	1,99 ± 0,31 (n = 6)	2,22 ± 0,18 (n = 8)	2,02 ± 0,11 (n = 9)
Sr	6,69 ± 0,10 (n = 9)	4,20 ± 0,08 (n = 9)	5,49 ± 0,03 (n = 9)	1,43 ± 0,13 (n = 7)	2,13 ± 0,27 (n = 7)	1,92 ± 0,15 (n = 9)
Δ	0,17 ± 0,06 (n = 9)	0,46 ± 0,08 (n = 9)	0,32 ± 0,03 (n = 9)			

Tableau 4 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 1 du vastus intermedius de rat (illustrées à la figure 21)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

*** : Différences significatives à p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

- sensibilité au strontium

La comparaison de tous les paramètres caractéristiques de l'activation par le Sr des fibres de type 1 du soleus et du Vast. Int. (Tableaux 3 et 4) montre que leurs propriétés d'activation par cet ion peuvent être considérées comme identiques.

2 - Fibres de type 2A

Les fibres exprimant l'isoforme 2A de MHC présentent un profil de migration électrophorétique de type rapide pour les MLC et la TnC (Fig. 19 et 19bis)

a) *Fibres de type 2A du soleus*

Les différences entre les caractéristiques d'activation par le Ca et le Sr des fibres de type 2A de soleus sont beaucoup plus marquées que pour les fibres de type 1 du même muscle. Comme le montre la figure 22A, la T/pSr est fortement décalée vers la droite par rapport à la T/pCa. Les valeurs de Δ , indiquées dans le tableau 5, caractérisent cette différence de réactivité des fibres 2A aux deux cations.

Les paramètres de seuil, de concentration en cation nécessaire pour obtenir 50% de la tension et la tension maximale sont significativement différents entre la T/pCa et la T/pSr des fibres identifiées "2A". Les valeurs des différents coefficients de Hill montrent que la T/pSr est beaucoup moins pentue que la T/pCa (Fig. 22B et Tableau 5). Selon le critère de sensibilité pCa₅₀-pSr₅₀, les fibres de type 2A sont 18 fois moins sensibles au Sr qu'au Ca.

b) *Fibres de type 2A du vastus intermedius*

Le décalage entre la T/pCa et la T/pSr des fibres 2A du Vast. Int. (Fig. 23A) est tout à fait comparable à celui observé pour les fibres 2A de soleus. Les résultats obtenus sur cet échantillon de taille plus importante (n=8 versus n=3 pour le soleus) confirment les données décrites pour les fibres 2A du soleus. Les seuils d'activation par le Ca et le Sr, la pCa₅₀ et la pSr₅₀, la pCa et la pSr d'activation maximale sont significativement différents pour ces fibres (Tableau 6). Les valeurs des différences correspondant à ces paramètres sont beaucoup plus importantes que pour les fibres de type 1 du même muscle. Comme le montrent la figure 23B et le tableau 6, les coefficients de la pente de la T/pSr sont moins élevés que ceux de la T/pCa.

c) *Comparaison des fibres de type 2A des muscles soleus et vastus intermedius*

- différence de sensibilité au calcium et au strontium

Les fibres de type 2A du Vast. Int. et du soleus présentent des différences d'activation par le Ca et le Sr similaires : pour la différence (pCa-pSr) d'activation maximale ($1,52 \pm 0,06$; n=8 pour le Vast. Int. vs $1,41 \pm 0,06$; n=3 pour le soleus) et $1,26 \pm 0,03$ (n=8) vs $1,26 \pm 0,06$ (n=3) pour la (pCa₅₀-pSr₅₀) des fibres de Vast. Int. et de soleus, respectivement. La différence de seuil d'activation entre le Ca et le Sr est

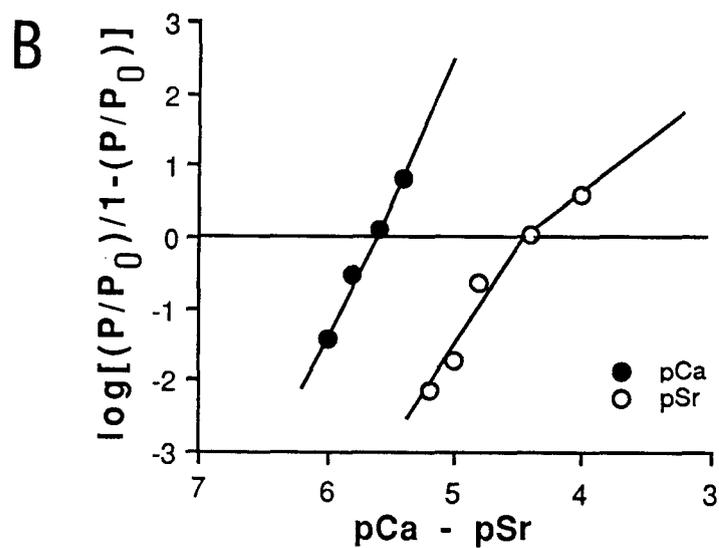
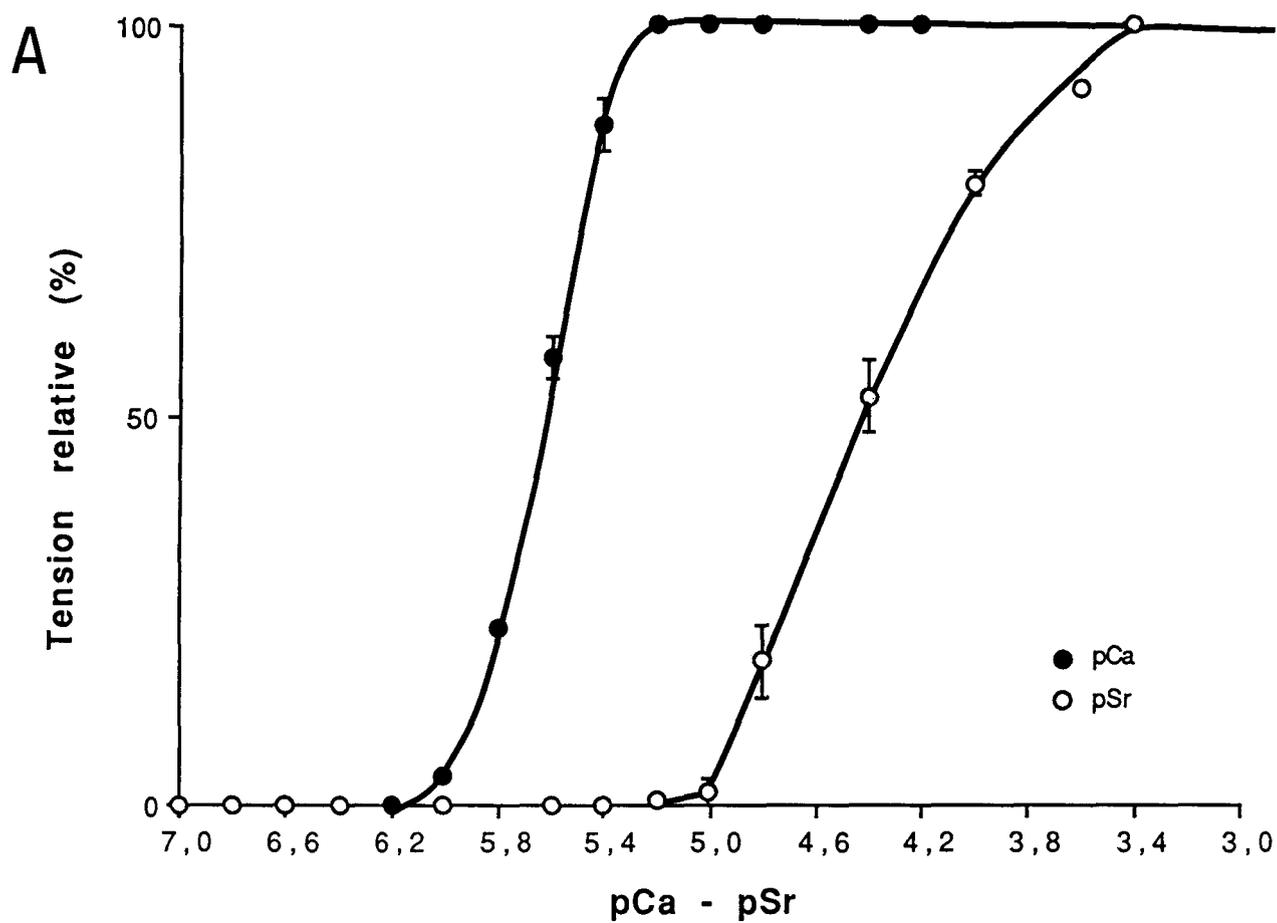


Figure 22 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 2A du soleus de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de type 2A de soleus

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa ₅₀ ou pSr ₅₀	n ₁	n ₂	n
Ca	6,25 ± 0,04 (n = 3)	5,01 ± 0,06 (n = 3)	5,63 ± 0,01 (n = 3)	3,05 ± 0,41 (n = 2)	4,37 ± 0,68 (n = 2)	3,77 ± 0,29 (n = 3)
Sr	*** 5,57 ± 0,04 (n = 3)	*** 3,60 ± 0,00 (n = 3)	*** 4,37 ± 0,05 (n = 3)	1,29 ± 0,05 (n = 2)	2,90 (n = 1)	** 1,69 ± 0,16 (n = 3)
Δ	0,67 ± 0,06 (n = 3)	1,41 ± 0,06 (n = 3)	1,26 ± 0,06 (n = 3)			

Tableau 5 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 2A du soleus de rat (illustrées à la figure 22)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

** et *** : Différences significatives à p<0,01 et p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

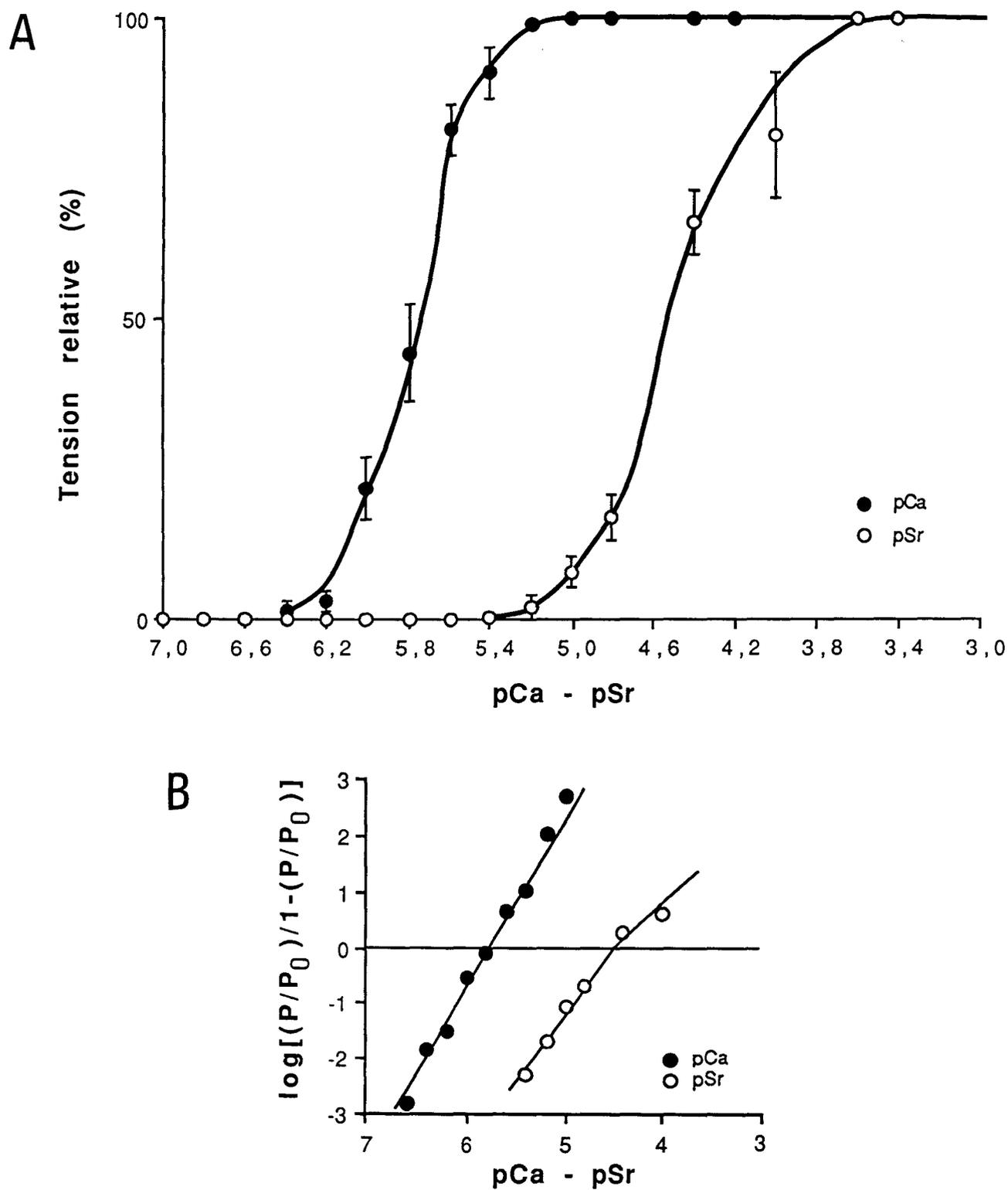


Figure 23 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 2A du vastus intermedius de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de type 2A de vastus intermedius

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa ₅₀ ou pSr ₅₀	n ₁	n ₂	n
Ca	6,46 ± 0,07 (n = 8)	5,08 ± 0,05 (n = 8)	5,77 ± 0,04 (n = 8)	2,71 ± 0,70 (n = 5)	3,50 ± 0,39 (n = 8)	3,33 ± 0,28 (n = 8)
Sr	*** 5,54 ± 0,08 (n = 8)	*** 3,56 ± 0,03 (n = 8)	*** 4,51 ± 0,05 (n = 8)	1,90 ± 0,11 (n = 2)	* 2,21 ± 0,21 (n = 6)	** 2,27 ± 0,11 (n = 8)
Δ	0,92 ± 0,06 (n = 8)	1,52 ± 0,06 (n = 8)	1,26 ± 0,03 (n = 8)			

Tableau 6 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 2A du vastus intermedius de rat (illustrées à la figure 23)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

*et ** et *** : Différences significatives à p<0,05 et p<0,01 et p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

plus marquée dans les fibres 2A du Vast. Int. Selon le critère (pCa_{50} - pSr_{50}), les fibres 2A isolées des 2 muscles sont 18 fois moins sensibles au Sr qu'au Ca.

- sensibilité au calcium

Les caractéristiques d'activation de la T/pCa des fibres de type 2A des deux muscles ne sont pas différentes significativement. Néanmoins, le seuil d'activation calcique et les coefficients de pente de la T/pCa sont un peu plus faibles pour les fibres de type 2A du Vast. Int. (Tableaux 5 et 6).

- sensibilité au strontium

Le seuil d'activation, la pSr_{50} et la pSr d'activation maximale ne sont pas significativement différents pour les fibres 2A des 2 muscles. Les coefficients n_1 et n de la T/pSr des fibres 2A du Vast. Int. sont significativement plus élevés ($p < 0,05$) que ceux des fibres 2A isolées du soleus (Tableaux 5 et 6).

C - Conclusions

1 - Influence du muscle d'origine des fibres

Les fibres d'un type donné (1 ou 2A) présentent des propriétés d'activation par le Ca et le Sr très proches, qu'elles soient isolées d'un muscle typiquement lent, le soleus, ou d'un muscle mixte, le vastus intermedius. Cette similarité entre les propriétés contractiles est cohérente avec leur composition identique en protéines myofibrillaires. Cependant, les fibres du vastus intermedius, qu'elles soient du type 1 ou 2A, semblent plus sensibles aux faibles concentrations calciques que les fibres 1 et 2A isolées du soleus. Les coefficients de pente (n_1 et n) des T/pCa des fibres de type 1 et 2A du Vast. Int. sont également plus faibles que ceux des T/pCa des fibres de type 1 et 2A du soleus. Ces variations ne sont pas liées à une différence de composition en protéines contractiles, puisque les profils électrophorétiques des fibres de chaque groupe sont identiques quel que soit le muscle d'origine des fibres.

Ces variations de la pente entre les fibres du même type des 2 muscles sont néanmoins à considérer avec circonspection. En effet, l'écart entre ces valeurs est assez faible. La faible taille de l'échantillon des fibres 2A du soleus contribue à diminuer la précision de ces valeurs pour ce groupe.

2 - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le calcium (Fig. 24 et 25)

La comparaison des paramètres de la T/pCa des fibres de type 1 et des fibres de type 2A met en évidence une différence de la réponse de ces 2 types de fibres au Ca (Fig. 24A et 25A). Que les fibres soient issues du soleus ou du vastus intermedius, la différence d'activation par le Ca des 2 types de fibres est identique.

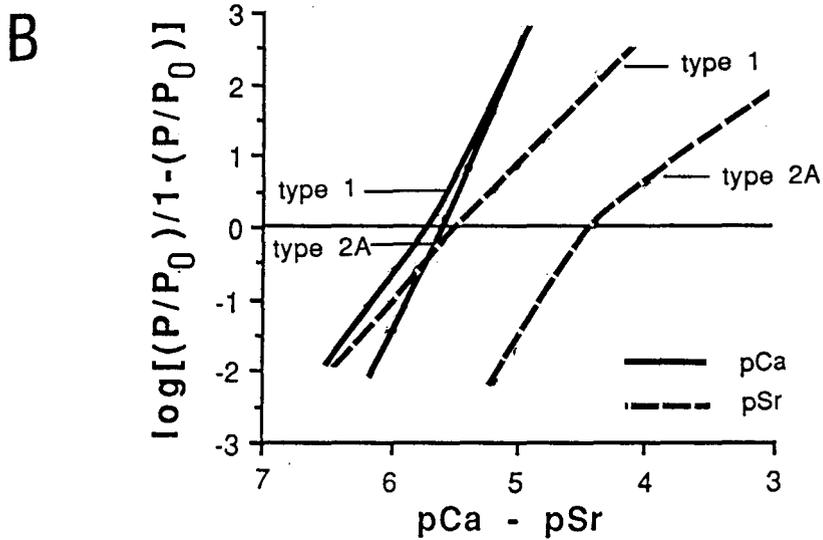
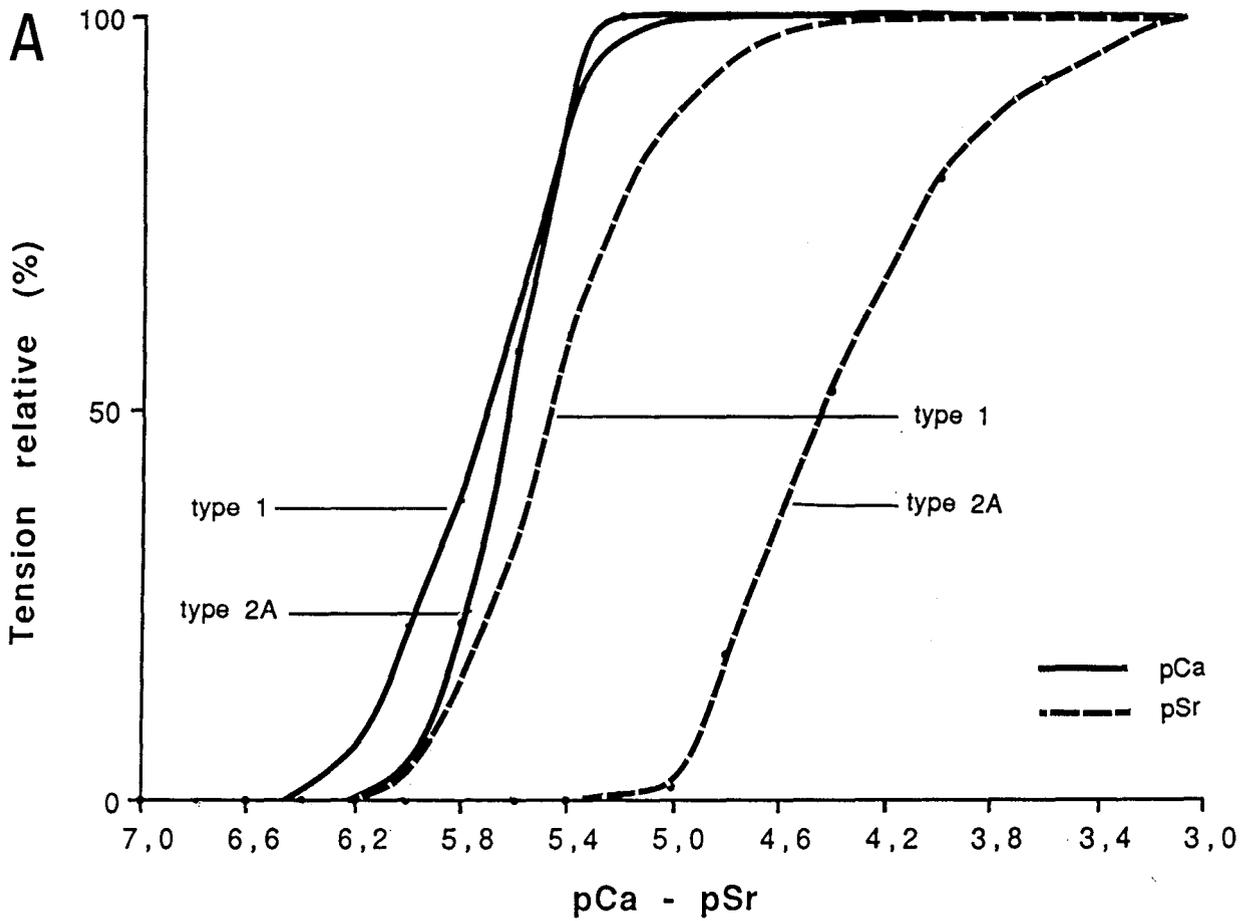


Figure 24 : Comparaison de l'activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 et de type 2A du soleus de rat (rappel des figures 20 et 22)

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

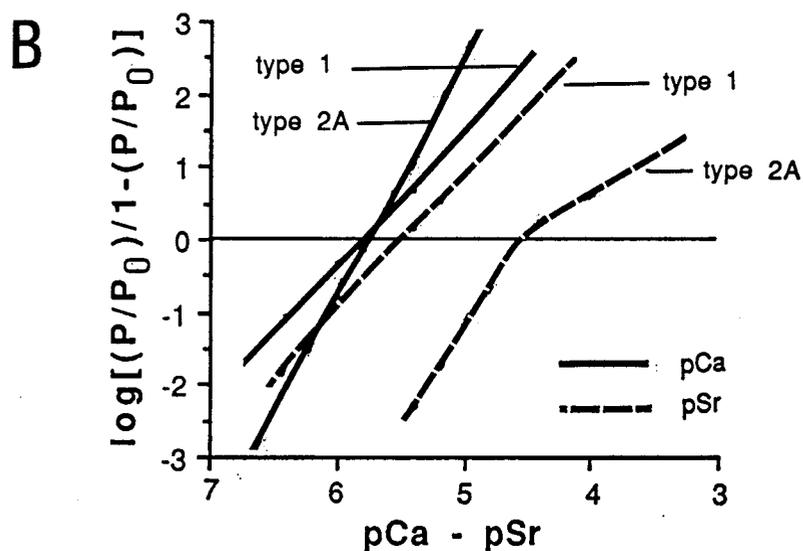
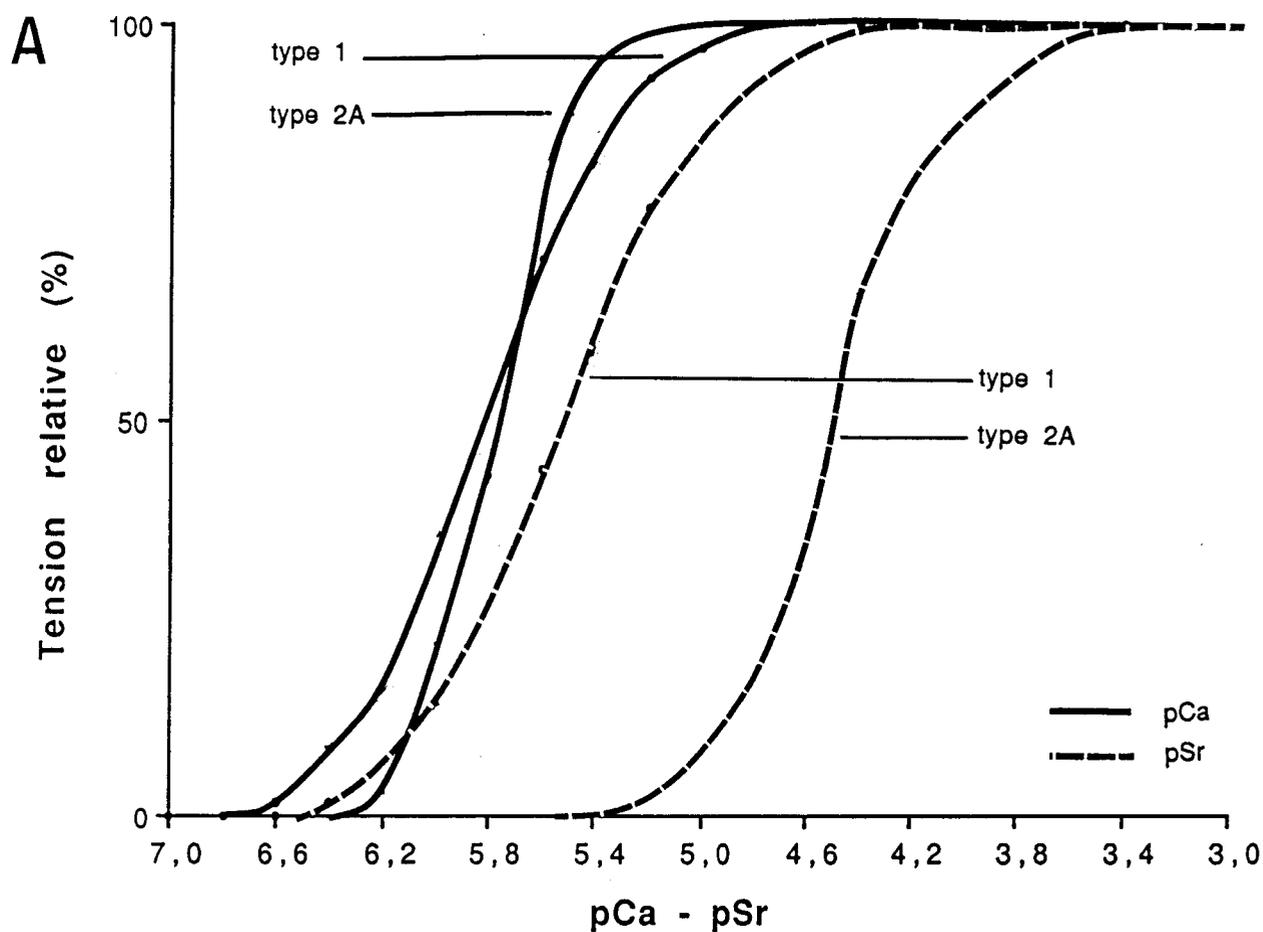


Figure 25 : Comparaison de l'activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 1 et type 2A du vastus intermedius de rat (rappel des figures 21 et 23)

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Le seuil d'activation par le Ca et la pCa_{50} sont décalés vers la droite pour les fibres 2A par rapport aux fibres de type 1. Le décalage du seuil est de 0,43 unité pCa pour les fibres de soleus et de 0,40 unité pCa pour les fibres de Vast. Int., cet écart est significatif dans les 2 cas. Le déplacement vers la droite de la pCa_{50} est beaucoup moins marqué : il est de 0,11 unité pCa pour les fibres de soleus, et significatif dans ce cas ; il est de 0,04 unité pCa, et non significatif, pour les fibres de Vast. Int.

Les T/pCa des fibres 2A sont plus pentues que celles des fibres de type 1. Une augmentation significative entre les coefficients n et n_2 est observée (Fig. 24B et 25B). Par contre, la différence entre les coefficients n_1 des 2 types de fibres est beaucoup moins marquée et n'est pas significative. Cette augmentation de la pente globale et de la pente de la T/pCa correspondant aux plus faibles niveaux d'activation calcique se traduit par la diminution de l'écart de pCa_{50} , comparé à l'écart des seuils, entre les 2 types de fibres. La pente de la T/pCa plus importante pour les fibres 2A se traduit également par une diminution significative de la pCa nécessaire pour obtenir l'activation maximale : décalage vers la gauche par rapport aux fibres de type 1 de 0,22 pour les fibres 2A de soleus et de 0,42 pour les fibres 2A de Vast. Int.

Les fibres de type 2A sont donc moins sensibles aux faibles concentrations calciques mais il semble que les phénomènes coopératifs intervenant dans l'activation par le Ca, estimés par les valeurs de la pente, soient plus importants dans les fibres rapides, en particulier lorsque la tension développée est inférieure à 50% de la tension maximale.

3 - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le strontium (Fig. 24 et 25)

La différence de composition en protéines myofibrillaires entraîne des modifications très importantes de certains paramètres d'activation de la tension par le Sr. Ces différences sont beaucoup plus marquées que celles observées, pour les mêmes paramètres, lors de l'activation calcique. En effet, les fibres 2A sont beaucoup moins sensibles au Sr que les fibres 1 : le décalage vers la droite de la pSr_{50} des fibres 2A est de l'ordre d'une unité pSr (Fig. 24A et 25A) ; un décalage du même ordre est observé pour le seuil d'activation. La concentration en Sr nécessaire pour obtenir l'activation maximale des fibres 2A est également significativement différente de la pSr d'activation maximale des fibres 1 (décalage vers la droite de l'ordre de 0,6 unité pSr pour les fibres 2A). Ces paramètres permettent donc de mettre en évidence une nette différence de sensibilité au Sr entre fibres 1 et 2A. Par contre, les paramètres de pente n , n_1 et n_2 (n_2 considéré sur le Vast. Int.) ne sont pas significativement différents entre les fibres 1 et 2A activées par le Sr (Fig. 24B et 25B). Ce cation, contrairement au Ca, ne permet pas de distinguer de différence de coopérativité mise en jeu dans l'activation entre les fibres lentes et rapides.

Les fibres exprimant les isoformes lentes de protéines contractiles présentent donc des propriétés d'activation par le Ca et le Sr qui peuvent être distinguées des fibres exprimant les isoformes rapides de ces protéines. La différence de sensibilité au Sr permet notamment de classer les fibres en 2 groupes, ces deux groupes correspondant aux deux compositions en protéines myofibrillaires.

II - FIBRES CO-EXPRIMANT LES DEUX TYPES D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES : FIBRES HYBRIDES

A - Description du profil électrophorétique

Comme l'illustrent les figures 26 et 26bis, des fibres exprimant à la fois l'isoforme lente (MHC1) et une isoforme rapide, la MHC2A, des chaînes lourdes de la myosine ont été mises en évidence dans les muscles soleus et vastus intermedius. Ces fibres expriment la MHC2A de façon majoritaire par rapport à la MHC1 ; l'intensité de coloration de la bande MHC2A étant nettement plus importante. Ce groupe de fibres sera donc dénommé "hybrides fast" (HF). Les deux types d'isoformes de chaînes légères de la myosine sont également exprimés dans ces fibres (partie B des Fig. 26 et 26bis) : la MLC1s et la MLC1f, la MLC2s et la MLC2f, et la MLC3. Selon les intensités de coloration des bandes correspondant aux 2 isoformes d'une chaîne légère, il est possible de déterminer que dans ces fibres, la MLC1f est exprimée de façon supérieure ou égale à la MLC1s ; la MLC2f est toujours plus exprimée que la MLC2s. Pour certaines de ces fibres, la bande correspondant à la MLC2s est réduite à l'état de trace. La MLC3 est également détectée dans certaines de ces fibres, mais toujours en faible quantité. Elle est donc très difficilement décelable. L'isoforme rapide de la TnC est exprimée dans les fibres de type HF. Cependant, la migration de la TnCs étant identique à celle de la MLC2f dans notre système électrophorétique, nous ne pouvons affirmer la co-expression des deux isoformes de TnC.

La composition en protéines contractiles des fibres HF est identique, que ces fibres soient issues du muscle soleus ou vastus intermedius.

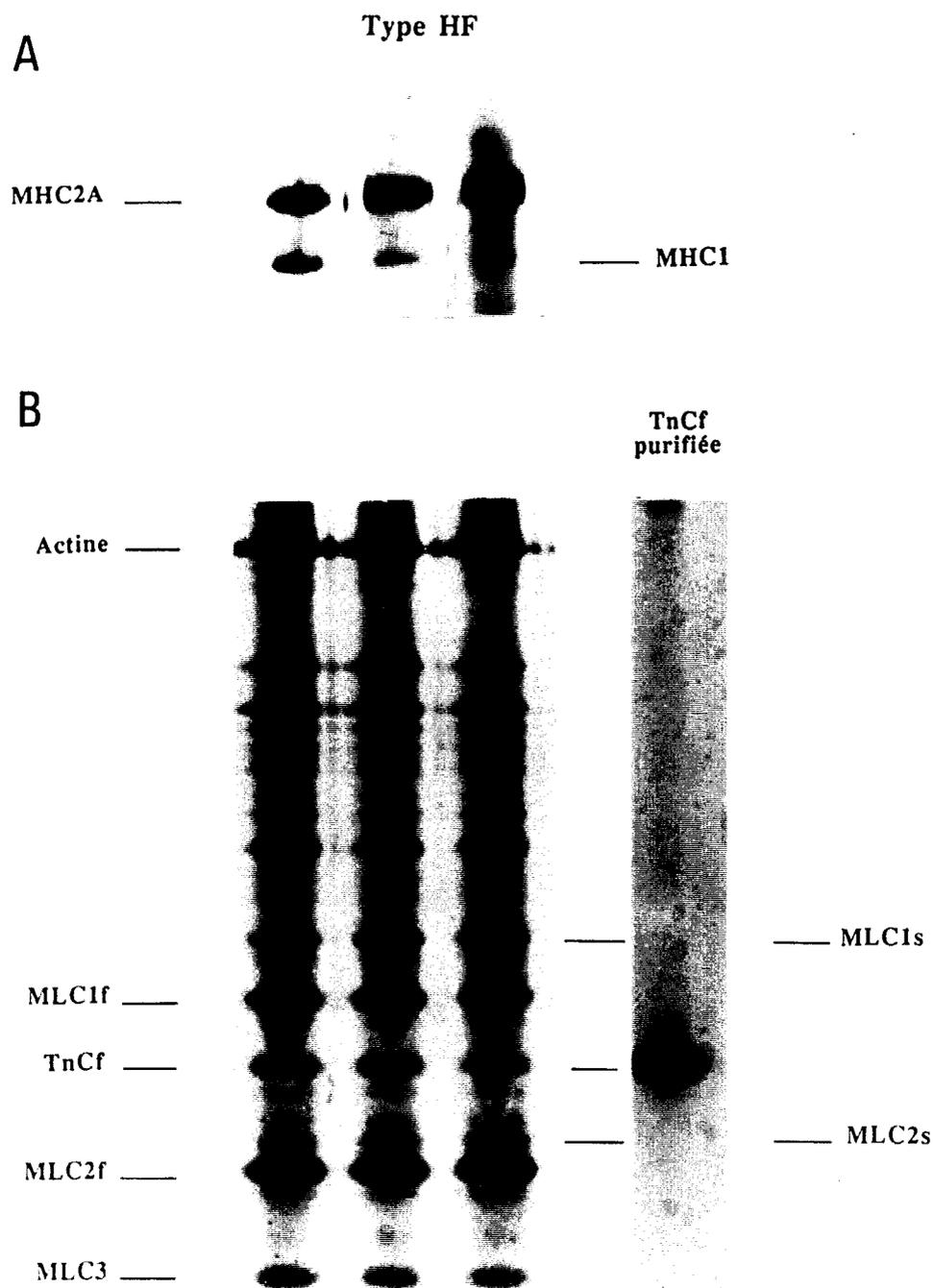


Figure 26 : Profil électrophorétique des fibres de type HF de soleus de rat
 A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%
 B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 12%

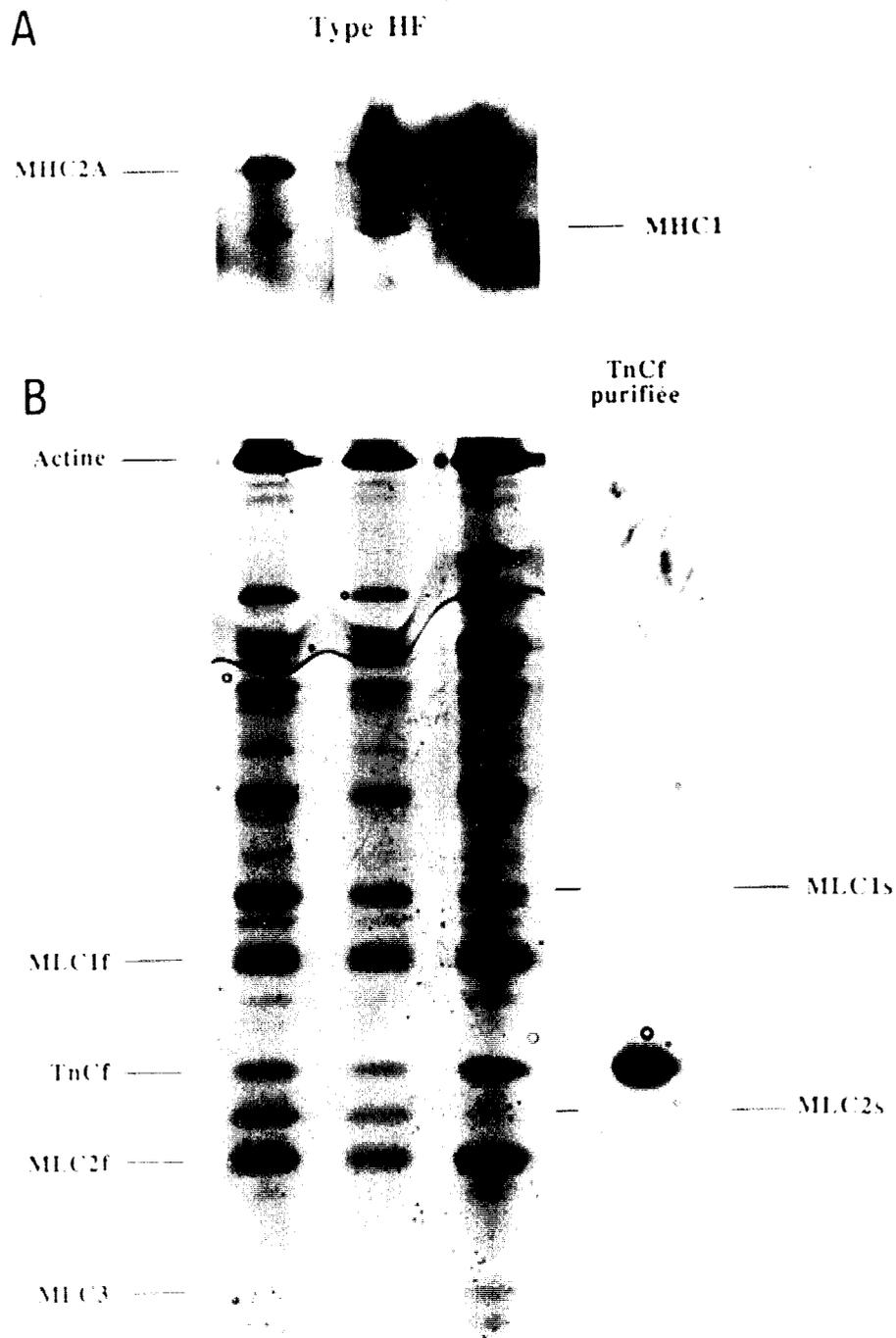


Figure 26bis : Profil électrophorétique des fibres de type HF de vastus intermedius de rat
 A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%.
 B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 12%.

B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium des fibres hybrides

1 - Fibres de type HF du soleus

a) *Différence de sensibilité au calcium et au strontium*

Les fibres de type HF isolées du soleus sont 16 fois plus sensibles au Ca qu'au Sr selon le critère (pCa_{50} - pSr_{50}) (Fig. 27A). Comme l'indique le tableau 7, tous les paramètres d'activation issus de la T/pCa et de la T/pSr sont significativement différents. Le décalage vers la droite de la T/pSr par rapport à la T/pCa est beaucoup plus important que le décalage observé pour les fibres de type 1 du même muscle. De plus, les valeurs des différences de seuil d'activation, de pCa et pSr d'activation maximale, et de (pCa_{50} - pSr_{50}) sont très proches de celles des fibres 2A du soleus. Statistiquement, la comparaison des valeurs des différents Δ montre que les valeurs de (pCa_{50} - pSr_{50}) et de (pCa - pSr) nécessaires pour l'activation maximale ne sont pas significativement différentes entre les fibres HF et les fibres 2A, alors qu'elles le sont à $p < 0,001$ entre les fibres HF et les fibres 1. La concentration seuil en Sr est encore plus élevée pour les fibres HF que pour les fibres 2A.

La différence de sensibilité des fibres HF au Ca et au Sr est donc similaire à celle des fibres 2A.

b) *Comparaison de l'activation par le calcium des fibres HF de soleus avec les fibres 1 et 2A du même muscle*

La comparaison des paramètres issus de la T/pCa entre les fibres HF, 1 et 2A du soleus confirme les résultats indiqués par la différence d'activation par le Ca et le Sr de ces fibres. En effet, tous ces paramètres, sauf n_1 , sont significativement différents entre les fibres HF et les fibres 1. Par contre, aucune différence significative n'est relevée entre les paramètres de la T/pCa des fibres HF et ceux de la T/pCa des fibres 2A.

c) *Comparaison de l'activation par le strontium des fibres HF de soleus avec les fibres 1 et 2A du même muscle*

Des résultats similaires à ceux obtenus pour l'activation calcique sont observés : les valeurs de seuil, de pSr_{50} et de pSr nécessaire pour l'activation maximale ne sont pas significativement différentes entre les fibres HF et les fibres 2A alors qu'elles sont différentes à $p < 0,001$ entre les fibres HF et les fibres 1. Pour les coefficients n_1 et n_2 de la T/pSr, aucune différence n'est observée entre les 3 groupes. Cependant, la pente globale de la T/pSr est plus importante pour les fibres HF que pour les fibres 1 et 2A.

2 - Fibres de type HF du vastus intermedius

a) *Différence de sensibilité au calcium et au strontium*

Comme les fibres HF isolées du soleus, les fibres HF isolées du Vast. Int. présentent une différence de sensibilité au Ca et au Sr importante (Fig 28) : tous les paramètres d'activation dérivés de la TpCa et de la TpSr sont significativement différents

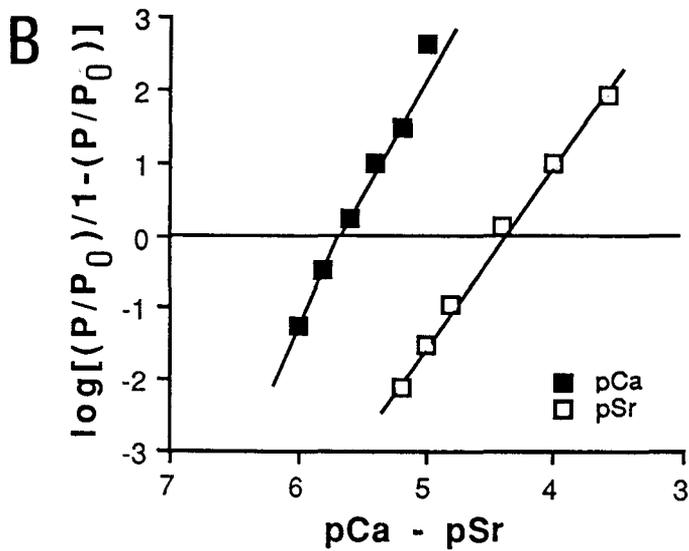
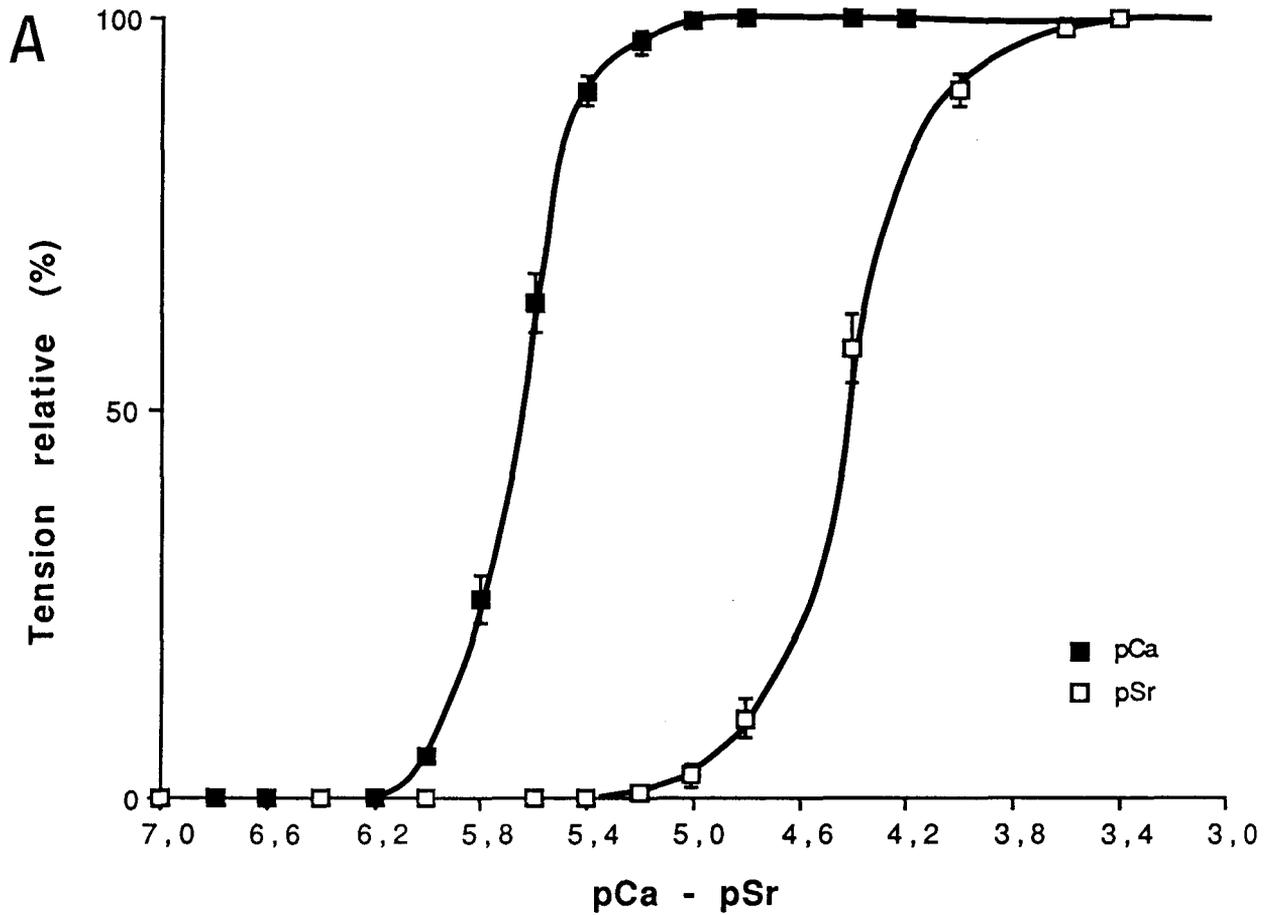


Figure 27 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type "hybride fast" du soleus de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de type HF de soleus

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa ₅₀ ou pSr ₅₀	n ₁	n ₂	n
Ca	6,28 ± 0,03 (n = 13)	5,02 ± 0,05 (n = 13)	5,65 ± 0,02 (n = 13)	3,62 ± 0,34 (n = 9)	4,19 ± 0,30 (n = 10)	3,83 ± 0,23 (n = 13)
Sr	*** 5,33 ± 0,07 (n = 13)	*** 3,65 ± 0,04 (n = 13)	*** 4,43 ± 0,03 (n = 13)	** 2,39 ± 0,27 (n = 9)	* 2,53 ± 0,19 (n = 5)	** 2,76 ± 0,22 (n = 13)
Δ	0,95 ± 0,08 (= 13)	1,37 ± 0,06 (n = 13)	1,21 ± 0,02 (n = 13)			

Tableau 7 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type "hybride fast" du soleus de rat (illustrées à la figure 27)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

* et ** et *** : Différences significatives à p<0,05 et p<0,01 et p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

(Tableau 8). La comparaison des Δ des fibres HF et des fibres 1 et 2A montre que la sensibilité des fibres HF du Vast. Int. n'est pas significativement différente de celle des fibres 2A du même muscle. Elle est différente de celle des fibres de type 1.

b) Comparaison de l'activation par le calcium des fibres HF du vastus intermedius avec les fibres 1 et 2A du même muscle

Tous les paramètres issus de la T/pCa des fibres HF du Vast. Int. ont des valeurs intermédiaires comprises entre celles des paramètres issus de la T/pCa des fibres de type 1 et 2A du Vast. Int.. Aucune différence significative n'est observée entre les différents paramètres des T/pCa des fibres HF et des T/pCa des fibres 1 et 2A. Seule la pente globale de la T/pCa est significativement plus faible pour les fibres HF que pour les fibres 2A.

c) Comparaison de l'activation par le strontium des fibres HF du vastus intermedius avec les fibres 1 et 2A du même muscle

L'activation par le Sr des fibres HF du Vast. Int. est tout à fait similaire à l'activation des fibres 2A par ce cation. Les paramètres caractéristiques de la sensibilité au Sr (seuil, pSr₅₀) sont significativement différents entre les fibres 1 et HF du Vast. Int.. La pSr nécessaire pour obtenir l'activation maximale est également différente entre ces 2 types de fibres. Aucune différence dans le coefficient de pente de la T/pSr (n_1 , n_2 , n) n'est observée entre les 3 groupes de fibres de ce muscle.

3 - Comparaison des fibres de type HF des muscles soleus et vastus intermedius

a) Différence de sensibilité au calcium et au strontium

La comparaison des valeurs indicatrices de la sensibilité relative au Ca et au Sr des fibres (différence de seuil Ca/Sr, différence de pCa et pSr d'activation maximale, différence entre la pCa₅₀ et la pSr₅₀) indique que les fibres HF des 2 muscles présentent des différences de réactivité au Ca et au Sr sensiblement identiques.

b) Sensibilité au calcium

La comparaison des paramètres d'activation par le Ca des fibres HF du soleus et du Vast. Int. montre que les fibres du Vast. Int. présentent un seuil d'activation et une pCa₅₀ décalés vers la gauche par rapport aux fibres HF du soleus. Les fibres HF du Vast. Int. semblent donc plus sensibles aux faibles concentrations calciques que les fibres du même type isolées du soleus. Le coefficient de pente globale (n) est également plus faible pour la T/pCa des fibres HF du Vast. Int. ($2,31 \pm 0,15$; $n=3$) que pour celle du soleus ($3,83 \pm 0,23$; $n=13$).

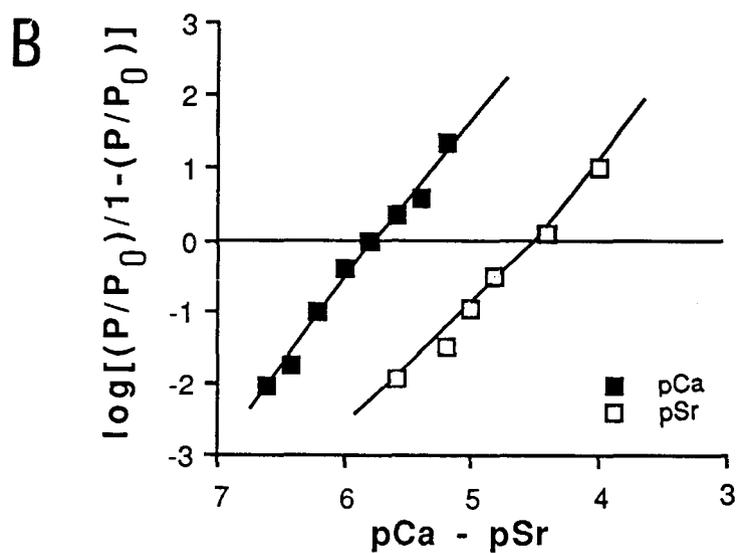
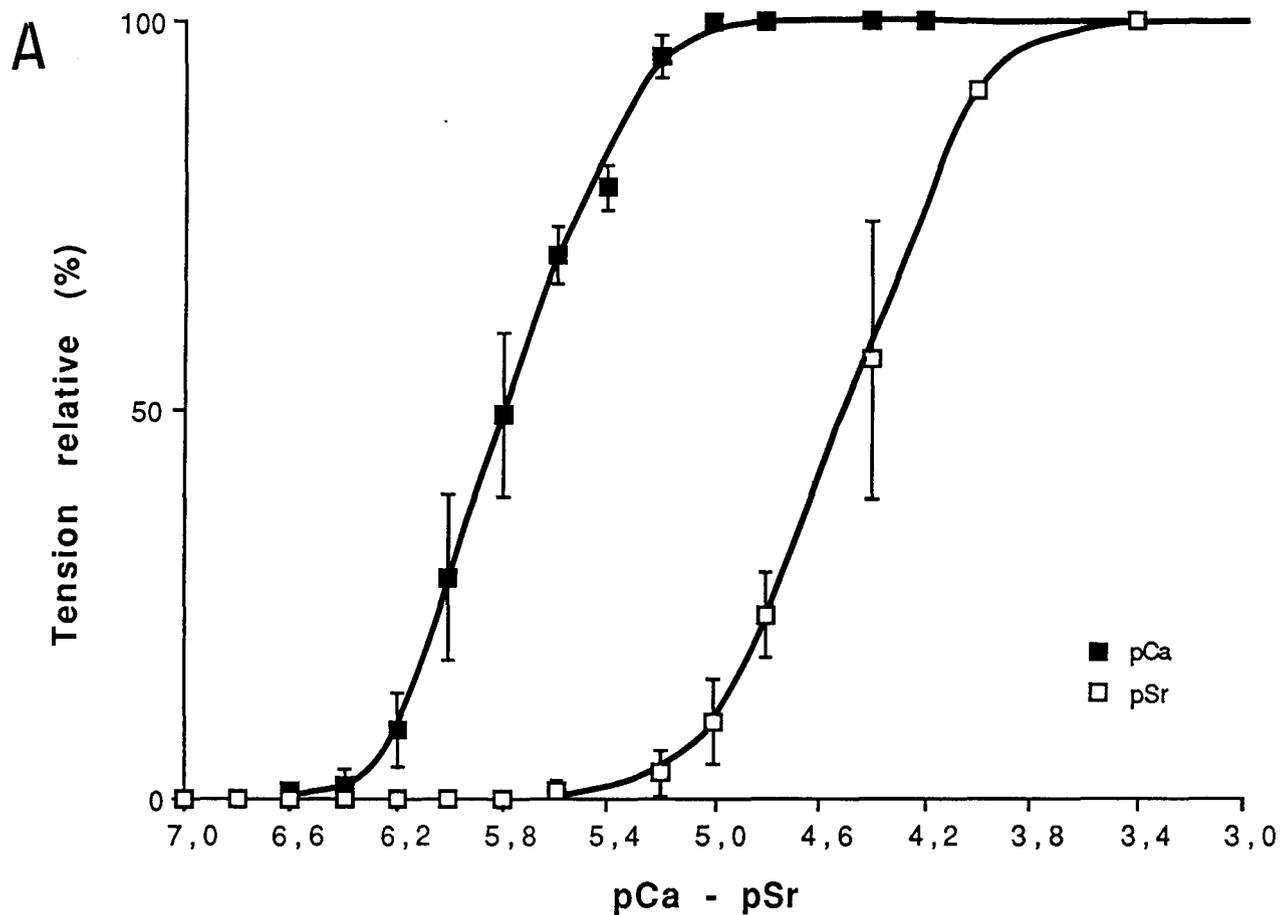


Figure 28 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type "hybride fast" du vastus intermedius de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de type HF de vastus intermedius

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa ₅₀ ou pSr ₅₀	n ₁	n ₂	n
Ca	6,62 ± 0,17 (n = 3)	4,84 ± 0,15 (n = 3)	5,83 ± 0,06 (n = 3)	2,24 ± 0,75 (n = 3)	3,18 ± 0,65 (n = 3)	2,31 ± 0,15 (n = 3)
Sr	** 5,56 ± 0,15 (n = 3)	** 3,59 ± 0,01 (n = 3)	*** 4,53 ± 0,11 (n = 3)	-	2,08 ± 0,90 (n = 3)	2,25 ± 0,13 (n = 3)
Δ	1,12 ± 0,22 (n = 3)	1,25 ± 0,16 (n = 3)	1,34 ± 0,08 (n = 3)			

Tableau 8 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type "hybride fast" du vastus intermedius de rat (illustrées à la figure 28)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

** et *** : Différences significatives à p<0,01 et p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

c) Sensibilité au strontium

Les fibres HF de Vast. Int. et de soleus ont une sensibilité au Sr similaire, comme l'indique la comparaison des paramètres des T/pSr obtenus par ces deux groupes de fibres.

C - Conclusions

1 - Influence du muscle d'origine des fibres

Les fibres HF du Vast. Int. semblent plus sensibles aux concentrations calciques faibles que les fibres HF du soleus. Le coefficient de pente, n , est également plus faible pour ces fibres isolées du Vast. Int. que pour les fibres du même groupe isolées du soleus. La composition en protéines myofibrillaires de ces fibres est similaire quel que soit le muscle considéré, le Vast. Int. ou le soleus, et n'expliquerait donc pas la différence de sensibilité au Ca des fibres HF des 2 muscles. Cependant ce groupe de fibres est faiblement représenté dans notre étude ($n=3$), comparé aux fibres HF du soleus ($n=13$). Ces données comparatives du comportement des fibres HF du Vast. Int. et du soleus sont donc simplement indicatrices.

2 - Influence de la composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le calcium

Les fibres HF du soleus, co-exprimant les isoformes lentes et rapides de MHC, MLC et la TnCf possèdent des caractéristiques d'activation par le Ca similaires aux fibres 2A du soleus, et très proches des fibres 2A du Vast. Int., alors que les fibres 2A n'expriment que les isoformes rapides de ces protéines. Le faible nombre de fibres HF de Vast. Int. étudié ne permet pas de définir aussi clairement le comportement de ces fibres vis à vis du Ca, et les caractéristiques de la relation T/pCa sont intermédiaires entre celles des fibres de type 1 et de type 2A.

3 - Influence de la composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le strontium

Les fibres HF du soleus et du Vast. Int. sont beaucoup plus sensibles au Ca qu'au Sr. Le décalage observé entre les relations T/pCa et T/pSr de ces fibres est identique au décalage existant entre celles des fibres 2A. La différence de sensibilité des fibres HF aux 2 cations est donc identique à celle des fibres exprimant exclusivement les isoformes rapides de MHC, MLC et la TnCf. Les résultats obtenus pour l'activation des fibres de type HF par le Sr confirment les indications obtenues par l'analyse de la relation T/pCa de ces fibres : l'expression d'isoformes lentes ne se manifeste pas sur les propriétés d'activation par le Ca et le Sr de ces fibres.

Cette observation soulève deux questions : la sensibilité des fibres au Ca et au Sr est-elle seulement influencée par les isoformes rapides de MHC, MLC et TnC lorsque les 2 types d'isoformes, lentes et rapides, sont exprimés dans une même fibre ? Ces résultats sont-ils liés à l'expression prédominante des isoformes rapides par rapport à l'expression des isoformes lentes ? La description et l'étude des propriétés fonctionnelles de 4 populations de fibres, isolées du muscle soleus de singe rhesus, nous ont permis d'apporter des éléments de réponse à ces questions.

DEUXIEME PARTIE

Mise en évidence d'une isoforme de chaîne lourde de la myosine caractéristique des muscles rapides, la MHC2B, dans le muscle soleus soumis à la microgravité. Conséquences sur les propriétés fonctionnelles des fibres exprimant cette isoforme

L'analyse électrophorétique de certaines fibres (10 sur 46) de soleus de rats exposés à 14 jours de microgravité a révélé une protéine, dans la zone des MHC, de migration intermédiaire entre la MHC1 et la MHC2A. Cette protéine migre comme la MHC2B, protéine exprimée dans les fibres isolées de muscles rapides. Le même phénomène fut observé lors de l'analyse électrophorétique de coupes de soleus de rats soumis à 10 et 14 jours de microgravité simulée. Quelles que soient les conditions expérimentales, la MHC2B n'a jamais été mise en évidence dans le soleus, muscle lent, de rat. Nous avons donc identifié cette protéine par l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les différentes isoformes de MHC. Cette identification fut réalisée sur les coupes de muscles entiers où la quantité de protéines est suffisante pour révéler les différentes isoformes de MHC, même si elles sont exprimées de façon minoritaire. Ces résultats sont exposés dans le premier chapitre de cette partie. Les propriétés fonctionnelles des 10 fibres isolées de soleus de rats exposés à 14 jours de microgravité réelle et exprimant la MHC2B ont été analysées et font l'objet du second chapitre de cette partie.

I - MISE EN EVIDENCE ET IDENTIFICATION DE LA MHC2B SUR COUPES DE SOLEUS DE RATS SOUMIS A 10 OU 14 JOURS DE MICROGRAVITE SIMULEE

A - Description du profil électrophorétique

Généralement, dans les muscles de rat, 3 isoformes de MHC sont séparées par une analyse électrophorétique sur gel de polyacrylamide à 6% contenant 40% de

glycérol : une bande de migration rapide, la MHC1, une bande intermédiaire, la MHC2B, et une bande migrant plus lentement correspondant à l'isoforme 2A. Dans certains muscles rapides de rongeurs, l'isoforme 2X peut être exprimée. Elle migre de façon identique à la 2A dans notre système électrophorétique. Nous nommerons donc cette bande "2A-2X". Les isoformes de MHC2A et 2X peuvent être séparées dans certaines conditions (Bär et Pette 1988 ; La Framboise et coll. 1990), mais cette séparation est difficilement reproductible. La séparation des différentes isoformes est illustrée à la figure 29A : le profil électrophorétique du diaphragme (colonne 2), muscle mixte, se compose de 3 bandes (1, 2B, 2A-2X) et celui de l'EDL (colonne 1), muscle rapide, de la bande 2B, majoritaire, et de la bande 2A-2X. Des traces de MHC1 sont visibles dans l'EDL. Le diaphragme et l'EDL ont été utilisés comme repères de migration des isoformes rapides des MHC. Le soleus "contrôle" (colonne 8), muscle lent, exprime presque exclusivement la MHC1. Des traces de MHC 2A-2X sont mises en évidence dans certains des solei "contrôle" étudiés (3 cas sur 5). Par contre, la bande 2A-2X est beaucoup plus représentée dans tous les muscles solei de rats soumis à 10 jours (n=5) ou 14 jours (n=10) de microgravité.

De plus, le profil électrophorétique de 3 solei sur 5 pour les rats suspendus 10 jours et de 7 solei sur 10 pour les rats suspendus 14 jours, est composé de 3 bandes : une bande correspondant à l'isoforme lente (MHC1), une bande correspondant à la migration des isoformes 2A-2X, et une bande de migration intermédiaire, identique à la migration de l'autre isoforme rapide décrite dans ce système électrophorétique, la MHC2B. Ce type d'isoforme n'a jamais été décrit dans le soleus de rat, même après des conditions de microgravité simulée ou réelle de durée supérieure ou égale à 14 jours. Nous avons donc vérifié l'identification de cette bande en utilisant des anticorps monoclonaux.

B - Identification de la "bande de MHC" intermédiaire par les anticorps monoclonaux

Pour caractériser les différentes isoformes, un anticorps spécifique des MHC1 et 2A (dénommé BF32) et un anticorps spécifique des MHC2X et 2B (dénommé RTD9) ont été utilisés. La figure 29B illustre les résultats obtenus par l'analyse successive de la membrane de transfert par deux anticorps. Le premier anticorps utilisé est l'anti MHC1 + 2A, le second l'anti MHC2X + 2B. Un échantillon de chaque muscle "contrôle" (EDL, soleus et diaphragme), 3 échantillons de soleus de rats suspendus 10 jours et 2 échantillons de soleus de rats suspendus 14 jours ont été analysés de cette manière.

L'anticorps anti 1 + 2A (Fig. 29Ba) révèle la présence de MHC1 dans le soleus "contrôle" (colonne 8) et le diaphragme (colonne 2). Les solei de rats soumis à la

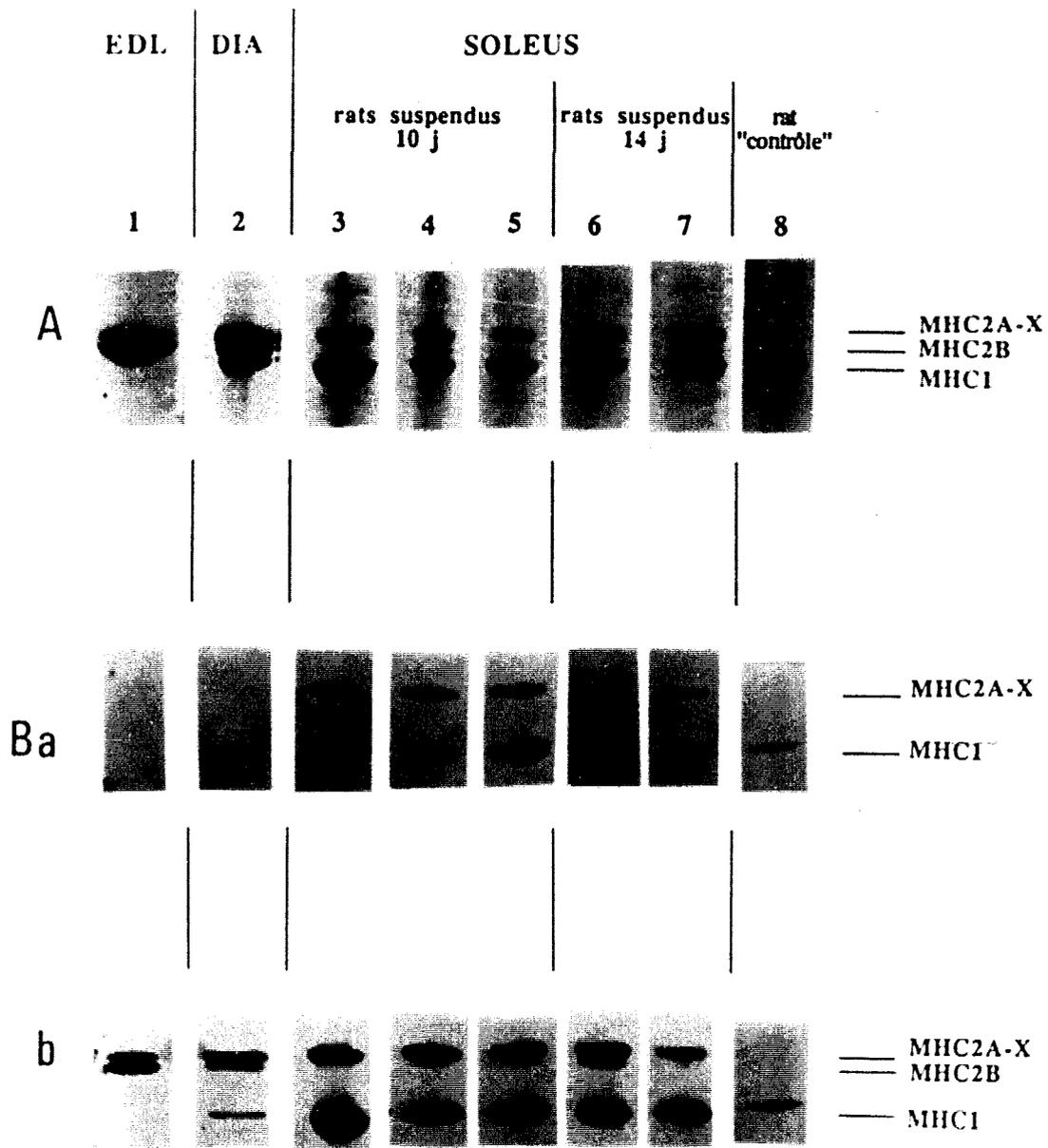


Figure 29 : Mise en évidence et identification de la MHC 2B sur coupes de soleus de rat soumis à 10 et 14 jours de microgravité

A - Séparation des isoformes de MHC sur gel 6% . Coloration au bleu de Coomassie

B - a) Incubation avec l'anticorps anti 1 + 2A (BF32) dilué au 500^{ème}

b) Incubation, sur la même membrane, avec l'anticorps 2B + 2X (RTD 9)

colonnes 1, 2 et 8 : muscles "contrôle" : 1 - EDL, 2 - diaphragme (DIA), 8 - soleus

microgravité expriment la MHC1 et la MHC2A (colonnes 3-4-5 et 6-7 après suspension de 10 et 14 jours respectivement). L'incubation de l'anticorps anti 2B + 2X sur le même échantillon, après l'action de l'anticorps BF32 (Fig. 29Bb, colonnes 1 et 2), permet de révéler 2 bandes sur l'EDL et le diaphragme : les MHC2B et 2X. La MHC2B est exprimée majoritairement dans l'EDL et la MHC2X est prédominante dans le diaphragme. Par contre, le soleus "contrôle" n'est absolument pas réactif à cet anticorps. Une bande supplémentaire est décelée dans certains solei de rats suspendus 10 et 14 jours : la MHC2B (colonnes 4-5-6-7). Dans ces muscles, la réactivité avec l'isoforme 2X est masquée par la première réaction entre l'anticorps anti MHC1+2A effectuée au cours de l'étape précédente. Cependant la comparaison de l'intensité de la réaction entre la bande correspondant aux isoformes 2A-2X avec l'anticorps anti MHC1+2A d'une part et l'anticorps anti MHC2X+2B d'autre part (Fig. 29Bb, colonnes 3 à 7) montre que l'isoforme 2X est exprimée dans les solei de rats soumis à la microgravité. L'anticorps anti MHC 2B+2X incubé sur 5 solei de rats suspendus 10 jours et 5 solei de rats suspendus 14 jours a révélé l'expression de la MHC2B dans 3 solei sur 5 pour chacun des 2 groupes. La bande de migration électrophorétique intermédiaire entre la MHC1 et 2A, révélée par la coloration des échantillons au bleu de Coomassie, est donc la MHC2B.

C - Conclusions

Ces résultats mettent en évidence un changement de l'expression des isoformes de MHC dans le soleus, changement induit par une exposition à des conditions de microgravité. L'isoforme rapide, 2A, exprimée dans certains solei "contrôle", est plus représentée dans les solei de rats soumis à la microgravité (Fig. 29A). De plus, l'expression de 2 isoformes rapides, jamais révélées dans le soleus "contrôle", la MHC2X et la MHC2B, est induite dans le soleus après suspension. Ces isoformes sont décelables dans ce muscle dès 10 jours d'exposition à la microgravité. Si l'expression de l'isoforme 2X a été mise en évidence dans le soleus de rat soumis à des conditions similaires (Takahashi et coll. 1991), nous montrons pour la première fois que ce muscle peut exprimer de la MHC2B lorsqu'il est soumis à des conditions de microgravité.

II - EXPRESSION DE LA MHC2B DANS LES FIBRES DE SOLEUS DE RAT SOUMIS A 14 JOURS DE MICROGRAVITE REELLE

A - Description du profil électrophorétique

L'analyse électrophorétique de coupes de soleus de rats soumis à 10 et 14 jours de microgravité simulée a permis de mettre en évidence l'expression de la MHC2B dans ces muscles. De plus, nous avons observé la présence de cette isoforme rapide de MHC dans les fibres isolées de soleus de rats après un séjour de 14 jours en microgravité réelle. Comme l'illustre la figure 30, dans toutes les fibres où la MHC2B a été décelée, cette isoforme est faiblement exprimée. Elle est toujours associée à l'expression de la MHC2A et à une faible expression de la MHC1 (7 fibres sur 10), ou à l'expression de la MHC2A seule (3 fibres sur 10). Nous ne pouvons affirmer l'expression de la MHC2X puisque nous ne parvenons pas à séparer les isoformes 2A et 2X par la migration électrophorétique.

La composition en MLC correspondant à cette distribution des MHC (Fig. 30B) est identique pour ces 10 fibres. Elle est similaire à celle des fibres 2A : MLC1s, MLC1f, MLC2f, MLC3 et TnCf. Pour le Vast. Int. des mêmes rats soumis à 14 jours de microgravité, l'expression de la MHC2B n'a été décelée dans aucune des fibres analysées.

B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium

Toutes les fibres de soleus exprimant l'isoforme de MHC2B ont été regroupées pour étudier leurs propriétés d'activation par le Ca et le Sr.

1 - Différence de sensibilité au calcium et au strontium

Les fibres de ce groupe sont beaucoup plus sensibles au Ca qu'au Sr (Fig. 31A et Tableau 9). Les valeurs caractéristiques de la sensibilité différentielle de ces fibres pour ces 2 cations (valeurs de Δ indiquées dans le tableau 9) sont similaires à celles des fibres de type 2A et HF. Néanmoins, comme pour les fibres HF, la différence entre les seuils d'activation par le Ca et le Sr est plus importante que pour les fibres 2A.

La différence de sensibilité au Ca et au Sr des fibres exprimant l'isoforme 2B de la MHC est donc identique à celle des 2 autres groupes de fibres où des isoformes rapides de protéines contractiles sont exprimées.

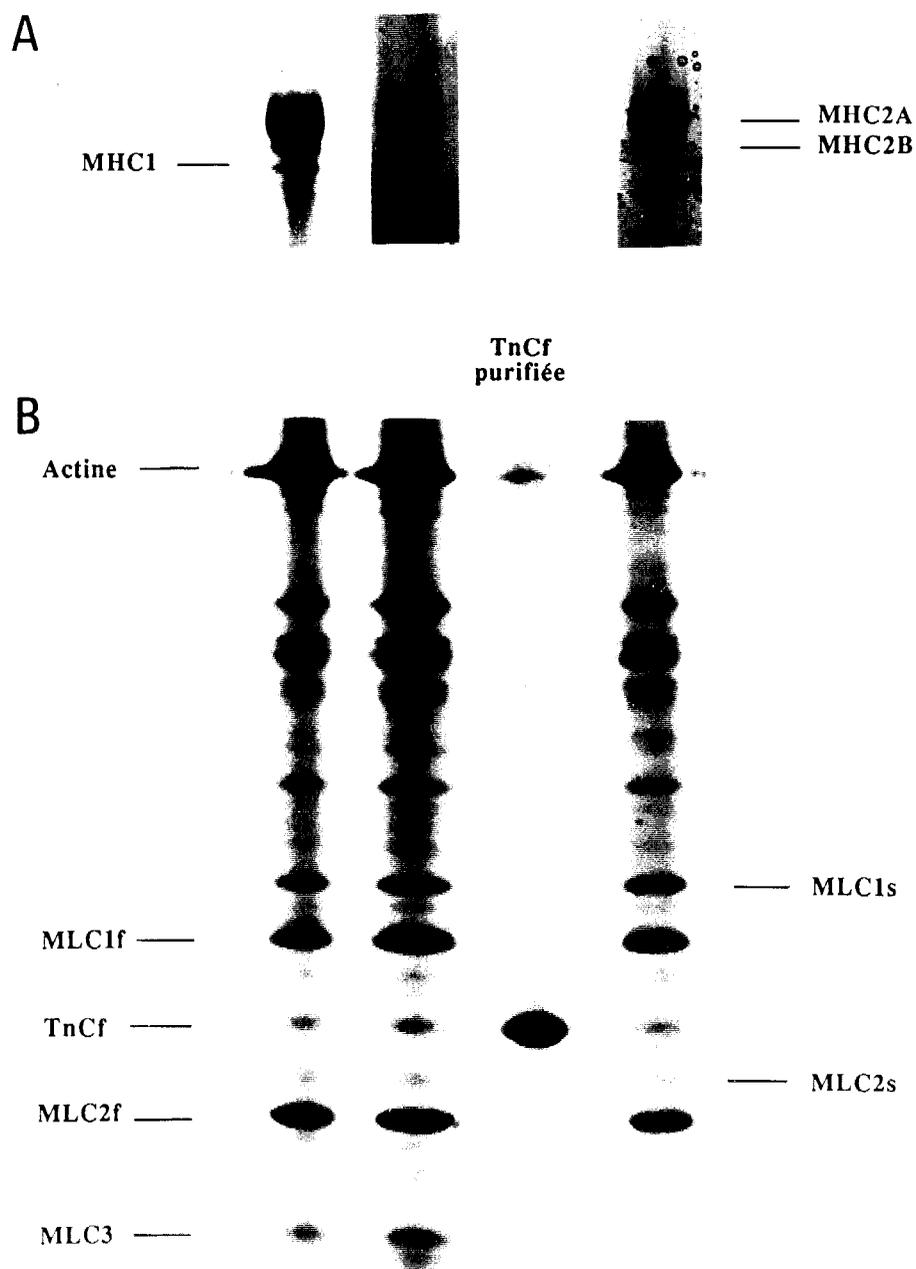


Figure 30 : Profil électrophorétique des fibres 2B de soleus de rat soumis à 14 jours de microgravité réelle

A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%

B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 12%

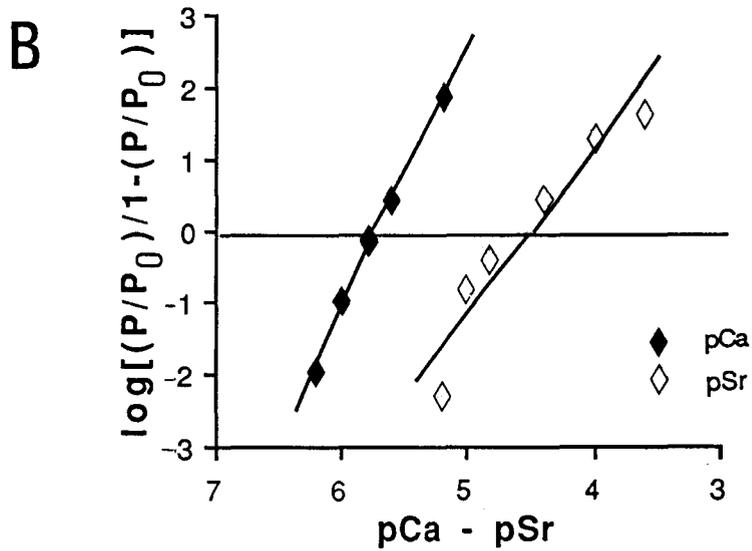
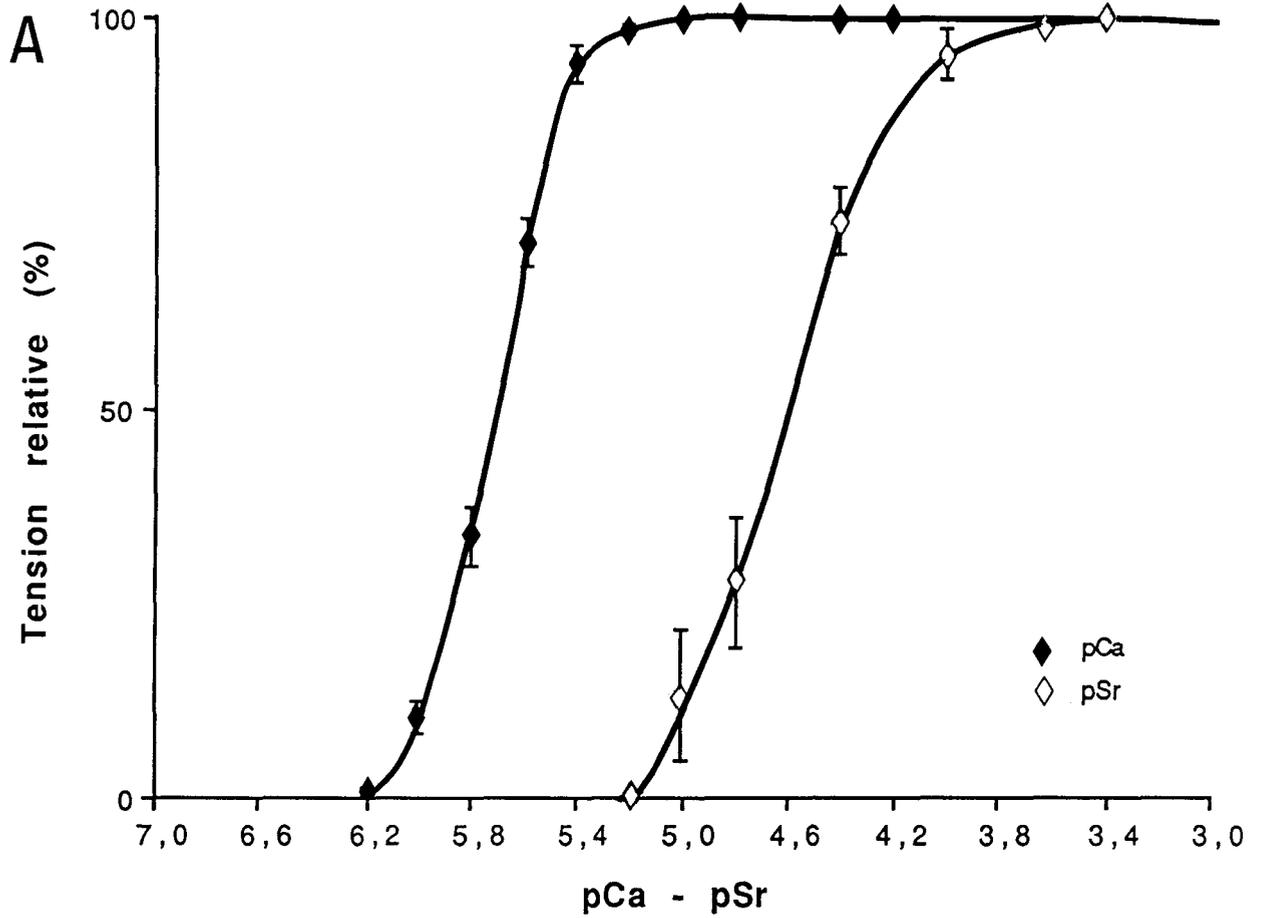


Figure 31 : Activation de la tension par le Ca et le Sr des fibres musculaires de type 2B du soleus de rat

A - Relations T/pCa et T/pSr

B - Forme linéarisée des relations T/pCa et T/pSr

Caractéristiques d'activation des fibres de soleus présentant l'isoforme 2B de MHC

	Seuil (en pCa ou en pSr)	Concentration pour l'activation maximale (en pCa ou en pSr)	pCa50 ou pSr50	n ₁	n ₂	n
Ca	6,37 ± 0,03 (n = 10)	5,08 ± 0,07 (n = 10)	5,70 ± 0,02 (n = 10)	3,56 ± 0,41 (n = 6)	3,39 ± 0,21 (n = 9)	3,52 ± 0,15 (n = 10)
Sr	*** 5,40 ± 0,05 (n = 7)	*** 3,75 ± 0,04 (n = 7)	*** 4,52 ± 0,04 (n = 7)	* 1,69 ± 0,51 (n = 3)	3,25 ± 0,65 (n = 4)	** 2,75 ± 0,20 (n = 7)
Δ	1,03 ± 0,04 (n = 7)	1,28 ± 0,07 (n = 7)	1,18 ± 0,03 (n = 7)			

Tableau 9 : Paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des fibres musculaires de type 2B du soleus de rat (illustrées à la figure 31)

Δ : Différences entre les valeurs de seuil (seuil Ca-seuil Sr), entre les concentrations en cations nécessaires pour obtenir soit 50% de la tension maximale (pCa₅₀-pSr₅₀), soit la tension maximale (pCa d'activation maximale-pSr d'activation maximale)

* et ** et *** : Différences significatives à p<0,05 et p<0,01 et p<0,001, respectivement, entre les valeurs d'un paramètre obtenues en Ca et Sr

2 - Comparaison de l'activation par le calcium des fibres de ce groupe et des fibres de type 1, 2A et HF du soleus

La comparaison des paramètres issus de la T/pCa des fibres exprimant l'isoforme 2B de MHC et les 3 autres types de fibres décrits dans le soleus indique que l'activation calcique de ces fibres est similaire à celle des fibres de type HF et 2A. Tous les paramètres d'activation calcique, sauf n_1 , sont significativement différents des paramètres d'activation calcique des fibres de type 1. Par contre, mis à part la valeur de n_2 qui est statistiquement plus élevée pour les fibres HF, aucune différence significative n'est observée pour les paramètres d'activation calcique des fibres de type HF et 2A.

3 - Comparaison de l'activation par le strontium des fibres de ce groupe et des fibres de type 1, 2A et HF du soleus

Comme pour l'activation par le Ca, les fibres exprimant la MHC2B présentent des propriétés d'activation par le Sr similaires à celles des fibres de type 2A et HF. Par contre, les valeurs de seuil, pSr_{50} et pSr d'activation maximale sont significativement différentes des valeurs obtenues pour les fibres de type 1. La pente globale de la relation T/pSr est identique à celle des fibres HF, donc plus élevée que celle des fibres de type 1 et 2A. Cependant, aucune différence n'est observée pour les coefficients n_1 et n_2 de la T/pSr des fibres des différents groupes.

C - Conclusions

L'expression d'une isoforme de MHC caractéristique des fibres rapides, qui apparaît dans les fibres de soleus lorsque ce muscle n'exerce plus son activité posturale (exposition à la microgravité) ne confère pas à ces fibres des propriétés d'activation par le Ca et le Sr différentes de celles des fibres exprimant la MHC2A ou des fibres "hybrides fast". La composition de ces fibres en chaînes légères de la myosine est identique à celle des fibres 2A, même si la MLC3 semble plus exprimée. Les propriétés de toutes les fibres exprimant de manière prédominante, ou exclusivement, des isoformes rapides des protéines contractiles sont donc identiques.

TROISIEME PARTIE

Propriétés fonctionnelles de fibres isolées de soleus de singe rhésus : étude des propriétés fonctionnelles de quatre populations de fibres différentes par leur composition en isoformes de protéines contractiles *

Cette étude de la composition en protéines myofibrillaires et de l'activation par le Ca de 41 fibres de soleus de singe rhésus nous permet de compléter les résultats obtenus sur les fibres de rat. En effet, chez le singe, nous avons mis en évidence 2 populations de fibres hybrides, alors que dans les muscles de rats étudiés dans la cadre de ce travail, une seule population de fibres intermédiaires était décrite : les fibres "hybrides fast". Ces 2 populations de fibres intermédiaires, observées dans le soleus de singe rhésus, sont : une population à dominance d'isoformes rapides ("hybride fast", HF) et une population à dominance d'isoformes lentes ("hybride slow", HS). Ceci nous permet de répondre à la question posée à l'issue de la première partie des résultats. De plus, comme la composition en myosine est décrite comme l'un des facteurs déterminant de la vitesse de contraction musculaire, nous avons réalisé sur certaines de ces fibres des mesures de vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}). Par contre, l'étude de l'activation de ces fibres par le Sr est plus succincte, afin d'alléger le protocole et d'éviter une chute trop importante de la tension maximale de la fibre. Ceci est nécessaire pour obtenir des redéveloppements de tension suffisants pour mesurer V_{max} de manière fiable. Le critère retenu pour juger de la sensibilité de la fibre au Sr est donc la différence entre les paramètres caractéristiques de l'affinité du système contractile pour l'ion activateur, soit la (pCa_{50} - pSr_{50}). Seules 3 concentrations de Sr, suffisantes pour déterminer la pSr_{50} ont été étudiées.

* Ces résultats font l'objet d'une publication dans la revue "Pflügers Arch." (sous presse)

I - DESCRIPTION DU PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES 4 POPULATIONS

La figure 32 illustre les 4 profils électrophorétiques caractéristiques définis dans les fibres de soleus de singe rhésus, selon l'expression des isoformes de MHC. La migration des différentes isoformes de MHC, MLC et de TnC est similaire à celle des fibres de rat (voir Fig.19 et 19bis pour rappel). La majorité des fibres étudiées n'expriment qu'une isoforme de MHC : la MHC1 (17 fibres) ou la MHC2A (7 fibres), et sont donc définies comme fibres de type 1 et fibres de type 2A. De même, seules les isoformes lentes des MLC (MLC1s et MLC2s) et de la TnC (TnCs) sont exprimées dans les fibres de type 1, alors que seules les isoformes rapides de ces protéines sont exprimées dans les fibres de type 2A. Les autres fibres étudiées expriment deux isoformes de MHC : la MHC1 et la MHC2A ; l'une des 2 isoformes étant exprimée de manière prédominante. Deux types de fibres hybrides ont donc été définis selon l'isoforme de MHC prédominante, les fibres HS (pour "hybride slow") où la MHC1 est plus exprimée (n=8), et les fibres HF (pour "hybride fast") où la MHC2A est majoritaire (n=9) (Fig. 32). L'expression relative de l'isoforme lente de MHC (MHC1) était significativement différente pour les groupes HF ($23 \pm 10\%$) et HS ($76 \pm 6\%$). De plus, l'expression des isoformes de MLC est du même type que celle des MHC : pour les fibres HS, les isoformes de MLC1s et MLC2s sont prédominantes par rapport aux isoformes rapides de ces protéines. Par contre, dans les fibres HF, les isoformes rapides de MLC (MLC1f, MLC2f et MLC3) sont beaucoup plus exprimées que les isoformes lentes ; la TnCf y est exprimée. Comme pour les fibres de rat, nous pouvons affirmer la présence de la TnCf dans les fibres HF mais ne pouvons conclure quant à la présence de TnCs, puisque la TnCs migre au même endroit que la MLC2f (Fig.32).

II - PROPRIETES D'ACTIVATION PAR LE CALCIUM ET LE STRONTIUM

A - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'affinité relative au calcium et au strontium

L'affinité relative des fibres de type 1 pour le Ca et le Sr se traduit par une valeur de ($pCa_{50}-pSr_{50}$) de $0,41 \pm 0,04$ (n=17). Cette même valeur, pour les fibres de type 2A est de $1,22 \pm 0,04$ (n=7) ; elle montre bien la différence d'affinité pour le Ca et le Sr des fibres rapides qui sont 16 fois plus sensibles au Ca qu'au Sr. Comme pour les fibres HF de rat, les fibres HF de soleus de singe expriment une différence de sensibilité au Ca et au Sr du même ordre de grandeur que celle des fibres 2A, soit $1,08 \pm 0,1$ (n=9).

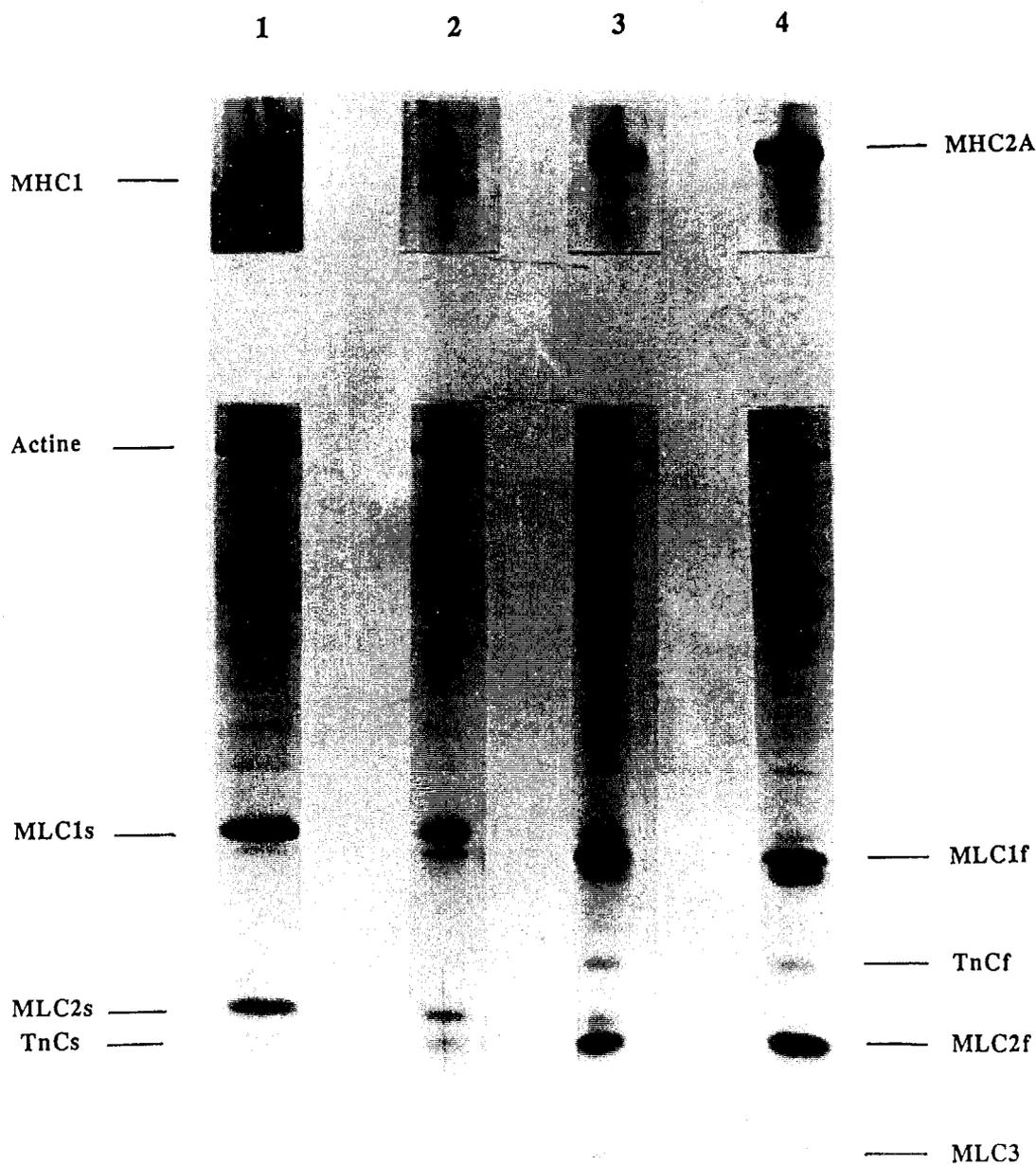


Figure 32 : Profil électrophorétique des 4 populations de fibres définies dans le soleus de singe rhésus

A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%

B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 12%

colonne 1 : type 1, colonne 2 : type HS, colonne 3 : type HF, colonne 4 : type 2A

Les valeurs de Δ ne sont pas significativement différentes entre les fibres HF et les fibres 2A, alors qu'elles sont significativement différentes de celles des fibres de type 1. Par contre, les sensibilités au Ca et au Sr des fibres HS sont similaires : la valeur de $(pCa_{50}-pSr_{50})$ pour ces fibres est de $0,35 \pm 0,03$ ($n=8$) et n'est pas différente significativement de la valeur de Δ des fibres de type 1. Les fibres hybrides sont donc scindées en 2 groupes suivant leur valeur de $(pCa_{50}-pSr_{50})$ qui sont significativement différentes. Les fibres HS ont une affinité relative pour le Ca et le Sr identique à celles des fibres lentes (soit 2 fois moins sensibles au Sr qu'au Ca), alors que les fibres HF sont 12 fois moins sensibles au Sr qu'au Ca et réagissent donc comme des fibres rapides selon ce critère.

B - Influence de la différence de composition en protéines myofibrillaires sur l'activation de la tension par le Ca

Les relations T/pCa des différents types de fibres sont représentées à la figure 33. Les paramètres caractéristiques de l'activation calcique de ces fibres sont regroupés dans le tableau 10.

1 - Fibres n'exprimant qu'un type d'isoformes de protéines myofibrillaires

La comparaison des paramètres de la T/pCa des fibres de type 1 et des fibres de type 2A montre que les fibres 1 sont plus sensibles au Ca que les fibres 2A : le seuil d'activation et la pCa_{50} sont décalés vers la droite respectivement de 0,30 et 0,17 unité pCa. Comme pour les fibres 1 et 2A de rat, le décalage de seuil est plus important que le décalage de la pCa_{50} . Pour ces 2 types de fibres, les critères de sensibilité au Ca sont significativement différents. Les T/pCa des fibres 2A sont plus pentues que celles des fibres de type 1. Les valeurs de n et n_2 sont significativement plus élevées pour les fibres de type 2A. Par contre, les valeurs de n_1 ne sont pas significativement différentes, même si ce coefficient est plus élevé pour les fibres de type 2A.

2 - Fibres hybrides

La T/pCa des fibres du groupe HF est décalée vers la droite par rapport à la celle des fibres du groupe HS, ce décalage entre les deux courbes, moins marqué que celui entre les fibres 1 et 2A, évoque néanmoins des caractéristiques d'activation par le Ca différentes pour les fibres de ces deux groupes. Même si la majorité des paramètres (sauf n_1) dérivés de la T/pCa des fibres HS et HF ne sont pas significativement différents, il apparaît que les fibres de type HF sont un peu moins sensibles au Ca (valeurs du seuil et de la pCa_{50}) que les fibres HS, et présentent des valeurs plus élevées pour les coefficients de Hill.

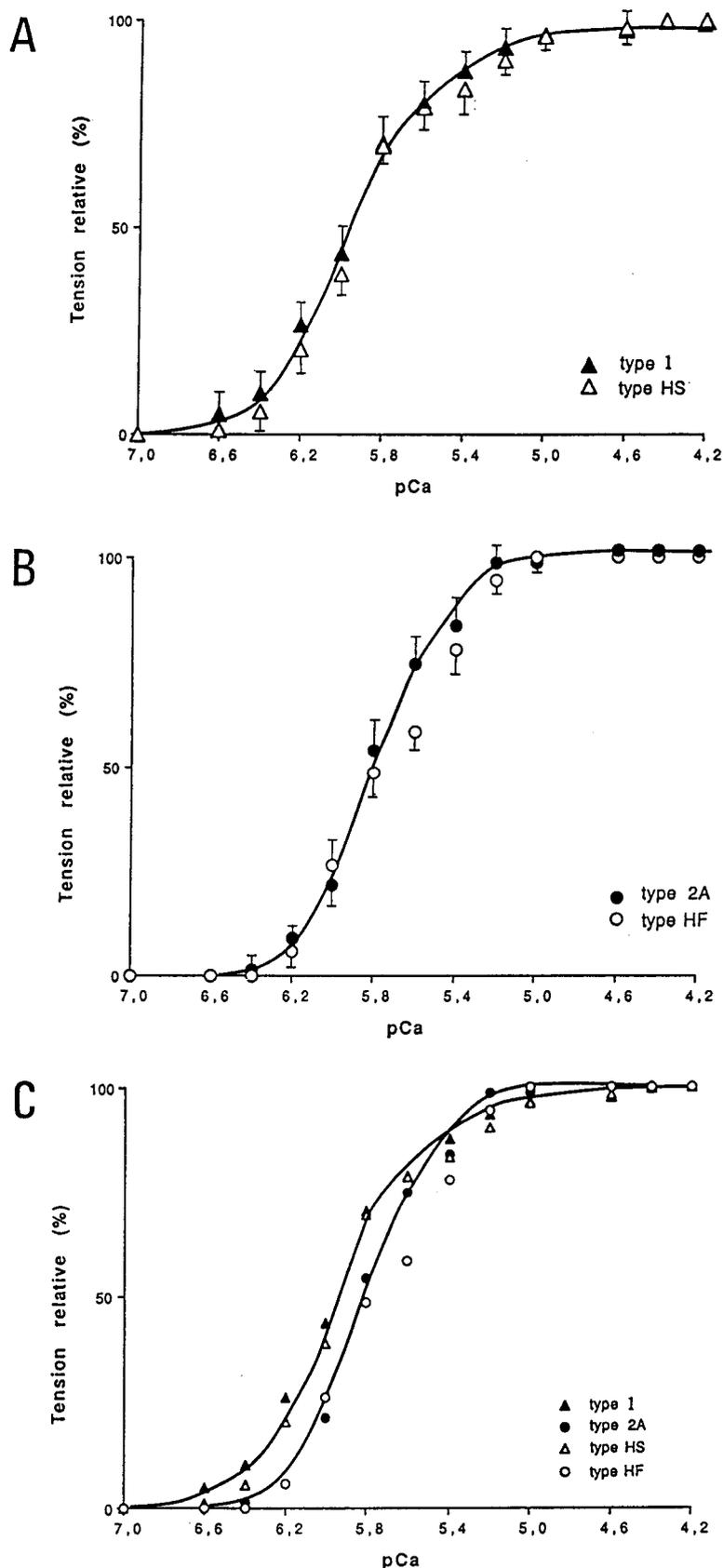


Figure 33 : Relations T/pCa établies pour les 4 populations de fibres isolées du soleus de singe rhésus

A - Relation T/pCa des fibres de type 1 et de type HS

B - Relation T/pCa des fibres de type 2A et de type HF

C - Relations T/pCa des 4 types de fibres (les E.S.M. ne sont pas représentées)

type de fibre	seuil (en pCa)	pCa ₅₀	n ₁	n ₂	n	pCa ₅₀ -pSr ₅₀
1 (n = 17)	6,78 ± 0,06	5,96 ± 0,04	1,82 ± 0,16	2,05 ± 0,15	1,89 ± 0,12	0,41 ± 0,04
HS (n = 8)	6,63 ± 0,35	5,86 ± 0,41	1,60 ± 0,16	2,38 ± 0,23	1,98 ± 0,20	0,35 ± 0,03
HF (n = 9)	† 6,48 ± 0,05	† 5,72 ± 0,04	†\$ 2,46 ± 0,16	3,05 ± 0,81	† 2,35 ± 0,14	†\$ 1,08 ± 0,10
2A (n = 7)	* 6,48 ± 0,08	* 5,79 ± 0,05	2,41 ± 0,51	*§ 4,10 ± 0,72	* 2,69 ± 0,46	*§ 1,22 ± 0,04

Tableau 10 : Caractéristiques d'activation par le Ca des 4 types de fibres déterminés dans le soleus de singe rhésus

† : Différence significative entre type 1 et type HF

* : Différence significative entre type 1 et type 2A

\$: Différence significative entre type HS et type HF

§ : Différence significative entre type HS et type 2A

Il apparaît donc que la relation T/pCa des fibres hybrides ont des positions différentes, intermédiaires entre celles des fibres 1 et 2A, dans le sens $1 \rightarrow HS \rightarrow HF \rightarrow 2A$ (Fig. 33C).

Cependant, la comparaison de la relation T/pCa des fibres 1 et HS (Fig 33A) ainsi que des paramètres caractéristiques de la T/pCa (Tableau 10) met en évidence que les fibres HS et 1 ont des propriétés d'activation proches. Ceci est vérifié pour tous les paramètres étudiés. Ces similitudes sont encore plus marquées entre les fibres HF et 2A (Fig. 33B et tableau 10).

III - MESURE DE VMAX

La Vmax a été mesurée sur 27 fibres parmi les 41 fibres étudiées. Ces 27 fibres étaient réparties en 17 fibres de type 1, 3 de type HS et 7 de type HF. La figure 34 illustre la distribution des valeurs de Vmax en fonction du type de fibre.

Les valeurs de Vmax obtenues pour les fibres de type 1 et les fibres HS sont distribuées entre 0,4 et 2,8 (en longueur de fibre / seconde). La répartition des fibres de ces deux groupes ne permet pas de distinguer les fibres HS et les fibres de type 1 par ce critère. Les valeurs moyennes de Vmax obtenues pour les fibres de type 1 ($1,25 \pm 0,15$ LF/s, n=17) et les fibres HS ($1,08 \pm 0,20$ LF/s, n=3) ne sont pas significativement différentes. Les valeurs de Vmax mesurées pour les fibres HF sont comprises entre 1,0 et 5,8 FL/s. La zone de distribution de ces valeurs est donc beaucoup plus importante, même si la répartition des valeurs de Vmax des fibres HF est située vers les vitesses plus importantes. La valeur moyenne de la Vmax des fibres HF ($3,03 \pm 0,60$ LF/s, n=7) est significativement plus élevée que celle des fibres de type HS et de type 1. Les valeurs de Vmax ont été rapportées à la quantité relative de MHC2A d'une part et à la quantité relative de MLC1f : nous n'avons pas mis en évidence de corrélation nette entre ces paramètres.

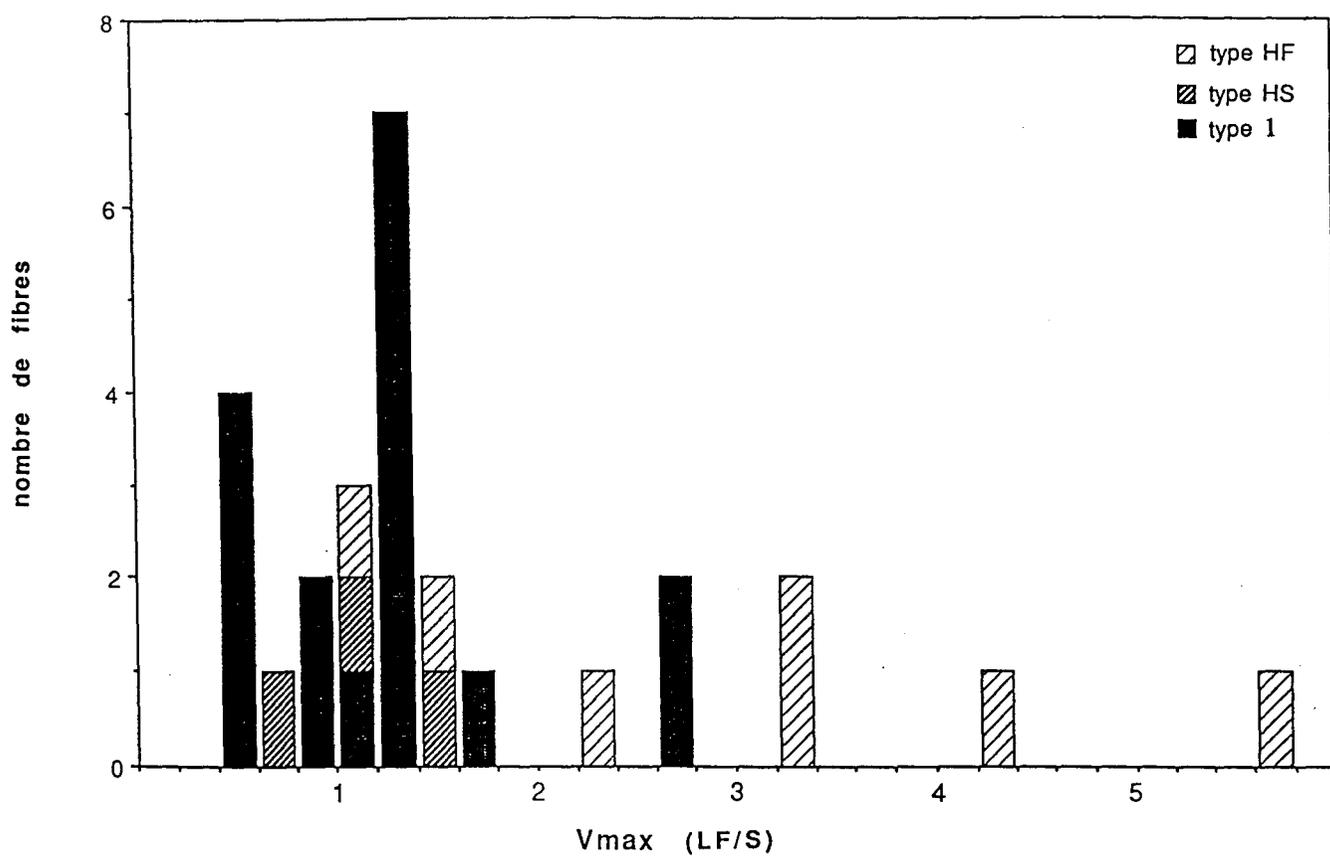


Figure 34 : Distribution des valeurs de V_{max} , en longueur de fibre par seconde (LF/s), mesurées sur des fibres isolées de soleus de singe rhésus

L'axe des ordonnées indique le nombre de fibres pour une classe de valeurs de V_{max}
3 types de fibres sont représentés : type 1, HS et HF

IV - CONCLUSION

1 - Propriétés d'activation par le Ca et le Sr des fibres n'exprimant qu'un type d'isoformes de protéines myofibrillaires

La comparaison des paramètres d'activation de la tension par le Ca des fibres de type 1 et 2A du soleus de singe rhésus révèle une différence de la réponse au Ca pour ces deux types de fibres. Cette différence est similaire à celle observée pour les fibres de type 1 et 2A des muscles soleus et Vast. Int. de rat (chapitre "résultats", 1^{ère} partie I-B). De même, l'affinité relative de ces fibres au Ca et au Sr, estimée par la différence (pCa_{50} - pSr_{50}), est semblable à celle des fibres de type 1 et 2A isolées du soleus et Vast. Int. de rat.

Les caractéristiques d'activation par le Ca et l'affinité relative au Ca et au Sr des fibres de type 1 et 2A des fibres de soleus de singe rhésus sont donc analogues à celles de fibres présentant des compositions myofibrillaires identiques mais isolées de muscles de rat.

2 - Propriétés d'activation par le Ca et le Sr des fibres hybrides

Les fibres hybrides isolées du soleus de singe rhésus sont séparables en deux groupes selon leur composition en protéines myofibrillaires : les fibres HS, qui expriment les isoformes lentes de MHC (et de MLC) de manière prédominante et les fibres HF qui expriment principalement les isoformes rapides de MHC (et de MLC) et le TnCf. Les fibres HF présentent des caractéristiques d'activation par le Ca et une affinité relative pour le Ca et le Sr analogues à celles des fibres de type 2A, alors que les fibres HS ont des propriétés d'activation proches de celles de type 1. Les fibres "HF" sont donc un peu moins sensibles au Ca que les fibres "HS" et présentent des valeurs plus élevées du coefficient de Hill.

Il apparaît donc que les propriétés d'activation par le Ca et l'affinité relative au Ca et au Sr des fibres hybrides sont liées à l'expression prédominante d'un type d'isoformes de MHC et de MLC et/ou à l'expression de la TnCf.

3 - Vitesse maximale de raccourcissement

Les valeurs de V_{max} des fibres de type 1, HS et HF sont réparties selon un continuum entre 0,4 et 5,8 LF / s. Nous ne pouvons donc distinguer les fibres 1, HS et HF par l'analyse de ce seul critère. Cependant, les valeurs de V_{max} sont plus élevées quand la MHC 2A est exprimée de manière prédominante : les valeurs moyennes de V_{max} des fibres de type 1 et HS sont significativement inférieures à la V_{max} moyenne des fibres de type HF. Néanmoins, aucune corrélation nette entre les isoformes de MHC et/ou de MLC et la V_{max} n'a été mise en évidence.

QUATRIEME PARTIE

Etude de la relation entre l'expression des isoformes lentes et rapides des chaînes lourdes et légères de la myosine dans les fibres hybrides.

L'étude de la composition en MLC des fibres de type HS et HF montre que l'expression des MLC est du même type que celle des MHC : les fibres HS expriment de manière prédominante les isoformes lentes de MLC. Dans les fibres HF, les isoformes rapides de MLC sont plus exprimées que les isoformes lentes. En outre, il semble, de visu, que l'expression des isoformes de MLC2 corresponde mieux à celle des MHC que celle des MLC1. Cette partie de notre travail est consacrée à l'étude quantitative de l'expression relative des différentes isoformes de la myosine dans les fibres hybrides.

I - PRELIMINAIRE METHODOLOGIQUE

Comme nous l'avons indiqué précédemment, la migration des protéines myofibrillaires sur gel homogène de concentration 12% ne permet pas de séparer l'isoforme lente de la TnC de l'isoforme rapide de la MLC2. L'analyse densitométrique de ces gels à 12% serait biaisée puisque la TnCs et la MLC2f ne peuvent être dissociées. Pour cette raison, un autre type de gel, à gradient de concentration 10-20% permettant de séparer la TnC de la MLC2f, est utilisé.

La séparation des protéines myofibrillaires de poids moléculaire inférieur ou égal à 42kD par SDS-PAGE sur gel à gradient de concentration 10-20% est illustrée à la partie B de la figure 35. Cette méthode, décrite par Salviati et coll. en 1982, est fréquemment utilisée pour séparer les différentes isoformes de MLC et de protéines régulatrices (Biral et coll. 1982 ; Salviati et coll. 1982, 1984, 1986 ; Danieli-Betto et coll. 1990). Ces auteurs parviennent à séparer légèrement les deux isoformes de TnC, qui migrent entre la MLC2f et la MLC3. Toutefois, lorsque nous avons utilisé cette technique, nous n'avons jamais obtenu cette séparation des deux isoformes de TnC (voir Fig. 35).

Sur ce type de gel, nous avons révélé les protéines myofibrillaires par une coloration à l'argent, selon la méthode décrite par Ansorge (1983). Cette coloration

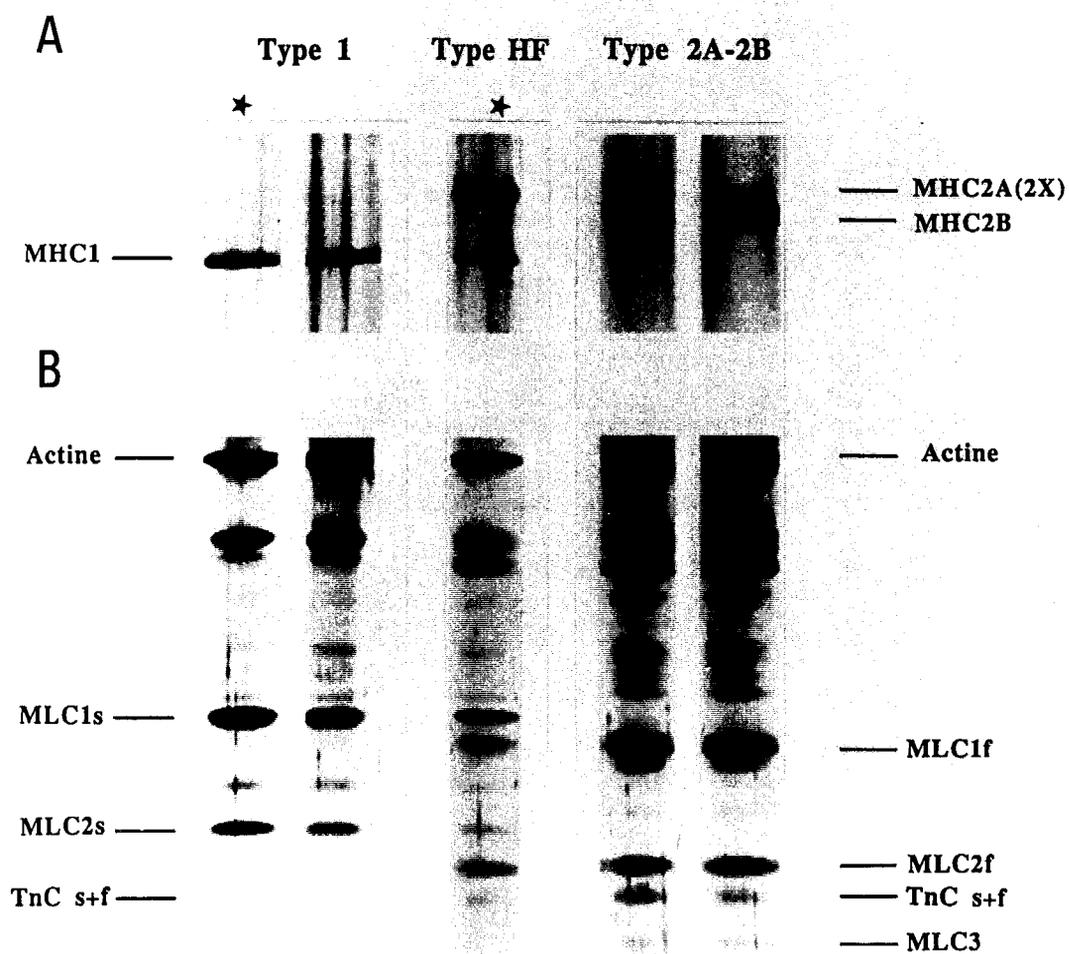


Figure 35 : Profil électrophorétique des fibres isolées de soleus (type 1 et HF) et d'EDL (type 2A-2B) de rat

A - Séparation par SDS-PAGE des isoformes de chaînes lourdes de la myosine sur gel 6%

B - Séparation par SDS-PAGE des protéines myofibrillaires de plus faible poids moléculaire sur gel 10-20%

permet de mettre en évidence les différentes isoformes de la myosine (parties A et B de la Fig. 35) mais n'est pas suffisamment sensible pour détecter la TnC, présente en faible quantité dans le matériel que nous étudions (segment de fibre musculaire isolée).

Comme il est suggéré que l'isoforme de TnC peut déterminer les propriétés d'activation par le Ca et le Sr, nous avons utilisé la méthode de séparation électrophorétique et la technique de coloration décrites par Giulian et coll. (1983) pour étudier la relation entre ces propriétés et la composition en protéines myofibrillaires. Cette méthode permet de séparer de façon beaucoup plus marquée les deux isoformes de TnC et de détecter de plus faibles quantités de protéines même si la TnC migre conjointement à la MLC2f. Nous pouvons néanmoins déterminer la présence de l'isoforme rapide de la TnC.

Le parallélisme d'expression entre les isoformes lentes et rapides de MHC, MLC1 et de MLC2 fut étudié sur des fibres hybrides de rats, après séparation des protéines sur un gel de gradient 10-20%. Par contre, pour les fibres de soleus de singe, dont les propriétés physiologiques étaient déterminées, seule l'analyse du parallélisme d'expression entre les isoformes de MHC et MLC1 est étudiée après séparation sur un gel 12%.

II - QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION RELATIVE DES ISOFORMES LENTES ET RAPIDES DE LA MYOSINE DANS LES FIBRES HYBRIDES

Un exemple de profil densitométrique, permettant de quantifier les proportions relatives d'isoformes lentes et rapides de MHC et de MLC exprimées, est donné à la Fig.36. La partie A de cette figure illustre un profil caractéristique de fibre de type 1 et la partie B celui d'une fibre de type HF. Les quantités relatives des isoformes lentes et rapides de la myosine sont déterminées. La quantité relative d'une isoforme de MHC ou MLC est exprimée comme un rapport de surface "sous pic" : la surface correspondant à l'isoforme lente et rapide est rapportée à la somme des surfaces correspondant aux deux isoformes (lente + rapide) de cette protéine. Pour chaque fibre, ce rapport est calculé pour les MHC, les MLC1 et, pour les fibres de rat, les MLC2. La MLC3, exprimée en trop faible quantité dans ces fibres, n'est pas considérée.

Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau 11, sous forme de moyenne, pour les fibres des groupes HS et HF. Dans les fibres HS de soleus de rat, dont l'expression moyenne des MHC 1 et 2A(2X) sont proches, la même distribution relative des isoformes lentes et rapides est obtenue pour les MLC. Les fibres HF de même origine présentent une différence plus marquée dans l'expression relative moyenne des MHC1

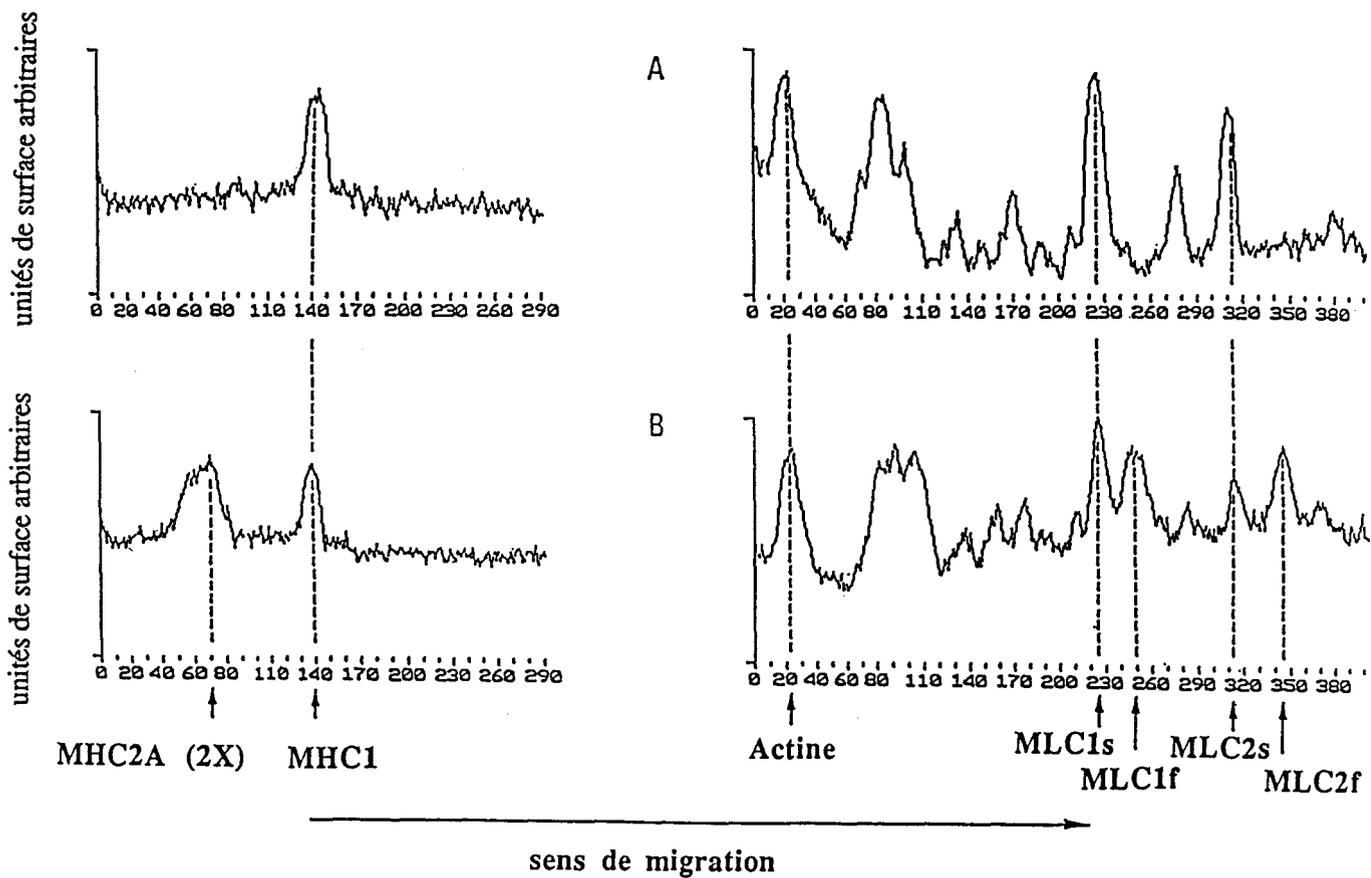


Figure 36 : Profil obtenu par analyse densitométrique de la zone de migration des chaînes lourdes de la myosine, sur gel 6% (partie gauche), et des chaînes légères de la myosine, sur gel 10-20% (partie droite), de fibres du soleus de rat

A : fibres de type 1

B : fibres de type HF

Ces profils densitométriques correspondent aux colonnes (*) de la figure 35

	MHC1/ MHC[1+2A(2X)]	MHC2A(2X)/ MHC[1+2A(2X)]	MLC1s/ MLC1(s+f)	MLC1f/ MLC1(s+f)	MLC2s/ MLC2(s+f)	MLC2f/ MLC2(s+f)
soleus de rat						
fibres de type HS (n=6)	57 ± 6	43 ± 6	54 ± 4	46 ± 4	59 ± 3	41 ± 3 ¥
fibres de type HF (n=6)	31 ± 5	69 ± 5 *	52 ± 5 ¥	48 ± 5 ¥	36 ± 7	64 ± 7 ¥
soleus de singe						
fibres de type HS (n=8)	76 ± 6	24 ± 6 *	69 ± 7	31 ± 7 ¥		
fibres de type HF (n=9)	23 ± 10	77 ± 10 *	43 ± 5	57 ± 5 ¥		

Tableau 11 : Expression relative des isoformes lentes et rapides des chaînes lourdes (MHC) et légères (MLC) de la myosine dans les fibres hybrides de soleus de rat et de singe rhésus

* : Différence significative entre MHC1 et MHC2A(2X)

¥ : Différence significative entre les différentes isoformes de MLC et la MHC1

($31\pm 5\%$, $n = 6$) et des MHC rapides ($69\pm 5\%$, $n = 6$). Ceci permet de mettre en évidence que l'expression des MLC2f ($36\pm 7\%$, $n = 6$) et des MLC2s ($64\pm 7\%$, $n = 6$) est mieux corrélée à l'expression des MHC que celle des MLC1. Par contre, les résultats de l'expression relative moyenne des isoformes de MHC et MLC1 étudiée pour les fibres hybrides de soleus de singe, montrent que, lorsque les différences de proportions relatives d'isoformes lentes et rapides de MHC sont très différentes, l'expression des isoformes de MLC1 semble bien corrélée à celle des MHC dans les fibres de type HS. Cette relation est nettement moins étroite pour les fibres de type HF.

Une étude plus précise est effectuée en reportant, pour chaque fibre hybride étudiée, la quantité relative d'isoformes rapides de MLC1 et MLC2 en fonction de celle des MHC2A (2X) (Fig. 37). Les droites de régression, les coefficients de corrélation (r) et les niveaux de signification sont indiqués sur le graphe de la Fig. 37. Le coefficient de corrélation linéaire est plus élevé pour les MLC2 que pour les MLC1, ce qui traduit une relation plus forte entre l'expression des isoformes de MLC2 et de MHC. Ce résultat est beaucoup plus net pour les fibres HF (encart de la Fig. 37) : le coefficient de corrélation linéaire entre la MLC2f et la MHC2A (2X) est de 0,83. La pente de la droite de régression est égale à 1, ce qui suggère une proportionnalité directe entre l'expression des isoformes de MHC et de MLC2. La même analyse des données est réalisée pour étudier la corrélation entre l'expression des MHC et des MLC1 des fibres HS et HF de soleus de singe : le coefficient de corrélation est de 0,61. Cette corrélation est donc moins étroite que celle obtenue pour les isoformes de MHC et MLC2 dans les fibres HF du soleus de rat.

III - CONCLUSION

Parallèlement à la co-expression des deux isoformes de MHC, les isoformes lentes et rapides de MLC sont exprimées dans les fibres hybrides. Les fibres de type HF expriment de manière prédominante les isoformes rapides de MLC et les fibres de type HS les isoformes lentes de MLC. De plus, les niveaux d'expression relative des isoformes lentes et rapides de MHC et MLC2 sont plus étroitement corrélées, dans un même fibre, que ceux des MHC et des MLC1.

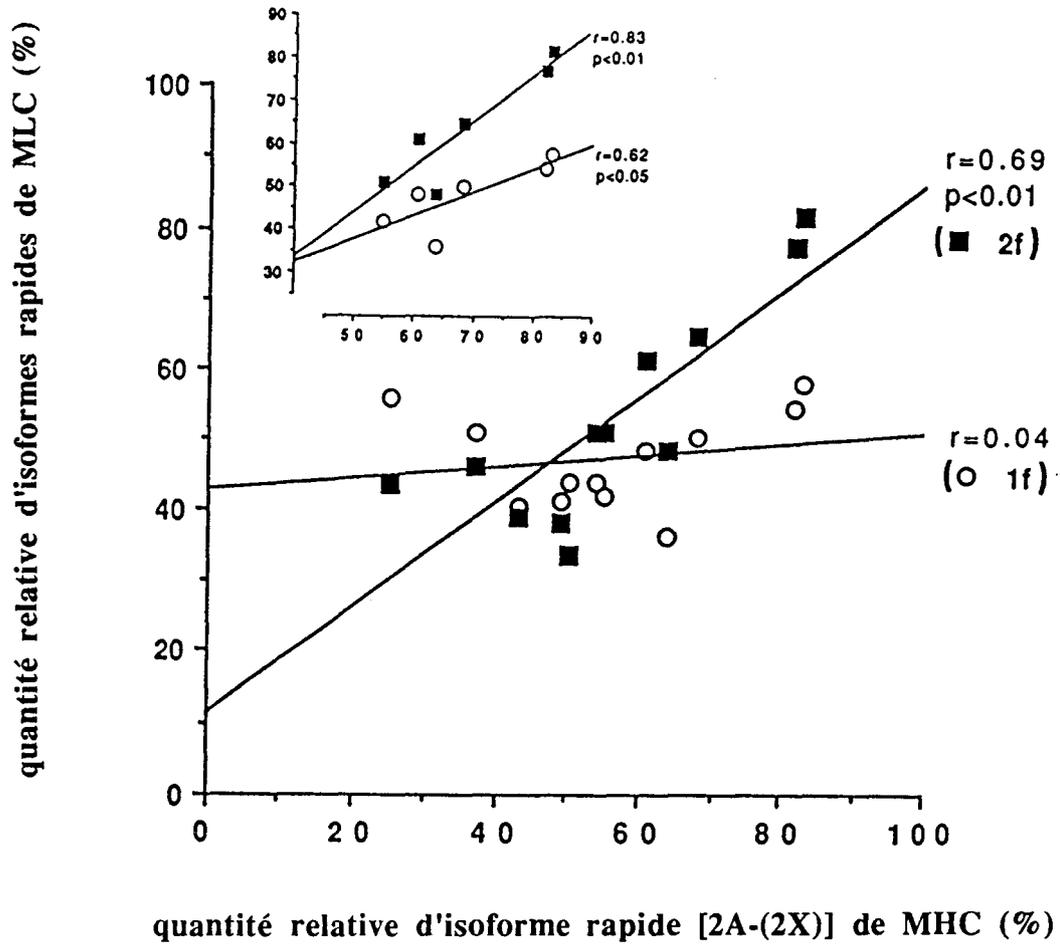


Figure 37 : Relation entre les proportions d'isoformes rapides des chaînes lourdes (MHC2A-2X) et légères (MLC1f et MLC2f) de la myosine dans les fibres de type hybride du soleus de rat

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

I - LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DE FIBRES N'EXPRIMANT QU'UN TYPE D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES

L'analyse de la composition protéique myofibrillaire par SDS-PAGE permet de séparer les isoformes lentes et rapides de MHC, MLC et Tn. Les fibres lentes et rapides sont donc distinguables par cette technique. Les fibres lentes et rapides n'expriment qu'un type d'isoformes de protéines myofibrillaires, isolées du soleus ou du Vast. Int. sont de type 1 et 2A. Ces résultats sont en accord avec ceux de Danieli-Betto et coll. (1986), Billeter et coll. (1981, 1982) pour le soleus et de Caiozzo et coll. (1991) pour le Vast. Int.

A - Les propriétés d'activation par le calcium

Les fibres musculaires isolées dont la composition en protéines myofibrillaires est différente présentent des sensibilités calciques distinctes. Les fibres de type 1 (lentes) sont plus sensibles au Ca que les fibres de type 2A (rapides) : leur seuil d'activation et l'affinité pour le Ca (traduite par la pCa_{50}) ont des valeurs plus grandes en pCa (donc plus faible [Ca]) que les fibres de type 2A. De plus, la pente globale de la relation T/pCa est plus élevée pour les fibres de type 2A que pour celles de type 1. Ces variations sont identiques entre les fibres lentes et rapides d'un muscle lent (soleus) ou mixte (Vast. Int.) de rat, ou d'un muscle lent (soleus) de singe rhésus. Ces observations sont en accord avec les résultats décrits par d'autres auteurs pour les fibres de différents Mammifères : rat (Stephenson et Forrest 1980 ; Laszewski-Williams et coll. 1989 ; Mounier et coll. 1989 ; Danieli-Betto et coll. 1990), cobaye (Takagi et Endo 1977), marsupial (Wilson et Stephenson 1990) et homme (Ruff 1989).

Si le décalage des seuils d'activation et la variation de la pente de la relation T/pCa sont toujours décrits par ces différents auteurs, le décalage de la pCa_{50} n'est pas un phénomène constamment observé. En effet, ce paramètre, traduisant l'affinité des protéines contractiles pour le Ca, est particulièrement sensible aux variations de température et de longueur de sarcomère (Stephenson et Williams 1981, 1982). Il est donc probable que les variations quantitatives observées sur l'ensemble des données bibliographiques soient liées aux différences de conditions expérimentales. La différence de pCa_{50} entre les fibres de type 1 et celles de type 2A observée dans notre étude est semblable à celle décrite par Laszewski-Williams et coll. (1989) et Danieli-Betto et coll. (1990) pour des fibres musculaires de rat, comme par Ruff (1989) pour des fibres musculaires d'homme.

La valeur de la pente de la relation T/pCa, plus élevée pour les fibres de type 2A, indique que les phénomènes coopératifs intervenant dans l'activation calcique seraient

plus importants dans les fibres rapides que dans les fibres lentes. Moss et coll. (1983) indiquent que la relation T/pCa des fibres rapides est mieux décrite lorsque deux coefficients de pente sont utilisés : l'un (n_1) calculé pour la partie de la relation T/pCa correspondant aux tensions supérieures à 50% de la tension maximale, et le second (n_2) calculé pour l'autre partie de la relation T/pCa (i.e. pour les tensions inférieures à 50% de la tension maximale). Ces auteurs suggèrent que la décomposition biphasique de la courbe est liée à l'implication de plus d'une classe de sites de liaison du Ca dans le développement de la tension. La valeur de n_2 correspondrait à la liaison du Ca aux sites de faible affinité de la TnC (Moss et coll. 1986b ; De Beer et coll. 1990). Cependant la validité de la description de la courbe de Hill par deux coefficients de pente est très variable en fonction du pH des solutions activatrices et de la longueur de sarcomère fixée (Moss et coll. 1983 ; Metzger et Moss 1987) et leur signification exacte n'est pas clairement établie. La description de la relation T/pCa des fibres de type 1 et 2A par les deux coefficients n_1 et n_2 révèle, excepté pour les fibres de type 1 du soleus de rat, un coefficient de pente initiale de la relation T/pCa (n_2) supérieur à n_1 . Cette différence entre n_1 et n_2 est légèrement plus marquée pour les fibres de type 2A que pour les fibres de type 1 mais néanmoins non significative. Nos résultats sont partiellement en accord avec ceux de Metzger et Moss (1987) qui montrent que pour l'activation calcique des fibres de soleus de rat, étudiée à pH 7, un seul coefficient suffit pour décrire la relation T/pCa puisque les coefficients n_1 et n_2 ne sont pas significativement différents. Par contre, ils décrivent une différence significative entre n_1 et n_2 pour les fibres rapides, n_2 étant toujours supérieur à n_1 . Dans notre travail, la taille de l'échantillon des fibres rapides étudiées est plus faible que celui des fibres lentes ; ceci est surtout lié à la nature des muscles considérés mais également au hasard de l'échantillonnage. De plus, en raison même de la pente importante de la relation T/pCa pour ces fibres rapides, il est très difficile d'obtenir, pour chaque fibre, un nombre de mesures suffisantes pour calculer de manière précise les deux coefficients de la pente de cette relation. Pour un type de fibres donné, aucune différence significative entre n_1 et n_2 n'est observée, nous considérerons donc que la relation T/pCa peut être décrite de manière fiable par le coefficient global : n . Cette observation est également valable pour l'étude des pentes des relations T/pSr , comme pour celle des relations T/pCa et T/pSr des fibres hybrides dont nous discuterons ultérieurement.

Nous montrons des différences de caractéristiques d'activation calcique entre les fibres de type 1 et 2A similaires quelle que soit l'origine musculaire des fibres étudiées. En revanche, une différence de seuil d'activation entre les fibres du soleus et du Vast. Int. est observée : les fibres de type 1 et 2A du Vast. Int. sont légèrement plus sensibles au Ca que celles du soleus alors que leur composition en protéines myofibrillaires sont respectivement identiques. Néanmoins, cet effet "muscle d'origine", également retrouvé pour les fibres hybrides, est négligeable devant l'effet "type de fibre" sur les paramètres

d'activation calcique. Laszewski-Williams et coll. (1989) ont décrit cette sensibilité calcique plus importante des fibres isolées d'un muscle mixte (le gracilis postérieur) comparée à celle de fibres isolées d'un muscle lent (le soleus) de rat, sans différence de composition en protéines myofibrillaires. Cette différence de sensibilité calcique pourrait être due à une variation d'activité métabolique ou à une variation de composition en protéines structurales non étudiées dans ce travail. En effet, la technique SDS-PAGE que nous utilisons ne permet pas, par exemple, de séparer les protéines selon leur degré de phosphorylation. Or la phosphorylation de la MLC2 entraîne un décalage vers la gauche de la relation T/pCa ainsi qu'une diminution de la coopérativité (Sweeney et Stull 1986). La différence de sensibilité calcique des fibres du Vast. Int. pourrait donc être liée à un degré de phosphorylation de la MLC2 différent dans le soleus et le Vast. Int. dû à une variation de l'activité de la MLCkinase dans ces deux muscles. En outre, nous pouvons suggérer que cette légère variation de la sensibilité au Ca des fibres isolées de ces muscles lents et mixtes peut être causée par une adaptation au type d'activité du muscle dont elles proviennent, comme par une différence de longueur optimale de travail de ce muscle.

B - Les propriétés d'activation par le strontium

Les différences d'activation de la tension des fibres de type 1 et 2A par le Sr sont nettement plus marquées que lorsque le Ca est utilisé comme cation activateur : le seuil d'activation et la pSr_{50} sont décalés d'environ une unité pSr vers la droite pour les fibres de type 2A par rapport à celles de type 1. Ces résultats concordent avec les différentes données obtenues pour les fibres de Mammifères (Kerrick et coll. 1976 ; Takagi et coll. 1978 ; Ruff et Whittlesey 1991 ; Stevens et coll. 1993). Une distinction "physiologique" entre les fibres lentes et rapides repose donc sur la différence de réactivité de ces fibres au Sr. Ceci fut démontré pour les fibres musculaires de rongeurs (Takagi et Endo 1977 ; Fink et coll. 1986 ; Stevens et coll. 1993), d'homme (Ruff et Whittlesey 1991) et de primate (cette étude). Alors que l'activation par le Ca permet de distinguer les fibres de type 1 et 2A par la pente de la relation T/pCa , nous ne relevons aucune différence de ce paramètre pour les relations T/pSr . De plus, comme pour la relation T/pCa , le coefficient de pente globale (n) est suffisant pour décrire précisément la relation T/pSr : même si en général n_2 est supérieur à n_1 , cette différence n'est jamais significative. Le Sr, contrairement au Ca, ne permettrait donc pas de mettre en évidence la mise en jeu de phénomènes coopératifs d'intensité différente lors de l'activation des fibres lentes et rapides par ce cation. Cette observation fut également notée par Hoar et coll. (1988) et Ruff et Whittlesey (1991). Par contre, d'autres auteurs (Fink et coll. 1986 ; West et Stephenson 1993) distinguent les types de fibres selon leur différence de coefficient de pente de la relation T/pSr . Les raisons de ces divergences, non évoquées dans la

littérature, ne sont pas élucidées. Par ailleurs, tandis que la relation T/pCa montre de légères différences d'activation des fibres d'un même type isolées d'un muscle lent et d'un muscle mixte de rat, la comparaison des relations T/pSr ne révèle pas la moindre variation de sensibilité entre les fibres issues de ces deux muscles. Les modifications de certains paramètres, mises en évidence par l'étude des relations T/pCa, n'apparaissent donc pas lors de l'étude des relations T/pSr. Les phénomènes impliqués dans l'activation calcique seraient modifiés lors de l'activation par le Sr. En effet, l'activation, par les cations divalents, des sites contrôlant la force est plus liée au rayon de l'ion qu'aux propriétés chimiques spécifiques de ces cations. Fuchs (1974) a montré que le pic d'activation de la tension était induit par un ion de rayon 0,99 Å : le Ca. Le rayon ionique du Sr est de 1,1 Å, sa fixation à la Tn est donc possible, mais moins importante (Kohama 1979). Grabarek et coll. (1990) ont montré un rôle majeur des interactions électrostatiques dans la transmission du signal, après la liaison des cations divalents, aux sites régulateurs des autres éléments du système de régulation du muscle squelettique. La différence de rayon ionique entre le Ca et le Sr et la différence d'environnement électrostatique engendrée pourraient donc induire des modifications fines de la régulation de la tension par ces deux cations.

Il apparaît donc judicieux d'utiliser à la fois les données des deux relations (T/pCa) et (T/pSr) pour distinguer les fibres lentes des rapides ; le critère le plus approprié et le plus discriminatif étant la différence d'affinité relative Ca/Sr pour ces deux types de fibres.

C - La différence d'activation par le calcium et le strontium

Selon ce critère, nous avons montré que les fibres lentes étaient deux fois plus sensibles au Ca qu'au Sr, alors que les fibres rapides sont 16 à 18 fois plus sensibles au Ca qu'au Sr. Ces données concernant l'affinité relative Ca/Sr des fibres de type 1 et 2A correspondent à celles de la littérature : Ruff et Whittlesey (1991), sur fibres musculaires humaines, donnent un rapport d'affinité relative Ca/Sr de 1,8 pour les fibres "1" et de 17 pour les "2A". De même, Fink et coll. (1986) montrent que les fibres rapides d'EDL de souris sont 12 fois moins sensibles au Sr qu'au Ca. La comparaison des valeurs de (pCa₅₀-pSr₅₀) décrites par différents auteurs pour les fibres de rat (Fink et coll. 1986 ; Lynch et coll. 1991 ; Stevens et coll. 1993) et d'autres Mammifères (Kerrick et coll. 1980 ; Wilson et Stephenson 1990 ; Gulati et coll. 1992) reflète la constance de la différence de sensibilité au Sr et au Ca des fibres lentes et rapides au sein de diverses espèces. Nous avons élargi ces données aux fibres lentes et rapides de primates, plus particulièrement aux fibres de soleus de singe rhésus.

La comparaison des caractéristiques d'activation par le Ca et le Sr des fibres 1 et 2A permet d'émettre une nouvelle hypothèse quant à l'absence de différence significative entre les coefficients de Hill des relations T/pSr de fibres de type 1 et 2A. Pour les fibres de type 1 comme pour celles de type 2A, le coefficient de pente de la relation T/pSr est moins élevé que celui de la relation T/pCa. La coopérativité mise en jeu dans le développement de la tension est donc moins importante lorsque le cation activateur est le Sr. De plus, il est intéressant de constater que cette différence entre le nCa et le nSr est beaucoup plus marquée pour les fibres 2A que pour les fibres 1 (diminution de n de l'ordre de 0,3 et 1,5 pour les fibres de type 1 et 2A, respectivement). Le passage de l'activation par le Ca à l'activation par le Sr des fibres de type 2A se traduit donc par un décalage vers la droite important et une diminution de la coopérativité de la relation tension/cation activateur. Ce phénomène est qualitativement comparable aux phénomènes observés sur la relation T/pCa lorsque, dans une fibre rapide, la TnC rapide est remplacée par l'isoforme de TnC lente (Moss et coll. 1986b). Ces auteurs interprètent la diminution de la pente de la relation T/pCa comme le reflet de la moindre affinité de la TnCs pour le Ca, comparée à l'affinité de l'isoforme rapide de TnC, et plus particulièrement comme le reflet possible du nombre de sites de la TnC impliqués dans la contraction (deux pour la TnCf et un seul pour la TnCs). Les résultats que nous exposons, concernant la relation T/pSr des fibres de type 1 et 2A, ne soutiennent pas cette idée de traduction du nombre de sites de la TnC impliqués dans la contraction par le coefficient de Hill puisque les fibres de type 1 et 2A présentent le même coefficient de Hill lors de l'activation par le Sr. En revanche, si l'on considère que la différence de sensibilité au Sr des fibres lentes et rapides est due à l'isoforme de TnC, hypothèse la plus répandue, le coefficient de Hill traduirait bien l'affinité de la TnC pour le cation activateur : la faible différence d'affinité relative Ca/Sr des fibres de type 1 induit une faible diminution de la coopérativité alors que la différence d'affinité Ca/Sr plus importante pour les fibres de type 2A serait caractérisée par une différence du coefficient n de la relation T/pCa et de la relation T/pSr beaucoup plus marquée. Néanmoins, cette explication n'est pas suffisante puisque la troponine des muscles rapides présente un rapport d'affinité Sr/Ca de 1/27 et celle des muscles lents un rapport de 1/3 (Ebashi et coll. 1968). Si la pente de la relation tension/cation ne dépendait que de l'affinité de la TnC pour le cation, la coopérativité apparente des fibres de type 2A activées par le Sr devrait être inférieure à celle des fibres de type 1 activées par ce même cation. Il faut donc envisager que l'isoforme de TnC n'est pas le seul déterminant de la réactivité différentielle des fibres lentes et rapides au Ca et au Sr, ou que la pente de la relation tension/cation, et donc la coopérativité apparente de la fibre, ne dépend pas uniquement de l'affinité de la TnC pour le cation activateur. Différents arguments en faveur de ces deux hypothèses sont énoncés dans la littérature. Tous les résultats concernant les différentes protéines impliquées dans la détermination de la pente de la relation tension/cation activateur furent obtenus à partir des relations T/pCa,

en particulier sur des fibres de type rapide. Brandt et coll. (1984) et Gulati et coll. (1988) évoquent un rôle direct de la TnC dans la coopérativité, mais également une nécessité d'interactions entre les autres protéines du filament fin (TnT d'un groupe fonctionnel et Tm du groupe fonctionnel adjacent) pour convertir ce filament fin en une unité coopérative. En outre, Bremel et Weber (1972) ont démontré que le nombre de ponts actine-myosine liés augmentait l'affinité du Ca pour la TnC, et donc la coopérativité : quand le nombre de têtes S1 de la myosine attachées au filament fin diminue, le coefficient n de la relation T/pCa diminue. Brenner (1988) a évoqué une intervention de la vitesse d'attachement des ponts actine-myosine sur la pente de la relation T/pCa . Il est donc possible, compte tenu de la variété des phénomènes impliqués dans la détermination de la coopérativité, que l'ion Sr ne permette pas, à la différence du Ca, une interaction aussi efficace entre groupes fonctionnels adjacents, ou entre le nombre de ponts actine-myosine attachés et le site de liaison du cation à la TnC, en particulier dans les fibres rapides. Les constantes cinétiques d'attachement des ponts actine-myosine lors de l'activation par le Sr pourraient également être diminuées et donc être responsables de la diminution de coopérativité par rapport à l'activation par le Ca.

II - LA RELATION STRUCTURE-FONCTION DE FIBRES CO-EXPRIMANT DEUX TYPES D'ISOFORMES DE PROTEINES MYOFIBRILLAIRES : LES FIBRES HYBRIDES

A - La composition myofibrillaire des fibres hybrides

La comparaison des paramètres d'activation de la tension induite par le Ca et le Sr sur une même fibre musculaire permet donc de séparer les fibres en deux groupes : les fibres lentes et rapides. Contrairement à Fink et coll. (1990) et Wilson et Stephenson (1990), nous ne mettons pas en évidence de groupe intermédiaire, différent des groupes "lent" et "rapide" selon leur affinité relative Ca/Sr, ni dans le soleus de rat et de singe, ni dans le Vast. Int. de rat. Ces auteurs définissent les fibres intermédiaires comme des fibres présentant un degré de coopérativité de la relation T/pCa et de la relation T/pSr compris entre celui des fibres lentes et rapides, alors que la valeur de la différence ($pCa_{50}-pSr_{50}$) correspond à celle des fibres lentes ou rapides. Dans notre étude, et comme cela est décrit par d'autres auteurs (Hoar et coll. 1988 ; Ruff et Whittlesey 1991), nous ne relevons pas de différence de pente de la relation T/pSr entre les fibres lentes et rapides, et aucune population intermédiaire n'est séparable selon le critère ($pCa_{50}-pSr_{50}$).

Par contre, l'analyse électrophorétique des fibres isolées révèle l'existence d'une population intermédiaire de fibres exprimant à la fois l'isoforme lente (1) et rapide (2A)

de MHC, dénommées fibres hybrides. La co-expression de MHC de type 1 et 2A dans une fibre musculaire isolée fut constatée par différents auteurs, dans le muscle soleus de rat "contrôle" (Reiser et coll. 1985 ; Danieli-Betto et coll. 1986), ou de rat soumis à la microgravité (Reiser et coll. 1987a). Les deux isoformes de TnC peuvent également être exprimées dans les fibres hybrides (Daniel-Betto et coll. 1990 ; Leeuw et Pette 1993). Un grand nombre de fibres exprimant deux isoformes de MHC en différentes proportions fut également mis en évidence dans les muscles normaux et dystrophiques d'humains (Billeter et coll. 1980 ; Biral et coll. 1988 ; Staron et Hikida 1992 ; Staron et Johnson 1993). Elles correspondent aux fibres de type "C" selon la classification utilisée par Staron et Pette (1986). Ces auteurs classent les fibres hybrides en trois groupes : IC, IIC et IIAC selon l'expression relative des deux isoformes de MHC. Les fibres de type IIC sont très rares (Staron et Hikida 1992), elles expriment les isoformes de MHC1 et 2A en quantité équivalente. Toutes les fibres hybrides analysées dans notre travail expriment une isoforme de MHC de manière prédominante, et sont donc subdivisées en deux groupes : "hybride fast" (HF) et "hybride slow" (HS) selon l'isoforme de MHC la plus représentée (2A et 1 respectivement). Les fibres ici dénommées HF correspondent aux fibres IIAC et les HS aux IC.

Parallèlement à la co-expression des deux isoformes de MHC, les isoformes lentes et rapides de MLC sont exprimées dans les fibres hybrides. Cette co-expression des deux types d'isoformes de MLC fut également décrite, pour les fibres musculaires de rat, par Mizusawa et coll. (1982) et Danieli-Betto et coll. (1990). En outre, les fibres de type HF expriment de manière prédominante les isoformes rapides de MLC et les fibres de type HS sont composées majoritairement d'isoformes lentes de MLC. Cette association favorable entre certaines isoformes de MHC et de MLC est bien documentée pour les fibres de rongeurs (lapin : Greaser et coll. 1988 ; rat : Wada et Pette 1993) et d'homme (Pette et Staron 1990 ; Wada et coll. 1990) mais n'avait jamais été mise en évidence pour les primates. L'isoforme rapide MLC3 n'est détectée que dans certaines fibres HF, et toujours en faible quantité alors que la MLC1f était toujours fortement exprimée. Ceci confirme donc l'idée d'association "privilégiée" de certaines isoformes de MHC et MLC : il est suggéré, pour les fibres rapides de rat, lapin et homme, que la MLC1f est préférentiellement associée à la MHC2A alors que la MLC3 serait plus exprimée dans les fibres de type 2B.

Nous montrons également que les niveaux d'expression relative des isoformes lentes et rapides de MHC et MLC2 sont similaires dans une même fibre, alors que ceux des MHC et MLC1 sont moins proches. Ce phénomène fut aussi observé par Brown et coll. (1983) et Seedorf et coll. (1983), dans le cas de fibres en transformation : ces auteurs induisent, par stimulation chronique, une transformation des fibres de soleus de lapin d'un type lent vers un type rapide. Ils ont observé une transformation plus précoce et coordonnée des MHC et MLC2 du type lent et rapide, alors que la transition isoformes

lentes - isoformes rapides de MLC1 était plus tardive. Comme le "turnover" de la MLC1 et de la MLC2 est similaire (Zak et coll. 1977), il ne peut être responsable de la meilleure corrélation entre les expressions des MLC2 et MHC. Le degré de coordination MHC/MLC2, plus important que celui MHC/MLC1, peut être lié à l'influence d'un même mécanisme de régulation de l'expression de ces isoformes, ou à des mécanismes de régulation interdépendants. L'expression de la MLC1 serait régulée de manière différente, ou serait moins sensible à une même régulation. Il est aussi envisageable que l'expression des isoformes de MLC1 et de MLC2 soit identique mais que l'affinité entre la MHC1 et la MLC2f (comme de la MHC2A pour la MLC2s) soit plus faible que celle entre la MHC1 et la MLC2s (et MHC2A - MLC2f). L'isoforme de MLC2 "excédentaire" serait donc liée à un degré moindre et donc plus accessible à la dégradation. Cette hypothèse est en accord avec la remarque de Termin et Pette (1991) qui suggèrent que la MHC2A se combine aussi bien à la MLC1s qu'à la MLC1f.

Les données actuelles ne permettent pas de déterminer si les fibres hybrides constituent une population bien déterminée entre les fibres lentes et rapides, population adaptée à un usage particulier, ou si ces fibres sont en cours de transformation d'un type lent vers un type rapide (ou vice-versa). Le contingent de fibres hybrides pourrait permettre au muscle d'évoluer plus rapidement vers un type donné, et ainsi faciliterait l'adaptation de ce muscle aux diverses situations. Toutefois, cette étude n'apporte aucun argument relatif à ces hypothèses puisque la présence des fibres hybrides est dénotée dans le muscle soleus de singe "contrôle" comme dans les muscles soleus et Vast. Int. de rats "contrôle" et soumis à deux semaines de microgravité.

B - Les propriétés fonctionnelles des fibres hybrides

1 - Activation par le calcium et le strontium

Dans notre travail, les fibres HS et HF ne peuvent être distinguées des fibres de type 1 et 2A, respectivement, selon les critères d'activation par le Ca et le Sr, les affinités relatives des fibres HS et HF n'étant pas significativement différentes de celles des fibres de type "pur" : les fibres HF sont 12 à 16 fois plus sensibles au Ca qu'au Sr alors que les fibres HS ne sont que 2 fois plus sensibles au Ca qu'au Sr. Les caractéristiques d'activation par le Ca sont également similaires pour les fibres de type HF et 2A d'une part et les fibres de type HS et 1 d'autre part. Les fibres HF sont un peu moins sensibles au Ca (valeurs du seuil et de la pCa_{50}) que les fibres HS et présentent des valeurs plus élevées du coefficient de Hill. Les relations T/pCa des fibres hybrides ont donc des positions différentes, intermédiaires entre celles des fibres de type 1 et 2A, les fibres de type HS et 1 ayant des caractéristiques d'activation calcique proches, tout comme les fibres de type HF et 2A. L'étude de la relation T/pSr, réalisée sur les fibres HF isolées

des muscles soleus et Vast. Int. de rat, montre que la relation T/pSr des fibres HF est similaire à celle des fibres 2A alors que tous les paramètres de la relation T/pSr sont significativement différents de ceux des fibres de type 1.

L'expression minoritaire des isoformes lentes dans les fibres de type HF, comme celle des isoformes rapides dans les fibres de type HS, n'entraîne pas de variations importantes des propriétés contractiles des fibres hybrides. Nous émettons donc l'hypothèse que les propriétés d'activation de la tension par le Ca et le Sr sont dictées par les isoformes prédominantes. Cette hypothèse n'est pas en accord avec celle de Danieli-Betto et coll. (1990) qui suggèrent que la sensibilité calcique des fibres isolées est principalement affectée par les isoformes rapides quand les isoformes lentes et rapides de MLC et de protéines régulatrices sont co-exprimées. Dans leur étude, ces auteurs se basent sur des fibres de soleus n'exprimant qu'un type de MHC (la 2A) et les isoformes lentes et rapides de MLC et de TnC. D'après la figure 2 (colonnes 5 et 7) de cette publication, il apparaît que les isoformes rapides de MLC sont plus exprimées que les isoformes lentes dans ce type de fibres. Elles correspondent donc à la composition en MLC des fibres que nous avons dénommées "HF", ces fibres présentant des relations T/pCa similaires à celles des fibres de type 2A. Contrairement à ces auteurs, nous avons mis en évidence des fibres "HS" dans notre étude, présentant donc une expression d'isoformes lentes de MLC plus marquée que celle des isoformes rapides, ce qui nous permet de nuancer leur conclusion. Notre hypothèse repose également sur les propriétés d'activation par le Sr des fibres hybrides, les fibres HS réagissent comme les fibres de type 1 à ce cation alors que les fibres HF réagissent comme les fibres de type 2A. Mizusawa et coll. (1982) ont aussi classé les fibres de soleus de rat en deux types selon leur réponse au Sr : les fibres lentes et les fibres rapides. Ces auteurs ont montré que les fibres rapides du soleus présentaient une double composition en MLC. Comme ils le remarquent, toutes les fibres répondant comme des fibres rapides au Sr exprimaient de manière prépondérante les isoformes rapides de MLC.

Les résultats de notre étude mettent en évidence l'expression de TnCf dans les fibres HF, alors que cette isoforme n'est pas détectée dans les fibres HS. Même si nous ne pouvons déterminer la présence de la TnCs dans les fibres HF (la TnCs comigre avec la MLC2f), nous pouvons considérer que les propriétés d'activation des fibres par le Ca et le Sr sont dépendantes de l'isoforme de TnC présente dans la fibre. En effet, la présence de l'isoforme lente ou rapide de TnC est généralement considérée comme responsable de la différence d'affinité au Ca, mais également au Sr, entre les fibres lentes et rapides (Moss et coll. 1986b ; Morimoto et Ohtsuki 1987 ; Babu et coll. 1989). L'implication de la TnC dans les relations T/pCa et T/pSr fut démontrée par l'échange des isoformes de TnC dans des fibres rapides et des cardiomyocytes. Si seule l'isoforme de TnCf (respectivement TnCs) est exprimée dans les fibres HF (respectivement HS), nos résultats confirment cette hypothèse. Cependant, il est envisageable que les 2 isoformes

de TnC soient exprimées dans les fibres hybrides, comme cela est parfois décrit (Danielli-Betto et coll. 1990). Le profil électrophorétique des fibres HS indique que si la TnCf est exprimée, elle est minoritaire puisque nous ne l'avons pas détectée. L'hypothèse énoncée antérieurement selon laquelle "les isoformes prédominantes détermineraient les paramètres des relations T/pCa et T/pSr" est également tout à fait en accord avec les expériences d'extraction de la TnC : les profils électrophorétiques des fibres musculaires, réalisés après extraction puis recombinaison avec l'autre isoforme de TnC, montre que l'extraction de l'isoforme "native" de TnC n'est jamais complète et que l'isoforme introduite de façon exogène est majoritaire (Moss 1992).

Nous mettons en évidence un parallélisme de l'expression des MHC et des MLC. De par ce parallélisme, nous ne pouvons réfuter que les propriétés d'activation par le Ca et le Sr dépendent de la composition en MHC et en MLC, puisqu'une corrélation positive peut être établie entre les relations T/pCa et T/pSr des fibres HS et HF et les isoformes de myosine prédominantes. En effet, une intervention des isoformes de la myosine dans la relation T/pCa et la relation T/pSr est évoquée par différents auteurs : selon Hofmann et coll. (1991), la MLC2 augmenterait la sensibilité de la fibre au Ca et modulerait le nombre de ponts formés pendant l'activation calcique. Elle interviendrait sur la contraction en modifiant la conformation de la région S1-S2 de la MHC. Le parallélisme observé dans notre étude entre l'expression des isoformes de MHC et celles de MLC2 peut donc être en partie responsable de la similarité observée entre les fibres de type HF et 2A d'une part et celles des fibres de type HS et 1 d'autre part. De plus, un effet des "ponts" de myosine liés à l'actine est évoqué sur la coopérativité de la relation T/pCa.

Cet effet sur la relation T/pCa peut donc être différent selon le type de myosine lié à l'actine et intervenir également de manière plus marquée selon les isoformes de MHC et MLC exprimées de manière dominante. Dans la détermination du paramètre "pente" de la relation T/pCa, intervient également la vitesse d'attachement-détachement des "ponts" actine-myosine. Il est bien connu que les constantes cinétiques de ce cycle sont différentes entre les fibres lentes et rapides. Une majorité de cycles formés selon des vitesses correspondant à celles des myosines rapides (et respectivement lentes) peut donc influencer la pente de la relation T/pCa vers celle des fibres rapides (et respectivement lentes).

Wilson et Stephenson (1990) émettent l'hypothèse suivante : le typage des fibres selon les propriétés physiologiques (relations T/pCa-T/pSr) serait basé sur l'ensemble des propriétés caractéristiques de l'appareil contractile et du système régulateur, plutôt que sur les propriétés spécifiques de protéines isolées comme l'isoforme de TnC. Nos résultats concordent donc également avec cette hypothèse, du fait de la corrélation positive entre les isoformes prédominantes de myosine et de la différence de sensibilité relative au Ca et au Sr.

Il est également possible que les différences observées entre la sensibilité au Ca des fibres de type HS et HF dépendent de la différence de composition en isoformes de protéines non déterminée dans notre étude : en effet, il est suggéré que les isoformes de TnT (Schachat et coll. 1987 ; Greaser et coll. 1988), Tm (Brandt et coll. 1984 ; Schachat et coll. 1987) et TnI (Grabarek et coll. 1986), comme l'état phosphorylé ou non de la MLC2 (Sweeney et Stull 1986 ; Metzger et coll. 1989 ; Sweeney et coll. 1993), peuvent influencer les différents paramètres de la relation T/pCa.

2 - Vitesse maximale de raccourcissement

Nous avons étudié sur les fibres de soleus de singe rhésus, la valeur de la vitesse maximale de raccourcissement. Ces valeurs sont distribuées entre 0.4 et 5.8 (en longueur de fibre par seconde, LF/s) ; cet ordre de grandeur est tout à fait similaire à celui obtenu par Ruff et Whittlesey (1991) sur des fibres humaines de *gastrocnemius lateralis*. Les valeurs de V_{max} des fibres de type 1, HS et HF, différentes par leur composition en myosine, forment un continuum entre les 2 valeurs extrêmes de 0.4 et 5.8 LF/s. Seul le profil électrophorétique justifie la discrimination des fibres en différents sous-groupes, comme nous l'avons décrit pour les autres paramètres fonctionnels. Cependant, en considérant la valeur moyenne de V_{max} pour chaque groupe de fibres, nos résultats nous permettent de distinguer les fibres de type HF des fibres de type 1 et HS. Même si nous n'observons pas de différence significative entre les groupes 1 et HS, nos résultats concernant la V_{max} des fibres de type HF et 1 sont en accord avec ceux de Greaser et coll. (1988), dans la mesure où ces auteurs estimaient possible de distinguer, par la V_{max} , les fibres intermédiaires des fibres lentes.

De nombreux auteurs rapportent une corrélation étroite entre la V_{max} et la composition en MHC (Reiser et coll. 1985, 1987a ; Sweeney et coll. 1988 ; Bottinelli et coll. 1991 ; Ruff et Whittlesey 1991). Une telle corrélation n'a pu être établie dans notre étude. Que les fibres expriment de manière isolée ou prédominante l'isoforme lente de MHC, elles sont caractérisées par de faibles valeurs de V_{max} . Cette observation diverge de celle de Reiser et coll. (1985) qui établit une relation linéaire entre la composition en MHC et la V_{max} (voir Fig. 4 de cet article) dans les fibres hybrides de soleus de lapin. La même relation est relevée par ces auteurs dans les fibres hybrides de soleus de rat (Reiser et coll. 1987a, Fig. 9). Néanmoins, quand l'isoforme rapide de MHC est exprimée de manière prédominante, nous mesurons de plus grandes valeurs de V_{max} . Certains auteurs, en particulier Mc Donald et Fitts (1993), ont mis en évidence des variations de V_{max} sur des fibres isolées de rats "contrôle" et de rats soumis à la microgravité simulée sans observer de modification de la composition en MHC dans ces fibres. D'autres protéines peuvent être responsables de la variabilité que nous observons dans les valeurs de V_{max} : une intervention des MLC sur la détermination de la V_{max} des

fibres rapides est suggérée par Greaser et coll. (1988), Sweeney et coll. (1988) et Moss et coll. (1990).

Récemment, Larsson et Moss (1993) ont montré que des fibres humaines, exprimant l'isoforme 2A de MHC et uniquement la MLC2f, présentaient des valeurs de V_{max} plus élevées que les fibres du même type exprimant à la fois la MLC2f et la MLC2s. Dans ces fibres, la MLC2f était plus exprimée que la MLC2s. Nous n'avons pu vérifier la corrélation entre la quantité relative de l'isoforme de MLC2 exprimée et la V_{max} , puisque la TnCs migre au même niveau que la MLC2f. Cependant, une tentative de corrélation entre la quantité d'isoforme de MLC1 et la V_{max} s'est révélée négative. Nos résultats ne permettent pas d'indiquer si les isoformes lentes et rapides de MLC1 n'interviennent pas sur la V_{max} , ou si cette corrélation est trop faible pour être révélée dans l'échantillon de fibres hybrides étudiées ($n = 17$).

III - MISE EN EVIDENCE DE L'EXPRESSION DE L'ISOFORME 2B DE LA MHC DANS LE MUSCLE SOLEUS DE RAT SOUMIS A LA MICROGRAVITE ET RELATION STRUCTURE-FONCTION DES FIBRES EXPRIMANT LA MHC2B

A - L'expression de la MHC2B dans le muscle soleus de rat soumis à la microgravité

Les fibres musculaires squelettiques peuvent exprimer une grande variété de phénotypes, qui généralement se manifestent par des changements de distribution des isoformes de MHC. Nous indiquons dans la première partie des résultats que certains types de fibres du soleus de rat et de Vast. Int. sont identiques, que le rat ait été exposé ou non à la microgravité. Les propriétés fonctionnelles que nous étudions sont également identiques pour ces fibres. En revanche, la deuxième partie de notre étude a permis de révéler une réponse adaptative du phénotype du muscle soleus soumis à des conditions de microgravité. D'une part, l'une des isoformes rapides de MHC, la MHC2A, exprimée dans certains solei "contrôle" est plus représentée dans le soleus de rats soumis à la microgravité. L'augmentation du contenu relatif en MHC2A dans le soleus soumis à la microgravité est décrite dans la littérature (Reiser et coll. 1987a ; Diffie et coll. 1991a ; Campione et coll. 1993 ; Leterme et coll. 1994). D'autre part, nous mettons en évidence, dès 10 jours de suspension, l'expression de deux isoformes rapides de MHC jamais révélée dans le soleus "contrôle" : la MHC2X et la MHC2B. L'isoforme 2X fut mise en évidence dans le soleus de rat soumis à des conditions similaires (Takahashi et coll. 1991 ; Campione et coll. 1993 ; Oishi et coll. 1993) et après un vol spatial (Caiozzo et

coll. 1994). Notre travail montre, pour la première fois, la possibilité d'induire l'expression de l'isoforme de MHC2B dans le soleus. En effet, Diffie et coll. (1991b) décrivent une très forte augmentation de la synthèse de l'ARN messenger correspondant à la MHC2B dans le muscle soleus de rat soumis à 14 jours de microgravité simulée mais n'ont pas détecté, au niveau protéique, la MHC2B. Ces auteurs ont recherché la protéine par électrophorèse, colorée au bleu de Coomassie comme par immunoblotting puis incubation avec un anticorps anti MHC2B. La comparaison de la Fig. 2 de cette publication et de la Fig. 30 présentée dans ce mémoire montre que la quantité de protéines analysée en SDS-PAGE par ces auteurs est nettement inférieure à celle que nous analysons. En outre, alors que nous étudions la composition en MHC directement sur des coupes de soleus dissoutes, ces auteurs effectuent une purification préalable de la myosine. Il est donc possible que la quantité de protéines analysée soit insuffisante et/ou que la purification de la myosine entraîne une perte de matériel, ce qui n'aurait pas permis à ces auteurs de révéler la MHC2B.

Cette expression de l'isoforme de MHC2B dans le soleus de rat va donc à l'encontre de l'idée de "résistance apparente du soleus de rat à exprimer le phénotype IIB" (Campione et coll. 1993) et montre l'étendue des facultés d'adaptation musculaire. En effet, il est décrit que la régulation génique dans différents types de fibres ne peut être modulée que dans une zone bien déterminée, liée aux différences intrinsèques entre les fibres musculaires (Ausoni et coll. 1990). L'apparition des isoformes de MHC2B et 2X dans le soleus de rat suspendu, semble donc impliquer une modulation de la régulation au niveau de la transcription, puisque ces gènes ne sont pas transcrits dans le soleus contrôlé.

Après un vol spatial de 14 jours, nous observons également l'expression de la MHC2B dans certaines fibres isolées de soleus, co-exprimée avec l'isoforme de MHC2A ou avec les isoformes 2A et 1. Nous ne pouvons vérifier l'expression de la MHC2X dans ces fibres puisque nous ne séparons pas les isoformes 2A et 2X par notre technique électrophorétique. Nous montrons donc la possibilité de la co-expression des MHC1, MHC2A et MHC2B dans une même fibre musculaire de soleus de rat. Néanmoins, aucune fibre co-exprimant uniquement la MHC1 et la MHC2B n'a été mise en évidence, comme l'ont remarqué également Biral et coll. (1988) sur des fibres de vastus lateralis d'homme. Ceci est donc en accord avec l'hypothèse de la transition d'un phénotype vers un autre selon un ordre déterminé de l'expression des gènes de la MHC $I \leftrightarrow 2A \leftrightarrow (2X) \leftrightarrow 2B$ (Schiaffino et coll. 1990). En outre, la coexistence des isoformes de MHC dans une même fibre, comme les rapports variables de l'expression relative de ces isoformes, confirment l'hypothèse des schémas de transformation émis par Pette et Staron (1993) :

$I \leftrightarrow IC \leftrightarrow (IIC) \leftrightarrow IIAC \leftrightarrow IIA \leftrightarrow IIAX \leftrightarrow IIXA \leftrightarrow (IIX \leftrightarrow IIXB \leftrightarrow IIBX) \leftrightarrow IIB.$

(Les types de fibres indiqués entre parenthèses ne sont pas mis en évidence dans notre travail)

B - Les propriétés d'activation par le calcium et le strontium des fibres de soleus exprimant l'isoforme de MHC2B

Les fibres de soleus exprimant l'isoforme de MHC2B présentent des propriétés d'activation par le Ca et par le Sr, ainsi qu'une sensibilité relative à ces 2 cations similaires à celle des fibres de type HF et 2A. Les fibres identifiées de type 2A et 2B (ou FOG et FG) par des techniques électrophorétiques (ou histochimiques) ne sont en général pas distinguables selon leur propriétés d'activation par le Ca et le Sr (Laszewski-Williams et coll. 1989 ; Donaldson 1984 ; Ruff et Whittlesey. 1991). Fink et coll. (1986, 1990) distinguent 2 sous-populations de fibres rapides selon les pentes des relations tension/cation, et les assimilent aux fibres de type FOG et FG. Cependant, aucune vérification histochimique ou électrophorétique du typage de ces fibres n'a été effectuée dans cette étude. D'autres auteurs (Sweeney et coll. 1986 ; Greaser et coll. 1988) mettent en évidence une différence d'activation par le calcium entre les fibres 2A et 2B. Ils relient cette différence de sensibilité aux isoformes de TnT rapides préférentiellement exprimées avec l'une ou l'autre de ces isoformes de MHC plutôt qu'à la différence de composition en MHC.

Les fibres contenant la MHC2B dont nous analysons les critères d'activation par le Ca et le Sr sont en fait des fibres hybrides : elle co-expriment soit la MHC2B et la MHC2A, soit la MHC2A, la MHC2B, et un peu de MHC1. Selon les données bibliographiques exposées ci-dessus, montrant que les caractéristiques d'activation par le Ca et le Sr des fibres 2A et 2B sont très comparables, sinon identiques, le fait que nous ne pouvons distinguer les fibres de type "2B" des fibres de type 2A et HF par leurs propriétés d'activation est donc tout à fait justifié. Une autre explication peut être liée à l'expression de la TnCf dans toutes les fibres de type 2B : le rôle déterminant dans la forme et la position des relations T/pCa et T/pSr serait confirmé par la similarité des propriétés d'activation des fibres de type HF, 2A et 2B. En outre, la composition en isoformes de MLC est similaire entre certaines fibres 2B et les fibres HF, comme entre les autres fibres 2B et les fibres 2A. Une relation entre la composition en MLC et les relations T/pCa et T/pSr peut donc aussi être évoquée. La MLC3 est toutefois plus exprimée dans les fibres de type 2B que dans les fibres de type HF et 2A. Cette observation corrobore donc l'hypothèse de l'association préférentielle de la MLC3 avec l'isoforme 2B de MHC.

CONCLUSION

L'étude de l'activation par le Ca et le Sr de la tension des fibres musculaires isolées permet de les classer en deux groupes, les fibres lentes et les fibres rapides. La différence d'activation de la tension entre ces deux groupes de fibres est particulièrement marquée lorsque le cation utilisé est le Sr. L'analyse de la sensibilité relative des fibres au Ca et au Sr permet donc une détermination "physiologique" du type de fibre. De plus, une étude approfondie des caractéristiques d'activation par le Sr et la mesure des constantes cinétiques d'attachement des ponts actine-myosine en présence de cation paraissent intéressantes pour vérifier les hypothèses concernant les phénomènes complexes impliqués dans l'activation des fibres musculaires en conditions physiologiques, i.e. activées par le Ca.

Notre travail montre l'existence de plus de deux types de fibres qui peuvent être distingués par l'utilisation d'une technique analytique biochimique : l'analyse électrophorétique des fibres musculaires isolées montre que ce classement des fibres selon leur réactivité relative au Ca et au Sr correspond en fait à une simplification, qui ne rend pas compte de certaines variations de l'expression phénotypique. Par l'analyse de la composition myofibrillaire des fibres musculaires isolées, des fibres de type hybrides ont été mises en évidence, alors que ce type de fibres était indiscernable par la seule étude des propriétés d'activation par le Ca et le Sr. Ceci montre donc que des propriétés structurales des fibres musculaires peuvent varier, sans affecter néanmoins certaines de leurs propriétés fonctionnelles. La composition du soleus de singe rhésus, plus hétérogène que celle du soleus de rat, nous a permis de distinguer, selon l'analyse électrophorétique, quatre populations de fibres et, en particulier, deux populations de fibres hybrides. L'étude des propriétés d'activation par le Ca et le Sr des deux populations de fibres hybrides (HS et HF) nous incite à nuancer les résultats décrits dans la littérature, comme les conclusions que nous aurions pu proposer par la seule analyse des fibres musculaires de type 1, 2A et HF du soleus de rat. En effet, les données obtenues par l'analyse des propriétés fonctionnelles des fibres HS et HF nous permettent d'émettre l'hypothèse suivante : "les isoformes prédominantes des protéines myofibrillaires gouvernent les propriétés fonctionnelles des fibres" et montrent que l'expression d'isoformes rapides n'entraîne pas systématiquement un comportement rapide des fibres pour les caractéristiques fonctionnelles analysées. Cependant, le rôle prépondérant des MHC dans la détermination de la vitesse maximale de raccourcissement des fibres hybrides n'a pu être démontré de manière formelle.

Peu de données concernent la relation entre l'expression des MHC, conjuguée à celle des MLC, et les propriétés contractiles de fibres isolées, en particulier pour les fibres exprimant plus d'un type de ces isoformes. Notre travail apporte donc des informations essentielles quant aux propriétés fonctionnelles des fibres hybrides. En outre, de nombreux auteurs décrivent une augmentation de la proportion de fibres hybrides dans un grand nombre de pathologies musculaires. Ces données soulignent donc l'intérêt de l'étude des fibres hybrides que nous avons réalisée.

L'étude de l'expression des isoformes lentes et rapides de MHC et de MLC dans les différents types de fibres, notamment dans les fibres hybrides, met en évidence un parallélisme dans l'expression des isoformes de ces protéines. Ce parallélisme dans l'expression des isoformes de MHC et MLC, et l'absence (ou la non révélation) d'expression de TnC fast dans les fibres HS ne permettent pas de conclure quant à l'intervention relative des MHC, des MLC et de la TnC dans la détermination des caractéristiques des relations T/pCa et T/pSr. En outre, une corrélation entre l'expression des isoformes de MLC et de TnT fut évoquée (Greaser et coll. 1988). Par ailleurs, une transformation de l'expression des isoformes de TnT et de TnI (d'un phénotype lent vers rapide) est associée à la modification de l'expression des MHC (du type 1 vers le type 2A-2X) dans le soleus de rat en conditions de microgravité simulée (Campione et coll. 1993). De nombreux auteurs décrivent une participation de ces protéines dans la détermination des caractéristiques de la relation T/pCa. Il paraît donc intéressant d'élargir notre champ d'investigations en étudiant la composition en TnT et TnI des fibres musculaires isolées et son influence sur les propriétés d'activation de la tension par le Ca. Des variations de la sensibilité au Ca sont également induites par le degré de phosphorylation de la MLC2. Il fut aussi démontré que le taux de phosphorylation est plus important dans les fibres de type rapide que dans les fibres de type lent. Le degré de phosphorylation de la MLC2 dans les fibres de type 1, 2A, et spécialement dans les fibres hybrides, pourrait être déterminé par un technique appropriée. Ceci permettrait d'établir une éventuelle relation entre le taux de phosphorylation de la MLC2 et les caractéristiques de la T/pCa de ces différents types de fibres. De plus, l'activité de la MLCkinase, enzyme qui assure la phosphorylation de la MLC2, est modulée par l'activité musculaire (Klug et coll. 1986). Cette observation souligne donc l'intérêt de l'étude de la phosphorylation de la MLC2 dans le muscle soleus dont on réduit l'activité par l'utilisation des modèles décrits dans notre mémoire.

La diversité des isoformes de protéines et le nombre de protéines impliquées dans la détermination de la relation T/pCa contribuent à la complexité de l'étude de la relation structure-fonction des fibres musculaires. En outre, dans notre travail, nous montrons un parallélisme de l'expression des différentes isoformes de protéines myofibrillaires, en particulier de MHC et de MLC. Nous observons également l'expression de l'isoforme rapide d'une protéine régulatrice (TnC) dans les fibres de type

rapide "dominant" (fibres de type HF et fibres exprimant la MHC 2B). Afin d'étudier la relation structure-fonction, il est nécessaire d'analyser la composition myofibrillaire globale de la fibre. Il importe de considérer avec circonspection l'interprétation du rôle d'une protéine, considérée isolément, dans la détermination des propriétés fonctionnelles.

L'un des résultats les plus importants de notre travail est la mise en évidence de la capacité du muscle soleus à exprimer l'isoforme de MHC2B lorsqu'il est soumis à des facteurs externes (microgravité) susceptibles de modifier son phénotype par variation de la charge qui lui est imposée. Nous démontrons ainsi la grande capacité d'adaptation du muscle soleus adulte, muscle typiquement lent.

Il serait intéressant, par l'étude des transcrits correspondant à ces différentes isoformes de MHC, de vérifier, dans le soleus, la modification de la régulation de la transcription des gènes codant pour ces isoformes en utilisant les techniques d'hybridation in situ. Il serait également possible de vérifier, par cette technique, si les myonucléi des fibres musculaires matures possèdent un degré de plasticité suffisant pour être "reprogrammés" et produire le nouveau phénotype.

Nous remarquons l'absence de fibres exprimant la MHC 2B dans les fibres de Vast. Int. considérées. Le hasard de l'échantillonnage peut bien sûr être évoqué. Néanmoins, cette remarque fut également émise par Diffie et coll. (1991b). Ces auteurs, alors qu'ils mettaient en évidence l'ARNm de la MHC2B dans le soleus de rat soumis à 14 jours de suspension, n'en observaient pas dans le Vast. Int. de ces mêmes rats. La variation de la charge sur le muscle Vast. Int., à fonction antigravitaire (Tsika et coll. 1987), pourrait induire une modification moins marquée de ce muscle du fait de sa composition plus hétérogène que celle du soleus.

Il serait important d'étudier les mécanismes de contrôle de l'expression des gènes codant pour les protéines musculaires. Ceci pourrait permettre de déterminer l'éventuel facteur responsable de la variation de l'expression génique induite par des signaux extra-cellulaires tels que la variation de l'activité musculaire en fonction de l'environnement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ANSORGE W. (1983) Fast visualisation of proteins bands by impregnation in potassium permanganate and silver nitrate. *Electrophoresis*, 82, 236-242.
- AIGNER S., GOHLSCH B., HAMALAINEN N., STARON R.S., UBER A., WEHRLE U. & PETTE D. (1993) Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain II_d, not II_b predominates. *Eur. J. Biochem.*, 211, 367-372.
- ARMSTONG R.B. & PHELPS R.O. (1984) Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.*, 171, 259-272.
- ASHLEY C.C., MOISESCU D.G. & ROSE R.M. (1974) Aequorin-light and tension responses from bundles of myofibrils following a sudden change in free calcium. *J. Physiol. (London)*, 241, 104-106.
- ASHLEY C.C. & MOISESCU D.G. (1977) Effect of changing the composition of the bathing solutions upon the isometric tension-pCa relationship in bundles of crustacean myofibrils. *J. Physiol. (London)*, 270, 627-652.
- AUSONI S., GORZA L., SCHIAFFINO S., GUNDERSEN K. & LØMO T. (1990) Expression of myosin heavy chain isoforms in stimulated fast and slow rat muscles. *J. Neurosci.*, 10, 153-160.
- BABA M.L., GOODMAN M., BERGER-COHN J., DEMAILLE J.G. & MATSUDA G. (1984) The early adaptive evolution of calmodulin. *Molec. Biol. Evol.*, 1, 442-455.
- BABU A., PEMRICK S. & GULATI J. (1986) Ca²⁺ activation of troponin C-extracted vertebrate striated fast-twitch muscle fibers. *FEBS Lett.*, 203, 20-24.
- BABU A., SCORDILIS S.P., SONNENBLICK E.H. & GULATI J. (1987) The control of myocardial contraction with skeletal fast muscle Troponin C. *J. Biol. Chem.*, 262, 5815-5822.
- BABU A., LEHMAN W. & GULATI J. (1989) Characterization of the Ca²⁺-switch in skeletal and cardiac muscles. *FEBS Lett.*, 251, 177-182.
- BAR A. & PETTE D. (1988) Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 235, 153-155.
- BARNARD R.J., EDGERTON V.R., FURUKAWA T. & PETER J.B. (1971) Histochemical, biochemical and contractile properties of red, white and intermediate fibers. *Am. J. Physiol.*, 220, 410-414.
- BARON M.D., DAVISON M.D., JONES P. & CRITCHLEY D.R. (1987) The sequence of chick α -actinin reveals homologies to spectrin and calmodulin. *J. Biol. Chem.*, 262, 17623-17629.
- BARTON P.J.R. & BUCKINGHAM M.E. (1985) The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.*, 231, 249-261.
- BILLETER R., WEBER H., LUTZ H., HOWALD H., EPPENBERGER H.M. & JENNY E. (1980) Myosin types in human skeletal muscle fibers. *Histochemistry*, 65, 249-259.

- BILLETER R., HEIZMANN C.W., HOWALD H. & JENNY E. (1981) Analysis of myosin light and heavy chain types in single human skeletal muscle fibers. *Eur. J. Biochem.*, 116, 389-395.
- BILLETER R., HEIZMANN C.W., REIST U., HOWALD H. & JENNY E. (1982) Two-dimensional peptide analyses of myosin heavy chains and actin from single-typed human skeletal muscle fibers. *FEBS Lett.*, 139, 45-48.
- BIRAL D., DAMIANI E., VOLPE P., SALVIATI G. & MARGRETH A. (1982) Polymorphism of myosin light chains - an electrophoretic and immunological study of rabbit skeletal-muscle myosins. *Biochem. J.*, 203, 529-540.
- BIRAL D., DAMIANI E., MARGRETH A. & SCARPINI E. (1984) Myosin subunit composition in human developing muscle. *Biochem. J.*, 224, 923-931.
- BIRAL D., BETTO R., DANIELI-BETTO D. & SALVIATI G. (1988) Myosin heavy chain composition of single fibres from normal human muscle. *Biochem. J.*, 250, 307-308.
- BOTTINELLI R., SCHIAFFINO S. & REGGIANI C. (1991) Force-velocity relation and myosin heavy chain isoform composition in skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol. (London)*, 437, 655-672.
- BRANDT P.W., DIAMOND M.S. & SCHACHAT F.H. (1984) The thin filament of vertebrate skeletal muscle co-operativity activates as a unit. *J. Mol. Biol.*, 180, 379-384.
- BRANDT P.W., DIAMOND M.S., RUTCHIK J.S. & SCHACHAT F.H. (1987) Co-operative interactions between troponin-tropomyosin units extend the length of the thin filament in skeletal muscle. *J. Mol. Biol.*, 195, 885-896.
- BRANDT P.W., ROEMER D. & SCHACHAT F.H. (1990) Co-operative activation of skeletal muscle thin filaments by rigor crossbridges. The effect of troponin C extraction. *J. Mol. Biol.*, 212, 473-480.
- BREMEL R.D. & WEBER A. (1972) Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature New Biol.*, 238, 97-101.
- BRENNER B. (1988) Effect of Ca^{2+} on cross-bridge turnover kinetics in skinned single rabbit psoas fibers: implications for regulation of muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3265-3269.
- BRIGGS M.M., KLEVIT R.E. & SCHACHAT F.H. (1984) Heterogeneity of contractile proteins. Purification and characterization of two species of troponin T from rabbit fast skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 259, 10369-10375.
- BRIGGS M.M., LIN J.J.C. & SCHACHAT F.H. (1987) The extent of amino-terminal heterogeneity in rabbit fast skeletal muscle troponin T. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 8, 1-12.
- BRIGGS M.M. & SCHACHAT F. (1989) N-terminal amino acid sequences of three functionally different troponin T isoforms from rabbit fast skeletal muscle. *J. Mol. Biol.*, 206, 245-249.
- BRONSON D.D. & SCHACHAT F.H. (1982) Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J. Biol. Chem.*, 257, 3937-3944.

- BROOKE M.H. & KAISER K.K. (1974) The use and abuse of muscle histochemistry. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 228, 131-144.
- BROWN W.E., SALMONS S. & WHALEN R.G. (1983) The sequential replacement of myosin subunit isoforms during muscle type transformation induced by long term electrical stimulation. *J. Biol. Chem.*, 258, 14686-14692.
- BROWN H.R. & SCHACHAT F.H. (1985) Renaturation of skeletal muscle tropomyosin: implications for in vivo assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 2359-2363.
- BUCKINGHAM M.E., ALONSO S., BARTON P., BUGAISKI G., COHEN A., DAUBAS A., MINTY A., ROBERT B. & WEYDERT A. (1984) Actin and myosin coding sequences in skeletal muscle development. *Exp. Biol. Med.*, 9, 228-334.
- BULLARD H.H. (1919) Histological as related to physiological and chemical differences in certain muscle of the rat. *The John Hopkins Hosp. Rep.*, 18, 323-328.
- BURKE R.E., LEVINE D.N., TSAIRIS P. & ZAJAC F.E. (1973) Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *J. Physiol. (London)*, 234, 723-748.
- BURKE R.E., LEVINE D.N., SALCMAN M. & TSAIRIS P. (1974) Motor units in cat soleus muscles: physiological, histochemical and morphological characteristics. *J. Physiol. (London)*, 238, 503-514.
- BUTLER T.M., SIEGMAN M.J., MOOERS S.U. & BARSOTTI R.J. (1983) Myosin light chain phosphorylation does not modulate cross-bridge cycling rate in mouse skeletal muscle. *Science*, 220, 1167-1169.
- BUTLER-BROWNE G.S. & WHALEN R.G. (1984) Myosin isozyme transitions occurring during the post-natal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.*, 102, 324-334.
- CAIOZZO V.J., HERRICK R.E. & BALDWIN K.M. (1991) Influence of hyperthyroidism on maximal shortening velocity and myosin isoform distribution in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.*, 261, 285-295.
- CAIOZZO V.J., BAKER M.J., HERRICK R.E., TAO M. & BALDWIN K.M. (1994) Effect of spaceflight on skeletal muscle: mechanical properties and myosin isoform content of a slow muscle. *J. Appl. Physiol.*, 76, 1764-1773.
- CAMPIONE M., AUSONI S., GUEZENNEC C.Y. & SCHIAFFINO S. (1993) Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, 74, 1156-1160.
- CARRARO U., DALLA LIBERA L. & CATANI C. (1981a) Myosin light chains of avian and mammalian slow muscles: evidence of intraspecific polymorphism. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 2, 335-342.
- CARRARO U., CATANI C., DALLA LIBERA L., VASCON M. & ZANELLA G. (1981b) Differential distribution of tropomyosin subunits in fast and slow rat muscles and its changes in long-term denervated hemidiaphragm. *FEBS Lett.*, 128, 233-236.

- CARRARO U. & CATANI C. (1983) A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscles reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 116, 793-802.
- CARRARO U., DALLA LIBERA L. & CATANI C. (1983) Myosin light and heavy chains in muscle regenerating in absence of the nerve: transient appearance of the embryonic light chain. *Exp. Neurol.*, 79, 106-117.
- CARRARO U. & CATANI C. (1993) Alcuni consigli per la preparazione dei campioni per gel elettroforesi. In *Elettroforesi e cromatografia di biopolimeri e loro frammenti*, Ed. CARRARO U. & DALLA LIBERA L., Unipress Padova, 67-69.
- CIACCIO C.G. (1998) La scoperta dei muscoli rossi e bianchi del coniglio rivendicata a Stefano Lorenzini. *Rend. Sess. Acad. Sci. Inst. Bologna*, 2, 115-117.
- CLOSE R. (1967) Properties of motor units in fast and slow skeletal muscles of the rat. *J. Physiol. (London)*, 193, 45-55.
- CLOSE R. (1972) Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, 52, 129-197.
- COHEN C. & VIBERT P.J. (1987) Actin filament: images and models. In *Fibrous Protein Structure*, Ed. SQUIRE J.M. & VIBERT P.J., Academic Press. London, 284-306.
- CORDONNIER C., STEVENS L., PICQUET F. & MOUNIER Y. (1994) Structure-function relationship of soleus muscle fibres from rhesus monkey. *Pflügers Arch.* (sous presse).
- CROW M.T. & KUSHMERICK M.J. (1982) Phosphorylation of myosin light chains in mouse fast-twitch muscle associated with reduced actomyosin turnover rate. *Science*, 217, 835-837.
- CUMMINS P. & PERRY S.V. (1973) The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.*, 133, 765-777.
- D'ALBIS A. & GRATZER W.B. (1973) Electrophoretic examination of native myosin. *FEBS Lett.*, 29, 292-296.
- D'ALBIS A., PANTALONI C. & BECHET J.J. (1979) An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.*, 99, 261-272.
- D'ALBIS A., PANTOLINI C. & BECHET J.J. (1982) Myosin isoenzymes in adult rat skeletal muscles. *Biochimie*, 64, 399-404.
- D'ALBIS A., JANMOT C. & BECHET J.J. (1986) Comparison of myosins from the masseter muscle of adult rat, mouse and guinea-pig. Persistence of neonatal-type isoforms in the murine muscle. *Eur. J. Biochem.*, 156, 291-296.
- D'ALBIS A., COUTEAUX R., JANMOT C., ROULET A. & MIRA J.C. (1988) Regeneration after cardiotoxin injury of innervated and denervated slow and fast muscles of mammals. Myosin isoform analysis. *Eur. J. Biochem.*, 174, 103-110.
- DALLA LIBERA L. (1988) A comparative study of chicken ventricular and slow skeletal myosin light chains. *Cell. Biol. Int. Rep.*, 12, 1089-1098.

- DANIELI-BETTO D., ZERBATO E. & BETTO R. (1986) Type 1, 2A and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138, 981-987.
- DANIELI-BETTO D., BETTO R. & MIDRIO M. (1990) Calcium sensitivity and myofibrillar protein isoforms of rat skinned skeletal muscle fibres. *Pflügers Arch.*, 417, 303-308.
- DE BEER E., GRUNDEMAN R., MANUSSEN T., VAN BUUREN K. & SCHIERECK P. (1990) Modelling of the calcium-sensitivity curves of skinned skeletal muscle fibres: the non-linearity of the Hill plot. In *Muscle and motility*, Ed. MARECHAL D. & CARRARO U., Intercept Andover Hampshire, 205-210.
- DE NARDI C., AUSONI S., MORETTI P., GORZA L., VELLECA M., BUCKINGHAM M. & SCHIAFFINO S. (1993) Type 2X-myosin heavy chain is coded by a muscle fiber type-specific and developmentally regulated gene. *J. Cell. Biol.*, 123, 823-835.
- DHOOT G.K., HALES M.C., GRAIL B.M. & PERRY S.V. (1985) The isoforms of C protein and their distribution in mammalian skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 6, 487-505.
- DIFFEE G.M., CAIOZZO V.J., HERRICK R.E. & BALDWIN K.M. (1991a) Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am. J. Physiol.*, 260, 528-534.
- DIFFEE G.M., HADDAD F., HERRICK R.E. & BALDWIN K.M. (1991b) Control of myosin heavy chain expression: interaction of hypothyroidism and hindlimb suspension. *Am. J. Physiol.*, 261, 1099-1106.
- DONALDSON S.K.B. (1984) Ca^{++} activated force-generating properties of mammalian skeletal muscle fibres: Histochemically identified peeled rabbit fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 5, 593-612.
- DONALDSON S.K.B. & KERRICK W.G.L. (1975) Characterization of the effects of Mg^{2+} on Ca^{2+} - and Sr^{2+} -activated tension generation of skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 66, 427-444.
- DUBOWITZ V. & PEARSE A.G.E. (1960) A comparative histochemical study of oxydative enzyme and phosphorylase activity in skeletal muscle. *Histochemie*, 2, 105-117.
- EASTWOOD A.B., WOOD D.S., BOCK K.L. & SORENSON M.M. (1979) Chemically skinned mammalian skeletal muscle. I. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue and Cell*, 11, 553-566.
- EBASHI S. (1963) Third component participating in the superprecipitation of natural actomyosin. *Nature*, 22, 1010-1012.
- EBASHI S. (1980) The croonian lecture 1979. Regulation of muscle contraction. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 207, 259-286.
- EBASHI S. & ENDO M. (1968) Calcium ion and muscle contraction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 18, 125-183.

- EBASHI S., KODAMA A. & EBASHI F. (1968) Troponin: I. Preparation and physiological function. *J. Biochem.*, 64, 465-477.
- EDDINGER T.J. & MOSS R.L. (1987) Mechanical properties of skinned single fibers of identified types from rat diaphragm. *Am. J. Physiol.*, 253, 210-218.
- EDMAN K.A.P. (1979) The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *J. Physiol. (London)*, 291, 143-159.
- EDMAN K.A.P., REGGIANI C., SCHIAFFINO S. & KRONNIE G. (1988) Maximum velocity of shortening related to myosin isoform composition in frog skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (London)*, 395, 679-694.
- EDSTROM L. & KUGELBERG E. (1968) Histochemical composition, distribution of fibres and fatiguability of single motor units. Anterior tibial muscle of the rat. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 31, 424-433.
- EISENBERG B.R. & SALMONS S. (1981) The reorganization of subcellular structure in muscle undergoing fast-to-slow type transformation. A stereological study. *Cell Tissue Res.*, 220, 449-471.
- EL-SALEH S.C., WARBER K.D. & POTTER J.D. (1986) The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 7, 387-404.
- ENGEL W.K. (1962) The essentiality of histo- and cytochemical studies of skeletal muscle in the investigation of neuromuscular disease. *Neurology*, 12, 778-784.
- FABIATO A. (1988) Computer programs for calculating total from specified free or free from specified total ionic concentrations in aqueous solutions containing multiple metals and ligands. *Methods Enzymol.*, 157, 378-417.
- FINK R.H.A., STEPHENSON D.G. & WILLIAMS D.A. (1986) Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J. Physiol. (London)*, 373, 513-525.
- FINK R.H.A., STEPHENSON D.G. & WILLIAMS D.A. (1990) Physiological properties of skinned fibres from normal and dystrophic (Duchenne) human muscle activated by Ca^{2+} and Sr^{2+} . *J. Physiol. (London)*, 420, 337-353.
- FITZSIMONS R.B. & HOH J.F.Y. (1983) Myosin isoenzymes in fast-twitch and slow-twitch muscles of normal and dystrophic mice. *J. Physiol. (London)*, 343, 539-550.
- FRANZINI-ARMSTRONG C., FERGUSON D.G. & GHAMP C. (1988) Discrimination between fast- and slow-twitch fibres of guinea-pig skeletal muscle using the relative surface density of junctional transverse tubule membrane. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 9, 403-414.
- FUCHS F. (1971) Ion exchange properties of the calcium receptor site of troponin. *Biochim. Biophys. Acta*, 245, 221.

- FUCHS F. (1974) Chemical properties of the calcium receptor site of troponin as determined from binding studies. In Calcium binding proteins, Ed. DRABIKOWSKI W., STRZELECKA-GOLASZEWSKA H. & CARAFOLI E., Elsevier, Amsterdam New York Warsaw, 1-27.
- GAHLMANN R., WADE R., GUNNING P. & KEDES L. (1988) Differential expression of slow and fast skeletal muscle troponin C. Slow skeletal muscle troponin C is expressed in human fibroblasts. *J. Mol. Biol.*, 201, 379-391.
- GAUTHIER G.F. (1970) The ultrastructure of the three fiber types in mammalian skeletal muscle. In The physiology and biochemistry of muscle as a food, Ed. BRISKY E.J., CASSENS R.G. & MARSH B.B., Kingsport Press, Tennessee, 103-130.
- GAUTHIER G.F. & LOWEY S. (1979) Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J. Cell Biol.*, 81, 10-25.
- GIULIAN G.G., MOSS R.L. & GREASER M. (1983) Improved methodology for analysis and quantification of proteins on one dimensional silver stained slab gels. *Analytical Biochemistry*, 129, 277-287.
- GODT R.E. & LINDLEY B.D. (1982) Influence of temperature upon contractile activation and isometric force production in mechanically skinned muscle fibres of the frog. *J. Gen. Physiol.*, 80, 279-297.
- GOODWIN E.B., LEINWAND L.A. & SZENT-GYORGYI A.G. (1990) Regulation of scallop myosin by mutant regulatory light chains. *J. Mol. Biol.*, 216, 85-93.
- GORZA L. (1990) Identification of a novel type 2 fiber population in mammalian skeletal muscle by combined use of histochemical myosin ATPase and anti-myosin monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 38, 257-265.
- GRABAREK Z., GRABAREK J., LEAVIS P.C. & GERGELY J. (1983) Cooperative binding to the Ca²⁺-specific sites of troponin C in regulated actin and actomyosin. *J. Biol. Chem.*, 258, 14098-14102.
- GRABAREK Z., LEAVIS P.C. & GERGELY J. (1986) Calcium binding to the low affinity sites in troponin C induces conformational changes in the high affinity domain. *J. Biol. Chem.*, 261, 608-613.
- GRABAREK Z., TAN R.Y., WANG J., TAO T. & GERGEKY J. (1990) Inhibition of mutant troponin C activity by an intra-domain disulphide bond. *Nature*, 345, 132-135.
- GREASER M.L. & GERGELY J. (1973) Purification and properties of the components from troponin. *J. Biol. Chem.*, 248, 2125-2133.
- GREASER M.L., MOSS R.L. & REISER P.J. (1988) Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J. Physiol. (London)*, 406, 85-98.
- GULATI J., SCORDILIS S. & BABU A. (1988) Effect of troponin C on the cooperativity in Ca²⁺ activation of cardiac muscle. *FEBS Lett.*, 236, 441-444.

- GULATI J., BABU A. & PUTKEY J.A. (1989) Down-regulation of fast-twitch skeletal muscle fiber with cardiac troponin-C and recombinant mutants. Structure/function studies with site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.*, 248, 5-8.
- GULATI J., BABU A. & SU H. (1992) Functional delineation of the Ca²⁺-deficient EF-hand in cardiac muscle, with genetically engineered cardiac-skeletal chimeric troponin C. *J. Biol. Chem.*, 267, 25073-25077.
- GUTH K. & POTTER J.D. (1987) Effect of rigor and cyclic cross-bridges on the structure of troponin C and on the Ca²⁺-affinity of the Ca²⁺-specific regulatory sites in skinned rabbit psoas fibers. *J. Biol. Chem.*, 262, 13627-13635.
- HARTNER K.T., KIRSCHBAUM B.J. & PETTE D. (1989) The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.*, 179, 31-38.
- HARTNER K.T. & PETTE D. (1990) Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.*, 188, 261-267.
- HARTSHORNE D.J., THEINER M. & MUELLER H. (1969) Studies on troponin. *Biochim. Biophys. Acta*, 175, 320-330.
- HAYWARD L.J. & SCHWARTZ R.J. (1986) Sequential expression of chicken actin genes during myogenesis. *J. Cell. Biol.*, 102, 1485-1493.
- HEELEY D.H., DHOOT G.K., FREARSON N., PERRY S.V. & VRBOVA G. (1983) The effect of cross-innervation on the tropomyosin composition of rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 152, 282-286.
- HEILBRUNN L.V. & WIERCINSKI F.J. (1947) The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell Comp. Physiol.*, 29, 15-32.
- HILL T.L., EISENBERG E. & GREENE L. (1980) Theoretical model for the cooperative equilibrium binding of myosin subfragment I to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3186-3190.
- HOAR P.E., POTTER J.D. & KERRICK W.G.L. (1988) Skinned ventricular fibres: troponin C extraction is species-dependent and its replacement with skeletal troponin C changes Sr²⁺ activation properties. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 9, 165-173.
- HOFMANN P.A., METZGER J.M., GREASER M.L. & MOSS R.L. (1990) Effects of partial extraction of light chain 2 on the Ca²⁺ sensitivities of isometric tension, stiffness, and velocity of shortening in skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 95, 477-498.
- HOFMANN P.A., HARTZELL H.C. & MOSS R.L. (1991) Alterations in Ca²⁺-sensitive tension due to partial extraction of C-protein from rat skinned cardiac myocytes and rabbit skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 97, 1141-1163.
- HOH J.F.Y. (1975) Neural regulation of mammalian fast and slow muscle myosins: an electrophoretic analysis. *Biochemistry*, 14, 742-747.

- HOH J.F.Y. (1978) Light chain distribution of chicken skeletal muscle myosin isoenzymes. *FEBS Lett.*, 90, 297-300.
- HOH J.F.Y. & YEOH G.P.S. (1979) Rabbit skeletal myosin isoenzymes from fetal, fast-twitch and slow-twitch muscles. *Nature*, 280, 321-322.
- HOH J.F.Y., HUGHES S., CHOW C., HALE P.T. & FITZSIMONS R.B. (1988) Immunocytochemical and electrophoretic analyses of changes in myosin gene expression in cat posterior temporalis muscle during postnatal development. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 9, 48-58.
- HOLY X. & MOUNIER Y. (1991) Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle & Nerve*, 14, 70-78.
- HOLROYDE M.J., ROBERTSON S.P., JOHNSON J.D., SOLARO R.J. & POTTER J.D. (1980) The calcium and magnesium binding sites on cardiac troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 255, 11688-11693.
- HOROWITS R. & PODOLSKY R.J. (1987) The positional stability of thick filaments in activated skeletal muscle depends on sarcomere length: evidence for the role of titin filaments. *J. Cell. Biol.*, 105, 2217-2223.
- HUXLEY A.F. (1957) Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys.*, 7, 255-318.
- JOHNSON J.D., CHARLTON S.C. & POTTER J.D. (1979) A fluorescence stopped-flow analysis of Ca^{2+} exchange with troponin-C. *J. Biol. Chem.*, 254, 3497-3502.
- JOHNSON J.D., COLLINS J.H., ROBERTSON S.P. & POTTER J.D. (1980) A fluorescent probe study of Ca^{2+} binding to the Ca^{2+} -specific sites of cardiac troponin and troponin C. *J. Biol. Chem.*, 255, 9635-9640.
- KELLY F.J., LEWIS S.E.M., ANDERSON P. & GOLDSPIK D.F. (1984) Pre- and postnatal growth and protein turnover in four muscles of the rat. *Muscle & Nerve*, 7, 235-242.
- KERRICK W.G.L., SECRIST D., COBY R. & LUCAS S. (1976) Development of difference between red and white muscles in sensitivity to Ca^{2+} in the rabbit from embryo to adult. *Nature*, 260, 440-441.
- KERRICK W.G.L., MALENCIK D.A., HOAR P.E., POTTER J.D., COBY R.L., POCINWONG S. & FISCHER E.H. (1980) Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers Arch.*, 386, 207-213.
- KERRICK W.G.L., ZOT H.G., HOAR P.E. & POTTER J.D. (1985) Evidence that the Sr^{2+} activation properties of cardiac troponin C are altered when substituted into skinned skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, 260, 15687-15693.
- KITAZAWA T. (1976) Physiological significance of Ca uptake by mitochondria in the heart in comparison with that by cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biochem.*, 80, 1129-1147.

- KLUG G.A., HOUSTON M.E. STULL J.T. & PETTE D. (1986) Decrease in myosin light chain kinase activity of rabbit fast muscle by chronic stimulation. *FEBS Lett.*, 200, 352-354.
- KOBAYASHI R., ITOH H. & TASHIMA Y. (1984) Different muscle-specific forms of rabbit skeletal muscle α -actinin. *Eur. J. Biochem.*, 143, 125-131.
- KOBAYASHI T., TAO T., GRABAREK Z., GERGELY J. & COLLINS J.H. (1991) Cross-linking of residue 57 in the regulatory domain of a mutant rabbit skeletal muscle troponin C to the inhibitory region of troponin I. *J. Biochem.*, 266, 13746-13751.
- KOHAMA K. (1979) Divalent cation binding properties of slow skeletal muscle troponin in comparison with those of cardiac and fast skeletal muscle troponins. *J. Biochem.*, 86, 811-820.
- KRETSINGER R.H. (1980) Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 8, 119-174.
- KUNZ B., BAUMANN H. & SCHAUB M.C. (1985) Myosin heavy chain peptide patterns and histochemical ATPase activities in heart and skeletal muscles of rat and rabbit. 14th Eur. Conf. on Muscle and Motility, Ulm (RFA), 11-15 September 1985.
- LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LaFRAMBROISE W.A., DAOOD M.J., GUTHRIE R.D., MORETTI P., SCHIAFFINO S. & ONTELL M. (1990) Electrophoretic separation and immunological identification of type 2X myosin heavy chain in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1035, 109-112.
- LANGNER B.G. & PEPE F.A. (1980) New, rapid methods for purifying α -actinin from chicken gizzard and chicken pectoral muscle. *J. Biol. Chem.*, 255, 5429-5434.
- LARSSON L. & MOSS R.L. (1993) Maximum velocity of shortening in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J. Physiol. (London)*, 472, 595-614.
- LASZEWSKI-WILLIAMS B., RUFF R.L. & GORDON A.M. (1989) Influence of fiber type and muscle source on Ca^{2+} sensitivity of rat fibers. *Am. J. Physiol.*, 256, 420-427.
- LEAVIS P.C. & GERGELY J. (1984) Thin filament proteins and thin filament-linked regulation of vertebrate muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 16, 235-305.
- LEES-MILLER J.P. & HELFMAN D.M. (1991) The molecular basis for tropomyosin isoform diversity. *BioEssays*, 13, 429-437.
- LEEUW T. & PETTE D. (1993) Coordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy-chain isoforms during fast-to-slow transition of low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Eur. J. Biochem.*, 213, 1039-1046.
- LETERME D., CORDONNIER C., MOUNIER Y. & FALEMPIN M. (1994) Influence of chronic stretching upon rat soleus muscle during non-weight bearing conditions. *Pflügers Arch.* (sous presse).

- LOWEY S., SLAYTER H.S., WEEDS A.G. & BAKER H. (1969) Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymatic degradation. *J. Mol. Biol.*, 42, 1-29.
- LOWEY S. & RISBY D. (1971) Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature*, 234, 81-85.
- LOWEY S., BENFIELD P., SILBERSTEIN L. & LANG L.M. (1979) Distribution of light chains in fast skeletal myosin. *Nature*, 282, 522-524.
- LOWEY S. (1986) The structure of vertebrate muscle myosin. In *Myology*, Ed. ENGEL A.G. & BANKER B.Q., Mc Graw-Hill New York, 563-588.
- LOWEY S., WALLER G.S. & TRYBUS K.M. (1993) Skeletal muscle myosin light chains are essential for physiological speeds of shortening. *Nature*, 365, 454-456.
- LYNCH G.S., STEPHENSON D.G. & WILLIAMS D.A. (1991) Endurance exercise effects on the contractile properties of single, skinned skeletal muscle fibres of young rats. *Pflügers Arch.*, 418, 161-167.
- MAHDAVI V., STREHLER E.E., PERIASAMY M., WIECZOREK D.F., IZUMO S. & NADAL-GINARD B. (1986) Sarcomeric myosin heavy chain gene family: organization and pattern of expression. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 18, 299-308.
- MAHDAVI V., IZUMO S. & NADAL-GINARD B. (1987) Developmental and hormonal regulation of sarcomeric heavy chain gene family. *Circ. Res.*, 60, 804-814.
- MARECHAL G., SCHWARTZ K., BECKERS-BLEUKX G. & GHINS E. (1984) Isozymes of myosin in growing and regenerating rat muscles. *Eur. J. Biochem.*, 138, 421-428.
- MARECHAL G., BIRAL D., BECKERS-BLEUKX G. & COLSON-VAN-SCHOOR M. (1989) Subunit composition of native myosin isoenzymes of some striated mammalian muscles. *Biomed Biochim. Acta*, 48, 417-421.
- MARUYAMA K., KIMURA S., OHASHI K. & KUWANO Y. (1981) Connectin and elastic protein of muscle. Identification of "titin" with connectin. *J. Biochem. (Tokyo)*, 89, 701-709.
- MASCARELLO F., CARPENE E., VEGGETTI A., ROWLERSON A. & JENNY E. (1982) The tensor tympani muscle of cat and dog contains IIM and slow-tonic fibres: an unusual combination of fibre types. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 3, 363-374.
- MASCARELLO F., VEGGETTI A., CARPENE E. & ROWLERSON A. (1983) An immunohistochemical study of the middle ear muscles of some carnivores and primates, with special reference to the IIM and slow-tonic fibre types. *J. Anat.*, 137, 95-108.
- Mc DONALD K.S. & FITTS R.H. (1993) Effect of hindlimb unweighting on single soleus fiber maximal shortening velocity and ATPase activity. *J. Appl. Physiol.*, 74, 2949-2957.
- METZGER J.M. & MOSS R.L. (1987) Greater hydrogen ion-induced depression of tension and velocity in skinned single fibers of rat fast than slow muscles. *J. Physiol. (London)*, 393, 727-742.

- METZGER J.M., GREASER M.L. & MOSS R.L. (1989) Variations in cross-bridge attachment rate and tension with phosphorylation of myosin in mammalian skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 93, 855-883.
- MIZUSAWA H., TAKAGI A., SUGITA H. & TOYOKURA Y. (1982) Coexistence of fast and slow types of myosin light chains in a single fiber of rat soleus muscle. *J. Biochem.*, 91, 423-425.
- MOISESCU D.G. & THIELECZEK R. (1979) Sarcomere length effects of the Sr^{2+} and Ca^{2+} activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochim. Biophys. Acta*, 546, 64-76.
- MOORE R.L. & STULL J.T. (1984) Myosin light chain phosphorylation in fast and slow skeletal muscles in situ. *Am. J. Physiol.*, 247, 462-471.
- MOORE G.E. & SCHACHAT F.H. (1985) Molecular heterogeneity of histochemical fibre types: a comparison of fast fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 6, 513-524.
- MOORE G.E., BRIGGS M.M. & SCHACHAT F.H. (1987) Patterns of troponin T expression in mammalian fast, slow and promiscuous muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 8, 13-22.
- MORANO I. & RUEGG J.C. (1986) Calcium sensitivity of myofilaments in cardiac muscle-effect of myosin phosphorylation. *Basic Res. Cardiol.*, 81, 17-23.
- MORANO I., ARNDT H. GARTNER C. & RUEGG J.C. (1988) Skinned fibers of human atrium and ventricle: myosin isoenzymes and contractility. *Circ. Res.*, 62, 632-639.
- MOREY E.R. (1979) Spaceflight and bone turnover: correlation with a new rat model of weightlessness. *Bioscience*, 29, 168-172.
- MORIMOTO S. & OHTSUKI I. (1987) Ca^{2+} - and Sr^{2+} -sensitivity of the ATPase activity of rabbit skeletal myofibrils: effect of the complete substitution of troponin C with cardiac troponin C, calmodulin and parvalbumins. *J. Biochem.*, 101, 291-301.
- MORIMOTO S. & OHTSUKI I. (1988) Effect of substitution of troponin C in cardiac myofibrils with skeletal troponin C or calmodulin on the Ca^{2+} and Sr^{2+} sensitive ATPase activity. *J. Biochem.*, 104, 149-154.
- MOSS R.L. (1992) Ca^{2+} regulation of mechanical properties of striated muscle. *Circulation Res.*, 70, 865-883.
- MOSS R.L., GIULIAN G.G. & GREASER M.L. (1982) Physiological effects of accompanying the removal of myosin LC₂ from skinned skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, 257, 8588-8591.
- MOSS R.L., SWINFORD A.E. & GREASER M.L. (1983) Alterations in the Ca^{2+} sensitivity of tension development by single skeletal muscle fibers at stretched lengths. *Biophys. J.*, 43, 115-119.
- MOSS R.L., GIULIAN G.G. & GREASER M.L. (1985) The effects of partial extraction of TnC upon the tension-pCa relationship in rabbit skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 86, 585-600.
- MOSS R.L., ALLEN J.D. & GREASER M.L. (1986a) Effects of partial extraction of troponin complex upon the tension-pCa relation in rabbit skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 87, 761-774.

- MOSS R.L., LAUER M.R., GARY G.G. & GREASER M.L. (1986b) Altered Ca^{2+} dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibres following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.*, 261, 6096-6099.
- MOSS R.L., REISER P.J., GREASER M.L. & EDDINGER T.J. (1990) Varied expression of myosin alkali light chains is associated with altered speed of contraction in rabbit fast-twitch skeletal muscles. In *The dynamic state of muscle fibers*, Ed. PETTE D., de Gruyter Berlin New York, 355-368.
- MOUNIER Y., HOLY X. & STEVENS L. (1989) Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflügers Arch.*, 415, 136-141.
- NATORI R. (1954) The property and contraction process of isolated myofibrils. *Jikeikai Med. J.*, 1, 119-126.
- OBINATA T., MARUYAMA K., SUGITA H., KOHAMA K. & EBASHI S. (1981) Dynamic aspects of structural proteins in vertebrate skeletal muscle. *Muscle & Nerve*, 4, 456-488.
- OGATA T. (1958a) A histochemical study of the red and white muscle fibers. I. Activity of the succinoxidase system in muscle fibers. *Acta Med. Okayama*, 12, 216-227.
- OGATA T. (1958b) A histochemical study of the red and white muscle fibers. II. Activity of the cytochrome oxidase in muscle fibers. *Acta Med. Okayama*, 12, 228-232.
- OGATA T. (1958c) A histochemical study of the red and white muscle fibers. III. Activity of the diphosphopyridine nucleotide diaphorase and triphosphopyridine nucleotide diaphorase in muscle fibers. *Acta Med. Okayama*, 12, 233-240.
- OISHI Y. (1993) Relationship between myosin heavy chain IId isoform and fibre types in soleus muscle of the rat after hindlimb suspension. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 66, 451-454.
- ORENTLICHER M., REUBEN J.P., GRUNDFEST H. & BRANDT P.W. (1974) Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibers. *J. Gen. Physiol.*, 63, 168-186.
- ORENTLICHER M., BRANDT P.W. & REUBEN J.P. (1977) Regulation of tension in skinned muscle fibers: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.*, 233, 127-134.
- PADYKULA H.A. & HERMAN E. (1955) Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 3, 161-167.
- PAN B.S., GORDON A.M. & LUO Z. (1989) Removal of tropomyosin overlap modifies cooperative binding of myosin S-1 to reconstituted thin filaments of rabbit striated muscle. *J. Biol. Chem.*, 264, 8495-8498.
- PARMACEK M.S. & LEIDEN J.M. (1989) Structure and expression of the murine slow/cardiac troponin C gene. *J. Biol. Chem.*, 264, 13217-13225.

- PARMACEK M.S. & LEIDEN J.M. (1991) Structure, function, and regulation of troponin C. *Circulation*, 84, 991-1003.
- PEARLSTONE J.R. & SMILLIE L.B. (1976) Amino acid sequence of tropomyosin-binding component of rabbit skeletal muscle troponin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 1902-1976.
- PERIASAMY M., WADGAONKAR R., KUMAR C., MARTIN B.J. & SIDDIQUI M.A.Q. (1989) Characterization of a rat myosin alkali light chain gene expressed in ventricular and slow twitch skeletal muscles. *Nucl. Acids Res.*, 17, 7723-7734.
- PERNELLE J.J., CHAFEY P., LOGNONNE J.L., RIGHETTI P.G., BOSISIO A.B. & WAHRMANN J.P. (1986) High resolution two-dimensional electrophoresis of myofibrillar proteins with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 7, 159-165.
- PERNELLE J.J., RIGHETTI P.G. & WAHRMANN J.P. (1988) 2-D analysis of human skeletal muscle myosin light chains with immobilized pH gradients. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 16, 227-236.
- PERSECHINI A., STULL J.T. & COOKE R. (1985) The effect of myosin phosphorylation on the contractile properties of skinned rabbit skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, 260, 7951-7954.
- PETER J.B., BARNARD R.J., EDGERTON V.R., GILLESPIE C.A. & STEMPEL K.E. (1972) Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. *Biochemistry*, 11, 2627-2633.
- PETTE D., HENRIKSSON J. & EMMERICH M. (1979) Myofibrillar protein patterns of single fibres from human muscle. *FEBS Lett.*, 103, 152-155.
- PETTE D. & STARON R.S. (1990) Cellular and molecular diversities of mammalian muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 116, 1-76.
- PETTE D. & STARON R.S. (1993) The molecular diversity of mammalian muscle fibers. *NIPS*, 8, 153-157.
- PIEROBON-BORMIOLI S., SARTORE S., VITADELLO M. & SCHIAFFINO S. (1980) "Slow" myosins in vertebrate skeletal muscle. An immunofluorescence study. *J. Cell. Biol.*, 85, 672-681.
- PIEROBON-BORMIOLI S., BETTO R. & SALVIATI G. (1989) The organization of titin (connectin) and nebulin in the sarcomeres: an immunocytochemical study. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 10, 446-456.
- POTTER J.D. & GERGELY J. (1974) Troponin, tropomyosin, and actin interactions in the Ca^{2+} regulation of muscle contraction. *Biochem.*, 13, 2697-2703.
- POTTER J.D. & GERGELY J. (1975) The calcium and magnesium binding sites of troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosinetriphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 250, 4628-4633.
- POTTER J.D. & JOHNSON J.D. (1982) Troponin. In *Calcium and cell function*, Ed. CHEUNG W.Y., Academic New York, 2, 145-173.

- RANVIER L. (1873) Propriétés et structures différentes des muscles rouges et des muscles blancs chez les lapins et chez les raies. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 77, 1030-1034.
- REISER P.J., MOSS R.L., GIULIAN G.G. & GREASER M.L. (1985) Shortening velocity in single fibers from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J. Biol. Chem.*, 260, 9077-9080.
- REISER P.J., KASPER C.E. & MOSS R.L. (1987a) Myosin subunits and contractile properties of single fibers from hypokinetic rat muscles. *J. Appl. Physiol.*, 63, 2293-2300.
- REISER P.J., GREASER M.L. & MOSS R.L. (1987b) Tension/pCa characteristics and regulatory proteins of single fibers from chicken neonatal and adult fast and slow skeletal muscles. *Biophys. J.*, 51, 222a.
- REUBEN J.P., WOOD D.S. & EASTWOOD A.N. (1977) Adaptation of single fiber techniques for the study of human muscle. In *Pathogenesis of Human Muscular Dystrophies*, Ed. ROWLAND L.P., Excerpta Medica Amsterdam, 259-269.
- ROBERTSON S.P., JOHNSON J.D. & POTTER J.D. (1981) The time-course of Ca^{2+} exchange with calmodulin, troponin, parvalbumin, and myosin in response to transient increases in Ca^{2+} . *Biophys. J.*, 34, 559-569.
- ROWLERSON A., POPE P., MURRAY J., WHALEN R.B. & WEEDS A.G. (1981) A novel myosin present in cat jaw-closing muscles. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 2, 415-438.
- ROY R.K., SRETER F.A. & SARKAR S. (1979) Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Dev. Biol.*, 69, 15-30.
- ROY R.R., BODINE-FOWLER S.C., KIM J., HAQUE N., DE LEON D., RUDOLPH W. & EDGERTON V.R. (1991) Architectural and fiber type distribution properties of selected rhesus leg muscles: Feasibility of multiple independent biopsies. *Acta Anat.*, 140, 350-356.
- RUFF R.L. (1989) Calcium sensitivity of fast- and slow-twitch human muscle fibers. *Muscle & Nerve*, 12, 32-37.
- RUFF R.L. & WHITTLESEY D. (1991) Ca-, Sr-tension relationships and contraction velocities of human muscle fibers. *Muscle & Nerve*, 14, 1219-1226.
- RUIZ-OPAZO N. & NADAL-GINARD B. (1987) α -Tropomyosin gene organization. *J. Biol. Chem.*, 262, 4755-4765.
- SALVIATI G., BETTO R. & DANIELI-BETTO D. (1982) Polymorphism of myofibrillar proteins of rabbit skeletal-muscle fibres. An electrophoretic study of single fibres. *Biochem. J.*, 207, 261-272.
- SALVIATI G., BETTO R., DANIELI-BETTO D. & ZEVIANI M. (1984) Myofibrillar-protein isoforms and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport activity of single human muscle fibres. *Biochem. J.*, 224, 215-225.

- SALVIATI G., BETTO R., DANIELI-BETTO D., BIASIA E., SERENA M., MINI M. & SCARLATO G. (1986) Myosin light chains and muscle pathology. *Neurology*, 36, 693-697.
- SARTORE S., MASCARELLO F., ROWLERSON A., GORZA L., AUSONI S., VIANELLO M. & SCHIAFFINO S. (1987) Fibre types in extraocular muscles: a new myosin isoform in the fast fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 8, 161-172.
- SCHACHAT F.H., BRONSON D.D. & Mc DONALD O.B. (1980) Two kinds of slow skeletal muscle fibers which differ in their myosin light chain complements. *FEBS Lett.*, 122, 80-82.
- SCHACHAT F.H., BRONSON D.D. & Mc DONALD O.B. (1985a) Heterogeneity of contractile proteins. A continuum of troponin-tropomyosin expression in mammalian skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 260, 1108-1113.
- SCHACHAT F.H., CANINE A.C., BRIGGS M.M. & REEDY M.C. (1985b) The presence of two skeletal muscle α -actinins correlates with troponin-tropomyosin expression and Z-line width. *J. Cell. Biol.*, 101, 1001-1008.
- SCHACHAT F.H., DIAMOND M.S. & BRANDT P.W. (1987) Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J. Mol. Biol.*, 198, 551-554.
- SCHACHAT F.H., BRIGGS M.M., WILLIAMSON E.K., Mc GINNIS H., DIAMOND M.S. & BRANDT P.W. (1990) Expression of fast thin filament proteins. Defining fiber archetypes in a molecular continuum. In *The dynamic state of muscle fibers*, Ed. PETTE D., de Gruyter Berlin New York, 279-291.
- SCHANTZ P.G. & DHOOT G.K. (1987) Coexistence of slow and fast isoforms of contractile and regulatory proteins in human skeletal muscle fibres induced by endurance training. *Acta Physiol. Scand.*, 131, 147-154.
- SCHAUB M.C., JAUCH A., WALZTHOENY D. & WALLIMANN T. (1986) Myosin light chain functions. *Biomed. Biochim. Acta*, 45, 39-44.
- SCHIAFFINO S. & PIEROBON-BORMIOLI S. (1973) Histochemical characterization of adenosine triphosphatases in skeletal muscle fibers by selective extraction procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 21, 142-145.
- SCHIAFFINO S., SAGGIN L., VIEL A. & GORZA L. (1985) Differentiation of fibre types in rat skeletal muscle visualized with monoclonal antimyosin antibodies. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 6, 60-61.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., DONES I., CORNELIO F. & SARTORE S. (1986a) Fetal myosin immunoreactivity in human dystrophic muscle. *Muscle & Nerve*, 9, 51-58.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., SARTORE S., SAGGIN L. & CARLI M. (1986b) Embryonic myosin heavy chain as a differentiation marker of developing human skeletal muscle and rhabdomyosarcoma. A monoclonal antibody study. *Exp. Cell. Res.*, 163, 211-220.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., PITTON G., SAGGIN L., AUSONI S., SARTORE S. & LØMO T. (1988) Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralysed rat skeletal muscle. *Dev. Biol.*, 127, 1-11.

- SCHIAFFINO S., GORZA L., SARTORE S., SAGGIN L., AUSONI S., VIANELLO M., GUNDERSEN K. & LØMO T. (1989) Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 10, 197-205.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., AUSONI S., BOTTINELLI R., REGGIANI C., LARSON L., EDSTROM L., GUNDERSEN K. & LØMO T. (1990) Muscle fiber types expressing different myosin heavy chain isoforms. Their functional properties and adaptative capacity. In *The dynamic state of muscle fibers*, Ed. PETTE D., de Gruyter Berlin New York, 329-341.
- SCHMITT T.L. & PETTE D. (1988) Type I protein is a slow isoform of troponin T. *FEBS Lett.*, 234, 83-85.
- SCHMITT T.L. & PETTE D. (1990) Correlations between troponin T and myosin heavy chain isoforms in normal and transforming rabbit muscle fibers. In *The dynamic state of muscle fibers*, Ed. PETTE D., de Gruyter Berlin New York, 293-302.
- SEEDORF K., SEEDORF U. & PETTE D. (1983) Coordinate expression of alkali and DTNB myosin light chains during transformation of rabbit fast muscle by chronic stimulation. *FEBS Lett.*, 158, 321-324.
- SMILLIE L.B., GOLOSINSKA K. & REINACH F.C. (1988) Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal muscle troponin T. *J. Biol. Chem.*, 263, 18816-18820.
- SOLARO R.J., MOIR A.J.G. & PERRY S.V. (1976) Phosphorylation of troponin I and the inotropic effect of adrenaline on perfused rabbit heart. *Nature*, 262, 615.
- STARON R.S., HIKIDA R.S. & HAGERMAN F.C. (1983) Reevaluation of human muscle fast-twitch-subtypes: evidence for a continuum. *Histochemistry*, 78, 33-39.
- STARON R.S. & PETTE D. (1986) Correlation between myofibrillar ATPase activity and myosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers. *Histochemistry*, 86, 19-23.
- STARON R.S., GOHLSCH B. & PETTE D. (1987) Myosin polymorphism in single fibers of chronically stimulated rabbit fast-twitch muscle. *Pflügers Arch.*, 408, 444-450.
- STARON R.S. & PETTE D. (1987a) The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit soleus muscle. *Biochem. J.*, 243, 687-693.
- STARON R.S. & PETTE D. (1987b) The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem. J.*, 243, 695-699.
- STARON R.S. & HIKIDA R.S. (1992) Histochemical, biochemical, and ultrastructural analyses of single human muscle fibers with special reference to the C fiber population. *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 563-568.
- STARON R.S. & JOHNSON P. (1993) Myosin polymorphism and differential expression in adult human skeletal muscle. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106, 463-475.
- STARR R., ALMOND R. & OFFER G. (1985) Location of C-protein, H-protein and X-protein in rabbit skeletal muscle fibre types. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 6, 227-256.

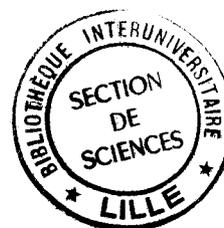
- STEPHENSON D.G. & FORREST Q.G. (1980) Different isometric force-[Ca²⁺] relationships in slow and fast twitch skinned muscle fibres of the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 589, 358-362.
- STEPHENSON D.G. & WILLIAMS D.A. (1981) Calcium activated force responses in fast and slow twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. *J. Physiol. (London)*, 317, 281-302.
- STEPHENSON D.G. & WILLIAMS D.A. (1982) Effects of sarcomere length on the force-pCa relation in fast and slow-twitch skinned muscle fibres from the rat. *J. Physiol. (London)*, 333, 637-653.
- STEPHENSON G.M.M. & STEPHENSON D.G. (1993) Endogenous MLC2 phosphorylation and Ca²⁺-activated force in mechanically skinned skeletal muscle fibres of the rat. *Pflügers Arch.*, 424, 30-38.
- STEVENS L., MOUNIER Y., HOLY X. & FALEMPIN M. (1990) Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, 68, 334-340.
- STEVENS L., MOUNIER Y. & HOLY X. (1993) Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am. J. Physiol.*, 264, 770-776.
- SUTOH K. (1982) An actin binding site on the 20K fragment of myosin subfragment 1. *Biochemistry*, 21, 4800-4804.
- SWEENEY H.L. & STULL J.T. (1986) Phosphorylation of myosin in permeabilized mammalian cardiac and skeletal muscle cells. *Am. J. Physiol.*, 250, 657-660.
- SWEENEY H.L., KUSHMERICK M.J., MABUCHI K., GERGELY J. & SRETER F.A. (1986) Velocity of shortening and myosin isozymes in two types of rabbit fast-twitch muscle fibers. *Am. J. Physiol.*, 251, 431-434.
- SWEENEY H.L., KUSHMERICK M.J., MABUCHI K., SRETER F.A. & GERGELY J. (1988) Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlated with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, 263, 9034-9039.
- SWEENEY H.L., BRITO R.M.M., ROSEVEAR P.R. & PUTKEY J.A. (1990) The low-affinity Ca²⁺-binding sites in cardiac/slow skeletal muscle troponin C perform distinct functions: Site I alone cannot trigger contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9538-9542.
- SWEENEY H.L., BOWMAN B.F. & STULL J.T. (1993) Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am. J. Physiol.*, 264, 1085-1095.
- SWEITZER N.K. & MOSS R.L. (1990) The effect of altered temperature on Ca²⁺-sensitive force in permeabilized myocardium and skeletal muscle. *J. Gen. Physiol.*, 96, 1221-1245.
- SWYNGHEDAUW B. (1986) Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiological reviews*, 66, 710-771.
- SYSKA H., WILKINSON J.M., GRAND R.J.A. & PERRY S.V. (1976) The relationship between biological activity and primary structure of troponin I from white skeletal muscle of the rabbit. *Biochem. J.*, 153, 375.

- TAKAGI A. & ENDO M. (1977) Guinea pig soleus and extensor digitorum longus: A study of single-skinned fibers. *Exp. Neurol.*, 55, 95-101.
- TAKAGI A., YONEMOTO K. & SUGITA H. (1978) Single-skinned human muscle fibres: activation by calcium and strontium. *Neurol.*, 28, 497-499.
- TAKAHASHI K. & HATTORI A. (1989) α -Actinin is a component of the Z-filament, a structural backbone of skeletal muscle Z-disks. *J. Biochem. (Tokyo)*, 105, 529-536.
- TAKAHASHI K., WADA M. & KATSUTA S. (1991) Expressions of myosin heavy chain IId isoform in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta Physiol. Scand.*, 143, 131-132.
- TAKANO-OHMURO H., GOLDFINE S.M., KOJIMA T., OBINATA T. & FISCHMAN D.A. (1989) Size and charge heterogeneity of C-protein isoforms in avian skeletal muscle. Expression of six different isoforms in chicken muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 10, 369-378.
- TAMAKI N. (1985) Effect of growth on muscle capillarity and fiber type composition in rat diaphragm. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 54, 24-29.
- TERMIN A., STARON R.S. & PETTE D. (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, 92, 453-457.
- TERMIN A., STARON R.S. & PETTE D. (1990) Myosin heavy chain isoforms in transforming rat muscle. In *The dynamic state of muscle fibers*, Ed. PETTE D., de Gruyter Berlin New York, 463-472.
- TERMIN A. & PETTE D. (1991) Myosin heavy chain-based isomyosins in developing, adult fast-twitch and slow-twitch muscles. *Eur. J. Biochem.*, 195, 577-584.
- THOMASON D.B. & BOOTH F.W. (1990) Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. App. Physiol.*, 68, 1-12.
- THORNELL L.E., CARLSSON E., KUGELBERG E. & GROVE B.K. (1987) Myofibrillar M-band structure and composition of physiologically defined rat motor units. *Am. J. Physiol.*, 253, 456-468.
- THORNELL L.E., CARLSSON E. & PEDROSA F. (1990) M-band structure and composition in relation to fiber types. In *The dynamic state of muscle fibers*, Ed. PETTE D., de Gruyter Berlin New York, 369-383.
- TOWBIN H., STAEHLIN T. & GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 4350-4354.
- TROJANOWSKI J.Q., OBROCKA M.A. & LEE V.M.Y. (1983) A comparison of eight different chromogen protocols for the demonstration of immunoreactive neurofilaments in rat cerebellum using the peroxidase-antiperoxidase method and monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 1217-1223.
- TSIKA R.W., HERRICK R.E. & BALDWIN K.M. (1987) Subunit composition of rodent isomyosins and their distribution in hindlimb skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 63, 2101-2110.

- VANDEKERKHOVE J. & WEBER K. (1979) The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation*, 14, 123-133.
- VIBERT P. & COHEN C. (1988) Domains, motions and regulation in the myosin head. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 9, 296-305.
- WADA M., KATSUTA S., DOI T. & KUNO S. (1990) Favourable associations between the myosin heavy-chain and light chain isoforms in human skeletal muscle. *Pflügers Arch.*, 416, 689-693.
- WADA M. & PETTE D. (1993) Relationships between alkali light-chain complement and myosin heavy-chain isoforms in single fast-twitch fibers of rat and rabbit. *Eur. J. Biochem.*, 214, 157-161.
- WANG K. (1984) Cytoskeletal matrix in striated muscle: the role of titin, nebulin and intermediate filaments. In *Contractile mechanisms in muscle*, Ed. SUGI H. & POLLACK C.H., Plenum New York, 285-306.
- WANG K., MC CLURE J. & TU A. (1979) Titin: major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 3698-3702.
- WANG K. & WILLIAMSON C.L. (1980) Identification of an N2 line protein of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3254-3258.
- WANG K. & WRIGHT J. (1988) Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line. *J. Cell. Biol.*, 107, 2199-2212.
- WEEDS A.G. (1976) Light chains from slow-twitch muscle myosin. *Eur. J. Biochem.*, 66, 157-173.
- WEEDS A.G. & LOWEY S. (1971) Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J. Mol. Biol.*, 61, 701-725.
- WEEDS A.G. & BURRIDGE K. (1975) Myosin from cross-reinnervated cat muscles. Evidence for reciprocal transformation of heavy chains. *FEBS Lett.*, 57, 203-208.
- WEST J.M. & STEPHENSON D.G. (1993) Ca²⁺ and Sr²⁺ activation properties of skinned muscle fibres with different regulatory systems from crustacea and rat. *J. Physiol. (London)*, 462, 579-596.
- WHALEN R.G., BUTLER-BROWNE G.S. & GROS F. (1976) Protein synthesis and actin heterogeneity in calf muscle cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73, 2018-2022.
- WHALEN R.G., BUTLER-BROWNE G.S. & GROS F. (1978) Identification of a novel form of myosin light chain present in embryonic muscle tissue and cultured muscle cells. *J. Mol. Biol.* 126, 415-431.
- WHALEN R.G., SCHWARTZ K., BOUVERET P., SELL S.M. & GROS F. (1979) Contractile protein isozymes in muscle development: identification of an embryonic form of myosin heavy chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 5197-5201.

- WHALEN R.G., SELL S.M., BUTLER-BROWNE G.S., SCHWARTZ K., BOUVERET P. & PINSET-HARSTROM I. (1981) Three myosin heavy-chains isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292, 805-809.
- WHALEN R.G., SELL S.M., ERIKSSON A. & THORNELL L.E. (1982) Myosin subunit types in skeletal and cardiac tissues and their developmental distribution. *Dev. Biol.*, 91, 478-484.
- WIECZOREK D.F., PERIASAMY M., BUTLER-BROWNE G.S., WHALEN R.G. & NADAL-GINARD B. (1985) Co-expression of multiple myosin heavy chain genes, in addition to a tissue specific one, in extraocular musculature. *J. Cell. Biol.*, 101, 618-629.
- WIECZOREK D.F., SMITH C.W.J. & NADAL-GINARD B. (1988) The rat α -tropomyosin gene generates a minimum of six different mRNAs coding for striated, smooth, and nonmuscle isoforms by alternative splicing. *Mol. Cell. Biol.*, 8, 679-694.
- WILKINSON J.M. (1974) The preparation and properties of the components of troponin. *Biochim. Biophys. Acta*, 359, 379.
- WILKINSON J.M. (1980) Troponin C from rabbit slow skeletal and cardiac muscle is the product of a single gene. *Eur. J. Biochem.*, 103, 179-188.
- WILKINSON J.M. & GRAND R.J.A. (1978) Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. *Nature*, 271, 31-35.
- WILKINSON J.M., MOIR A.J.G. & WATERFIELD M.D. (1984) The expression of multiple forms of troponin T in chicken fast-skeletal muscle may result from differential splicing of a single gene. *Eur. J. Biochem.*, 143, 47-56.
- WILSON G.J. & STEPHENSON D.G. (1990) Calcium and strontium activation characteristics of skeletal muscle fibres from the small marsupial *Sminthopsis macroura*. *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, 10, 12-24.
- WOODS W.F. (1967) Molecular weight and sub-unit structure of tropomyosin B. *J. Biol. Chem.*, 242, 2859.
- WOOD D.S., ZOLLMAN J., REUBEN J.P. & BRANDT P.W. (1975) Human skeletal muscle: properties of the "chemically skinned" fiber. *Science*, 187, 1075-1076.
- YAMAMOTO K. (1983) Sensitivity of actomyosin ATPase to calcium and strontium ions. Effect of hybrid troponins. *J. Biochem.*, 93, 1061-1069.
- YAMAMOTO K. & MOOS C. (1983) The C-proteins of rabbit red, white, and cardiac muscles. *J. Biol. Chem.*, 258, 8395-8401.
- YAMAMOTO K., TOKUNAGA M., SUTOH K., WAKABAYASHI T. & SEKINE T. (1985) Location of the SH group of the alkali light chain on the myosin head as revealed by electron microscopy. *J. Mol. Biol.*, 183, 287-290.

- ZAK R., MARTIN A.F., PRIOR G. & RABINOWITZ M. (1977) Comparison of turnover of several myofibrillar proteins and critical evaluation of double isotope method. *J. Biol. Chem.*, 252, 3430-3435.
- ZOT H.G. & POTTER J.D. (1982) A structural role for the Ca^{2+} - Mg^{2+} sites on troponin C in the regulation of muscle contraction. Preparation and properties of troponin C depleted myofibrils. *J. Biol. Chem.*, 257, 7678-7683.
- ZOT H.G., IIDA S. & POTTER J.D. (1983) Thin filament interactions and Ca^{2+} binding to Tn. *Chemica Scripta*, 21, 133-136.
- ZOT H.G., GUTH K. & POTTER J.D. (1985) Measurement of fluorescence and tension development in skinned skeletal muscle fibers reconstituted with TnC DANZ. *Biophys. J.*, 47, 473.
- ZOT H.G., GUTH K. & POTTER J.D. (1986) Fast skeletal muscle skinned fibers and myofibrils reconstituted with N-terminal fluorescent analogues of troponin C. *J. Biol. Chem.*, 261, 15883-15890.



RESUME

La relation structure-fonction de fibres musculaires isolées est analysée dans un muscle lent (le soleus) et un muscle mixte (le vastus intermedius) de rats "contrôle" ou exposés à la microgravité, et dans le muscle soleus de singe rhésus. L'analyse électrophorétique, en milieu dénaturant, des fibres musculaires nous permet de déterminer leur composition en protéines myofibrillaires. La fonction de ces fibres est étudiée par l'analyse des propriétés d'activation des fibres "pelées" par les ions calcium (Ca) et strontium (Sr). Outre les fibres de type lent et rapide, des fibres hybrides présentant à la fois des isoformes lentes et rapides de myosines (lourde, MHC, et légère, MLC) sont observées. Deux sous groupes de fibres hybrides sont déterminés : les hybrides lentes (où l'isoforme lente de MHC est prédominante) et les hybrides rapides (où l'isoforme rapide de MHC est prédominante). Pour les fibres hybrides, l'expression des MLC, en particulier de la MLC2, est bien corrélée à celle des MHC. Les caractéristiques d'activation par le Ca sont différentes pour les fibres lentes et rapides. Cette différence est plus marquée quand le cation activateur est le Sr. Les propriétés fonctionnelles des fibres hybrides lentes et rapides sont similaires à celles des fibres exprimant exclusivement les isoformes lentes ou rapides de MHC, MLC, et troponine C. L'étude des cinétiques de contraction des fibres de soleus de singe rhésus montre que les fibres exprimant uniquement, ou de manière prédominante, les isoformes lentes de myosine ont des vitesses de contraction faibles. Cette relation structure-fonction est identique pour les 2 muscles de rat étudiés et pour le soleus de singe. Dans le soleus de rat soumis à 10 et 14 jours de microgravité, nous montrons l'expression d'une isoforme de MHC (la MHC2B) spécifique des muscles rapides. Une modification du phénotype du soleus est donc induite par l'exposition à des conditions de microgravité.

Mots-clefs : calcium ; fibres musculaires isolées ; microgravité ; protéines myofibrillaires ; soleus ; strontium ; vastus intermedius.

ABSTRACT

The structure-function relationship of skinned fibers isolated from a slow-twitch muscle (soleus) and a mixed muscle (vastus intermedius) of normal rats and rats exposed to microgravity conditions, and of soleus muscle fibers from rhesus monkey was investigated. Myofibrillar protein composition was determined by electrophoretic analysis and the contractile properties were studied by analysing the tension induced by calcium (Ca) or strontium (Sr). Fibers exhibiting only slow or only fast myosin heavy (MHC) and light (MLC) chain isoforms, as well as fibers expressing a mixed proportion of slow and fast myosin isoforms were observed in these muscles. These latter fibers, with mixed myosin isoforms, were called hybrid slow (HS) or hybrid fast (HF), based on the predominant myosin isoform. For these hybrid fibers, the MLC expression was well correlated with that of the MHC, specially for the MLC2 isoforms. Ca activation parameters were different for slow *versus* fast fibers. This difference was greater when Sr was used to activate tension. Functional properties of HS and HF fibers were similar to those of fibers expressing only slow or fast, respectively, isoforms of MHC, MLC and troponin C. Maximal shortening velocity, studied in monkey soleus fibers, was lower for fibers expressing only, or predominantly, slow MHC and MLC isoforms. We suggest that when both slow and fast isoforms of myofibrillar proteins are expressed in a muscle fiber, the functional properties are mainly determined by the predominant isoform. The structure-function relationship was similar in all fibers, irrespective of their muscle origin. In soleus muscles of rats exposed for 10 or 14 days to microgravity conditions, we observed a fast isoform of MHC (MHC2B), which is never expressed in normal soleus muscles, thus a phenotypic transformation of this slow-twitch muscle is induced upon exposure to microgravity conditions.

Key words: calcium; isolated muscle fibers; microgravity; myofibrillar proteins; soleus; strontium; vastus intermedius.