

50376
1996
356

Université des Sciences et Technologies de LILLE I

THESE

présentée par

Florence PICQUET

pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de LILLE I

en "Sciences de la Vie et de la Santé"



ETUDE AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT EN CONDITIONS NORMALES ET D'IMMOBILISATION

Soutenue le 3 décembre 1996 devant le jury composé de :

Mme G.S. BUTLER-BROWNE Directeur de recherches INSERM, Université de Paris VII	Rapporteur
M. G. RAYMOND Directeur de recherches CNRS, Université de Poitiers	Rapporteur
M. M. FALEMPIN Professeur des Universités, Lille I	Examineur
M. A. GUELL Responsable des Programmes Sciences de la Vie, CNES	Examineur
M. J.P. VILAIN Professeur des Universités, Lille I	Examineur
Mme Y. MOUNIER Professeur des Universités, Lille I	Directeur

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

SOMMAIRE

INTRODUCTION

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES DE BASE

I - STRUCTURE DU MUSCLE	6
II - STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE	7
III - STRUCTURE DES MYOFIBRILLES	10
IV - MECANISME DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE	10
A - Le couplage excitation-contraction	12
B - La création de force musculaire	12
V - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT EPAIS	16
1. <i>Diversité des chaînes légères de la myosine</i>	17
a. Chaînes de type alcalin	19
b. Chaînes de type DTNB	20
c. Rôle des chaînes légères de myosine	20
2. <i>Diversité des chaînes lourdes de la myosine</i>	22
a. Les isoformes rapides	22
b. Les isoformes lentes	25
c. Les isoformes développementales	25
VI - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT FIN	28
A - L'actine	28
B - La tropomyosine	28
C - Les troponines	30
VII - FORMATION DES MUSCLES SQUELETTIQUES	31
A - La myogénèse	31
B - La croissance post-natale	36
C - La mise en place de l'innervation définitive	37
D - Les transitions des isoformes de myosine au cours du développement musculaire	40
1. <i>Les isoformes développementales de la myosine</i>	41
2. <i>La myosine lente</i>	43
3. <i>Les isoformes rapides de la myosine</i>	44

E - Les autres protéines contractiles	44
F - Les interactions entre le calcium et les protéines contractiles	46
1. <i>L'établissement de la relation Tension/taux de calcium</i>	46
2. <i>La modification de la relation T/pCa au cours du développement post-natal</i>	47
VIII - MODIFICATION DU DEVELOPPEMENT EN FONCTION DE L'ACTIVITE MUSCULAIRE	49

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE	53
A - Caractéristiques des animaux	53
B - Groupes d'animaux	53
C - Caractéristiques des muscles étudiés	54
D - Modèles d'inactivité	54
E - Prélèvements	56
II - TECHNIQUE DE FIBRE PELEE	57
A - Pelage des fibres musculaires	57
1. <i>Technique utilisée</i>	57
2. <i>Isolement et montage</i>	58
B - Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques	58
C - Solutions	61
D - Protocole expérimental	62
1. <i>Mesure des tensions isométriques</i>	62
2. <i>Expression des résultats</i>	64
III - TECHNIQUE ELECTROPHORETIQUE	69
A - Séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosine	69
B - Préparation des échantillons	70
C - Coloration des gels	70
IV - TECHNIQUE HISTOCHIMIQUE	71
V - TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE	73
VI - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	74

RESULTATS

CHAPITRE 1 : EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL (ANIMAUX CONTROLES)

I - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES	76
A - Typages ATPasiques	76
B - Immunohistochimie	78
C - Analyse électrophorétique et densitométrique des isoformes de chaînes lourdes de la myosine	78
II - EVOLUTION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES	83
A - Tensions maximales	83
B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium	87
C - Corrélations entre la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine et le critère Δ	92

CHAPITRE 2 : EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS DE RAT NOUVEAU-NE APRES UNE PERIODE D'IMMOBILISATION DE SIX JOURS EN PRESENCE DE L'INNERVATION POLYNEURALE

I - CRITERES D'ATROPHIE MUSCULAIRE	94
A - Evolution des masses corporelles et musculaires	94
B - Surface des fibres	96
II - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES DU MUSCLE SOLEUS DE RAT IMMOBILISE ENTRE 6 ET 12 JOURS POST-NATALS	96
A - Typage ATPasique	96
B - Immunohistochimie	99
C - Analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine	102
III - EVOLUTION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS DE RAT IMMOBILISE ENTRE 6 ET 12 JOURS POST-NATALS	105
A - Tensions maximales	105
B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium	107

**CHAPITRE 3 : EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES
ET FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT NOUVEAU-NE APRES
UNE IMMOBILISATION DE SIX JOURS EN ETAT D'INNERVATION
MONOSYNAPTIQUE**

I - CRITERES D'ATROPHIE MUSCULAIRE	111
A - Evolution des masses corporelles et musculaires	111
B - Surface des fibres	111
II - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 17 A 23 JOURS POST-NATALS	114
A - Typage ATPasique	114
B - Immunohistochimie	114
C - Analyse électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine	119
III - EVOLUTION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 17 A 23 JOURS POST-NATALS	121
A - Tensions maximales	121
B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium	121

**CHAPITRE 4 : EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET
FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT ADULTE SOUMIS A UNE
IMMOBILISATION D'UNE DUREE DE SIX JOURS
(ETAT D'INNERVATION MONOSYNAPTIQUE)**

I - CRITERES D'ATROPHIE MUSCULAIRE	127
A - Evolution des masses corporelles et musculaires	127
B - Surface des fibres	129
II - MODIFICATIONS DES PROPRIETES STRUCTURALES	129
A - Typage ATPasique	129
B - Analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine	129
III - MODIFICATIONS DES PROPRIETES FONCTIONNELLES	135
A - Tensions maximales	135
B - Propriétés d'activation par le calcium et le strontium	135

DISCUSSION

EVOLUTION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DU MUSCLE SOLEUS AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL

I - EVOLUTION STRUCTURALE	143
II - EVOLUTION FONCTIONNELLE	149

MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 6 A 12 JOURS POST-NATALS

I - ATROPHIE MUSCULAIRE	153
II - MODIFICATIONS STRUCTURALES	154
III - MODIFICATIONS FONCTIONNELLES	155

MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 17 A 23 JOURS POST-NATALS, EN ETAT D'INNERVATION MONOSYNAPTIQUE

I - ATROPHIE MUSCULAIRE	157
II - MODIFICATIONS STRUCTURALES	158
III - MODIFICATIONS FONCTIONNELLES	160

MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS ADULTE IMMOBILISE

I - ATROPHIE MUSCULAIRE	162
II - MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES	163

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PUBLICATIONS

INTRODUCTION

Le développement d'un organisme aussi complexe que celui d'un vertébré fait de plusieurs milliards de cellules à partir d'une cellule-oeuf de petite taille constitue un aspect fascinant de la Physiologie. Une des questions majeures est de comprendre les mécanismes contrôlant la détermination puis la différenciation des différents tissus et organes. A ce titre, le développement musculaire représente un sujet d'études particulièrement intéressant dans la mesure où il s'agit d'un processus qui fait intervenir une cascade d'évènements dont les différentes étapes ont déjà fait l'objet d'études diverses.

Le muscle possède une plasticité qui lui permet d'évoluer de la période embryonnaire à la période néonatale puis adulte. Cette évolution est contrôlée et régulée par de nombreux facteurs que l'on peut ranger dans trois catégories : les facteurs hormonaux, l'innervation, et le niveau d'activité du muscle. Ce sont ces deux derniers facteurs qui seront plus spécialement envisagés dans cette étude.

De nombreux travaux réalisés sur des animaux soumis à une période d'inactivité, ont révélé une atrophie musculaire consistant en une perte de masse et de force musculaires et se manifestant surtout au niveau des muscles posturaux. Cette atrophie dite fonctionnelle résulte de la non-utilisation de certains muscles et a déjà été bien étudiée grâce à des expériences effectuées sur des rats après des séjours en microgravité réelle (vols spatiaux) ou en microgravité simulée (modèle d'hypodynamie-hypokinésie). Sur cette base, nous avons souhaité analyser l'influence du niveau d'activité (ou de non-activité) auquel le muscle est soumis, sur le mécanisme de la contraction musculaire en s'adressant non plus à des muscles adultes, de typage bien établi, mais à des muscles dont le processus de maturation musculaire est en cours, c'est à dire au stade du développement post-natal. De façon à approfondir nos connaissances sur les caractéristiques et l'origine de l'atrophie musculaire de non-utilisation, nous avons choisi

de soumettre un muscle postural, le soleus, à des périodes d'immobilisation par plâtrage. Nous n'avons pas retenu le modèle de suspension pour cette étude mais préféré un protocole d'immobilisation conduisant à une atrophie de même type (absence de charge corporelle sur les membres postérieurs) sans que la croissance normale de l'animal ne soit entravée. De plus, le muscle soleus a été choisi parce qu'il est un muscle postural de type lent et que toutes les données actuelles décrivent, lors d'atrophies fonctionnelles sur l'adulte, une transformation sous forme de continuum des fibres lentes en fibres rapides, phénomène que nous examinerons donc sur des rats nouveau-nés. Par ailleurs, une étude sur des animaux en cours de développement présente l'avantage de contrôler directement le rôle du facteur innervation. En effet, il est bien connu que l'acquisition, le maintien et l'adaptation des caractéristiques musculaires sont sous la dépendance étroite de l'innervation et que le haut degré de plasticité du système neuromusculaire est particulièrement apparent au cours des premières semaines de la vie post-natale, période où se produit la régression d'une forme polyneurale de l'innervation en faveur de l'installation progressive d'une innervation monosynaptique. En outre, différents travaux montrent que l'influence de l'innervation sur la détermination des caractéristiques des différents types de fibres musculaires se manifeste par une modulation du contenu en isoformes de certaines protéines contractiles. L'activité physique ou au contraire l'immobilisation peuvent influencer également sur l'expression des isoformes de diverses protéines contractiles.

Au cours du développement post-natal, il existe, pour certaines protéines contractiles, des transitions claires entre différentes isoformes. C'est tout particulièrement le cas pour les chaînes lourdes de myosine qui, à la différence d'autres protéines (chaînes légères de myosine, troponines, tropomyosine), évoluent entre les formes embryonnaire,

néonatale, lente et rapide, et ont leur expression régulée à la fois par le message nerveux et par l'activité du muscle. L'analyse du système de transitions de ces chaînes lourdes de myosine est donc apparue comme le marqueur le mieux adapté à une étude du développement post-natal.

Notre travail portera donc sur la relation entre l'évolution des propriétés contractiles et structurales du muscle soleus de rat au cours du développement post-natal dans des conditions normales et après des périodes d'immobilisation.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES
DE BASE

Les muscles ont la propriété en se contractant d'engendrer les mouvements. Selon l'aspect caractéristique qu'ils présentent en microscopie électronique, les muscles des vertébrés sont classés en 2 catégories. Il s'agit des muscles striés et des muscles lisses. Ainsi, les muscles striés présentent une striation parallèle, horizontale et verticale, régulière, facilement reconnaissable. Ces muscles comprennent les muscles squelettiques et le muscle cardiaque. Les muscles lisses sont par contre dépourvus de toute striation. Ils sont présents dans de nombreux organes tels que l'estomac, les intestins, les artères, les veines etc... Dans cette étude, seuls les muscles squelettiques retiendront notre attention.

I - STRUCTURE DU MUSCLE

Les muscles sont entourés d'un tissu conjonctif dense. Ils se subdivisent en faisceaux de fibres musculaires entourés de tissu conjonctif et de réseaux de vaisseaux sanguins. A l'extrémité du muscle, le tissu conjonctif s'organise en tendons qui permettent l'insertion du muscle sur le squelette. Le réseau de vaisseaux sanguins se subdivise pour arriver, au stade final, aux artérioles et veinules qui en entourant chaque fibre musculaire assurent l'oxygénation, le transport des métabolites et des hormones.

II - STRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE

Les muscles squelettiques sont constitués de fibres musculaires. Chaque fibre est un syncytium constitué par l'association de plusieurs structures caractéristiques, les myofibrilles (figure 1).

La fibre musculaire est la plus petite entité capable de se contracter. Ses dimensions sont variables suivant l'âge, l'espèce animale ou le type de muscle. Ainsi, pour un même muscle, son diamètre peut varier de 10 μm chez le rat nouveau-né à plus de 70 μm chez l'adulte. Sa longueur chez l'homme peut atteindre 12 cm. La fibre musculaire est limitée par une membrane excitable appelée sarcolemme. Son cytoplasme (ou sarcoplasme) contient essentiellement de nombreux faisceaux de myofibrilles cylindriques. Celles-ci apparaissent en microscopie optique comme des structures subcellulaires fines ou épaisses comportant un système de striations alternativement claires et sombres. Le sarcoplasme contient en plus des myofibrilles, des organites caractéristiques des cellules tels que des noyaux, des vacuoles, des lysosomes, des mitochondries.

Les myofibrilles sont entourées d'un système membranaire élaboré (figure 2). Le sarcolemme s'invagine en système transverse ou tubule T. Ce système est couplé à une réserve intracellulaire de calcium appelée réticulum sarcoplasmique. L'association d'un tubule T et de 2 vésicules du réticulum sarcoplasmique constitue une triade, élément clé du couplage excitation-contraction.

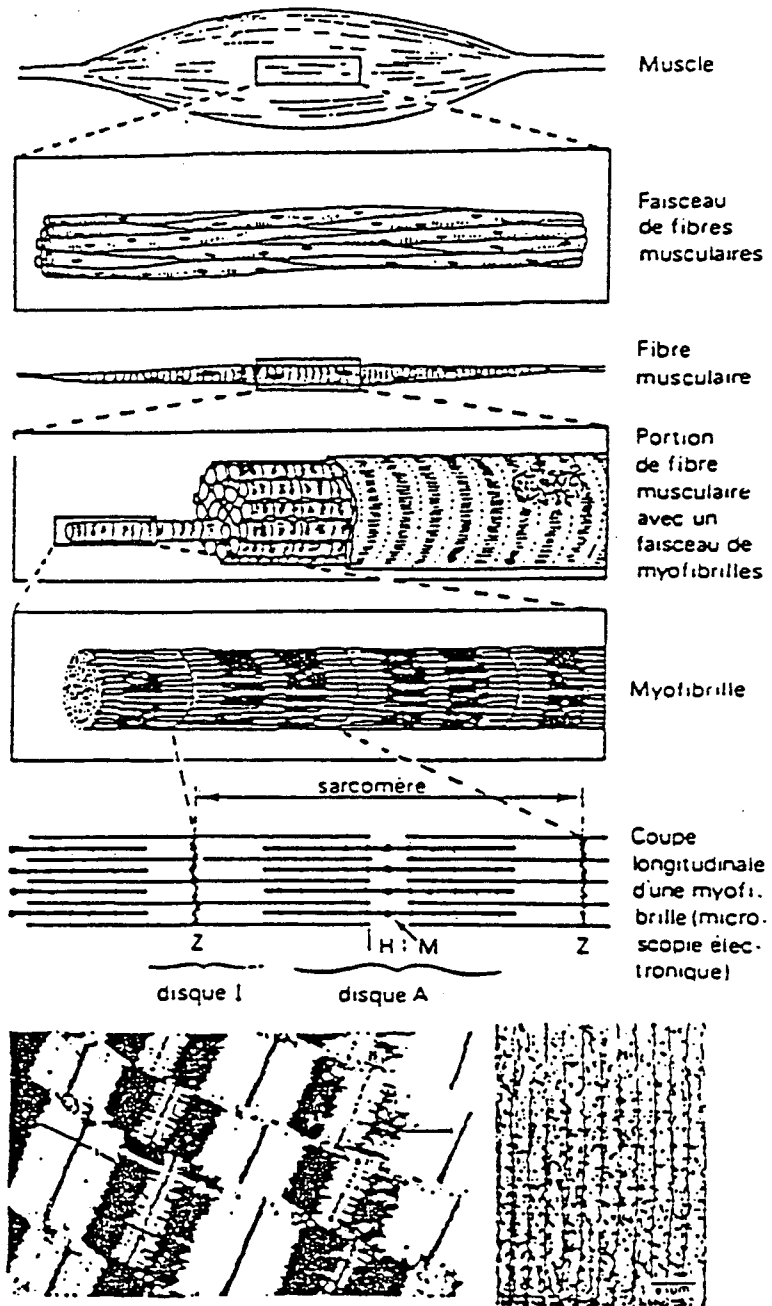


Figure 1 : Organisation du muscle strié squelettique (d'après Sheeler et Bianchi dans "Cell biology : structure biochemistry and function", Ed. J. Wiley et sons, 1980). La microphotographie en bas à gauche montre une coupe longitudinale de fibre (d'après Huxley dans "The cell" Ed. Brachet et Minsky, 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 (d'après Franzini-Armstrong et coll., 1988).

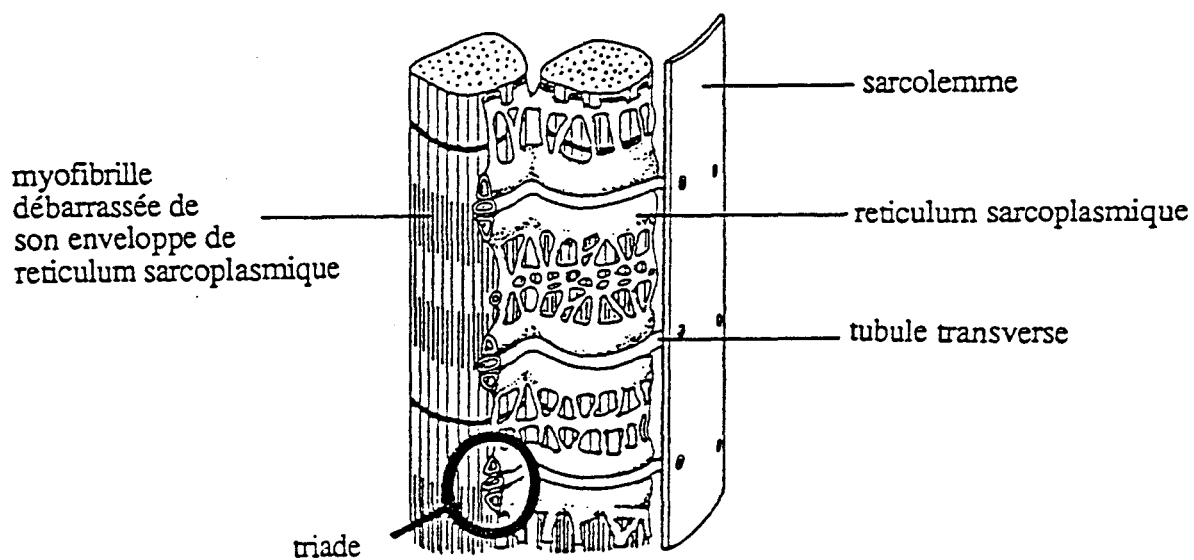


Figure 2 : Les myofibrilles, le réticulum sarcoplasmique et les tubules transverse (d'après Jones et Round, 1990).

III - STRUCTURE DES MYOFIBRILLES

Les myofibrilles sont constituées de 2 types de myofilaments qui représentent l'unité même de la contraction musculaire. Les striations transverses visibles en microscopie optique sont alors le résultat de leur arrangement spécifique. Le sarcomère s'étend entre 2 stries Z et constitue l'unité contractile. Chez les muscles de mammifères, sa longueur de repos varie entre 2 et 3 μm . En microscopie optique, il apparaît comme une succession de bandes sombres ou anisotropes (bandes A) et de bandes claires ou isotropes (bandes I) qui sont dues à l'arrangement des myofilaments. Les bandes A sont formées de molécules de myosine et constituent le filament épais. La zone centrale de la bande A où l'arrangement des molécules de myosine n'implique pas les têtes S1 est appelée bande H. Le filament fin matérialisé par les bandes I comporte la double hélice de molécules d'actine sur laquelle viennent s'agencer les molécules de troponines et de tropomyosine.

L'organisation des myofibrilles est représentée à la figure 3.

IV - MECANISME DE LA CONTRACTION MUSCULAIRE

La contraction musculaire et la création de force qui en découle résultent d'un ensemble de processus : phénomènes électriques au niveau de la membrane des fibres musculaires, couplage excitation-contraction et contraction musculaire.

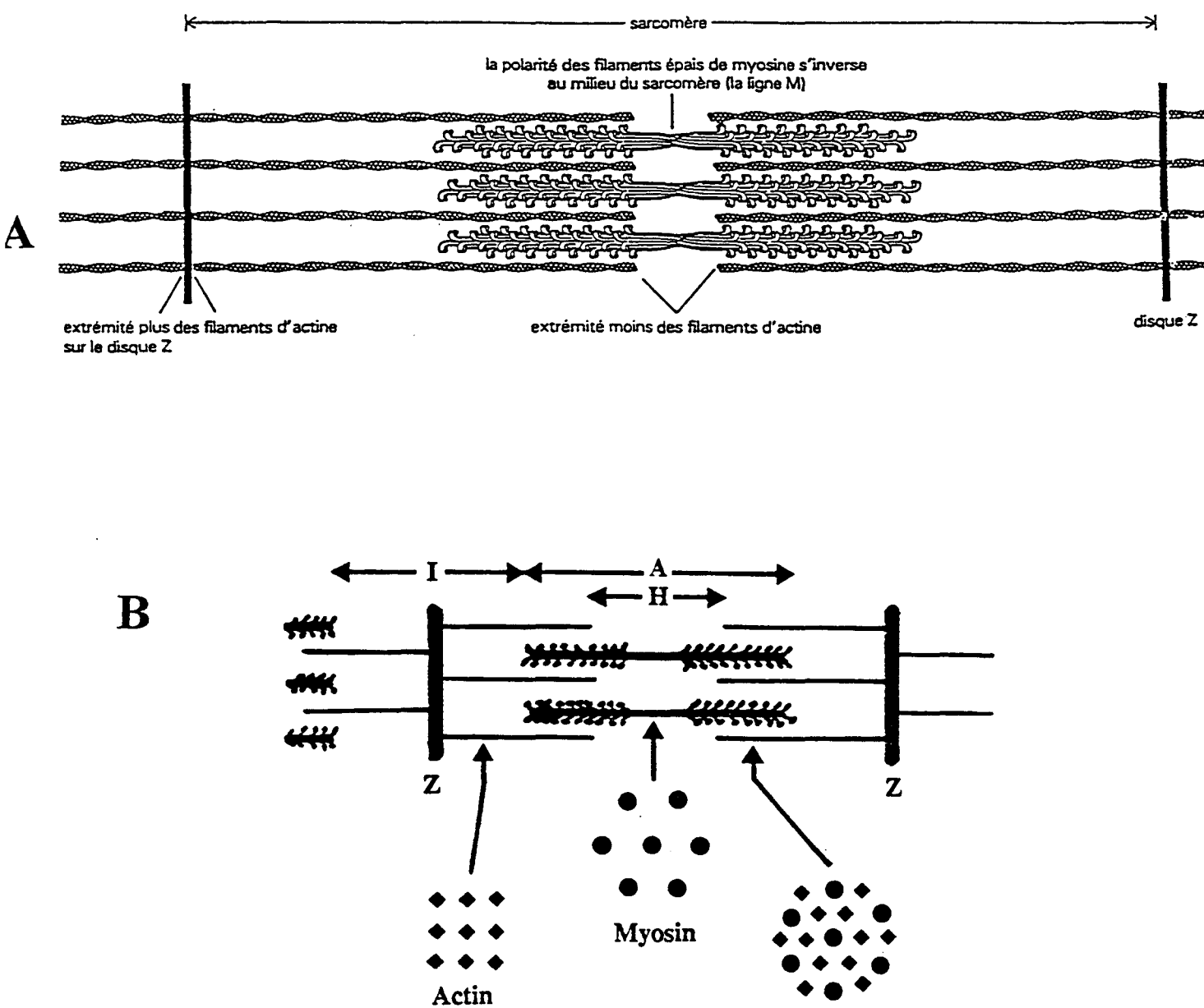


Figure 3 : Organisation des molécules d'actine et de myosine pour former un sarcomère.

A : d'après Alberts et coll., 1990.

B : d'après Jones et Round, 1990.

A - Le couplage excitation-contraction

Le système musculaire est sous la dépendance étroite du système nerveux qui communique avec la cellule musculaire par l'intermédiaire de la jonction neuromusculaire. Chaque contraction musculaire naît suite à une excitation électrique du muscle. Les influx nerveux atteignent la jonction neuromusculaire et entraînent la libération d'acétylcholine au niveau des terminaisons nerveuses. Ce transmetteur en se fixant sur les récepteurs du sarcolemme induit une variation du potentiel de membrane qui provoque à son tour la création d'un potentiel d'action musculaire.

Ce potentiel d'action musculaire se propage vers le centre de la fibre musculaire le long des membranes des tubules transverses jusqu'aux triades qui sont de véritables réserves de Calcium (Ca) intracellulaire. L'excitation provoque alors une libération de Ca vers le myoplasme. La contraction est déclenchée par la fixation de Ca sur la troponine C qui permet la création de ponts entre l'actine et la myosine. Le relâchement est dû au recaptage du Ca par le réticulum sarcoplasmique et au détachement des ponts.

B - La création de la force musculaire

D'après la théorie d'Huxley (1957), la contraction musculaire et la création de force qui en résulte sont dues au raccourcissement des fibres musculaires (théorie des filaments glissants). Le glissement du filament fin par rapport au filament épais s'effectue par l'intermédiaire de ponts entre les protéines motrices (actine et myosine) qui se forment et se détruisent cycliquement.

On sait que le mécanisme de la contraction musculaire est sous le contrôle direct de protéines régulatrices (troponines et tropomyosine) sensibles aux variations de Ca intracellulaire.

Lorsque la fibre est au repos, en absence de Ca intracellulaire, le filament de tropomyosine (TM) est logé dans le double filament d'actine. Il masque ainsi par encombrement stérique le site de liaison de l'actine à la myosine. La position de la TM est maintenue par la troponine T (TnT) qui possède un site de liaison avec la TM. La troponine I (TnI) associée à l'actine et à la troponine C (TnC) inhibe au repos l'interaction actine-myosine.

En présence, dans le myoplasme, d'une concentration en calcium suffisante, la troponine C fixe le Ca et provoque une diminution de l'affinité de la TnI pour l'actine. Les liaisons entre les 3 sous-unités de la troponine sont alors renforcées ; elles provoquent un changement de conformation de l'ensemble qui induit un déplacement de la TM. Le complexe TM-TnT s'enfonce plus profondément dans la gorge de l'actine et libère le site de fixation de l'actine à la myosine. La formation de ponts entre l'actine et la myosine est possible (figure 4). Le déroulement de ces phénomènes est couplé à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par cycle (figure 5A).

Chaque cycle, résumé à la figure 5B, comporte les étapes suivantes :

(i) : la tête S1 de myosine peut réagir avec une molécule d'actine pour laquelle elle a une grande affinité. Grâce à la fixation du Ca sur la TnC, le site de fixation de l'actine est en effet libéré. L'angle formé entre l'actine et la tête S1 de myosine est de 90° .

(ii) : libération d'un produit de la réaction (Pi). Cette énergie libérée est transformée en travail mécanique. La tête S1 de myosine présente une rotation suivant un

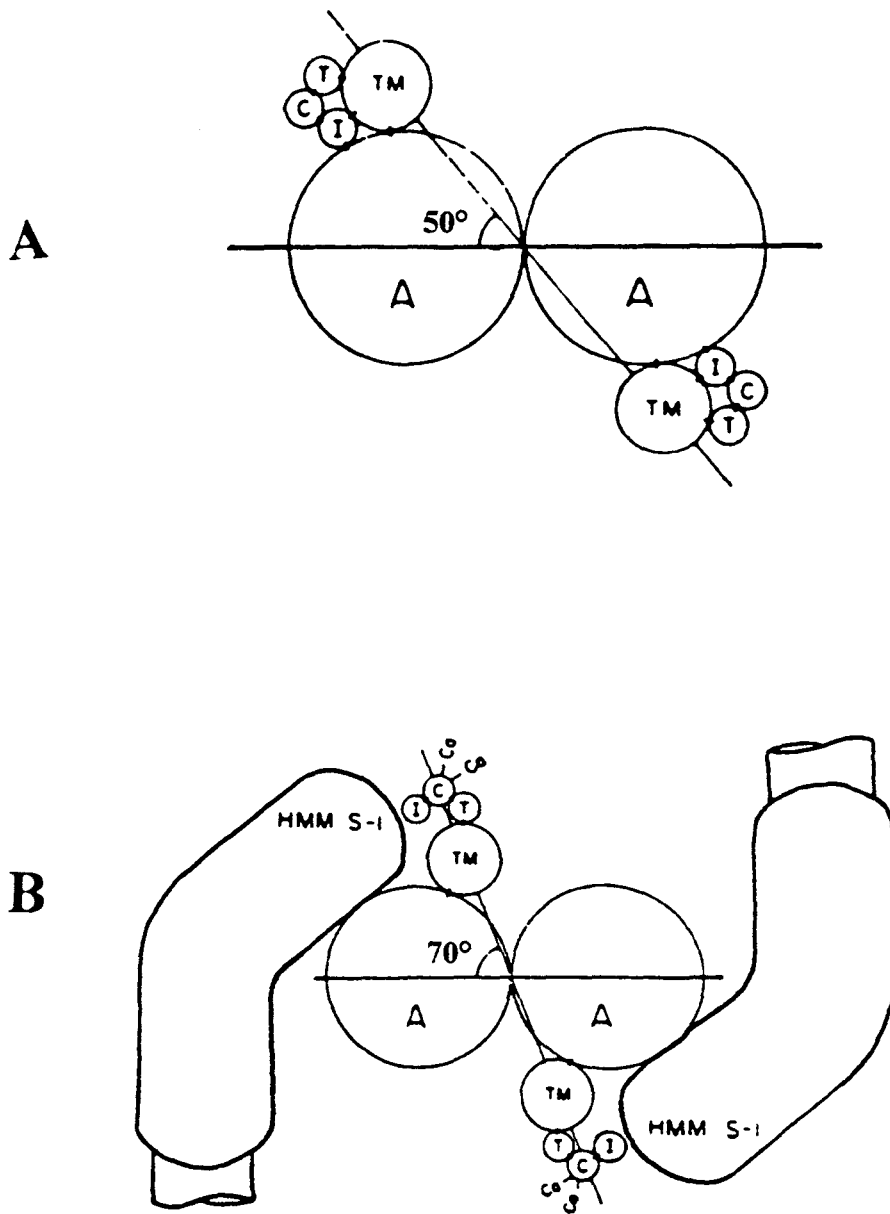


Figure 4 : Représentation transversale de l'interaction entre la myosine et les sous unités régulatrices du filament fin (d'après Potter et Gergely, 1974).

A : En absence de calcium.

B : En présence de calcium.

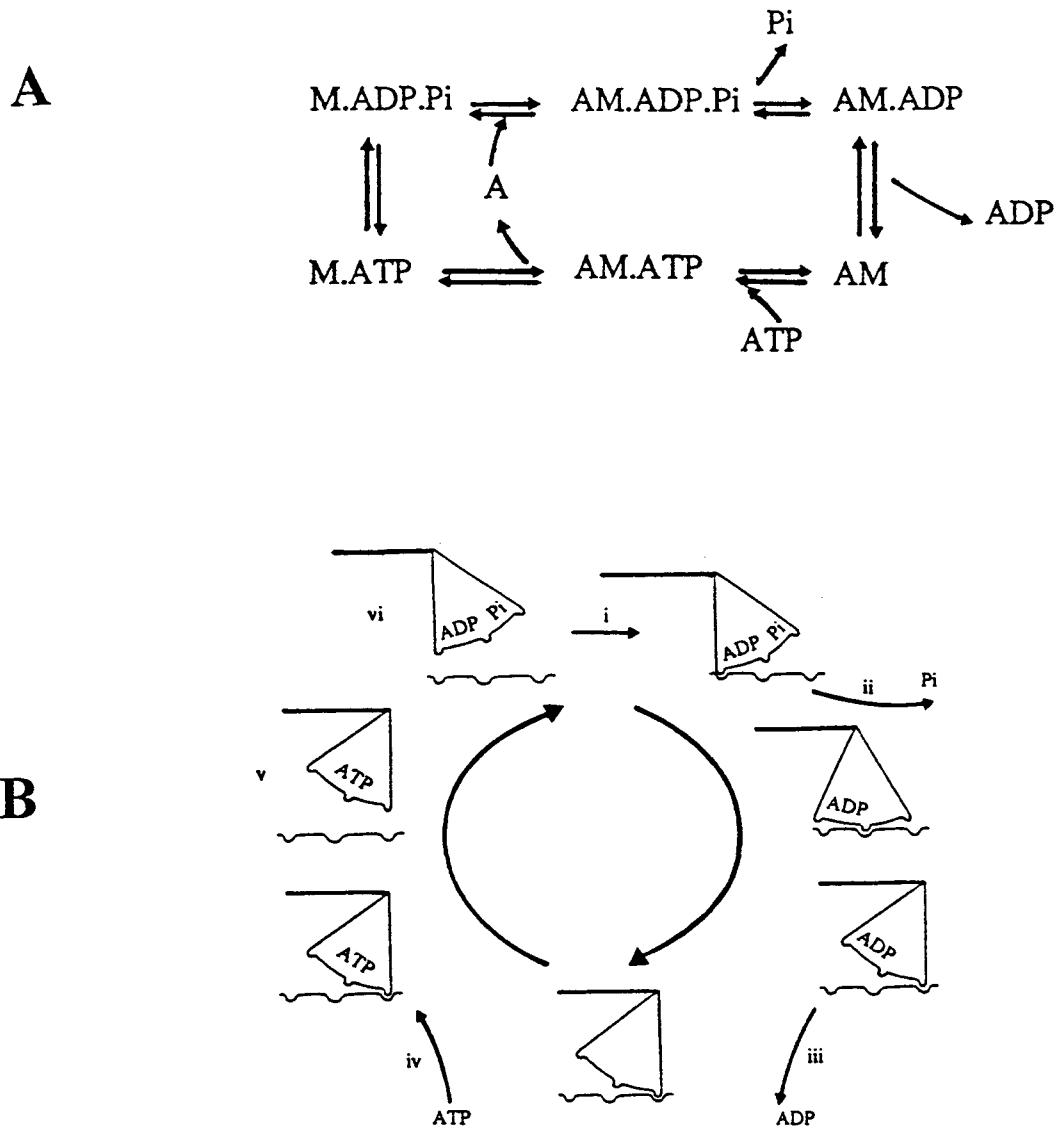


Figure 5 : A : Etapes de l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par l'actine (A) et la myosine (M), (d'après Jones et Round, 1990).

B : Etapes biochimiques d'un cycle d'attachement et de détachement de ponts actine-myosine. La création de force est réalisée aux étapes ii et iii, (d'après Jones et Round, 1990).

angle de 45°. Le déplacement du filament fin par rapport au filament épais se traduit par un raccourcissement de l'ordre de 10 nm.

(iii) : suite à la rotation de la tête S1 de myosine, l'ADP est libéré.

(iv) : une molécule d'ATP vient se fixer sur la tête de myosine.

(v) : la fixation d'ATP diminue l'affinité de l'actine pour la myosine et permet le détachement actine-myosine.

(vi) : l'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi permet de repositionner la tête S1 de la myosine (angle de 90°). Le système est prêt à accomplir un nouveau cycle.

L'ATP, hydrolysé par l'ATPase portée par la tête S1 de la myosine constitue la source d'énergie immédiate de la contraction. Cette source d'énergie s'épuise rapidement et doit être régénérée soit par la dégradation de la créatine phosphate (créatine phosphate + ADP + Pi → ATP + créatine, réaction catalysée par une créatine phosphokinase) soit par l'intermédiaire de la glycolyse ou de la glycogénolyse.

V - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT EPAIS

Le filament épais est essentiellement constitué de molécules de myosines. Chaque molécule de myosine comporte 2 chaînes dites "lourdes" (MHC pour Myosin Heavy Chain) de poids moléculaire 200 kDa, associées à 4 chaînes légères (MLC pour Myosin Light Chain) d'environ 20 kDa chacune (Lowey et coll., 1969 ; Weeds et Lowey, 1971). Les chaînes lourdes s'organisent en hélice sur une longueur d'environ 1400 Å. A une extrémité, ces 2 chaînes lourdes se séparent pour se combiner chacune avec 2 chaînes légères en formant ainsi une tête globulaire.

Les premières études réalisées sur la molécule de myosine par l'utilisation de coupures enzymatiques grâce à la trypsine et à la papaine avaient permis de séparer, respectivement, la "queue" de la myosine et la tête S1 du reste de la molécule. On obtenait ainsi une méromyosine "légère" (LMM) qui comprenait la queue fibrillaire de la molécule et une méromyosine lourde (HMM) constituée des têtes globulaires (voir figure 6A). La méromyosine lourde se scinde ensuite en 2 parties : le fragment S1 constitué des têtes globulaires proprement dit et le fragment S2 qui rattache celles-ci au reste de la molécule. C'est le fragment S1 qui possède l'activité enzymatique de la myosine et qui se lie à l'actine. Le fragment S2 est une partie plus flexible qui sert de liaison entre le fragment S1 et le reste de la molécule (queues). Les queues de myosine (environ 300) s'assemblent entr'elles pour constituer le filament épais (figure 6B).

1. Diversité des chaînes légères de la myosine

Les chaînes légères de la myosine s'associent à la tête S1 des MHC par des liaisons non covalentes à raison de 2 molécules de chaînes légères par molécule de MHC.

Il existe deux classes de MLC :

- les MLC dites essentielles de type alcalin (la MLC 1 et la MLC 3) qui se dissocient de la MHC à pH alcalin. Elles sont non phosphorylables.

- les MLC dites régulatrices de type "DNTB" (ou MLC 2) qui se dissocient de la MHC en présence d'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoate (DNTB). Ces chaînes légères sont phosphorylables.

Une chaîne légère phosphorylable et une chaîne légère non phosphorylable s'associent à une molécule de MHC.

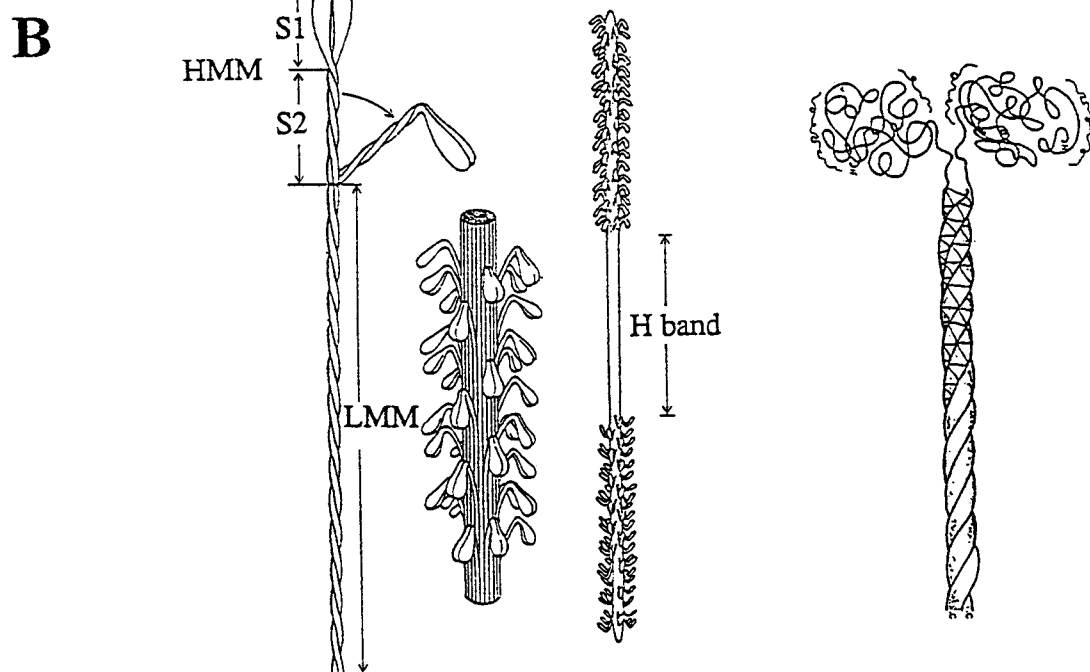
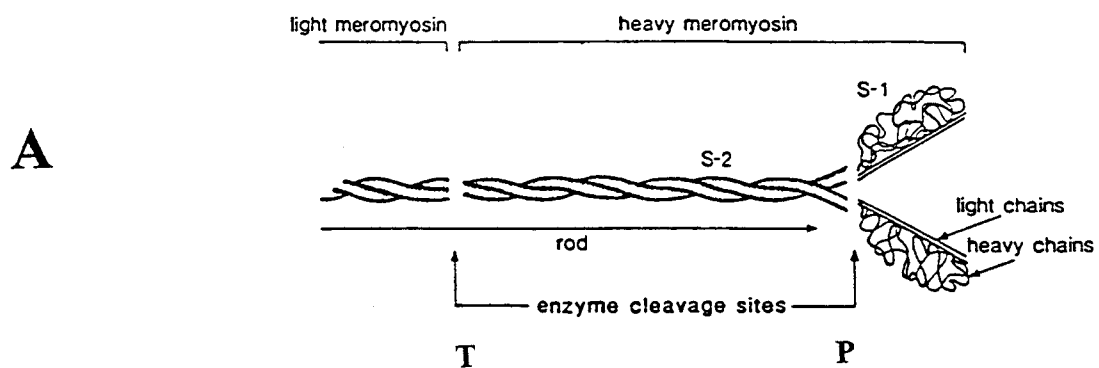


Figure 6 : A : Structure de la myosine (d'après Pollack, 1990).

T : coupure enzymatique à la trypsine

P : coupure enzymatique à la papaine

B : Structure du filament épais.

a. Chaînes de type alcalin.

Différentes isoformes des MLC de type alcalin ont été identifiées (Gauthier et coll., 1982 ; Barton et Buckingham, 1985).

- La MLC 1 lente ou MLC 1s (pour slow) est plus spécifiquement exprimée dans les fibres musculaires squelettiques. Toutefois, la MLC 1s est indifférenciable de la MLC 1 qui est exprimée dans le ventricule cardiaque (MLC 1v). En effet, chez le rat et la souris, ces deux isoformes sont codées par le même gène et présentent en électrophorèse bidimensionnelle des profils de migration identiques (Whalen et coll., 1978 ; Barton et Buckingham, 1985 ; Barton et coll., 1985 a et b).

- La MLC 1 rapide et la MLC 3 rapide ou respectivement MLC 1f et MLC 3f (pour fast) sont spécifiquement exprimées dans les fibres musculaires rapides des muscles squelettiques. Ces deux protéines sont le résultat des produits de traduction de deux ARN différents, mais transcrits à partir du même gène. Le transcrit de la MLC 1f comporte ainsi les exons 1 et 4 alors que le transcrit de la MLC 3f présente les exons 2 et 3 (Nabeshima et coll., 1984 ; Periasamy et coll., 1984). La différence au niveau des régions amino-terminales conduit à une différence de masse moléculaire pour ces deux isoformes. Celle de la MLC 1f est de 25 kDa alors que celle de la MLC 3f est de 17 kDa (Frank et Weeds, 1974). Il a été démontré que ces protéines peuvent être substituées l'une à l'autre dans leur association avec la MHC (d'Albis et coll., 1979). Elles peuvent ainsi former des homodimères (MLC 1f -MLC 1f) ou (MLC 3f -MLC 3f) ou des hétérodimères (MLC 1f -MLC 3f).

- L'expression de la MLC 1 embryonnaire (MLC 1emb) est limitée aux stades précoces du développement dans les muscles squelettiques des mammifères (Whalen et coll., 1978 ; Strohman et coll., 1983), à l'exception du muscle masséter humain (Butler-Browne et coll., 1988 ; Soussi-Yanicostas et coll., 1990 ; Soussi-Yanicostas et Butler-Browne, 1991), et du muscle extraoculaire de rat (Wieczorek et coll., 1985) où l'expression de cette isoforme persiste jusqu'à l'âge adulte.

L'expression de cette isoforme, identique à la MLC 1 atriale exprimée dans le muscle cardiaque (Barton et coll., 1985 b), est également observée lors de la régénération des fibres musculaires et dans les cultures primaires de cellules myogéniques humaines et de rat (Strohman et coll., 1983).

b. Chaînes de type DTNB

Les chaînes légères de type "DTNB" (ou MLC 2) existent sous deux formes, l'une phosphorylée et l'autre non phosphorylée. La phosphorylation est réalisée par une kinase calcium dépendante. A ce jour, plusieurs isoformes ont été identifiées :

- la MLC 2 rapide (ou MLC 2f pour fast) et la MLC 2 lente (MLC 2s pour slow) qui sont exprimées respectivement dans les fibres rapides et dans les fibres lentes des muscles squelettiques (Lowey et Risby, 1971 ; Collins, 1976). La MLC 2s est également exprimée dans le ventricule cardiaque (MLC 2v : Lowey et Risby, 1971 ; Whalen et coll., 1982).

c. Rôle des chaînes légères de myosine

Bien que le rôle des MLC soit peu connu, leur localisation proche de la région charnière hélice/tête (Flicker et coll. 1983 ; Waller et Lowey, 1985) suggère

qu'elles pourraient moduler les interactions entre l'actine et la myosine (Moss et coll., 1982 ; Schaub et coll., 1986). Certains travaux suggèrent l'existence d'une corrélation entre la vitesse maximale de raccourcissement et le rapport MLC 1f/MLC 3f chez les fibres rapides de type IIB de différents muscles de lapin (Greaser et coll., 1988 ; Moss et coll., 1990). Il semblerait de plus que les MLC 2 phosphorylables aient une influence sur les propriétés mécaniques. L'extraction ou l'addition de ces LC provoque respectivement une diminution ou une augmentation de la vitesse maximale de raccourcissement (V_{max}) de fibres musculaires pelées (Moss et coll., 1982).

Des analyses électrophorétiques réalisées sur fibre isolée ont montré que les chaînes légères de myosine de type rapide sont exprimées dans les muscles rapides et les chaînes de type lent dans les muscles lents (Salviati et coll., 1982, 1983). Cependant, certains résultats indiquent qu'un groupe de chaînes légères donné ne se combine pas exclusivement avec un type de MHC donné.

Des coexistences de MLC lentes et rapides ont été observées dans des fibres contenant des MHC lentes ou rapides. Ainsi, certaines fibres de type I de muscles humains expriment en plus des MLC lentes, une certaine proportion de MLC rapides (Billeter et coll., 1981 ; Ishiura et coll., 1981). De plus, des fibres de muscles de rat, de lapin, ou de bovin habituellement considérées de type histochimique IIA (rapide) contiennent non seulement des MLC f mais de plus des MLC 1s et MLC 2s (Young et Davey, 1981 ; Mizusawa et coll., 1982 ; Salviati et coll., 1982 ; Staron et Pette, 1986, 1987 a et b). Ces fibres n'exprimant pas à la fois des MHC s et MHC f ne peuvent être considérées comme appartenant au type histochimique IIC (indifférencié).

2. Diversité des chaînes lourdes de la myosine

De très nombreuses études ont démontré que chez les vertébrés, les différentes isoformes de la MHC sont exprimées selon des spécificités tissulaires et temporelles différentes (tableau 1). Certaines isoformes sont spécifiques du tissu musculaire et d'autres, de cellules non musculaires. Dans le cas des isoformes musculaires, certaines ne sont exprimées que dans un type de muscles ou de fibres musculaires et d'autres, qu'à des stades précis du développement.

Ainsi, douze isoformes de la MHC exprimées dans les muscles striés (squelettiques et cardiaque) ont été identifiées chez les mammifères. Les premières études ont permis d'identifier deux formes de myosines différentes, rapide et lente (Lowey et Risby, 1971). Par la suite, des études immunologiques (Billeter et coll., 1980) puis l'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les MHC (Danieli-Betto et coll., 1986 ; Schantz et Dhoot, 1987) ont mis en évidence l'existence d'isoformes de MHC distinctes dans des fibres de type ATPasique différents (type I lent, types IIA et IIB rapides).

Les isoformes identifiées à ce jour comportent 5 isoformes rapides, 5 lentes et 2 développementales.

a. Les isoformes rapides

Deux des isoformes rapides, MHC IIA et MHC IIB sont présentes dans de nombreuses espèces (Dalla-Libera, 1981 ; Danieli-Betto et coll., 1986 ; Staron et Pette, 1987 b). Ces isoformes de MHC furent tout d'abord identifiées dans les muscles squelettiques de rat par immunohistochimie et par électrophorèse SDS PAGE. De plus, deux ARN messagers différents ont pu être isolés dans les muscles squelettiques de rat (Wieczorek et coll., 1985).

Muscles en développement		Muscles adultes	
Embryonnaires	Néonataux	Rapides	Lents
MHC emb MHC β slow	MHC néo (MHC emb)	MHC IIB MHC IIX MHC IIA	MHC β slow
MLC 1 emb	MLC 1 fast	MLC 1 fast	MLC 1 slow, ventriculaire
MLC 1 slow a MLC 1 fast MLC 2 fast	(MLC 3 fast) MLC 2 fast	MLC 3 fast MLC 2 fast	(MLC 1 slow a) MLC 2 slow
Actine α cardiaque	Actine α squelettique	Actine α squelettique	Actine α squelettique
Actine α squelettique	(Actine α cardiaque)		
TnC fast TnC slow/cardiaque	TnC fast	TnC fast	TnC slow/cardiaque
TnI slow	TnI fast	TnI fast	TnI slow
TnT cardiaque	TnT fast, foetales	TnT fast adultes	TnT slow
TnT slow			
TM β	TM β	TM α fast	TM α slow
TM α fast	TM α fast	(TM β)	TM α fast
TM α slow			TM β

Tableau 1 : Combinaisons possibles entre les isoformes de protéines contractiles en fonction des différents types de muscle (Schiaffino et Reggiani, 1996). Les isoformes entre parenthèses sont minoritaires.

Une forme supplémentaire de MHC rapide (MHC IIX) a été identifiée par immunoblot (Schiaffino et coll. 1989, 1990). Indépendamment de ces travaux, d'autres auteurs ont mis en évidence une isoforme de MHC rapide particulièrement abondante dans le diaphragme de rat (Bar et Pette, 1988 ; Termin et coll. 1989 a, b, 1990). Cette isoforme, dénommée MHC IID présente un profil de migration électrophorétique identique à celui de la MHC IIX. La séparation de ces 2 isoformes par immunoblot s'étant révélée impossible, il est généralement admis que la MHC IID serait identique à la MHC IIX. Cette isoforme est exprimée par les fibres dont les propriétés métaboliques et contractiles sont intermédiaires entre celles des fibres IIA et IIB (Bottinelli et coll., 1991 ; Larsson et coll., 1991 ; Bottinelli et coll., 1994). L'existence de la MHC IIX a été définitivement établie depuis l'isolation du cDNA spécifique (De Nardi et coll., 1993). Récemment, des expériences d'hybridation in situ menées en parallèle avec des expérimentations d'immunohistochimie ont montré que l'expression des transcrits de MHC (MHC IIX, MHC IIA et MHC IIB) se corrélait particulièrement bien avec l'existence d'isoformes de MHC différentes (De Nardi et coll., 1993). La présence de trois isoformes de MHC différentes est donc admise.

Deux autres isoformes de MHC sont exprimées spécifiquement dans certains muscles. Il s'agit d'une isoforme dite "super rapide" : MHC IIM présente dans les muscles masticateurs de carnivores (Rowlerson et coll., 1981 ; Mascarello et coll., 1982), et d'une MHC rapide (MHC eom) présente dans certaines fibres à contraction "super rapide" des muscles extra-oculaires (Wieczorek et coll., 1985 ; Sartore et coll., 1987).

b. Les isoformes lentes

La MHC I principalement exprimée dans les fibres lentes (Gauthier et Lowey, 1979) est également présente dans le muscle cardiaque (β MHC card) (Lompré et coll., 1984). Une isoforme supplémentaire (MHC I ton pour "tonic") a été identifiée dans les fibres lentes toniques des muscles extraoculaires et les fibres intrafusales (Sartore et coll. 1987 ; Mascarello et Rowleron 1992). Des expériences récentes suggèrent qu'il y aurait en fait trois isoformes de MHC lentes (Hughes et coll., 1993). Ces formes mises en évidence dans les muscles squelettiques de l'homme et du rat apparaîtraient successivement au cours du développement. Il existerait ainsi des formes lentes embryonnaire, néonatale et adulte. Cependant, l'identité de ces isoformes est à ce jour encore inconnue.

c. Les isoformes développementales

Deux isoformes spécifiques de MHC, la myosine embryonnaire (MHC emb) et la myosine néonatale (MHC néo) ont été décrites chez les mammifères dans les muscles au cours du développement (Whalen et coll., 1979, 1981 ; Carraro et Catani, 1983 ; Butler-Browne et Whalen, 1984).

Il a été démontré récemment que ces formes développementales sont également exprimées chez certains muscles adultes spécifiques et plus particulièrement les muscles extraoculaires (Wieczorek et coll., 1985 ; Sartore et coll., 1987), le masséter de souris (d'Albis et coll., 1986), le masséter humain (Soussi-Yanicostas et Butler-Browne, 1991), des muscles en régénération (d'Albis et coll., 1988), des muscles dénervés (Biral et coll., 1989) et des fibres intrafusales (Kucera et Walro, 1989). Un

exemple de profil de migration électrophorétique de différentes isoformes de MHC identifiées chez le rat est représenté par la figure 7.

Le typage ATPasique est habituellement corrélé à la composition en MHC de la fibre.

Ainsi, la MHC IIB est exprimée dans les fibres de type ATPasique IIB et la MHC IIA dans les types IIA. Ces isoformes rapides peuvent coexister pour donner le type IIAB. L'expression de la MHC I caractérise le type I lent. De plus, les isoformes de MHC I et IIA peuvent s'associer et constituent alors une population de type IIC (lorsque la MHC IIA est davantage exprimée que la MHC I) à activité ATPasique intermédiaire. Lorsque la MHC I est prédominante, la fibre s'oriente vers un type IC (pour classification voir Termin et coll., 1989 a). Il a été démontré que les fibres de type IIC, couramment observées au cours du développement post-natal ou sur des muscles dénervés ou en phase de régénération représenteraient plutôt un continuum entre les fibres de type I et les fibres de type IIA (Staron et Pette, 1986). Des expériences d'immunohistochimie (Soussi-Yanicostas et coll., 1990) ont révélé que ces fibres de type IIC contenaient, en plus des isoformes I et IIA, une proportion variable de MHC développementales. La régression de ces MHC développementales et l'orientation des fibres de type IIC vers des types I et IIA est un phénomène requérant très probablement la présence de l'innervation (Gao et Kennedy, 1992). Le type IIC représenterait alors un état de transition du type IIA vers le type I et ceci aboutirait à un renforcement de l'expression du type I chez les muscles lents, conséquence directe du développement post-natal.

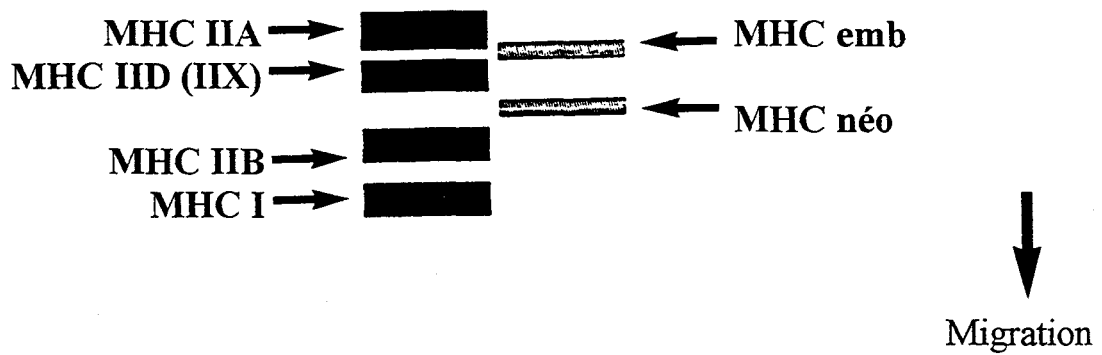


Figure 7 : Migration électrophorétique sur gradient SDS-PAGE des isoformes de MHC : MHC embryonnaire (MHC emb), MHC néonatale (MHC néo), MHC lente (MHC I) et MHC rapides (MHC IIA, IID ou IIX et HCIIB) (d'après Termin et coll., 1989 b).

VI - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT FIN

Ces protéines sont essentiellement représentées par l'actine et les protéines régulatrices qui lui sont associées, les troponines et la tropomyosine (figure 8).

A - L'actine

L'actine est le constituant principal du filament fin. Elle est dite motrice à cause de son rôle dans la création de la contraction musculaire. Sous forme monomérique (actine G), c'est une protéine globulaire de 43 kDa, qui se polymérise en double filament hélicoïdal (actine F). In vitro, sa polymérisation peut être induite par une augmentation de la concentration saline, jusqu'à un niveau proche du niveau physiologique. Cette molécule est hautement conservée puisque sa séquence en acides aminés varie très peu d'une espèce à l'autre. Elle existe cependant sous différentes formes qui sont exprimées de façon transitoire au cours du développement musculaire. La β et γ actine que l'on trouve à la fois dans les cellules musculaires et non musculaires sont exprimées très tôt au cours du développement musculaire. L' α actine cardiaque et squelettique, spécifiquement musculaires, sont exprimées durant la vie embryonnaire. Chez l'adulte, l' α actine squelettique est la forme prédominante.

En l'état actuel des connaissances, aucune isoforme spécifique d'un type contractile donné n'a été identifiée.

B - La tropomyosine

Avec le complexe des troponines, elle constitue le groupe des protéines régulatrices liées au filament d'actine. La tropomyosine (TM) se loge dans le sillon du

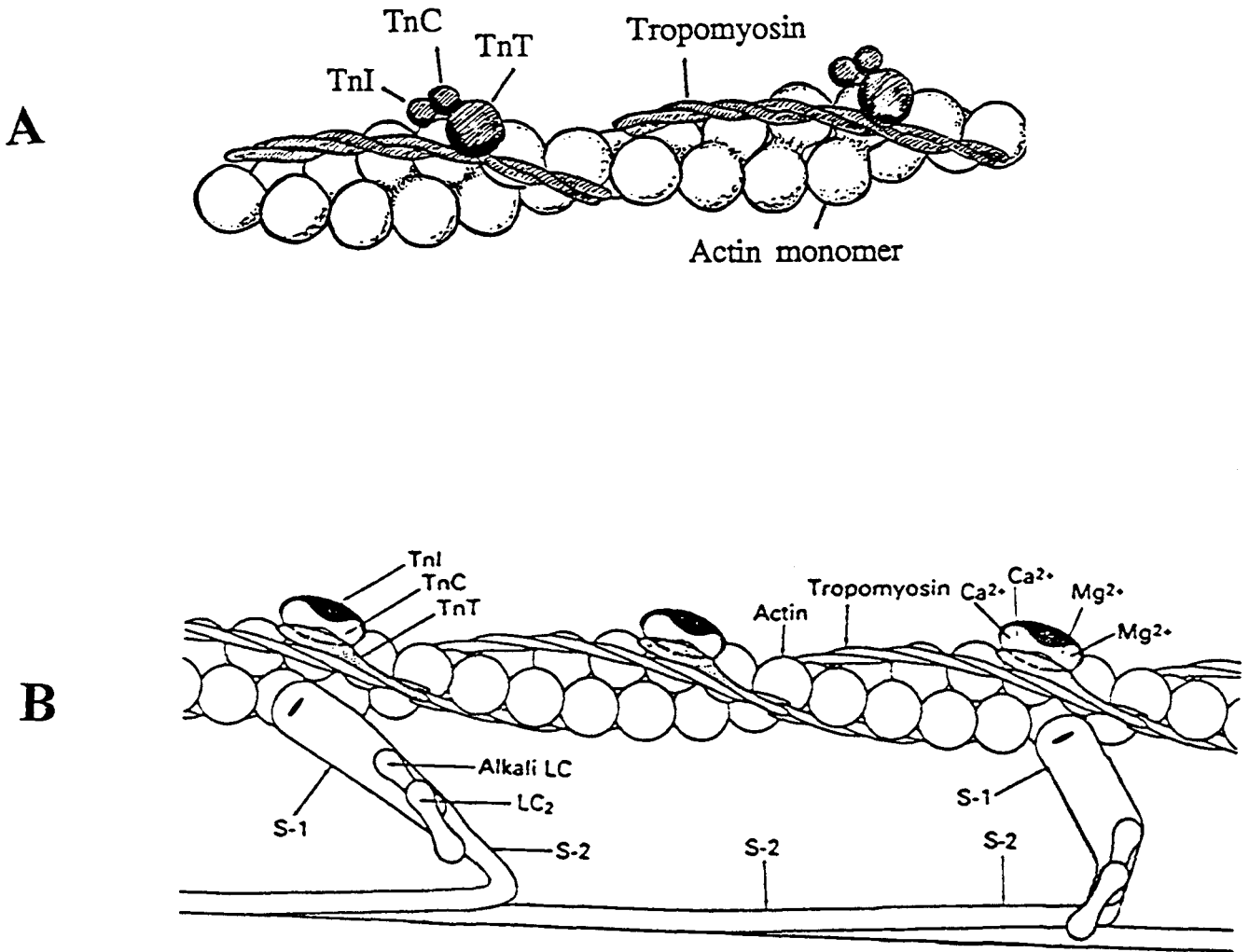


Figure 8 : **A** : Représentation schématique du filament fin, (d'après Jones et Round, 1990).

B : Mécanisme d'association du filament fin avec le filament épais de myosine.

double filament d'actine. C'est une protéine dimérique (PM 65 kDa) formée de 2 sous unités α TM et β TM (Cummins et Perry, 1973, 1974). Dans le muscle squelettique, des combinaisons sous forme d'homodimères (α/α , β/β) ou d'hétérodimère (α/β) sont possibles.

Des isoformes lentes et rapides de la sous unité α existent et ont été identifiées chez plusieurs espèces animales dont le rat. Trois gènes différents, identifiés, codent pour les sous unités β (Helfman et coll., 1986), α lente (Ruiz-Opazo et Nadal-Ginard, 1987 ; Wieczorek et coll., 1988) et α rapides (Reinach et Macleod, 1986 ; Clayton et coll., 1988). Le rapport des sous unités α/β est plus élevé chez les muscles rapides que chez les muscles de type lent (Cummins et Perry, 1973). Ainsi, les fibres de type II du muscle psoas de lapin expriment la sous unité α rapide de la TM alors que les deux sous unités α lente et rapide de la TM sont présentes dans les fibres de type I lent du muscle soleus.

C - Les troponines

Ce sont les protéines initiatrices de la contraction musculaire. Le complexe des troponines comporte 3 sous-unités fonctionnellement différentes : la troponine T (TnT) qui assure la liaison à la tropomyosine, la troponine C (TnC) responsable de la fixation du calcium, la troponine I (TnI) à rôle inhibiteur qui, en absence de Ca, se lie à l'actine et l'empêche de s'associer à la myosine.

La libération de Ca dans le sarcoplasme induit une série de changements conformationnels déjà évoqués dans ce chapitre (voir figure 4). En se liant au calcium, la TnC change de conformation et provoque le basculement du complexe TM-Tn. La TnI

libère le site de liaison de l'actine à la myosine. La création de ponts entre l'actine et la myosine est alors possible.

Des isoformes lentes et rapides ont été identifiées pour chacune des sous-unités de la troponine. Les différences de sensibilité au Ca entre les fibres isolées lentes et rapides ont fréquemment été attribuées aux isoformes de TnC présentes dans la fibre (Laszewski-Williams et coll., 1989 ; Ruff, 1989). En effet, il a été démontré sur des fibres isolées de lapin que le niveau de tension développé en fonction du taux de calcium présent (relations Tension/pCa) dépendait des isoformes de TnC (Moss et coll., 1986). Toutefois, ces différences pourraient également être attribuées à l'interaction TnT-TnC.

Les protéines contractiles aussi bien motrices que régulatrices sont exprimées à des stades différents du développement musculaire. L'ensemble de ces processus débutant à des stades précoces de la myogénèse constitue la maturation musculaire.

VII - FORMATION DES MUSCLES SQUELETTIQUES

A - La myogénèse

La myogénèse est l'ensemble des processus qui régissent la formation du tissu musculaire. Elle débute au stade embryonnaire par la formation de myoblastes. Ce sont des cellules mononucléées post-mitotiques capables de fusionner et de synthétiser des protéines contractiles musculaires (Holtzer et coll., 1970, 1975).

Sous l'influence de certains facteurs externes (densité cellulaire, agents mitogènes), les myoblastes quittent le cycle cellulaire et s'engagent dans la voie de la différenciation

terminale. Le passage en stade terminal active alors le programme myogénique ; cette étape correspond à la fusion des myoblastes en myotubes (figure 9).

Parallèlement, se produisent des modifications biochimiques amenant à l'expression des protéines caractéristiques de la future fibre musculaire (synthèse d'actine, de myosine, de troponines) et d'enzymes spécifiques (créatine phosphokinase). Au cours du développement embryonnaire, les myoblastes prolifèrent pour former progressivement les fibres musculaires qui acquièrent au cours des premières semaines post-natales leurs caractéristiques adultes notamment sous l'influence de facteurs hormonaux et nerveux.

Au cours de l'ontogénèse musculaire, on assiste à l'apparition séquentielle de deux générations de myotubes. Les myotubes de première génération ou myotubes primaires (longueur 100 à 300 μm) sont habituellement groupés par 3 et entourés d'un nombre variable de cellules mononucléées indifférenciées. Ensuite chaque myotube primaire s'isole en entraînant un certain nombre de cellules mononucléées. Le myotube et ses cellules s'entourent alors d'une membrane basale commune (formée à partir du 19^{ème} jour de gestation chez la souris ; Cardasis et Cooper, 1975). C'est à l'intérieur de cette membrane basale que se développe à partir des cellules mononucléées, la deuxième génération de myotubes ou myotubes secondaires (Ontell et Dunn, 1978).

A la fin de la myogénèse primaire, les motoneurones ont établi des contacts avec les myotubes primaires et chaque myotube est alors innervé par plusieurs axones. C'est au niveau de ces jonctions que viennent se former les myotubes secondaires. Les axones innervant les myotubes primaires entrent progressivement en contact avec les myotubes secondaires. Les myotubes secondaires ne deviendraient polyinnervés qu'après leur séparation des myotubes primaires. Au cours des deux à trois semaines suivant la

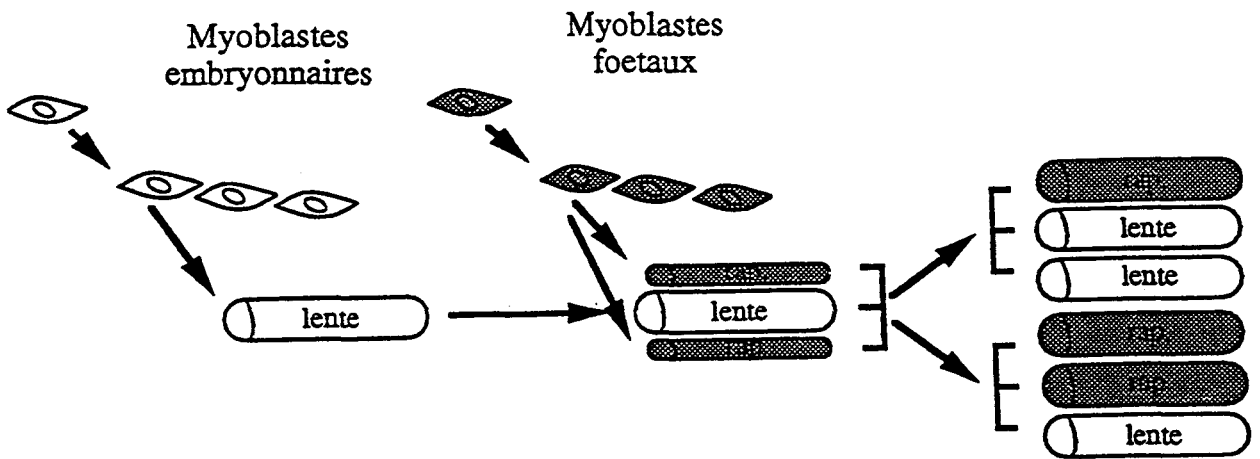


Figure 9 : Schéma récapitulatif de la formation des fibres.

👁️ : Myoblaste destiné à exprimer l'isoforme de MHC lente.

🐟 : Myoblaste destiné à exprimer les isoformes de MHC rapides.

naissance, la plupart des axones dégèrent pour faire place à une configuration monosynaptique. Chez l'adulte, les fibres ne sont innervées que par un seul axone.

Dans le muscle Extensor Digitorum Longus (EDL) d'un rat âgé de 2 jours, les agrégats de fibres primaires et secondaires situés sous une membrane basale commune représentent encore 40 % du total des fibres musculaires indépendantes. Au 5ème jour post-natal, ils ne représentent plus que 2 % de la population totale des fibres striées et 1 % au 8ème jour post-natal. Dès le 19ème jour de gestation, dans le muscle EDL, le nombre de fibres de type I est proche de celui du muscle adulte (environ 3 %). Rubinstein et Kelly (1981) en concluent que la population de fibres lentes dans l'EDL adulte est déjà déterminée avant la naissance et représente en fait les myotubes de première génération.

Dans les semaines suivant la naissance, histochimiquement, les fibres du soleus se transforment de type II en type I à cause de la conversion de leurs motoneurones (Rubinstein et Kelly, 1978). Ce changement a été considéré par Rubinstein et Kelly (1981) comme une adaptation du muscle à une situation où il est utilisé pour le développement de la posture. Une certaine diversité des types de fibres peut être détectée immunohistochimiquement dès le 16ème jour de gestation. A ce stade (figure 10), toutes les fibres expriment la MHC embryonnaire (MHC emb), mais certaines expriment également la MHC I, lente et d'autres la MHC néonatale (MHC néo). Ainsi, les fibres de première génération sont le résultat de deux sous populations de fibres présentant soit la MHC néo et la MHC emb, soit la MHC I et la MHC néo. Au cours de la maturation, ces fibres s'orienteront vers un type I lent. Les fibres de deuxième génération expriment la MHC néo, certaines au niveau du soleus présentent également la MHC I (Condon et coll., 1990).

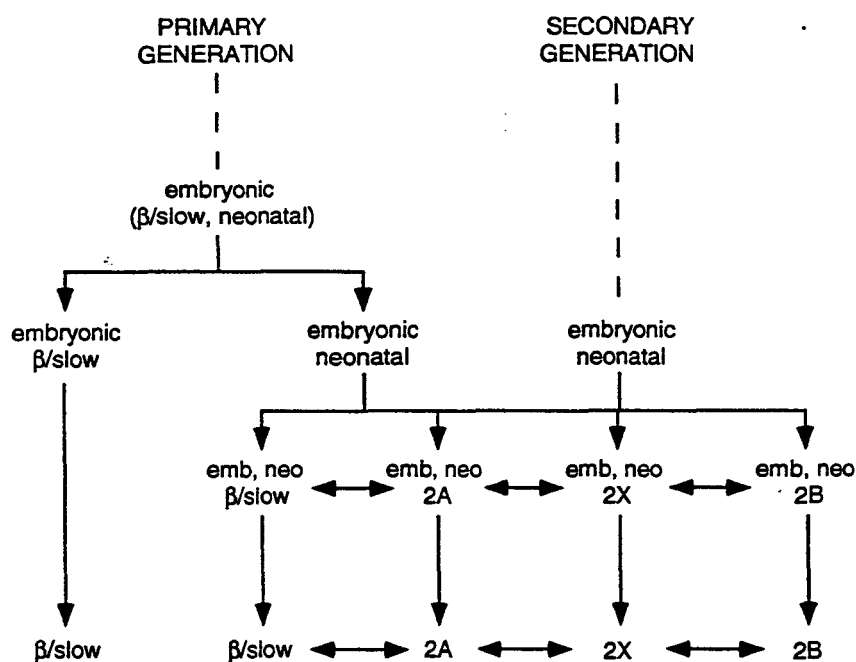


Figure 10 : Etapes de la diversification des fibres du muscle squelettique de rat (d'après De Nardi et coll., 1993). La première étape a lieu durant le développement embryonnaire et est caractérisée par l'apparition de la diversité des fibres de première génération en fibres exprimant la MHC I et en fibres exprimant la MHC néo. La deuxième étape, après la naissance consiste en l'émergence des MHC IIA, IIB et IIX.

B - La croissance post-natale

Le système musculosquelettique se caractérise par sa plasticité qui lui permet d'évoluer entre les périodes embryonnaire, néonatale et adulte.

Ainsi à la naissance, les muscles squelettiques de rongeurs présentent une forte proportion de fibres de type histochimique IIC indifférencié. Durant les premières semaines suivant la naissance, la différenciation des fibres s'affine. Cependant, les études histochimiques entreprises sur le phénomène de différenciation cellulaire restent très limitées et même controversées : ainsi l'expression des fibres de type I du soleus de rat commence à partir du 2ème jour post-natal pour Brooke et coll. (1971) mais pour Okada et coll. (1984), elle ne débute qu'à partir du 5ème jour post-natal, et pour Umezu et coll. (1992), à partir du 12ème jour post-natal. Lorsque la différenciation est amorcée, le typage du muscle présente alors une proportion équivalente de fibres de type I et de fibres de type IIC.

Durant les premières semaines suivant la naissance, la proportion des fibres de type I restera relativement constante alors que les fibres de type IIC se transformeront graduellement en fibres de type IIA ou IIB (Baldwin, 1984). Ces changements reflètent les transitions existant entre les différentes isoformes de myosine embryonnaire, néonatale et adultes (Whalen et coll., 1979 ; Butler-Browne et Whalen, 1984).

Durant ces phases de maturation, le muscle présente un accroissement de sa taille et de sa longueur (Baldwin, 1984). L'accroissement de la longueur des fibres est attribuée à un ajout de sarcomères en série à chaque extrémité de la fibre. Comme le nombre de fibres musculaires reste constant dès que le développement embryonnaire est achevé (Timson et Dudenhoefter, 1990), l'accroissement du diamètre du muscle est le résultat de l'accroissement du diamètre des fibres existantes. Celui-ci semble provenir de

la prolifération des myofibrilles (Goldspink, 1983 ; Saltin et Gollnick, 1983). La croissance des fibres musculaires a une signification fonctionnelle. Il semble en effet qu'elle coïncide avec l'installation d'une configuration nerveuse monosynaptique et avec le développement des fonctions posturales.

C - La mise en place de l'innervation définitive

L'installation de l'innervation définitive est une étape importante du développement musculaire post-natal. La plupart des muscles présentent différents types de fibres. Le typage est habituellement sous la dépendance étroite du système nerveux. Chaque neurone moteur vient innover un certain nombre de fibres qui présenteront toutes un typage semblable. Les motoneurones possèdent eux-mêmes des types différents qui influenceront le typage des fibres musculaires qu'ils innervent (Burke, 1981).

L'installation de l'innervation est un évènement précoce qui fait intervenir certaines formes de reconnaissance, encore mal identifiées, entre les fibres nerveuses et les fibres musculaires. Dès le stade embryonnaire, l'innervation polyneurale s'installe. Les membranes des myotubes expriment une forte proportion de récepteurs à acétylcholine sur lesquels viennent se fixer des axones moteurs. Ainsi, une fibre musculaire reçoit plusieurs terminaisons nerveuses différentes qui la maintiennent en un état indifférencié. L'installation de l'innervation définitive monosynaptique coïncide avec l'élimination de la plupart des récepteurs à acétylcholine. Les récepteurs restants ne seront exprimés qu'au niveau de la jonction neuromusculaire définitive.

Chez le rat, l'innervation polyneurale régresse progressivement pour faire place à une configuration monosynaptique au cours des 2 premières semaines post-natales (Bennett et Petitgrew, 1974 ; Brown et coll., 1976). Dans le même temps des transitions

dans l'expression des isoformes de myosine des fibres musculaires ont lieu. Le type de nerf innervant une fibre donnée influence de manière certaine le contenu en myosine de cette fibre. Il a été montré par des techniques ATPasiques et de déplétion glycolytique qu'à 8 jours post-nataux le soleus de rat présente encore une innervation polyneurale, tandis qu'à partir du 16^{ème} jour post-natal l'essentiel de cette polyinnervation est éliminé (Thompson et coll., 1984 ; Condon et coll., 1989). Durant cette période, le soleus contient environ 55 % de fibres de type lent et 45 % de fibres de type rapide exprimant des isoformes de MHC développementales. L'examen des unités motrices démontre donc qu'à la différence des muscles adultes, celles-ci ne sont pas homogènes. Un panachage de fibres lentes et rapides existe au sein d'une même unité motrice (Gordon et Van Essen, 1985 ; Jones et coll., 1987).

Chez le soleus de rat nouveau-né, Fladby et Jansen (1990) ont démontré que par unité motrice examinée, seulement 50 à 70 % des fibres musculaires exprimaient les mêmes isoformes de myosine. A partir de 2 semaines post-natales, ces mêmes unités motrices ne présentent plus qu'un seul type de fibre musculaire en total accord avec le type du nerf considéré (Fladby et Jansen, 1990). La perte de l'innervation polyneurale coïncide d'une part avec le développement de la posture et d'autre part avec une modification de l'activité électromyographique du muscle soleus (Westerga et Gramsbergen, 1994). In vivo, l'activité des fibres musculaires provoque la libération d'ions potassium qui provoquent une dégénérescence des récepteurs à acétylcholine (figure 11). Une élimination synaptique a lieu de telle sorte qu'il ne subsiste qu'une seule jonction neuromusculaire par fibre (Laufer et coll., 1989).

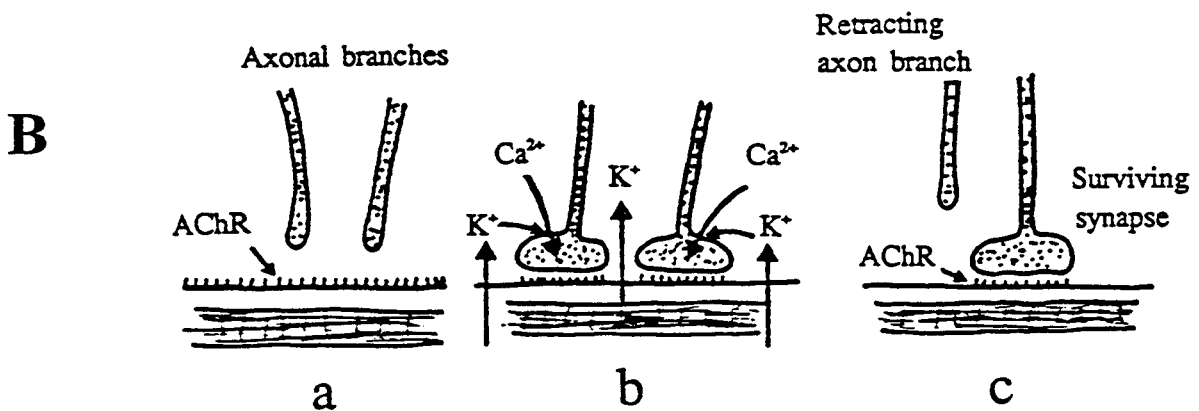
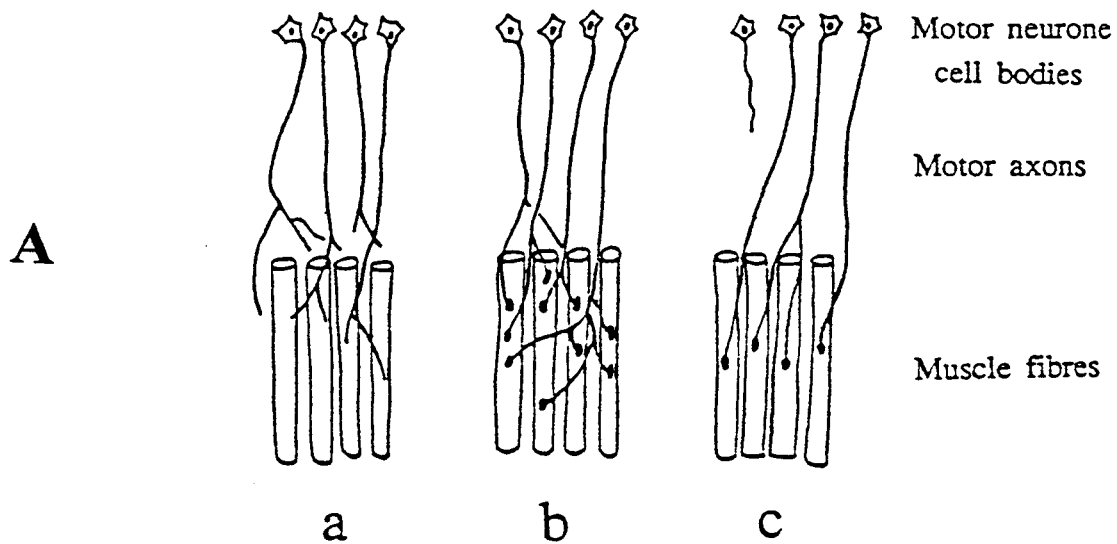


Figure 11 : **A** : Invasion des muscles par les neurones moteurs, (d'après Jones et Round, 1990). Les branches neuronales envahissent tout d'abord le muscle de fœtus (a), puis des synapses multiples se forment à la surface de chaque fibre (b) qui présente alors une innervation polyneurale. Au cours de la maturation musculaire, il se produit une élimination sélective synaptique, de telle sorte qu'une seule d'entr'elles persistera (innervation monosynaptique, c).

B : Processus détaillé de l'élimination synaptique (d'après Jones et Round, 1990). De nombreux axones moteurs innervent encore une fibre musculaire (a). L'apparition d'une activité musculaire provoque un relargage de potassium (K^+) dans l'espace présynaptique (b). Au cours de la maturation fibrillaire, l'activité contractile des fibres musculaires induit d'une part une réduction du nombre de récepteurs à l'acétylcholine et d'autre part cause le retrait de toutes les jonctions neuromusculaires, à l'exception d'une seule qui constituera la jonction neuromusculaire définitive (c).

La libération de potassium des fibres musculaires provoque l'ouverture de canaux calciques - potassium dépendants de la membrane de la terminaison axonale. L'entrée de calcium au niveau terminal du nerf stimule des protéases Ca-dépendantes qui attaquent les neurofilaments terminaux de la membrane présynaptique. Les axones se rétractent à l'exception d'un seul qui constituera la jonction neuromusculaire définitive. L'axone survivant pourrait être le plus développé. Sa taille importante serait un atout car elle lui permet, grâce à un grand volume, de garder sa concentration en calcium à un taux relativement bas (Vrbova et Lowrie, 1989).

Dans le même temps, le typage du muscle s'oriente davantage vers un typage adulte (régression importante de la MHC néo, augmentation de l'expression des isoformes adultes de MHC : MHC I et MHC IIA).

D - Les transitions des isoformes de myosine au cours du développement musculaire

Certaines isoformes de myosine semblent être dépendantes de la présence ou non de l'innervation définitive. Il a été démontré que la présence de l'innervation définitive influence différemment les muscles lents et les muscles rapides. Ainsi, une dénervation des membres postérieurs de rat pratiquée à un stade précoce du développement post-natal (1 semaine après la naissance), conduit à une atrophie des fibres musculaires mais ne modifie pas la cinétique d'apparition des myosines adultes rapides. De plus, la disparition de la MHC néo reste similaire à celle observée chez les muscles contrôles. Ces travaux suggèrent que le programme de transition des myosines rapides et néonatale chez un muscle rapide est davantage lié à des facteurs endogènes (Carraro et coll., 1979 ; Butler-Browne et coll., 1982 ; Whalen et coll., 1982).

Par contre, en ce qui concerne les muscles squelettiques lents, la dénervation interrompt le programme d'expression de la myosine lente. Elle provoque une répression de la synthèse de la MHC lente et induit l'apparition de fibres de type rapide (Carraro et coll., 1981 ; Gauthier et Hobbs, 1982). Gauthier et coll. (1984) ont utilisé le curare afin de prévenir l'élimination de l'innervation polyneurale qui chez le poulet a lieu normalement à la fin du développement embryonnaire. Lorsque le muscle est paralysé au 18ème jour d'incubation, il peut encore contenir un excès de terminaisons nerveuses, qui normalement, devraient être éliminées à cette date chez un muscle contrôle. Les muscles de type rapide ne semblent pas être affectés par l'injection, mais en ce qui concerne les muscles lents, les fibres présentent des signes de transformation. Elles n'expriment plus la MHC lente et de nouvelles populations de myosine, non identifiées dans cette étude, apparaissent. Il semblerait donc que les fibres de type lent puissent être préférentiellement affectées lors d'une modification de l'innervation.

1. Les isoformes développementales de la myosine

Des étapes de transition dans l'expression des isoformes de myosine existent au cours de la vie foetale et post-natale. Il a été démontré que des isoformes développementales (embryonnaire et néonatale) étaient exprimées à des stades précis du développement (Whalen et coll., 1979, 1981 ; Butler-Browne et coll., 1982).

- La myosine embryonnaire

La présence de myosine embryonnaire a pu être détectée à l'aide d'anticorps polyclonaux. Condon et coll. (1990) ont ainsi établi chez le rat la présence de MHC emb dès le 14ème jour de gestation. Cette isoforme est abondamment exprimée dans

l'ensemble des fibres primaires et secondaires des muscles du membre postérieur de rat jusqu'au 20ème jour de gestation. L'expression de cette isoforme décroît ensuite graduellement au cours du développement post-natal. Elle disparaît totalement au cours de la première semaine post-natale (Butler-Browne et Whalen, 1984 ; La Framboise et coll., 1990). Par des techniques d'électrophorèse bidimensionnelle sur muscle entier, une MLC 1emb a également été détectée au 4ème jour post-natal (La Framboise et coll., 1990). Cette MLC 1emb disparaît cependant au cours de la 1ère semaine de vie post-natale en même temps que la MHC emb. L'expression temporelle de cette myosine embryonnaire ne semble pas être régulée différemment suivant le type de muscle puisque sa durée d'expression est la même pour des muscles de type rapide (EDL, diaphragme) ou lent (soleus).

- La myosine néonatale

Jusqu'à présent, seule la chaîne lourde de myosine a été détectée. Narusawa et coll. (1987) l'ont en effet identifiée par utilisation d'anticorps à partir du 18ème jour de développement embryonnaire chez les muscles EDL et Tibialis Anterior. La MHC néo est préférentiellement présente dans les myotubes secondaires (Thompson et coll., 1990). Elle est abondamment exprimée durant les 2 premières semaines de vie post-natale puis tend à diminuer progressivement entre 2 et 3 semaines (Butler-Browne et Whalen, 1984). Sa fréquence de disparition semble dépendante du type de muscle (La Framboise et coll., 1990). Ainsi, pour des muscles tels que l'EDL ou le diaphragme, elle disparaît totalement au 30ème jour post-natal, tandis qu'elle peut encore être occasionnellement exprimée dans le muscle soleus au 60ème jour.

2. La myosine lente

L'existence d'une activation génique a été détectée à l'aide de sondes cDNA spécifiques à partir du 16ème jour de gestation sur le muscle soleus (Narusawa et coll., 1987). La synthèse de myosine lente semble être un événement précoce de la myogénèse. De plus, elle est exprimée conjointement avec la myosine embryonnaire. Il a été démontré que tous les myotubes primaires expriment aussi bien la MHC I que la MHC emb. Les travaux de Condon et coll. (1990) montrent que la synthèse de myosine lente débute bien avant que les premiers contacts neuromusculaires soient établis. En effet, suite à un traitement par bungarotoxine qui élimine toute jonction neuromusculaire, il a été démontré que les fibres musculaires du train postérieur de rat étaient capables d'exprimer d'une part des isoformes de myosine développementales et d'autre part la myosine lente. Il existerait donc un mécanisme de pré-détermination du type de fibres indépendant de l'innervation. Cependant, l'établissement d'une innervation polyneurale puis monosynaptique est indispensable au déroulement de la myogénèse normale et à la différenciation des fibres musculaires. En effet, des expériences de dénervation néonatale provoquent sur le muscle soleus une diminution rapide de la MHC lente au profit du renforcement de l'expression des formes rapides. On peut donc penser que dans ce muscle la présence de l'innervation protège et amplifie le programme de synthèse de la MHC I.

Des isoformes développementales de la MHC I semblent exister mais leur profil de migration électrophorétique et leur réaction aux anticorps classiques sont semblables à ceux de la MHC I adulte. Il existerait une forme lente exprimée dès les stades embryonnaires puis une forme lente "néonatale" exprimée après le 27ème jour post-natal. L'expression de cette dernière viendrait s'ajouter dans une certaine population

de fibres à celle de la MHC I déjà présente dès le stade embryonnaire (Hughes et coll., 1993). Après l'établissement de l'innervation définitive, il se produit parallèlement au niveau du muscle soleus une accumulation de MHC lente, et une régression des isoformes développementales de MHC (Butler-Browne et Whalen, 1984) ; le muscle soleus acquiert alors progressivement son typage adulte.

3. Les isoformes rapides de la myosine

Il s'agit ici des isoformes de MHC IIA et IIB. Les gènes sont exprimés au cours de la vie foetale puis réprimés transitoirement à la naissance (De Nardi et coll., 1993). Excepté dans le diaphragme où la protéine MHC IIA a pu être identifiée à un stade précoce du développement post-natal (4ème jour, Watchko et coll., 1992), les MHC IIA et IIB réapparaissent habituellement vers le 14ème jour post-natal pendant l'établissement de l'innervation définitive. Umezumi et coll. (1992) ont pu démontrer que les types histochimiques IIA et IIB n'apparaissent en ATPase qu'à partir du 15ème jour post-natal, tant sur le soleus que sur l'EDL. Leur proportion augmente graduellement jusqu'au stade adulte.

E - Les autres protéines contractiles

Il s'agit essentiellement du complexe des troponines et de la tropomyosine. Jusqu'à présent, aucune isoforme développementale spécifique n'a été détectée pour ces protéines à l'exception de la TnT. Cinq isoformes embryonnaires de la TnT ont été identifiées chez le rat et l'homme (Sabry et Dhoot, 1991) et chez le lapin (Briggs et Schachat, 1993). Des transitions des formes foetales vers les formes rapides de TnT existent à la naissance (Briggs et coll., 1990). Les formes rapides de TnT semblent être

préférentiellement associées à une prédominance de la forme α de la TM. Néanmoins, les transitions des formes développementales vers les isoformes adultes sont achevées au cours de la première semaine de développement post-natal, et semblent n'avoir lieu que chez les muscles rapides. Aucune isoforme développementale de la TnT n'a jusqu'à présent été détectée chez les muscles lents (Reiser et coll., 1992). Leeuw et coll. (1994) ont montré qu'à 2 jours post-natals, le soleus de lapin comportait en effet 90 % de TnT lente de type adulte. La TnC lente est également exprimée à 60 % et le taux d'expression de la TnI lente passe de 50 % à 2 jours post-natals à 60 % au 8ème jour post-natal.

De plus, la dénervation du soleus ne semble pas affecter les isoformes de TnT et de TnI. Il semblerait d'après Leeuw et coll. (1994) que les TnT et TnI ne soient pas sous la dépendance directe de l'innervation. Une augmentation de la proportion en TnC rapide est seule observée.

Il apparaît donc que l'influence directe de l'innervation se manifeste préférentiellement sur le système d'expression temporelle des isoformes de myosine. Des expériences de dénervation montrent qu'il peut exister des stades "critiques" du développement où la sensibilité du système musculaire face au système nerveux est accrue. En effet une dénervation néonatale ne bloque pas l'apparition de la MHC IIB mais interfère avec la MHC IIA et retarde la disparition de la MHC néo. Ces effets sont variables suivant le type de muscle étudié (pour revue, voir Schiaffino et Reggiani, 1996). Les transitions existant entre les isoformes de MHC paraissent dépendre d'un programme pré-déterminé où l'apparition de l'innervation définitive joue un rôle-clé. L'installation de la forme monosynaptique de l'innervation coïncide également avec le

développement de la posture et d'une manière générale avec la sollicitation des muscles au niveau de chaque mouvement.

F - Les interactions entre le calcium et les protéines contractiles

1. L'établissement de la relation Tension/taux de calcium

L'augmentation du taux de calcium intracytoplasmique induit la contraction des fibres musculaires. La rupture du sarcolemme par pelage permet une approche directe de la machinerie contractile qui devient accessible aux ions. Le milieu baignant les fibres pelées doit contenir de l'ATP puisqu'elles sont incapables d'en synthétiser et doit ressembler le plus possible au myoplasme puisque des facteurs tels que le pH, la concentration en magnésium, la force ionique et la température affectent la réponse du système contractile au Ca (Ashley et Moiescu, 1977).

Grâce à l'utilisation d'un tampon calcium (Ashley et coll. 1974), qui facilite la manipulation de solutions à teneur en Ca faible, les échanges se font à une vitesse comparable aux échanges réalisés in vivo. Il a été, de plus, possible d'étudier la relation existant entre l'amplitude de la contraction et la valeur de la concentration calcique du milieu. Cette relation est appelée Tension/pCa (T/pCa) où $pCa = -\log [Ca^{2+}]$. Une gamme de concentrations croissantes en Ca libre (pCa) est appliquée à la fibre. La relation entre la tension relative et la concentration en Ca est établie en rapportant les tensions maximales (P) développées par la fibre à la valeur de la tension maximale (P_0) obtenue pour une pCa saturant tous les sites calciques de la TnC.

Il a été montré que la sensibilité au Ca des fibres isolées était différente selon le typage des fibres, lent ou rapide (Laszewski-Williams et coll., 1989 ; Mounier et coll.,

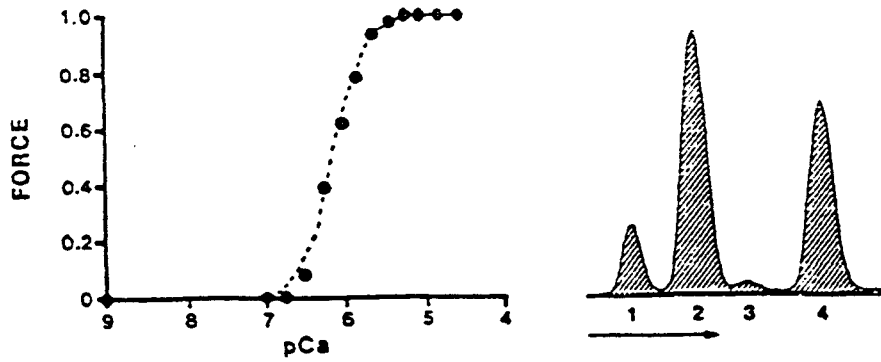
1989). Ce comportement a été attribué à la composition des fibres en protéines myofibrillaires.

2. La modification de la relation T/pCa au cours du développement post-natal

Bien que des transitions importantes d'isoformes de myosine aient lieu au cours du développement post-natal, jusqu'à présent le rôle des protéines régulatrices sur la relation T/pCa a surtout été étudié. Des hypothèses récentes suggèrent que la sensibilité au Ca serait modulée par des isoformes de TnT. Il apparaît que la TnT présente, à la différence de la TnC et de la TnI, des transitions dans l'expression de ses différentes isoformes au cours du développement post-natal (Nassar et coll., 1991). Sur le ventricule de lapin nouveau-né, la TnT est représentée par 4 isoformes rapides différentes : TnT1, TnT2, TnT3, TnT4, dont les proportions relatives évoluent rapidement dans les premiers jours du développement post-natal. Des études font apparaître qu'une diminution de l'isoforme prédominante de TnT, la TnT2, entraîne un déplacement de la relation tension/pCa vers des valeurs de pCa plus faibles, ce qui traduit une baisse de la sensibilité au Ca (figure 12). La sensibilité du système contractile de lapin nouveau-né s'apparente sensiblement à celle observée chez l'adulte. L'existence d'une relation existant entre les isoformes de TnT et la sensibilité au Ca a également été décrite chez le muscle squelettique de poulet (Reiser et coll., 1992). Des variations de sensibilité au calcium seraient corrélable à l'isoforme de TnT présente. La modification de la proportion relative d'isoformes lentes et rapides de la TM, TnI et TnC ne semble pas affecter la relation T/pCa au cours du développement post-natal.

Cependant, de nombreuses transitions existent en ce qui concerne les

A



B

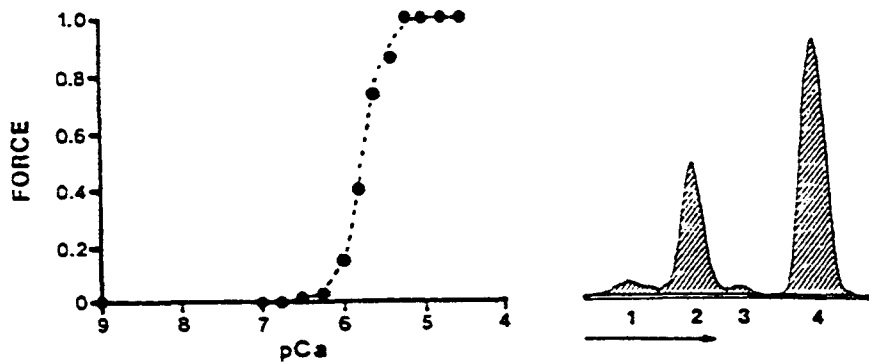


Figure 12 : Illustration de profils densitométriques de Western Blot et de relations Tension/pCa établis sur le ventricule de lapin nouveau-né à deux stades du développement post-natal :

A : à 2 jours post-natals

B : à 5 jours post-natals

Les profils densitométriques représentent le sens de migration électrophorétique des isoformes de TnT; TnT 1 (1), TnT 2 (2), TnT 3 (3) et TnT 4 (4).

A 5 jours post-natals, la diminution significative de l'isoforme de TnT2 provoque un déplacement vers la droite de la relation Tension/pCa (d'après Nassar et coll., 1991).

isoformes de myosine, et il n'est pas à exclure qu'elles puissent influencer la position et ou l'allure de la relation T/pCa au cours du développement post-natal.

VIII - MODIFICATION DU DEVELOPPEMENT EN FONCTION DE L'ACTIVITE MUSCULAIRE

Plusieurs paramètres peuvent influencer et modifier le déroulement normal du programme de transitions pré-établi des différents protéines contractiles.

Parmi les modèles permettant l'étude des facteurs influençant le développement musculaire, il est possible de distinguer ceux affectant la relation nerf-muscle (dénervation, réinnervation...) et ceux, qui tout en préservant l'intégrité de la relation nerf-muscle, peuvent n'affecter que le bon fonctionnement du développement musculaire post-natal. Dans cette dernière catégorie, entrent les facteurs position du muscle et/ou niveau d'activité musculaire. Ils peuvent en effet, s'ils sont modifiés, induire des perturbations structurales et fonctionnelles des protéines contractiles.

Les conditions de **non-utilisation** musculaire peuvent être provoquées par des séjours en microgravité réelle (vols spatiaux) ou par des modèles expérimentaux recréant ces conditions. Les modèles les plus fréquemment utilisés sont l'immobilisation (Fitts et coll., 1989) ou la suspension du train postérieur de rat (Morey-Holton et Wronski, 1981 ; Falempin et coll., 1991). Les expériences d'immobilisation des articulations par plâtrage mettent en évidence l'influence de la position sur les différentes propriétés musculaires. Les muscles squelettiques sont plus ou moins touchés selon leur type ou leur fonction (Stevens et coll., 1993). En effet, les muscles lents posturaux tels

que le soleus sont beaucoup plus sensibles à l'immobilisation que les muscles rapides tels que l'EDL. La position d'immobilisation est également importante : les résultats les plus spectaculaires surviennent lorsque les muscles sont immobilisés dans une position intermédiaire (angle de l'articulation de la cheville maintenu à environ 90°) ou raccourcie (angle proche de 180°). Dans ce dernier cas, la cheville est maintenue en position de flexion plantaire (voir figure 13 dans le chapitre suivant). Les muscles soleus et gastrocnémien sont alors raccourcis au maximum. Un étirement du soleus par plâtrage pendant une période de suspension permet de restaurer les propriétés contractiles (Leterme et coll., 1994) confirmant l'importance de la position d'immobilisation. Il a été démontré qu'après 2 semaines d'immobilisation en flexion plantaire, la masse musculaire et le diamètre des fibres chutent d'environ 50 % (Booth et Kelso, 1973 ; Spector et coll., 1982 ; Baker et Matsumoto, 1988). Les fibres musculaires présentent des symptômes de dégénérescence avancée et une réduction du nombre des sarcomères est également rapportée. Des perturbations structurales, associées à l'atrophie musculaire, interviennent rapidement. En effet, une réduction de la synthèse protéique et/ou une augmentation du catabolisme ont été décrites dans ces mêmes conditions (Goldspink, 1977). Ces modifications seraient maximales après une semaine d'immobilisation. Plus précisément, les auteurs (Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992) rapportent chez le rat adulte une diminution significative de la quantité totale de MHC après 4 jours d'immobilisation du soleus en position raccourcie. De plus, il a été montré que lorsque le muscle soleus de rat nouveau-né est immobilisé en position raccourcie, celui-ci ne se différencie pas complètement en un muscle lent postural (Goldspink et coll., 1992). Il semblerait exprimer préférentiellement les gènes de la myosine de type rapide tandis que le gène de la myosine lente serait réprimé.

A ces modifications structurales s'ajoutent des perturbations de cinétique de contraction des muscles. Le muscle soleus adulte de rat ténotomisé, ou immobilisé en position intermédiaire ou raccourcie se transforme en un muscle de type plus rapide, avec une augmentation du pourcentage de fibres de type II rapide (Booth et Kelso, 1973). Cette transformation peut être empêchée également lorsque le message nerveux est bloqué en présence de tétradotoxine (Falempin et Fodili, 1995) ou après une électrostimulation appropriée (Furby et coll., 1993 ; Leterme et Falempin, 1994). D'autres travaux montrent que l'activité électromyographique du muscle soleus est fortement diminuée ou perturbée par l'immobilisation (Fischbach et Robbins, 1969).

En ce qui concerne les situations **d'hyperactivité**, des transformations vers un typage lent ont été plus fréquemment reportées. Ces modifications sont observées chez le muscle plantaris après excision d'un muscle synergique, le muscle gastrocnémien. Cette ablation conduit à une réaction d'hypertrophie des muscles restant en place, conjuguée d'une part à l'inhibition de l'expression des isoformes rapides de MHC et d'autre part à une potentialisation de l'expression de la MHC I (Baldwin et coll., 1987). De tels résultats ont été obtenus avec des muscles soleus et EDL après excision de muscle Tibialis Antérieur (Leférovich et coll., 1991). Ce type de transformation serait pour le muscle restant en place un moyen d'économiser ses ressources énergétiques, puisque les muscles lents utilisent moins d'ATP.

L'immobilisation de l'articulation de la cheville entraînant la privation de l'activité motrice a donc des répercussions importantes et immédiates sur les différentes propriétés musculaires et plus particulièrement sur les isoformes de myosine.

MATERIELS ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

A - Caractéristiques des animaux

Nos travaux ont porté sur des rats mâles de souche Sprague-Dawley. Les rats utilisés sont d'une part des rats nouveau-nés âgés respectivement de 6, 12, 17 et 23 jours post-nataux et d'autre part des rats adultes âgés de 13 semaines (91 jours post-nataux). Les rats et leur portée ainsi que les rats adultes, sont placés en cages individuelles dans des conditions identiques de température (25°C), de nourriture et d'éclairage (fractionné en cycle circadien de 12 h/12 h).

B - Groupes d'animaux

Les animaux sont divisés en 2 groupes principaux :

- animaux contrôles : animaux âgés respectivement de 6, 12, 17, 23 et 91 jours (5 animaux/sous-groupe) : ces groupes seront respectivement dénommés, 6 j CONT, 12 j CONT, 17 j CONT, 23 j CONT et ADULTE CONT,

- animaux immobilisés : animaux ayant subi une immobilisation de 6 jours (10 animaux/sous-groupe), et alors âgés respectivement de 12, 23 et 97 jours (groupes 12 j IMMO, 23 j IMMO et ADULTE IMMO).

Les âges des animaux ont été choisis en fonction des différents états d'innervation, l'innervation définitive apparaissant entre 12 et 17 jours (Westerga et Gramsbergen, 1994).

Le plâtrage a été réalisé pour une durée de 6 jours aux âges suivants :

- de 6 à 12 jours post-nataux, période où le muscle soleus est encore innervé polyneuralemment,

- de 17 à 23 jours post-natals ; l'innervation du muscle présente alors une configuration monosynaptique,

- de 91 à 97 jours post-natals, le muscle présente un état adulte stable ; sa différenciation et son innervation sont complètes.

C - Caractéristiques des muscles étudiés

Il est connu, sur le rat adulte, que les muscles lents posturaux antigravitaires sont les plus touchés par une période d'inactivité. Nos travaux ont donc porté sur le muscle soleus. Le muscle soleus, impliqué dans la posture et le mouvement de la cheville, est un fléchisseur plantaire. Il est résistant à la fatigue. Histologiquement, il s'agit d'un muscle lent, composé majoritairement de fibres de type I et d'une plus faible proportion de fibres de type IIA (Bar et Pette, 1988). Les fibres de type I possèdent un haut pouvoir oxydatif mais un potentiel glycolytique peu important (métabolisme SO ou Slow Oxydative). Leur activité ATPasique est faible. Le soleus comporte également des fibres de type intermédiaire IIC et rapides IIA. Les fibres rapides de type IIA possèdent par contre un métabolisme glycolytique important (FG ou Fast Glycolytic). Leur activité ATPasique est importante. Les fibres de type IIC sont des fibres hybrides qui présentent une activité ATPasique et un métabolisme intermédiaires.

D - Modèle d'inactivité

Le modèle d'inactivité choisi est le plâtrage de la patte arrière gauche en position de flexion plantaire (figure 13) pour une durée de 6 jours. La position de flexion plantaire consiste en l'immobilisation de la cheville avec un angle de 180°. L'articulation

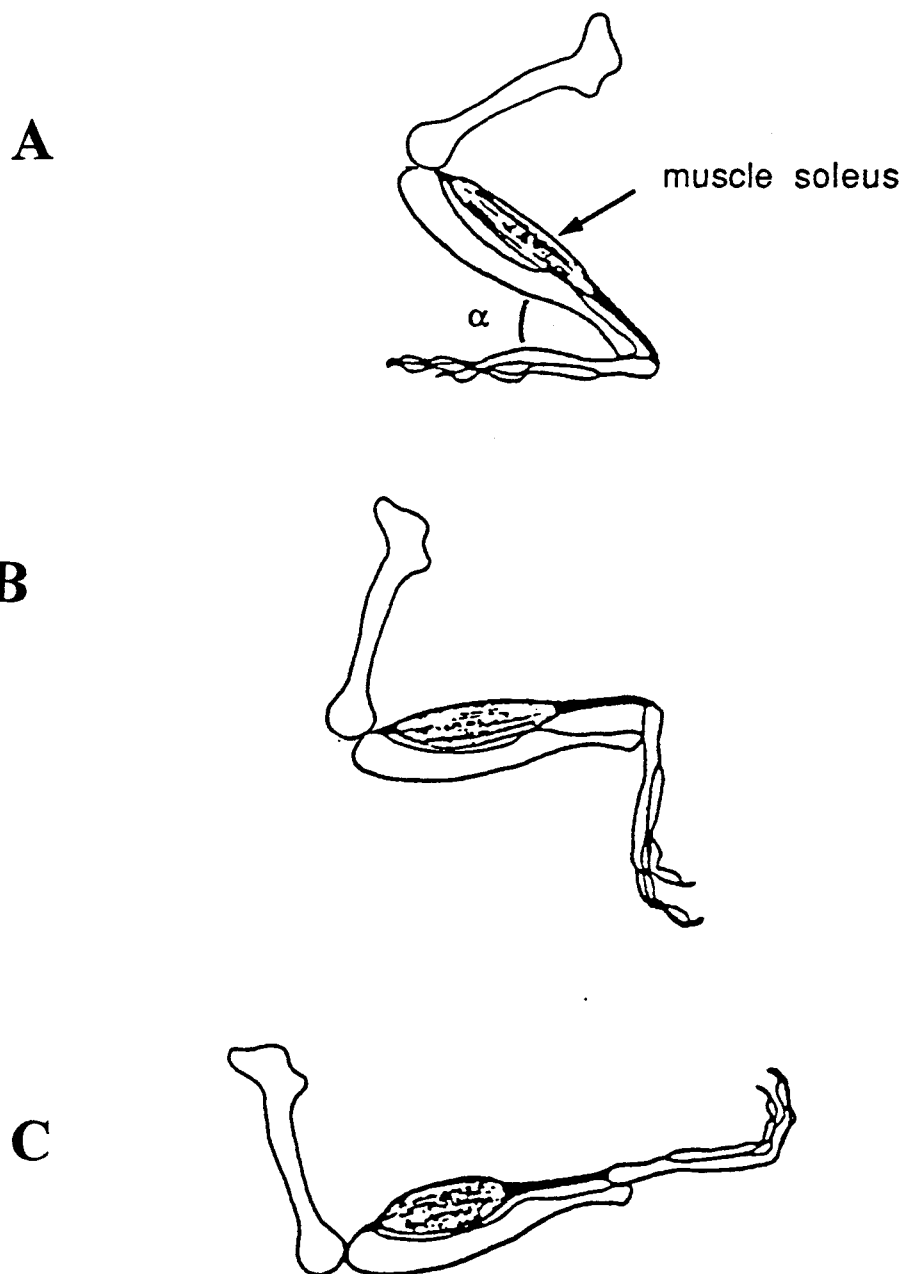


Figure 13 : Illustrations schématiques de trois positions possibles de l'articulation de la cheville et de la longueur du muscle soleus de la patte postérieure de rat.

A : position de dorsiflexion. L'angle antérieur de l'articulation (α) est d'environ 30° . Le muscle soleus est étiré.

B : position intermédiaire. L'angle antérieur de l'articulation est d'environ 90° . Le muscle soleus est en position neutre.

C : position de flexion plantaire. L'angle antérieur de l'articulation est proche de 180° . Le muscle soleus est fortement raccourci.

du genou présente alors un angle de 35° par rapport à l'articulation de la cheville. Le soleus est raccourci au maximum.

Le protocole de plâtrage est le suivant : la patte gauche du rat est passée à l'alcool puis séchée. La cheville est étirée à 180° puis enrobée d'une bande de plâtre pour les rats nouveau-nés ou d'une bande de résine de plâtrage synthétique pour les rats adultes. Afin de ne pas gêner la croissance de l'animal, le plâtre est changé tous les deux jours. La patte arrière droite du rat est laissée libre afin de lui permettre de se déplacer et d'avoir accès à l'eau et à la nourriture. Le muscle soleus droit des rats immobilisés ne sera pas utilisé dans cette étude. Il a été démontré en effet que l'immobilisation d'un muscle donne provoquait chez son contralatéral une réaction d'hypertrophie (Heslinga et Huang, 1992).

E - Prélèvements

Les prélèvements musculaires des animaux contrôles et immobilisés sont réalisés sous anesthésie générale à l'aide d'éthylcarbamate (1.60 mg/g). Aussitôt le prélèvement effectué, les muscles sont pesés puis divisés au hasard en 2 lots ; l'un d'eux est soumis à la technique de pelage, l'autre est congelé dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide puis stocké à -80°C dans le but d'une étude histologique et immunohistochimique ultérieure à l'aide de coupes sériées. Le muscle pelé est utilisé sous forme de faisceaux de fibres ou de fibres isolées sur lesquels(elles) sont réalisées l'étude des propriétés contractiles puis l'analyse électrophorétique.

II - TECHNIQUE DE FIBRE PELEE

A - Pelage des fibres musculaires

1. *Technique utilisée*

Le principe de pelage des fibres musculaires consiste à rendre accessible le système contractile (protéines contractiles et réticulum sarcoplasmique) à différentes substances. Le pelage permet d'éliminer la membrane externe (ou sarcolemme) de la fibre musculaire.

Le pelage que nous avons réalisé est un pelage chimique au moyen d'un chélateur du calcium, l'EGTA ((éthylène glycol β aminoéthyl éther) NNN'N' tétra-acide acétique). L'EGTA perméabilise le sarcolemme, sans altérer le système contractile. Un tel pelage est classiquement utilisé pour les muscles squelettiques striés et ne modifie pas la sensibilité des protéines contractiles au calcium.

La méthode de pelage chimique utilisée au laboratoire (Mounier et coll., 1989) est issue du protocole de Wood et coll. (1975). Après le prélèvement, la biopsie est transférée à 0°C dans une solution de pelage ou solution relaxante (R) contenant de l'EGTA (5 mM). Quatre à six heures plus tard, la solution R est remplacée par de la solution fraîche. Les biopsies sont ensuite replacées à 0°C. Vingt quatre heures après le prélèvement, les biopsies sont transférées dans une solution de conservation contenant de la solution R et du glycérol 50 % (vol/vol). Ce mélange permet de conserver les biopsies à - 20°C pendant 2 à 3 mois (Wood et coll., 1975). De plus, un inhibiteur de protéases, la leupeptine, est ajouté à la dose de 10 μ g/ml dans la solution de conservation. La leupeptine permet de prévenir une chute de tension des biopsies de rats nouveau-nés due

à l'action particulièrement importante des protéases endogènes chez un jeune animal (Reiser et coll., 1988).

2. Isolement et montage

Au moment de l'expérimentation, la biopsie est sortie du congélateur. Pour les rats adultes, une fibre d'une longueur de 2 à 3 mm est isolée à l'aide de pinces fines. Compte-tenu de la fragilité des fibres musculaires de rats nouveau-nés, nous avons utilisé des faisceaux de fibres musculaires. Pour des raisons d'homogénéité, le diamètre des faisceaux est choisi approximativement égal à la valeur du diamètre d'une fibre adulte. Les fibres ou les faisceaux sont noués à leurs extrémités par un fil de soie tressée (ethicon, Ethnor S.A., Paris), puis sont utilisés pour des enregistrements de tensions isométriques.

B - Dispositif d'enregistrement des tensions isométriques

La fibre (ou le faisceau) comportant à chaque extrémité un fil de soie tressée est installée dans la cuve expérimentale contenant de la solution R. L'une des extrémités est alors reliée à un point fixe (pince fine) et l'autre à un crochet relié au capteur de force. La longueur de repos et le diamètre de la fibre ou du faisceau sont mesurés à la loupe binoculaire (X 60) grâce à un oculaire micrométrique. La figure 14 illustre le dispositif expérimental utilisé.

La fibre musculaire de rat adulte est ensuite étirée pour atteindre 120 % de sa longueur de repos. Cet étirement est effectué sous le contrôle d'un rayon laser Hélium Néon, dirigé perpendiculairement à l'axe longitudinal de la fibre. Le réseau de diffraction obtenu, recueilli sur un écran, permet de déterminer la longueur des sarcomères. On peut assimiler un sarcomère à une fenêtre de diffraction et en déterminer ainsi la longueur.

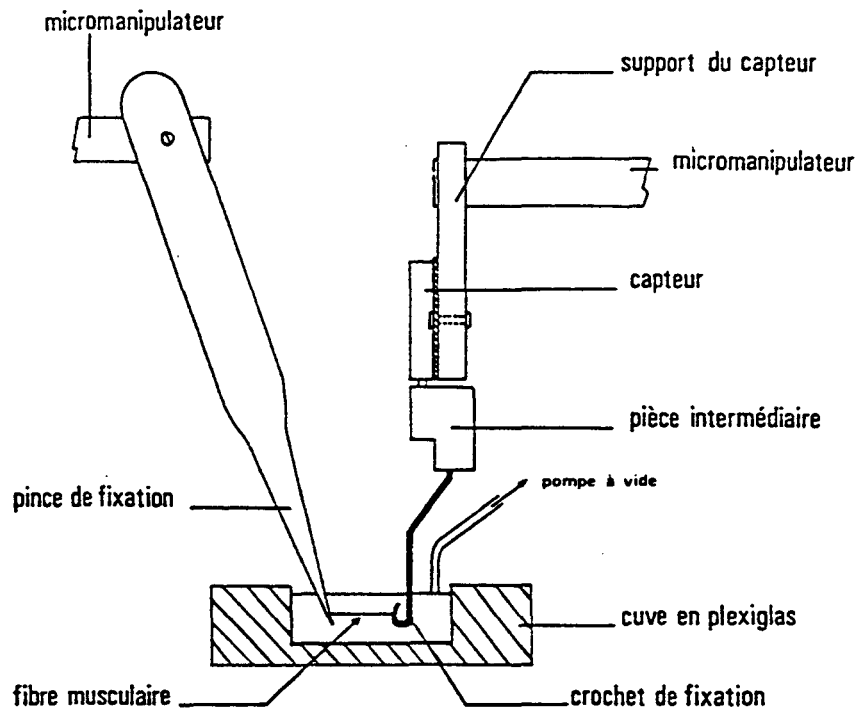
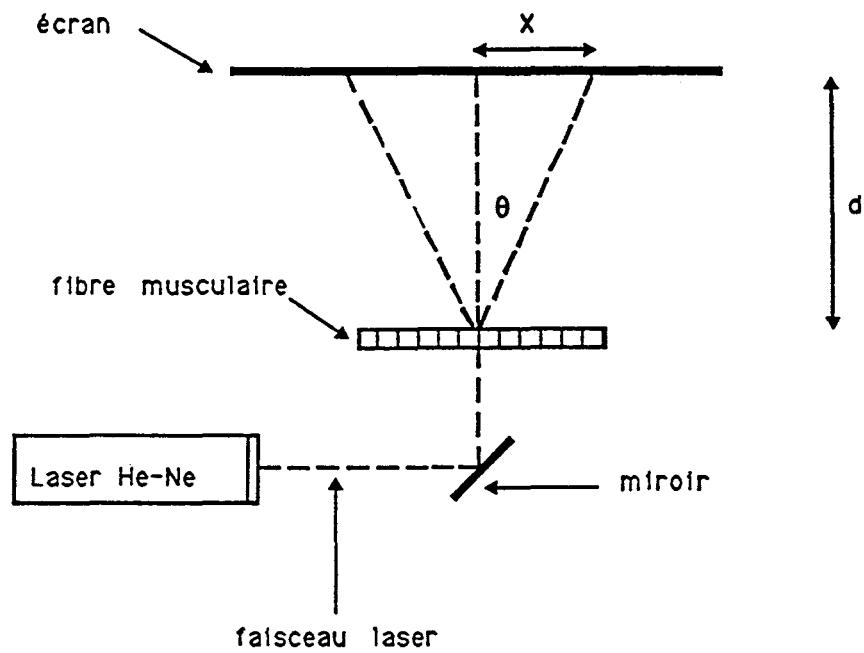
A**B**

Figure 14 : **A** : Schéma du dispositif de montage d'une fibre musculaire.

B : Principe de mesure de la longueur des sarcomères.

La longueur de sarcomère (LS) est donnée par la formule suivante :

$$LS = \lambda / \sin \theta$$

λ = longueur d'onde du laser (soit 632 nm)

θ = angle de diffraction

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, la formule devient :

$$LS = \lambda [\sqrt{(d^2 + x^2)} / X]$$

Pour les fibres de soleus, la longueur du sarcomère après étirement s'établit à $2.70 \pm 0.02 \mu\text{m}$. Cette valeur correspond à un étirement de 120 % de la longueur initiale. Cette longueur d'étirement a été choisie après avoir vérifié qu'elle permettait le développement d'une tension maximale. Elle est maintenue constante et vérifiée durant toute la durée de l'expérimentation.

En ce qui concerne les faisceaux de rats nouveau-nés, il n'a pas été possible de relever les valeurs des longueurs de sarcomères, aucune bande de diffraction n'étant visible. Afin d'homogénéiser avec les fibres de rats adultes, ceux-ci ont été étirés à 120 % de leur longueur de repos. Pour un faisceau, cet étirement permet d'induire, comme pour une fibre isolée, le développement d'une tension maximale.

Les tensions isométriques développées sont mesurées par un capteur de force BG 10 (sensibilité 0.70 v/g ; KULITE Semiconductor Products, Inc. Ridgefiels, NJ, USA). Un étalonnage du capteur de force est réalisé régulièrement de façon à contrôler la linéarité de la réponse dans la gamme étudiée. La réponse amplifiée (10 V/g) est enregistrée sur traceur papier (Gould 2200). Un ordinateur de type PC relié directement à l'amplificateur enregistre les tensions, après numérisation par une carte de conversion

analogique/digitale (PC - PLM 16 - National Instruments). Un logiciel approprié, créé au sein du laboratoire permet un traitement des données expérimentales.

C - Solutions

Tous les produits utilisés proviennent de SIGMA Chemical (St Louis, MO, USA). La force ionique de toutes les solutions est fixée à 200 mM et le pH est ajusté à 7.00 ± 0.02 à l'aide de potasse (1 N puis 0.1 N) ou d'acide propionique (1 N puis 0.1 N). La concentration d'ATP, constante dans toutes les solutions, est fixée à 2.5 mM, quantité largement suffisante pour couvrir tous les besoins énergétiques de la fibre au cours de l'expérimentation. Les proportions des composants entrant dans les différentes solutions sont déterminées à l'aide du programme informatique de Fabiato (1988) avec les constantes d'association données par Orentlicher et coll. (1977), pour les solutions pCa et par Moiescu et Thieleczek (1979), pour les solutions pSr.

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

	Solution R	Solution W	Solution de conservation
Propionate de potassium (mM)	170	185	170
Acétate de magnésium (mM)	2.5	2.5	2.5
K ₂ EGTA (mM)	5	-	5
Acide 3 (Morpholino) propane sulfonique (MOPS), (mM)	20	20	20
ATP (mM)	2.5	2.5	2.5
Glycérol (en %, v/v)	-	-	50
Leupetine (µg/ml)	-	-	10

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 de calcium provenant du CaEGTA et du K₂ EGTA mélangés en proportions adéquates pour obtenir une gamme de pCa comprise entre 7.0 et 4.2.

Les solutions pSr ($pSr = -\log [Sr^{2+}]$) sont obtenues en ajoutant à la solution W du Sr EGTA et K₂ EGTA, comme pour les solutions pCa. Le tableau 2 indique la composition des différentes solutions de pCa et pSr.

La solution Brij est composée de solution R additionnée de 2 % (v/v) de détergent Brij 58. Un traitement des fibres ou des faisceaux pelés par cette solution rend le réticulum sarcoplasmique non fonctionnel tout en préservant l'intégrité des protéines contractiles (Orentlicher et coll., 1974).

D - Protocole expérimental

1. Mesure des tensions isométriques

La fibre isolée ou le faisceau sont laissés pendant 20 mn dans la solution Brij. Ils sont ensuite rincés plusieurs fois par la solution W puis replacés dans la solution R. Après le retrait de la solution R, la fibre ou le faisceau sont rincés par la solution W qui élimine toute trace d'EGTA provenant de la solution R. Une contraction maximale d'amplitude P_0 peut être induite par l'application d'une solution calcique de pCa 4.2. Cette solution est à teneur suffisante en calcium pour saturer tous les sites calciques libres impliqués dans le développement de la contraction. Le relâchement de la fibre ou du faisceau est obtenu par le retour à la solution R.

A

pCa	K Prop (mM)	Mg Ac ₂	K ₂ EGTA (mM)	Ca EGTA (mM)	MOPS (mM)	ATP (mM)
7.0	172	2.46	4.20	0.80	20	2.5
6.8	172	2.46	3.85	1.15	20	2.5
6.6	172	2.45	3.40	1.60	20	2.5
6.4	172	2.44	2.85	2.15	20	2.5
6.2	172	2.43	2.28	2.72	20	2.5
6.0	172	2.42	1.73	3.27	20	2.5
5.8	172	2.41	1.25	3.75	20	2.5
5.6	172	2.41	0.86	4.14	20	2.5
5.4	172	2.40	0.57	4.43	20	2.5
5.2	172	2.40	0.36	4.64	20	2.5
5.0	172	2.40	0.22	4.78	20	2.5
4.8	172	2.40	0.11	4.89	20	2.5
4.6	172	2.39	0.02	4.98	20	2.5
4.4	172	2.39	0.00	5.00	20	2.5
4.2	172	2.38	0.00	5.00	20	2.5

B

pSr	K Prop (mM)	Mg Ac ₂	K ₂ EGTA (mM)	Sr EGTA (mM)	MOPS (mM)	ATP (mM)
7.0	172	2.48	4.99	0.010	20	2.5
6.8	172	2.48	4.98	0.016	20	2.5
6.6	172	2.48	4.97	0.025	20	2.5
6.4	172	2.48	4.96	0.040	20	2.5
6.2	172	2.48	4.94	0.064	20	2.5
6.0	172	2.48	4.90	0.099	20	2.5
5.8	172	2.48	4.84	0.160	20	2.5
5.6	172	2.48	4.76	0.240	20	2.5
5.4	172	2.48	4.62	0.380	20	2.5
5.2	172	2.47	4.43	0.571	20	2.5
5.0	172	2.47	4.15	0.850	20	2.5
4.8	172	2.46	3.76	1.243	20	2.5
4.6	172	2.45	3.26	1.740	20	2.5
4.4	172	2.44	2.67	2.330	20	2.5
4.2	172	2.43	2.02	2.982	20	2.5
4.0	172	2.42	1.34	3.660	20	2.5
3.8	172	2.41	0.67	4.330	20	2.5
3.6	172	2.41	0.00	5.020	20	2.5
3.4	172	2.40	0.00	5.800	20	2.5

Tableau 2 : A : Composition des solutions pCa.

B : Composition des solutions pSr.

Après relâchement par la solution R, la fibre ou le faisceau sont lavés par la solution W puis activés par l'application d'une solution à concentration calcique définie (pCa X), suivie immédiatement par la solution pCa 4.2 qui induit la tension maximale. Ceci permet d'exprimer le niveau de tension (P) obtenu pour la solution de pCa X par rapport au niveau de tension maximale (P_0) enregistré suite à l'application de la pCa 4.2 et de normaliser la tension (P/P_0). L'intérêt d'une telle procédure est de s'affranchir d'une éventuelle diminution de P_0 au cours de l'expérience ainsi que de la variabilité des tensions entre les différentes fibres ou faisceaux.

La figure 15 récapitule un cycle d'expérimentation. Le changement des solutions au niveau de la cuve expérimentale se fait rapidement grâce à un système d'aspiration sous vide. Les déflexions transitoires figurant sur les tracés correspondent au changement des solutions.

L'application de solutions à teneur croissante en calcium (pCa 7.0 à pCa 4.2) permet d'établir la relation Tension/pCa (ou T/pCa). Le même procédé est réalisé après application de solutions à concentration croissante en strontium et la relation T/pSr est ainsi obtenue. Pour la T/pSr, la contraction maximale est induite par une solution de pSr 3.4.

2. Expression des résultats

La relation T/pCa, représentée à la figure 16, est une courbe de type sigmoïde. Les paramètres de seuil, d'affinité et de pente de la T/pCa sont dérivés de l'équation théorique de Hill et coll., (1980) :

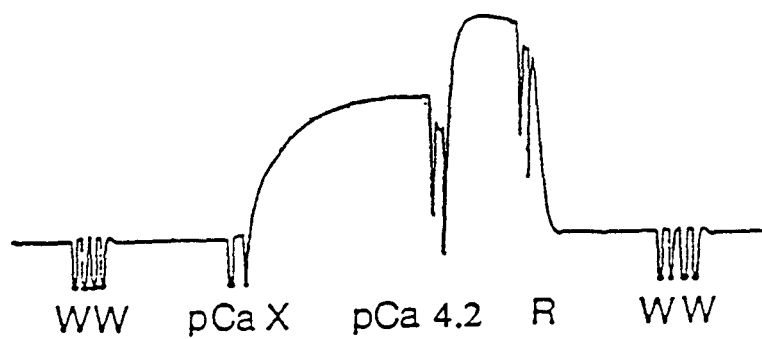
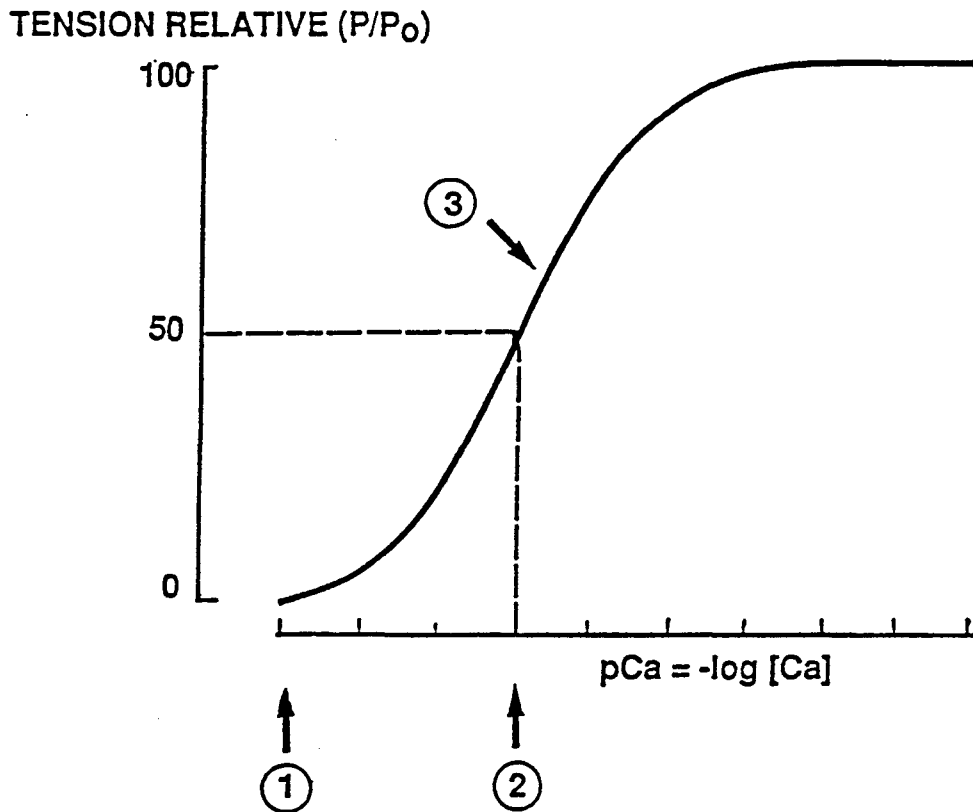


Figure 15 : Exemple d'un cycle d'expérimentation.



- 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 16 : 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.

$$P/P_0 = \frac{([Ca^{2+}]/Kd)^n}{1 + ([Ca^{2+}]/Kd)^n} \quad \text{où}$$

P/P_0 = tension normalisée

$[Ca^{2+}]$ = concentration en calcium

Kd = constante de dissociation apparente

n = coefficient de Hill

Plusieurs paramètres illustrant les caractéristiques des protéines contractiles peuvent être déduits de la relation T/pCa. Ce sont :

- le seuil d'activation calcique traduisant la sensibilité des protéines au calcium ;
- la pCa_{50} , c'est-à-dire la valeur de pCa induisant 50 % de la tension maximale et traduisant l'affinité calcique du système contractile ;
- le coefficient de Hill (n) qui correspond à la pente de la relation. Ce coefficient est un indicateur du degré de coopérativité existant entre les sites calciques impliqués dans la contraction musculaire.

Ces paramètres peuvent également être déterminés à partir de la relation Tension/pSr (T/pSr). Cependant un seul sera utilisé dans le cadre de cette étude. Il s'agit de la pSr_{50} . En effet, la différence entre les paramètres caractéristiques de l'affinité des protéines contractiles pour le calcium et le strontium permet de définir de manière physiologique le type de la fibre (figure 17). Ainsi, la valeur absolue de la différence entre les 2 valeurs de pCa_{50} et pSr_{50} ($pCa_{50} - pSr_{50}$) ou critère Δ est un paramètre que nous

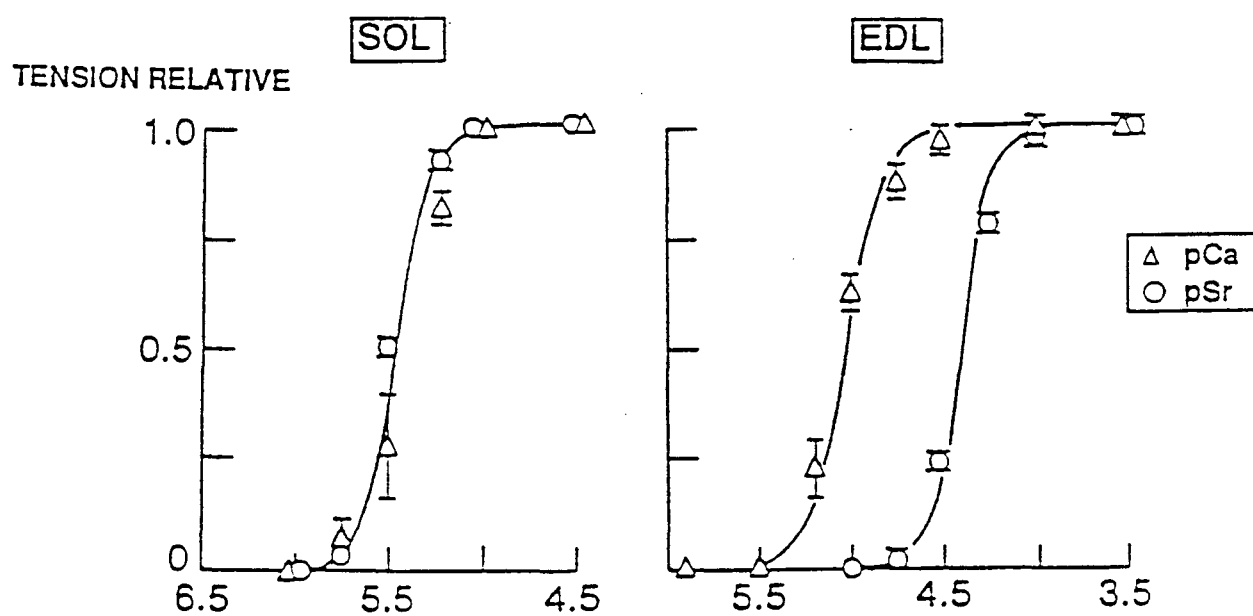


Figure 17 : Identification d'une fibre de type lent (SOL) et d'une fibre rapide (EDL) par le test strontium (d'après Takagi et Endo, 1977).

avons utilisé. L'existence de une ou plusieurs populations de fibres est déterminée d'après la loi d'anamorphose, c'est à dire la loi de la normalité appliquée aux fréquences relatives cumulées. Sur les adultes, deux populations apparaissent : ainsi, une fibre sera identifiée lente si Δ est inférieur à 0.60 et rapide quand Δ est supérieur à 0.90. Sur les nouveau-nés, une seule population de faisceaux est détectée selon le critère Δ . Tous les paramètres dérivés des relations Tension/pCa et Tension/pSr caractérisant les différents types de fibres isolées sont applicables aux faisceaux étudiés.

III - TECHNIQUE ELECTROPHORETIQUE

La composition en protéines myofibrillaires des fibres et des faisceaux étudiés pour leurs propriétés contractiles est déterminée par électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE) selon la technique de Laemmli (1970). Ce procédé nous permet de séparer les isoformes de chaînes lourdes de la myosine.

Les électrophorèses sont réalisées dans une cuve verticale HOEFER (modèle SE 600). La température est maintenue constante à 15°C pendant toute la durée de la migration.

A - Séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosine

La migration des isoformes de MHC (~ 200 KD) est réalisée sur un gel de concentration de 3.5 % et un gel de séparation de 6 % (Carraro et Catani, 1983). L'addition de glycérol dans les gels augmente considérablement le pouvoir de séparation

des différentes isoformes (Danieli-Betto et coll., 1986). Le tampon de migration a une composition de 32.5 mM de Tris, 288 mM de Glycine et 0.1 % de SDS (p/v). La migration est réalisée à 250 volts, durant 6 heures, avec une intensité maximale de 13mA par plaque.

B - Préparation des échantillons

Après les mesures physiologiques, la fibre (ou le faisceau) étudié est dissous dans le tampon de solubilisation de Laemmli contenant un agent réducteur (le β mercapto ethanol) et stocké à -20°C jusqu'au jour de l'électrophorèse. La composition du tampon de dissolution est une solution contenant 62.5 mM de Tris (pH 6.8), 1 % de SDS (p/v), 15 % de glycérol et 5 % de β mercaptoéthanol (v/v).

C - Coloration des gels

La coloration utilisée est une coloration à l'argent d'une grande sensibilité (2 à 70 ng ; Giulian et coll., 1983), car la quantité de protéines myofibrillaires contenue dans une fibre de rat adulte et dans un faisceau de fibres de rat nouveau-né est peu importante.

Après la migration, le gel est fixé pendant 30 mn dans une solution contenant 33 % (v/v) d'éthanol à 100° et 10 % (v/v) d'acide acétique. Une seconde fixation est réalisée durant une nuit dans une solution de glutaraldéhyde à 10 % (v/v). Un rinçage de 5 h sous eau distillée sera alors nécessaire pour éliminer le film de glutaraldéhyde déposé à la surface du gel.

Le gel est ensuite coloré sous agitation pendant 5 mn dans une solution d'argent ammoniacal contenant 18.9 mM de NaOH (p/v), 207 mM d'ammoniaque (v/v) et 0.8 % (p/v) de nitrate d'argent.

Après 2 rinçages à l'eau distillée, la révélation est réalisée par une solution d'acide citrique (0.23 mM) et de formaldéhyde (0.02 %). La révélation est arrêtée par un lavage de 30 mn à l'eau distillée.

Une analyse densitométrique (Quantiscan Microvial Systems, Biosoft, U.K.) des gels permet de déterminer les proportions relatives de chaque isoforme de MHC exprimée dans les fibres et les faisceaux étudiés.

IV - TECHNIQUE HISTOCHIMIQUE

La méthode utilisée pour la distinction des différents types de fibres du soleus est celle de Guth et Samaha (1969). L'activité enzymatique de l'adénosine triphosphatase (ATPase) myofibrillaire est détectée sur des sections transversales (épaisseur de 10 μ m) du muscle, effectuées à l'aide d'un cryostat.

Des préincubations sont effectuées d'une part dans des tampons acides (100 mM d'acide acétique ; 100 mM d'acétate de sodium) préalablement ajustés à pH 4.20, 4.25, 4.30, 4.45 pendant 10 mn à 23°C et d'autre part dans des tampons basiques (100 mM de 2-amino-2-méthyl-1,3 propanediol ; 18 mM de chlorure de calcium) ajustés à pH 9.4 et 10.4 pendant 15 mn à 23°C. Avant la préincubation à pH basique, les lames sont fixées pendant 5 mn dans une solution contenant 5 % de formaldéhyde à 35 %, 200 mM de cacodylate de sodium, 68 mM de chlorure de calcium et 35 mM de sucrose.

Toutes les lames préincubées à pH acide et basique sont ensuite incubées respectivement 45 et 30 mn à 37°C dans un tampon (pH 9.4) contenant 18 mM de chlorure de calcium, 2.7 mM d'ATP et 100 mM de 2-amino-2-méthyl-1,3-propanediol.

Après rinçage dans une solution contenant 70 mM de chlorure de calcium, les lames sont colorées par un passage dans une solution de chlorure de cobalt à 2 % puis dans une solution de sulfure d'ammonium à 5 %. Après rinçage à l'eau courante et déshydratation aux alcools croissants et au toluène, les lames sont montées à l'eukitt.

La préincubation acide permet d'inhiber l'activité ATPasique de façon plus importante pour les fibres de type II que pour les fibres de type I. A l'analyse microscopique, les fibres de type I seront donc plus intensément colorées (fibres de coloration noire) que les fibres de type II (coloration blanche). Cette technique met également en évidence la présence de fibres ne se colorant que faiblement (coloration grise). Ce sont des types intermédiaires (IIC). Cette classification histochimique a été confirmée par Termin et coll. (1989 a) qui ont démontré que les fibres de type histochimique I et IIA exprimaient en électrophorèse respectivement les isoformes lente (I) et rapide (IIA) de la myosine. Les fibres de type IIC résultent d'une coexpression des isoformes adultes I et IIA de la myosine éventuellement associés à des formes de MHC développementales (MHC embryonnaire ou néonatale).

La fixation au formaldéhyde des lames préincubées à pH basique permet la réversibilité de la réaction. Ainsi, à pH 10.4, les fibres de type II apparaissent colorées en noir alors que les fibres de type I sont blanches. Les types intermédiaires présentent toujours une coloration intermédiaire.

Le typage ATPasique est réalisé sur l'ensemble des fibres présentes sur une coupe. Des mesures de surface sur 200 à 300 fibres sont réalisées par l'intermédiaire d'un analyseur d'images automatique (SAMBA 2005).

V - TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHEMIQUE

Le taux d'expression des isoformes de chaînes lourdes de la myosine a été établi sur des coupes de muscles entiers par utilisation d'anticorps monoclonaux :

- NCL-MHCs (Tébu/novocastra) dirigé contre la MHC I (Ecob-Prince et coll., 1989),
- NCL-MHCd (Tébu/novocastra) dirigé contre les MHC développementales (MHC néo et MHC emb, Davies et coll., 1991),
- NCL-MHCf (Tébu/novocastra) dirigé contre les MHC rapides (MHC IIA et MHC IIB, Ecob-Prince et coll., 1989),
- NN 7 (fourni par le Dr G.S. Butler-Browne) dirigé contre la MHC néo (Butler-Browne et Whalen, 1984),
- 2 B6 dirigé contre la MHC emb (Gambke et Rubinstein, 1984), fourni par le Dr G.S. Butler-Browne.

Ces anticorps, dont la spécificité a été testée, ont été respectivement obtenus à partir de myosines extraites de soleus de lapin adulte, de psoas de lapin adulte, de muscles des pattes postérieures de rat nouveau-né (7 jours) et de myosine néonatale et embryonnaire purifiées de muscles de rat nouveau-né. L'incubation des anticorps primaires s'effectue sur des coupes sériées durant 3 heures en chambre humide à

température ambiante. Les sections sont ensuite lavées 3 fois dans du tampon PBS avant d'être incubées 30 mn dans les mêmes conditions que précédemment avec un anticorps secondaire biotinylé (Novostain Super ABC Kit-Novocastra).

La réaction de fixation de cet anticorps est amplifiée à l'aide du complexe avidine-biotine couplé à une peroxidase. La révélation est visualisée par la diaminobenzidine (SIGMA). Après déshydratation aux alcools croissants et au toluène, les coupes sont montées à l'eukitt. La réactivité à chaque anticorps est vérifiée sur un minimum de 200 fibres identifiées sur chaque coupe de muscle entier.

VI - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes, affectées de leur erreur standard à la moyenne ($X \pm E.S.M.$). Les différences statistiques entre les moyennes sont estimées par le test t de Student appliqué aux faibles effectifs, $P < 0.05$ étant choisi comme seuil de signification.

RESULTATS

CHAPITRE 1

EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL (ANIMAUX CONTROLES)

I - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES

A - Typages ATPasiques

L'histogramme de la figure 18 récapitule l'évolution, au cours du développement post-natal, des typages ATPasiques du muscle soleus. De 6 à 23 jours, la composition des muscles selon la réaction ATPasique des fibres montre une évolution constante. Ainsi à 6 jours post-natals, toutes les fibres du soleus présentent un type intermédiaire IIC et sont considérées comme indifférenciées. A partir de 12 jours, environ 52 % des fibres sont de type I et 48 % sont encore de type IIC.

Du 12 au 23ème jour post-natal et jusqu'à l'âge adulte, on constate une augmentation progressive du nombre des fibres de type I (respectivement : 52 %, 56 %, 63.50 % et 72 % à 12, 17, 23, et 91 jours) et parallèlement, une diminution des fibres de type IIC (respectivement : 48 %, 41 %, 34 % et 6.50 % à 12, 17, 23, et 91 jours post-natals). Les premières fibres de type IIA ne sont détectables qu'à partir du 17ème jour post-natal (2.40 %). Cette proportion reste la même à 23 jours et atteint 21.5 % pour un soleus adulte.

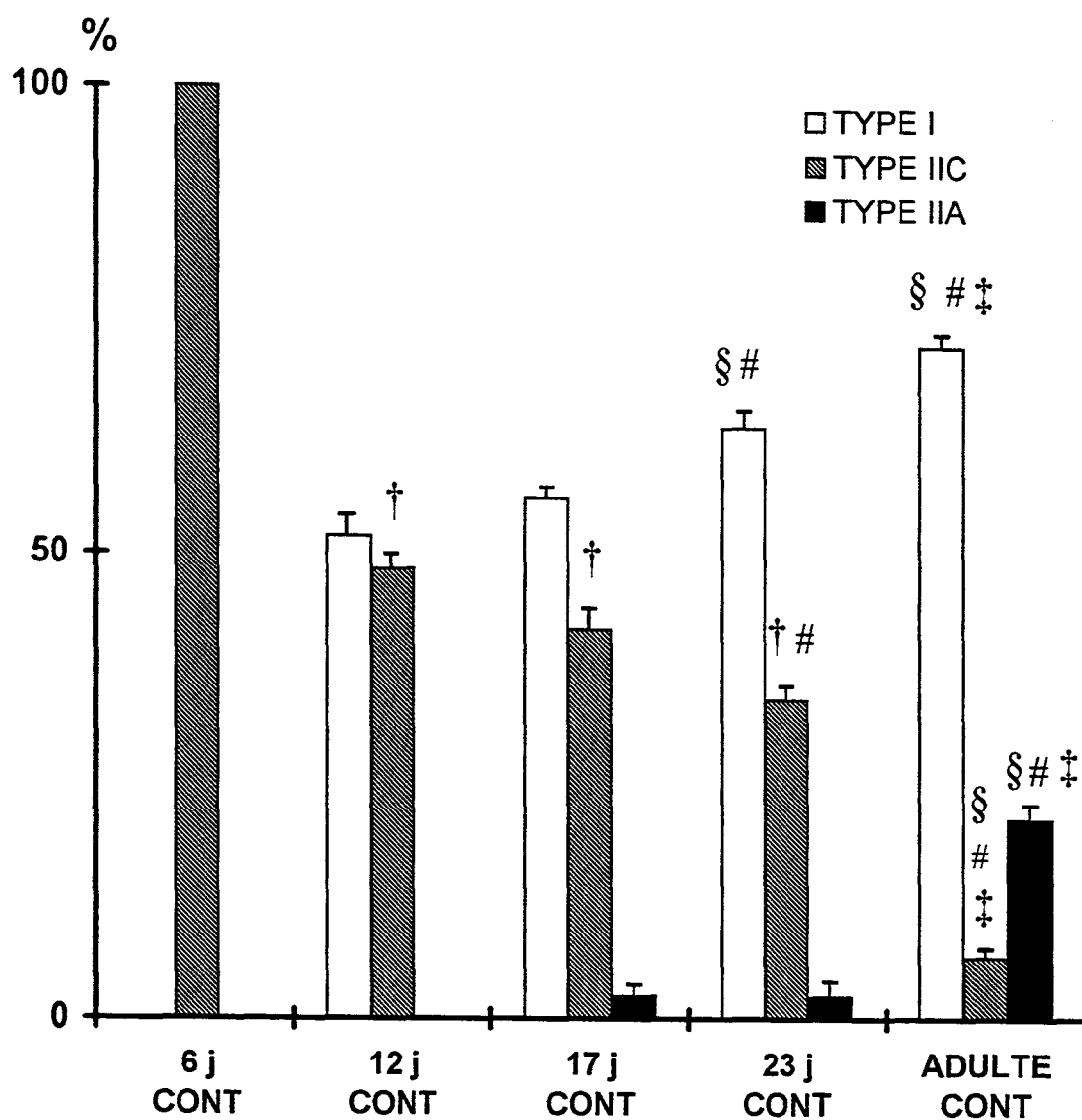


Figure 18 : Evolution des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus au cours du développement post-natal. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT, # avec le groupe 17 j CONT, ‡ avec le groupe 23 j CONT.

B - Immunohistochimie

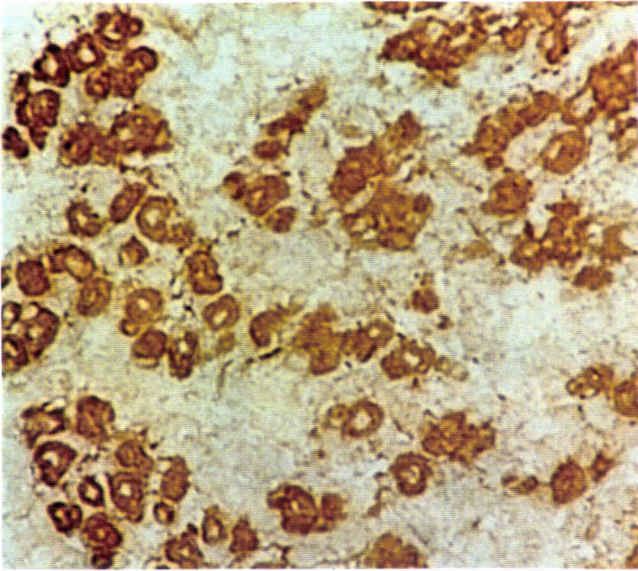
L'expression et l'identification des formes de MHC développementales ont été testées sur nos échantillons par immunohistochimie (figure 19). Les 2 anticorps primaires utilisés sont : NCL MHCd qui reconnaît la MHC emb et la MHC néo chez le fœtus de rat et la MHC néo au stade post-natal, et l'anticorps 2B6 qui reconnaît spécifiquement la MHC emb. La réaction positive de cet anticorps (présence de MHC emb) a été visualisée sur les muscles du train postérieur de fœtus de rat au 18ème jour de gestation. De 6 à 23 jours post-nataux, l'anticorps 2B6 présente une réaction négative, indiquant que la MHC emb n'est plus exprimée à partir du 6ème jour post-natal. L'anticorps NCL-MHCd montre une réaction positive du 6ème au 23ème jour post-natal. Comme la MHC emb n'est plus présente à ces stades post-nataux, cet anticorps ne peut que démontrer la présence de MHC néo.

Ces résultats indiquent qu'aux stades développementaux étudiés, la MHC néo est encore exprimée alors que la MHC emb ne l'est plus.

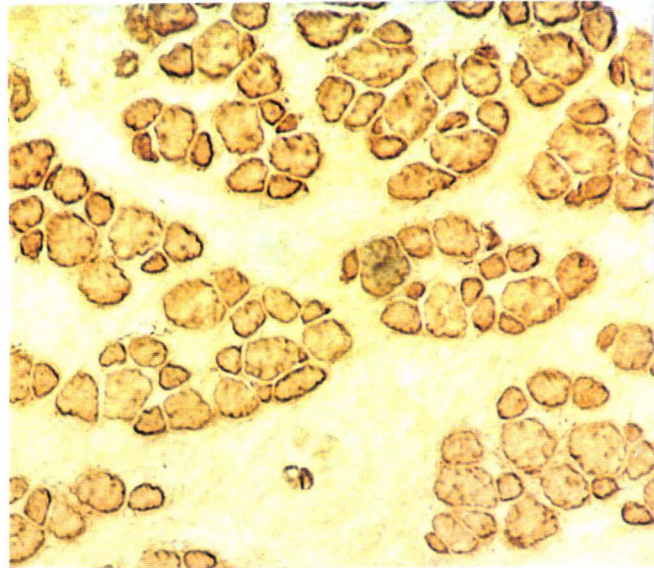
C - Analyse électrophorétique et densitométrique des isoformes de chaînes lourdes de la myosine

Une étude de la composition en chaînes lourdes de myosine a été réalisée sur toutes les fibres et tous les faisceaux caractérisés par leurs propriétés fonctionnelles. Cependant, lorsqu'il s'agit de faisceaux de fibres de rats nouveau-nés, la quantité de protéines se répartissant en isoformes de chaînes lourdes de myosine (MHC) étant faible, le nombre de faisceaux exploitables en analyse électrophorétique est inférieur au nombre total des faisceaux caractérisés par leurs propriétés contractiles. Cette différence s'accroît

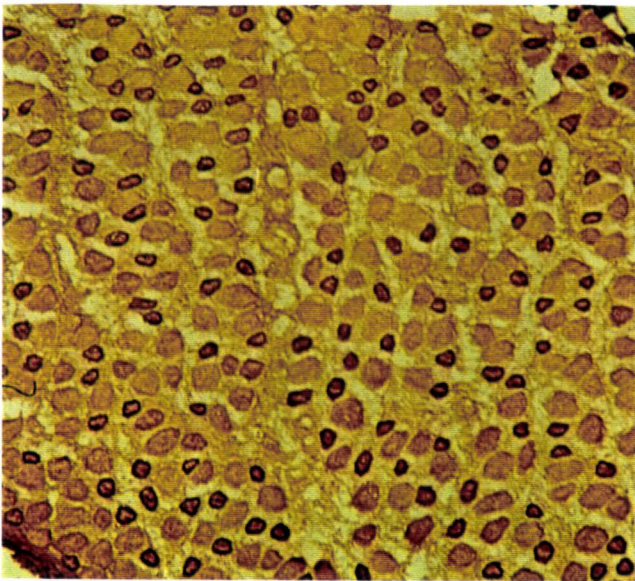
Réaction de l'anticorps NCL MHCd



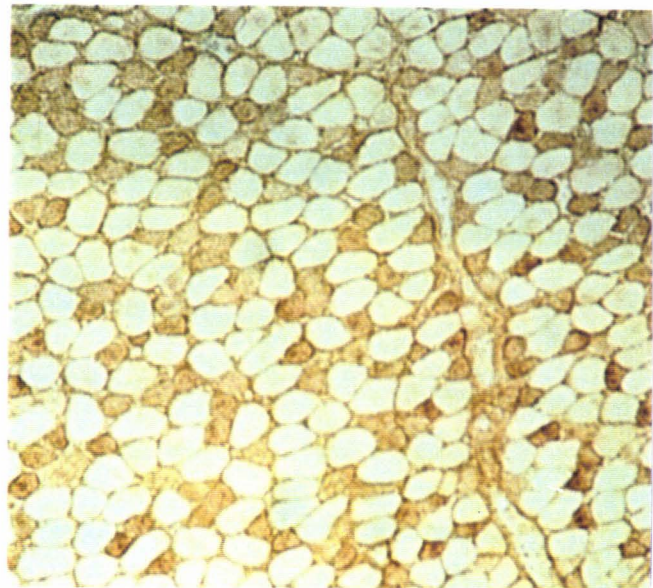
1 : foetus au 18ème jour de gestation (G x 50)



2 : soleus au 6ème jour post-natal (G x 50)

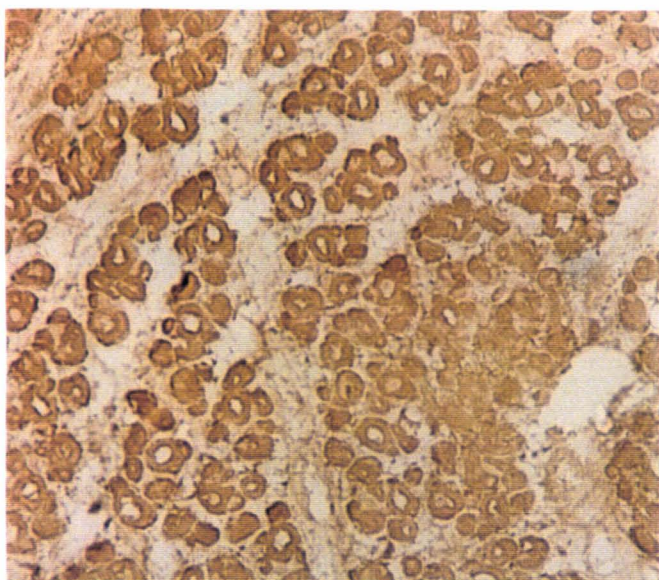


3 : soleus au 12ème jour post-natal (G x 20)

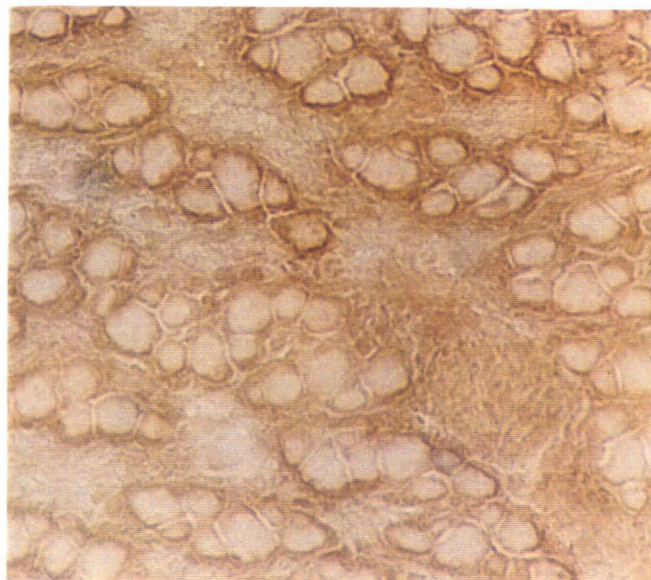


4 : soleus au 23ème jour post-natal (G x 20)

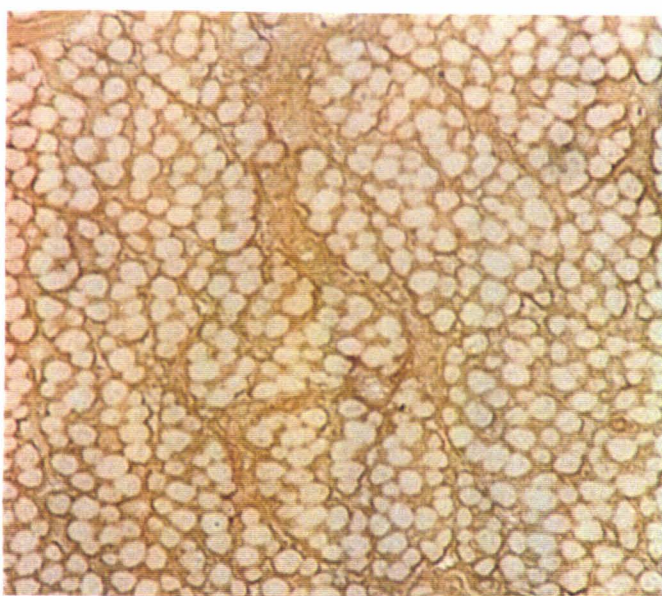
Réaction de l'anticorps 2 B6



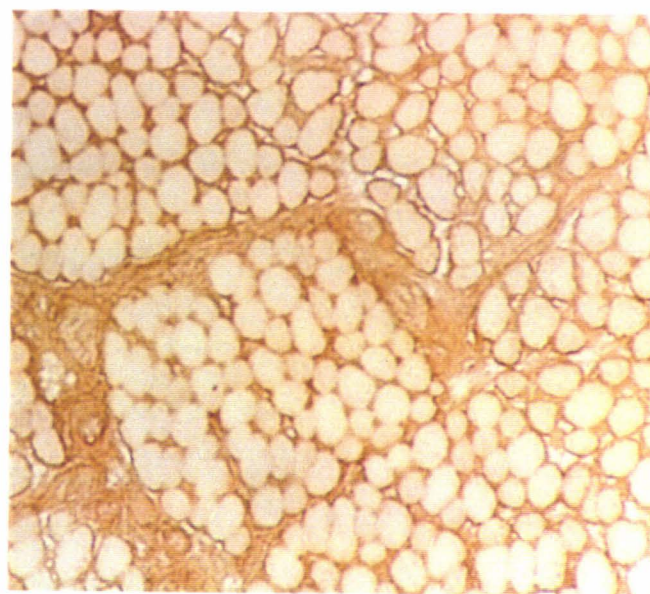
1 : foetus au 18ème jour de gestation (G x 50)



2 : soleus au 6ème jour post-natal (G x 50)



3 : soleus au 12ème jour post-natal (G x 20)



4 : soleus au 23ème jour post-natal (G x 20)

Figure 19 : Identification des isoformes de MHC développementales par immunohistochimie. Les coupes ont été incubées avec les anticorps indiqués.

encore après immobilisation. Dans le but de conserver une valeur statistique aux résultats obtenus, la composition en isoformes de MHC de faisceaux non testés pour leurs propriétés contractiles a également été étudiée. La composition moyenne en isoformes de MHC des faisceaux testés et non testés pour leurs propriétés contractiles étant identiques (aucune différence statistique), les résultats ont été regroupés.

Les différentes isoformes de MHC adultes des faisceaux ont été identifiées par la comparaison de leur profil électrophorétique avec celui connu de fibres de soleus adulte. La MHC néonatale a été identifiée de manière certaine en comparant sa migration à celle de MHC néonatale purifiée. Ces profils de migrations sont illustrés à la figure 20.

Trois isoformes de MHC peuvent être détectées dans l'ordre croissant de migration électrophorétique :

- une isoforme rapide des chaînes lourdes de la myosine : MHC IIA,
- une isoforme développementale : MHC néo,
- l'isoforme lente de MHC : MHC I.

A 6 jours post-natals, seules les MHC I et MHC néo sont présentes. La MHC IIA est décelable à partir du 12ème jour. A partir de ce stade, les 3 isoformes de MHC sont présentes jusqu'au 23ème jour post-natal.

Au stade adulte, seules les isoformes adultes MHC I et MHC IIA ont été identifiées.

Dans un but de quantification, une analyse densitométrique a été réalisée sur l'ensemble des faisceaux et des fibres caractérisées électrophorétiquement. Les résultats sont représentés par les figures 21 et 22.

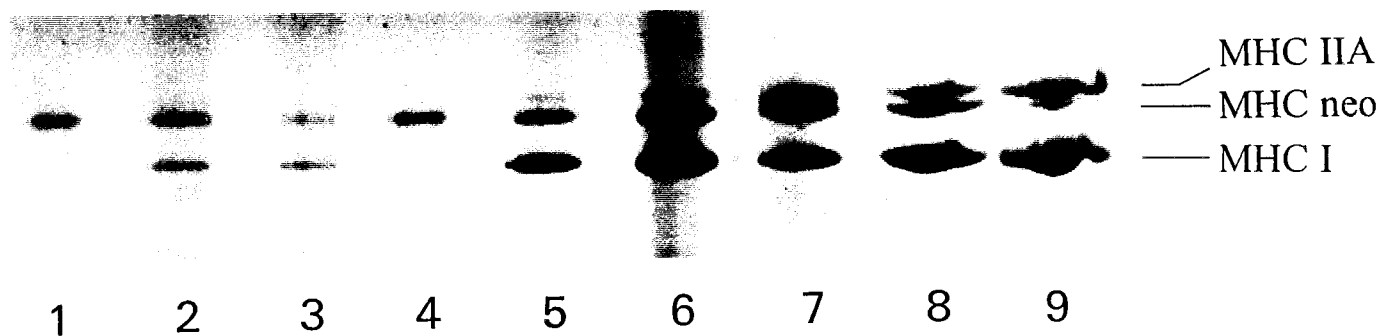


Figure 20 : Profil électrophorétique des isoformes de MHC. Les numéros reportés font référence aux puits :

1 et 4 : MHC néo purifiée, 2 et 3 : faisceaux du groupe 6 j CONT, 5 et 6 : faisceaux du groupe 12 j CONT, 8 : faisceau du groupe 17 j CONT, 9 : faisceau du groupe 23 j CONT. Le puits 7 contient un mélange de MHC néo purifiée et une fibre hybride rapide du soleus adulte contrôle.

La quantité relative de chaque isoforme de MHC est exprimée en pourcentage (figure 21). Les analyses densitométriques révèlent que la proportion de MHC I augmente de 50 % à 65 % entre 6 et 17 jours post-natals, tandis que la MHC néo diminue (de 49 % à 17 %). A 23 jours, la composition en MHC I reste inchangée (66 %) alors que la MHC néo continue à décroître (11 %). La MHC IIA apparaît à 12 jours (10 %) et sa proportion augmente au cours du développement post-natal (22 % à 23 jours).

Les fibres adultes identifiées par le test strontium montrent une bonne adéquation entre ce test et l'analyse densitométrique (figure 22). Ainsi, les fibres lentes n'expriment que l'isoforme lente de MHC, la MHC I. La plupart des fibres caractérisées comme rapides par le test strontium présentent une nette prédominance de l'isoforme rapide MHC IIA (74 %) avec toutefois la présence en faible quantité de l'isoforme lente MHC I (26 %). Ces fibres ont été appelées "hybrides rapides". Les fibres purement rapides (100 % MHC IIA) ne représentent que 6 % du total des fibres examinées.

II - EVOLUTION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES

A - Tensions maximales

Les tensions maximales P_0 des faisceaux et des fibres (tableau 3) sont établies suite à l'application de solution calcique (pCa 4.2) permettant de saturer tous les sites calciques du système contractile et de créer le maximum de ponts entre l'actine et la myosine. Les valeurs de P_0 sont exprimées en tension ramenée à l'unité de surface, soit en

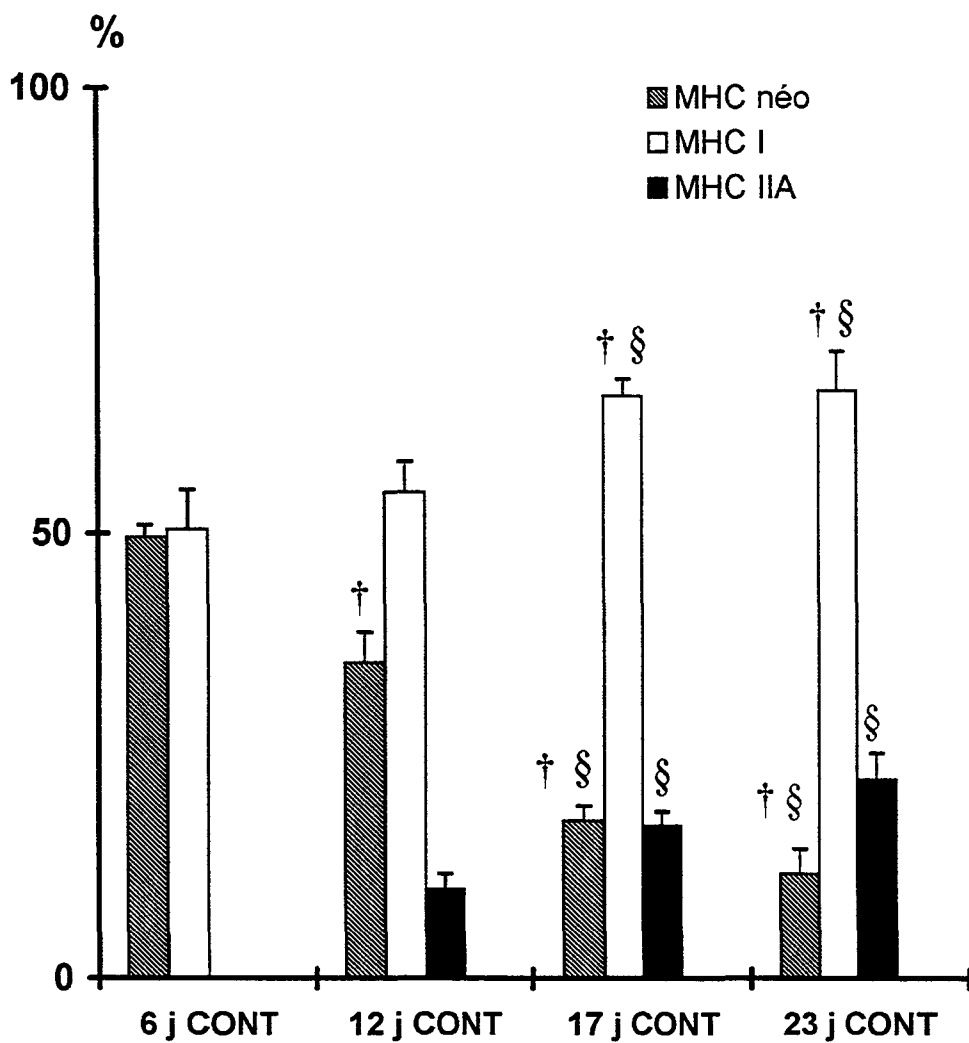


Figure 21 : Analyse densitométrique de la répartition en isoformes de MHC au cours du développement post-natal. Les résultats exprimés sous forme de moyenne \pm ESM, ont été établis respectivement à partir de 27, 38, 20 et 25 faisceaux de fibres pour les groupes 6 j CONT, 12 j CONT, 17 j CONT et 23 j CONT.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT.

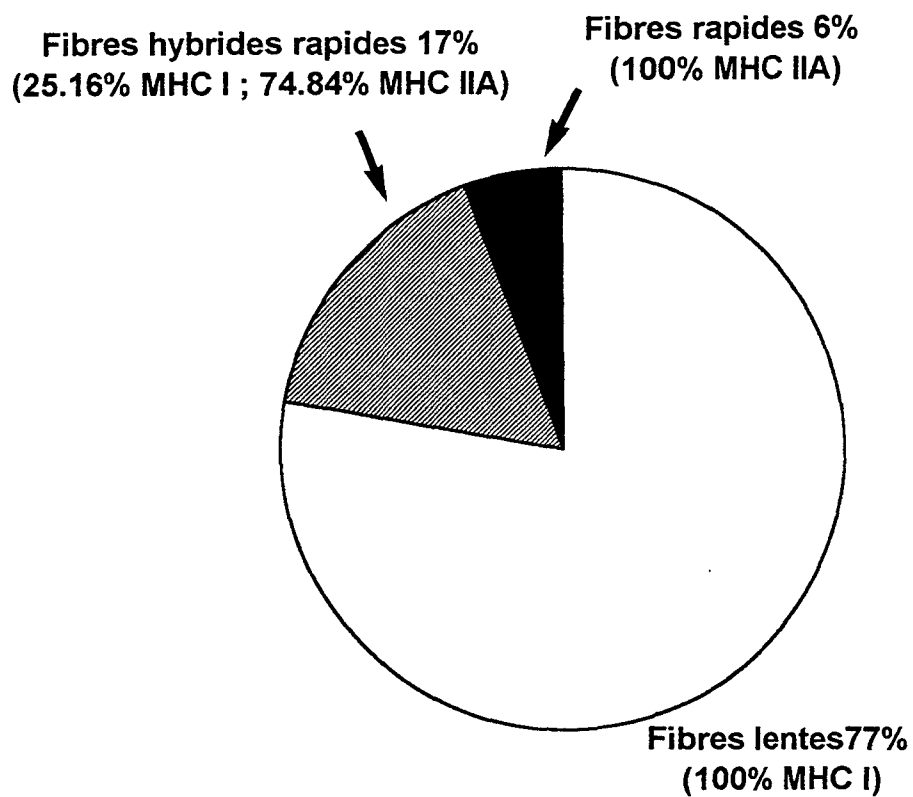


Figure 22 : Représentation de la composition en isoformes de MHC chez les fibres de soleus adulte, caractérisées par le test strontium (n = 18).

	P_0 kN/m ²
6 j CONT (20)	57.37 ± 4.19
12 j CONT (30)	64.97 ± 4.07
17 j CONT (20)	80.21 ± 6.81 † §
23 j CONT (20)	79.66 ± 3.96 † §
ADULTE CONT Lent (15)	88.15 ± 9.62 † §
ADULTE CONT Rapide (5)	96.41 ± 7.07 † §

Tableau 3 : Evolution des tensions maximales P_0 exprimées en kN/m² des fibres de rats adultes et des faisceaux de rats nouveau-nés. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de faisceaux et de fibres étudiées.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT.

kN/m² et montrent une augmentation significative de la force à partir du 17^{ème} jour post-natal. Ces valeurs se stabilisent à des valeurs proches de celles observées pour des fibres adultes de type lent. L'évolution de ce paramètre rend compte de l'acquisition, au cours du développement post-natal, des caractéristiques lentes du muscle soleus.

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

Les propriétés d'activation par le Ca et le Sr ont été déterminées pour l'ensemble des faisceaux et des fibres étudiées. Les résultats sont rapportés dans les figures 23, 23 bis et 24 et dans le tableau 4.

D'après la répartition en histogramme du critère Δ (c'est-à-dire la différence entre la pCa₅₀ et la pSr₅₀), 2 populations de fibres ont pu être distinguées pour le muscle soleus adulte (figure 23A). Une large majorité (75 %) des 20 fibres étudiées a été identifiée comme étant de type lent puisque la moyenne des valeurs de Δ est de 0.32 ± 0.05 (tableau 4). Le reste de la population des fibres adultes (25 %) présentant une valeur moyenne de Δ de 1.22 ± 0.02 a été caractérisée comme étant de type rapide.

En ce qui concerne les faisceaux de fibres de rats nouveau-nés, les valeurs de Δ sont de type intermédiaire, c'est-à-dire localisées entre celles des fibres adultes lentes et rapides (figure 23B). A ces âges post-natals, les valeurs de Δ ne permettent pas de distinguer différentes populations. Néanmoins, à 23 jours post-natals, les faisceaux étudiés présentent un niveau de répartition des valeurs de Δ plus large avec une apparition de valeurs faibles marquant une évolution vers un type lent adulte.

Les relations Tension/pCa établies pour les faisceaux de fibres sont représentées figure 24. Les paramètres d'activation par le Ca sont reportés dans le tableau 4. Les relations T/pSr et les paramètres en dérivant exceptée la pSr₅₀ ne sont pas

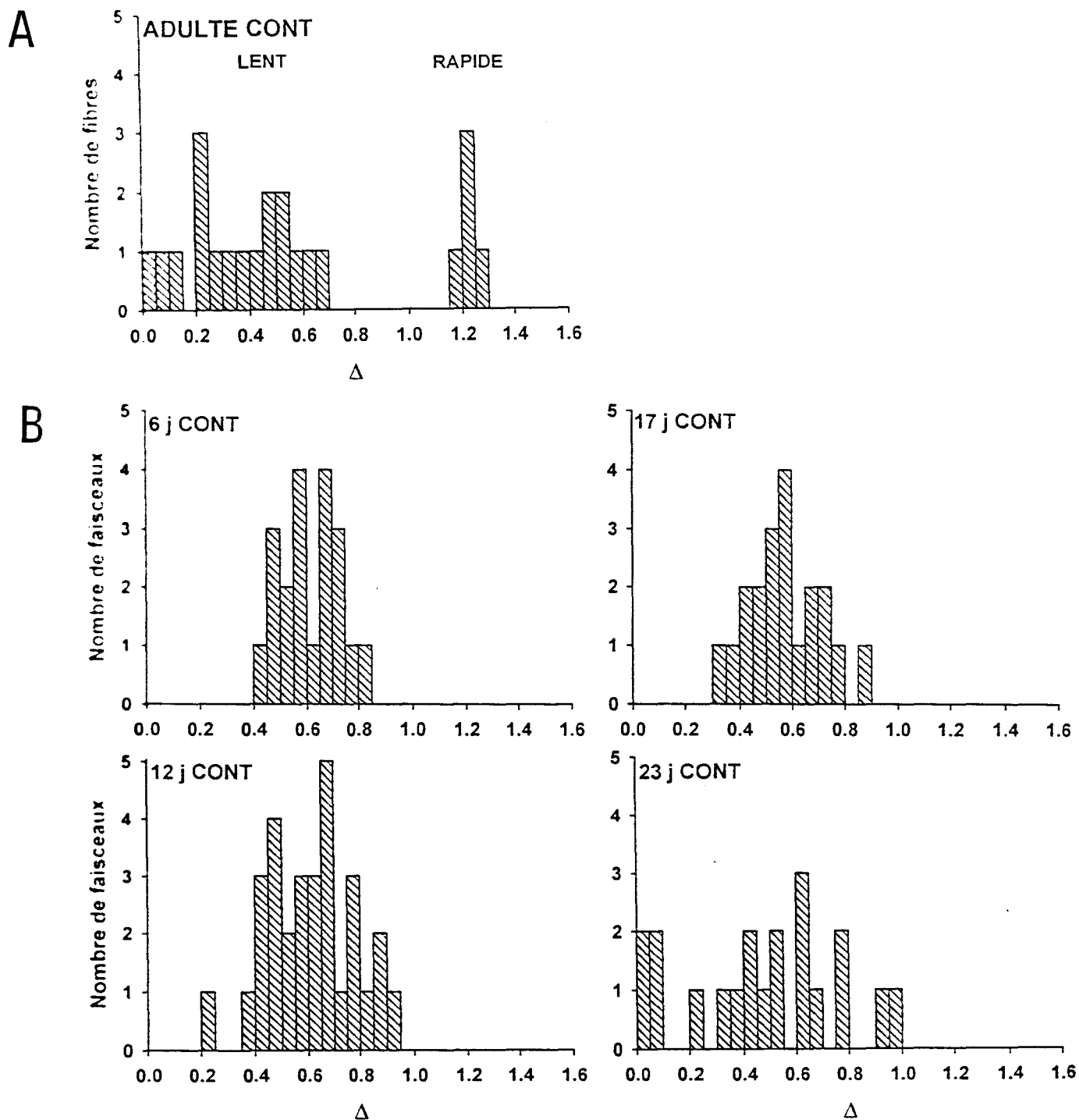


Figure 23 : Evolution au cours du développement post-natal des valeurs de Δ ($pCa_{50} - pSr_{50}$), déterminées pour les faisceaux de fibres de rats nouveau-nés (A) et pour les fibres isolées de rats adultes.

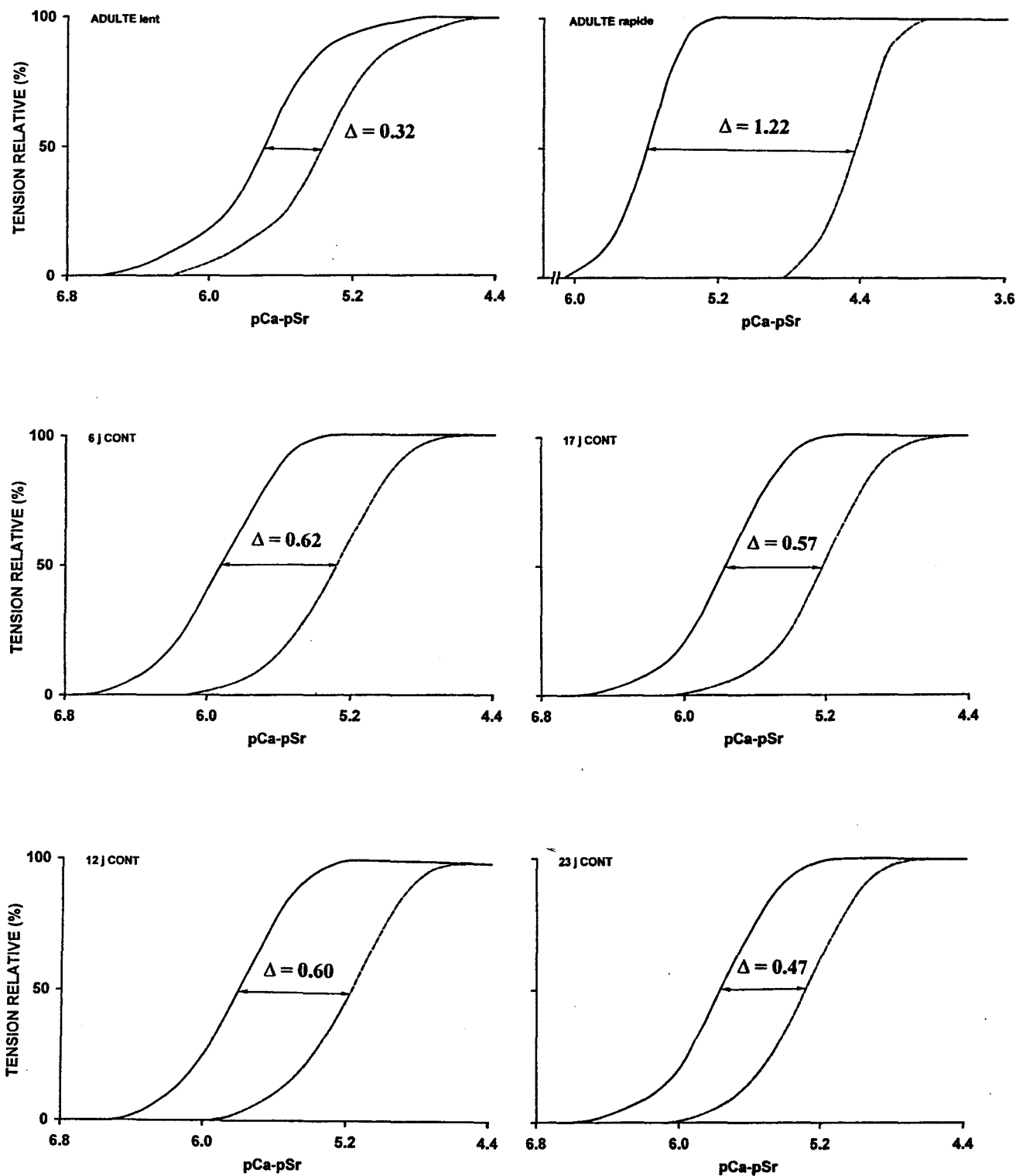


Figure 23 bis : Représentation des relations Tension/pCa (en trait plein) et Tension/pSr (en pointillés) moyennes des groupes de rats contrôles. Chaque relation est établie suivant l'équation théorique de Hill. Les points expérimentaux ne sont pas représentés.

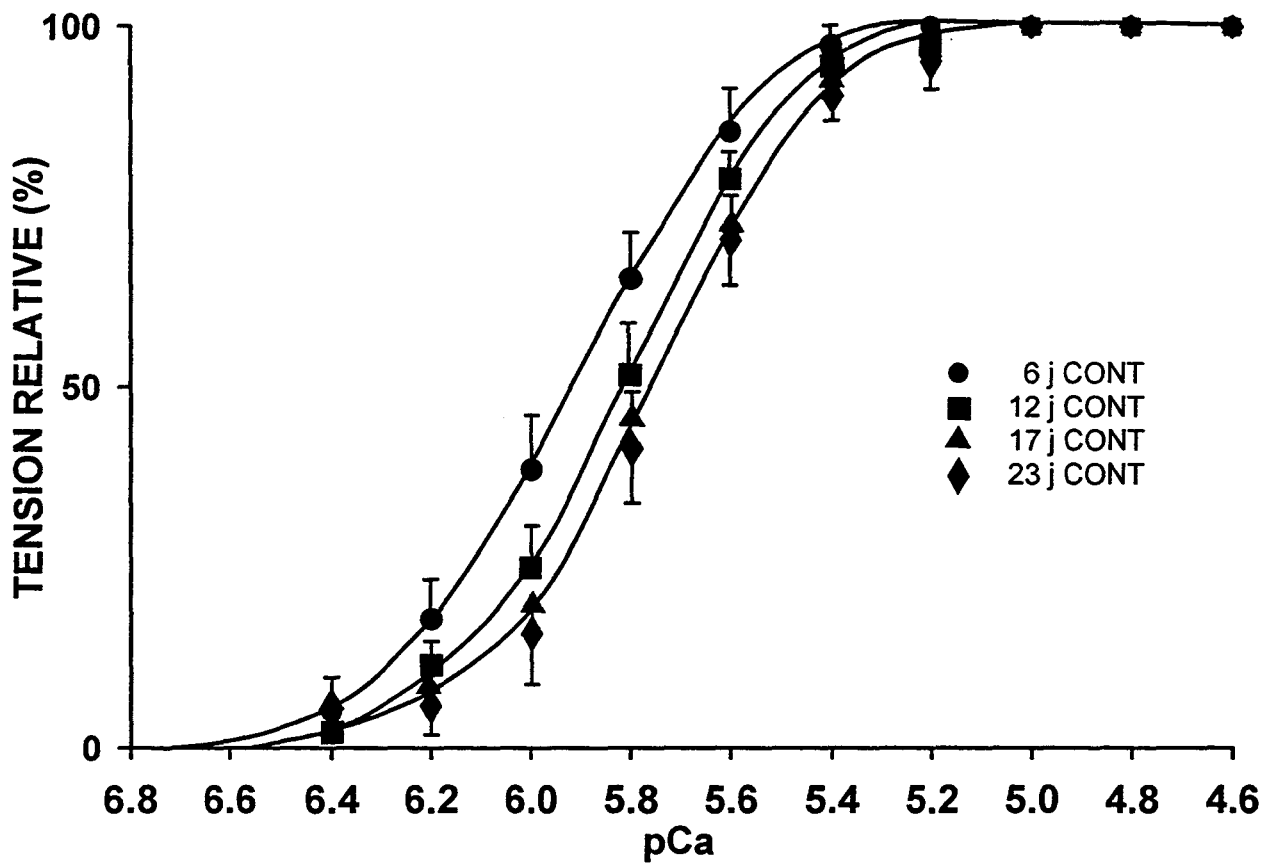


Figure 24 : Relations Tension/pCa établies pour les groupes 6 j CONT, 12 j CONT, 17 j CONT et 23 j CONT. Les relations T/pCa des fibres adultes ne sont pas représentées. Chaque point expérimental est exprimé sous forme de moyenne \pm ESM. Les courbes sont tracées suivant l'équation théorique de Hill.

	pCa _{seuil}	pCa ₅₀	Δ	n
6 j CONT (20)	6.76 ± 0.06	5.90 ± 0.03	0.62 ± 0.03	3.28 ± 0.31
12 j CONT (30)	6.57 ± 0.04 †	5.80 ± 0.02 †	0.60 ± 0.03	3.40 ± 0.24
17 j CONT (20)	6.62 ± 0.06	5.77 ± 0.03 †	0.57 ± 0.03	2.32 ± 0.13 † §
23 j CONT (20)	6.67 ± 0.04	5.79 ± 0.03 †	0.47 ± 0.03 † § #	2.59 ± 0.16 † §
<hr/>				
ADULTE CONT Lent (15)	6.81 ± 0.06	5.70 ± 0.03	0.32 ± 0.05	2.08 ± 0.18
ADULTE CONT Rapide (5)	6.28 ± 0.07 *	5.63 ± 0.04	1.22 ± 0.02 *	3.80 ± 0.50 *

Tableau 4 : Evolution des propriétés d'activation par le Ca et le Sr. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de faisceaux ou de fibres sur lesquels l'étude a été réalisée. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT, # avec le groupe 17 j CONT, * avec les fibres lentes adultes (groupe ADULTE CONT lent).

représentés ici car ils ne servent habituellement qu'à identifier le type de fibre ou de faisceau étudié.

L'examen des valeurs de pCa_{50} révèle une diminution des valeurs de pCa_{50} du 6ème au 12ème jour post-natal. Du 12ème au 23ème jour post-natal, les valeurs de pCa_{50} ne varient pas significativement.

Les valeurs de Δ ne présentent pas de variation sensible du 6ème au 17ème jour post-natal, toutefois la valeur de Δ au 23ème jour post-natal est significativement plus faible que celles obtenues pour les autres groupes de rats nouveau-nés. Elle se rapproche alors sensiblement de la valeur moyenne de Δ des fibres lentes adultes.

Les valeurs des coefficients de Hill (n) sont identiques à 6 et 12 jours post-natals mais sont néanmoins supérieures à celles observées à 17 et 23 jours post-natals, ces 2 dernières étant significativement différentes entr'elles.

Seul le seuil d'activation calcique du groupe 12 j CONT présente une variation significative vis à vis du groupe 6 j CONT.

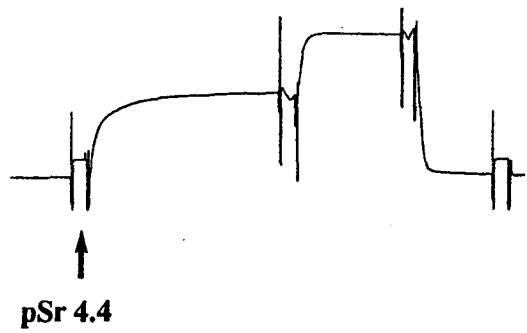
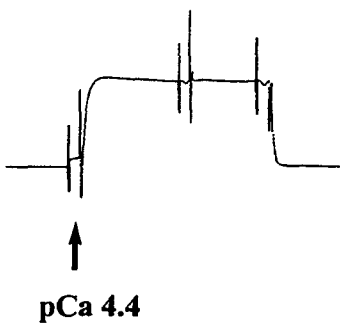
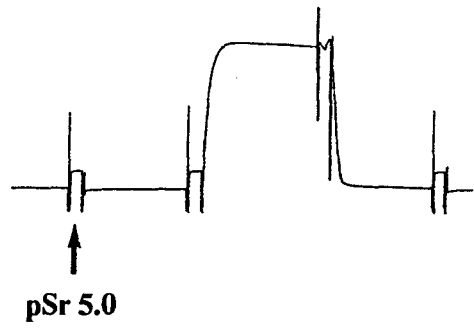
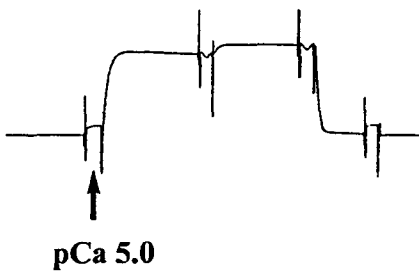
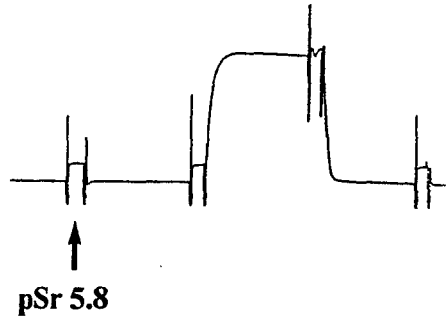
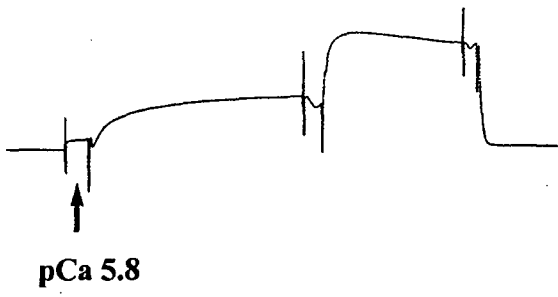
Concernant le groupe ADULTE CONT, les 2 populations de fibres observées (c'est-à-dire lente et rapide) présentent des paramètres d'activation différents.

L'analyse des relations T/pCa et T/pSr (exemples de tensions illustrées figure 24 bis) obtenues sur ces fibres montre que 5 d'entr'elles présentent un décalage important de la courbe T/pSr vers la droite. Ce décalage Δ d'une valeur moyenne de 1.22 est classiquement observé sur des fibres de type rapide. Les courbes T/pSr des 15 fibres restantes présentent un décalage T/pCa-T/pSr nettement moindre ($\Delta = 0.32$) et sont identifiées comme étant de type lent. L'étude des paramètres dérivés de la T/pCa montre que la valeur de la pente de la relation (n) est significativement plus élevée pour les fibres de type rapide. Le seuil d'activation calcique est plus bas (en valeur de pCa) pour les

REPONSE D'UNE FIBRE RAPIDE

EN CALCIUM

EN STRONTIUM



20 mv |
10 sec

10 mv |
10 sec

REPONSE D'UNE FIBRE LENTE

EN CALCIUM

EN STRONTIUM

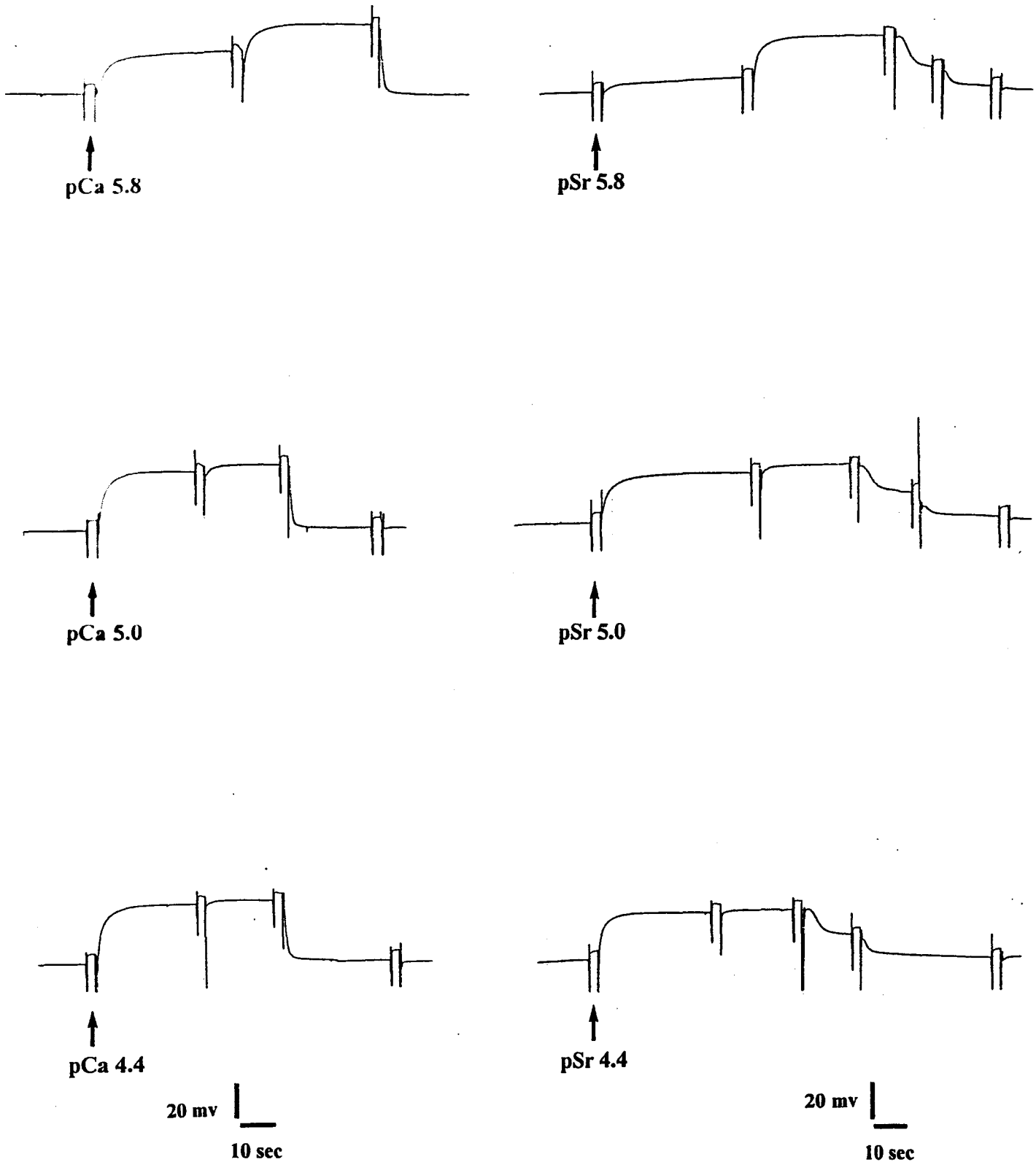


Figure 24 bis : Exemples de tensions sous maximales et maximales en calcium et en strontium pour une fibre lente et une fibre rapide. Les tensions maximales sont induites en calcium et en strontium respectivement par l'application d'une solution pCa 4.2 et pSr 3.4.

fibres rapides que pour les fibres lentes adultes. Par contre, les valeurs de pCa_{50} des fibres lentes et rapides ne sont pas sensiblement différentes.

Les paramètres dérivés des relations T/pCa et T/pSr des faisceaux de fibres de rats nouveau-nés n'ont pas été comparés à celles des fibres de rats adultes, puisque dans un cas il s'agit d'un faisceau, donc d'un ensemble de fibres pelées et dans l'autre de fibres pelées isolées.

C - Corrélations entre la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine et le critère Δ

La figure 25 illustre la relation établie pour chaque âge post-natal entre les pourcentages relatifs des différents types de MHC et les valeurs de Δ . L'expression de la MHC I augmente de façon continue de 6 à 17 jours, les valeurs de Δ diminuent et le muscle évolue vers un type lent. Toutefois, de 17 à 23 jours post-natals, la composition en isoforme de MHC I reste inchangée tandis que les valeurs moyennes de Δ continuent à diminuer. Au cours du développement post-natal, la proportion relative de MHC IIA augmente alors que la proportion de MHC néo régresse. Les coefficients de corrélation entre la composition en isoformes de MHC (exprimée en pourcentage relatif pour chaque type d'isoforme) et la valeur de Δ pour chaque faisceau sont répertoriés dans le tableau 5. Les résultats montrent que le taux de corrélation entre un type d'isoforme de MHC donnée et le critère Δ dépend du stade post-natal étudié. Ainsi, aucune corrélation réelle n'est décelable à 6 et 12 jours. Par contre, à 17 jours post-natals, la MHC néo présente le meilleur taux de corrélation alors qu'à 23 jours post-natals, âge où le muscle commence à affirmer son typage lent, ce sont les isoformes adultes dominantes (MHC I et MHC IIA) qui montrent le meilleur taux de corrélation.

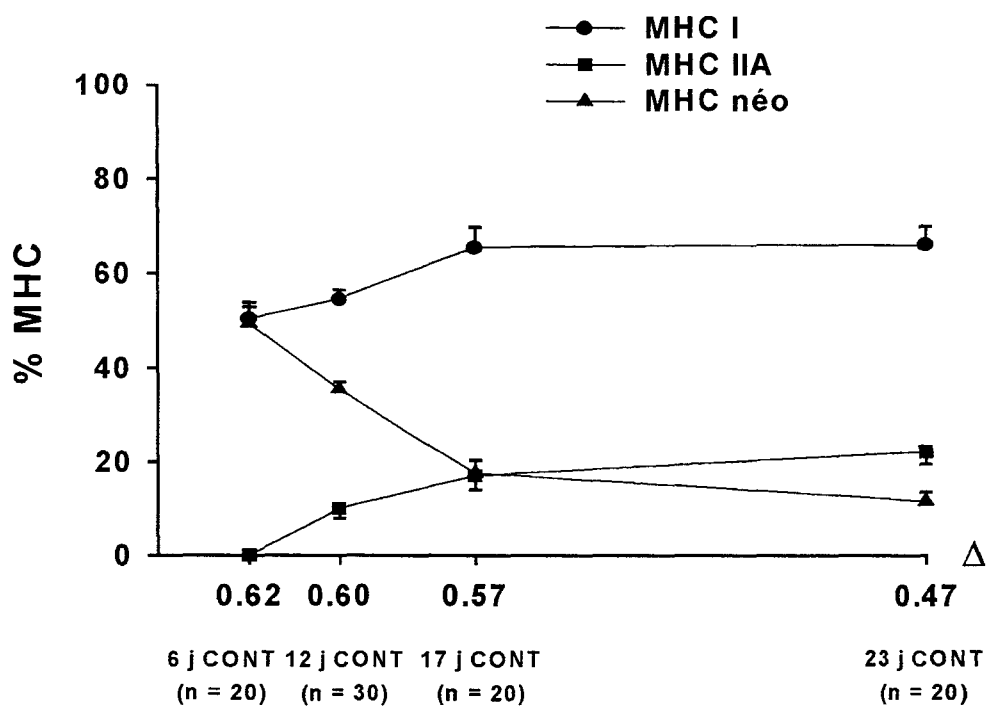


Figure 25 : Relations établies entre la moyenne des valeurs de Δ pour chaque âge post-natal et la valeur moyenne de chaque isoforme de myosine exprimée.

	6 j CONT	12 j CONT	17 j CONT	23 j CONT
r MHC I	0.093	0.12	0.51	0.86
r MHC néo	0.093	0.18	0.82	0.07
r MHC IIA	-	0.013	0.38	0.97

Tableau 5 : Evolution du taux de corrélation entre la valeur de Δ et la composition en isoformes de MHC établi pour chaque faisceau contrôle (r : coefficient de corrélation).

CHAPITRE 2

EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS DE RAT NOUVEAU-NE APRES UNE PERIODE D'IMMOBILISATION DE SIX JOURS EN PRESENCE DE L'INNERVATION POLYNEURALE

L'immobilisation a été imposée au membre postérieur du rat entre 6 jours et 12 jours post-natals.

I - CRITERES D'ATROPHIE MUSCULAIRE

A - Evolution des masses corporelles et musculaires

Le tableau 6 récapitule l'évolution du poids corporel (BW en g) et du poids du soleus (MW en mg) des rats immobilisés du 6ème au 12ème jour post-natal. Les mesures ont été réalisées sur un minimum de 10 animaux par groupe. Après 6 jours d'immobilisation, le poids corporel des rats nouveau-nés continue à évoluer normalement, alors que la masse musculaire présente une diminution de 51.73 % par rapport au groupe 12 j CONT. Le nombre total de fibres mesuré sur la section transversale du muscle passe de 2050 ± 110 pour les animaux contrôles à 2176 ± 71 après immobilisation, les valeurs n'étant pas significativement différentes.

	BW (g)	MW (mg)
6 j CONT (30)	13.5 ± 0.3	2.1 ± 0.1
12 j CONT (16)	26.4 ± 0.8 †	5.8 ± 0.2 †
12 j IMMO (19)	24.7 ± 0.6 †	2.8 ± 0.2 †§

Tableau 6 : Evolution du poids corporel du rat (BW en g) et du muscle soleus (MW en mg).

Les moyennes ont été obtenues à partir du nombre d'animaux entre parenthèses.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT.

B - Surface des fibres

La surface de chaque type de fibres identifié par marquage ATPasique sur coupes transversales de muscles entiers a été déterminée à partir d'un minimum de 300 fibres. De 6 à 12 j CONT (figure 26), les fibres de type IIC présentent une augmentation progressive de la surface. Suite à une période d'immobilisation de six jours, une diminution significative de la surface de chaque type de fibres est observée : 50.49 % de diminution par rapport au groupe 12 j CONT pour les fibres de type I et 30 % pour les fibres de type IIC. L'atrophie est donc plus sévère pour les fibres de type I, et les fibres de type IIC présentent à 12 j IMMO une surface comparable à celle des fibres de type IIC à 6 j CONT.

L'immobilisation de 6 à 12 jours post-natals induit donc une atrophie significative matérialisée par une diminution de la surface de chaque type de fibre.

II - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES DU MUSCLE SOLEUS DE RAT IMMOBILISE ENTRE 6 ET 12 JOURS POST-NATALS

A - Typage ATPasique

L'histogramme de la figure 27 présente la répartition des différents types de fibres identifiés par ATPase sur coupes de muscles entiers. Du 6ème au 12ème jour post-natal, la composition en fibres évolue et est marquée par l'apparition des fibres de type I (52 %) et la régression des fibres de type IIC ; ainsi, 100 % des fibres sont de type IIC à 6 jours contre 48 % à 12 jours contrôles.

Suite à une période d'immobilisation, les typages ATPasiques présentent une modification significative par rapport aux groupes contrôles. A 12 jours, la

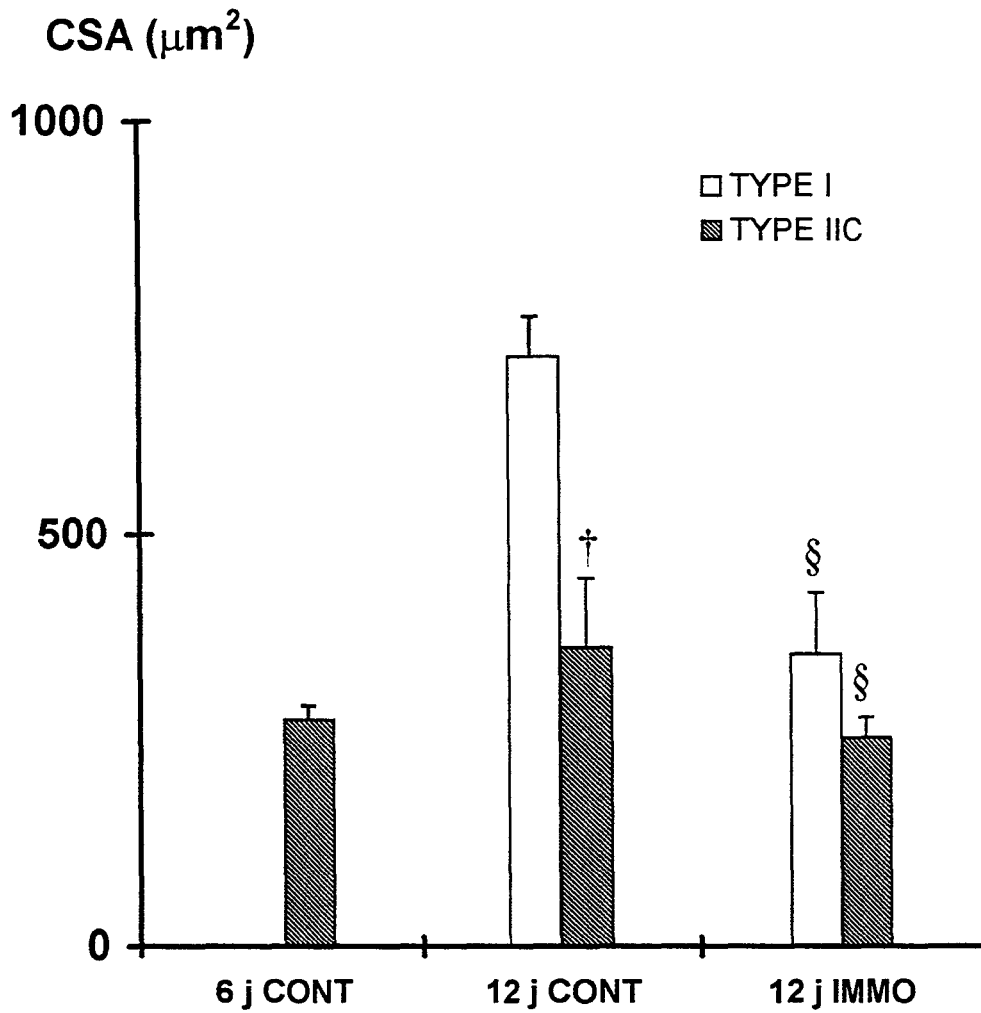


Figure 26 : Evolution des sections transversales (CSA en μm^2) des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT.

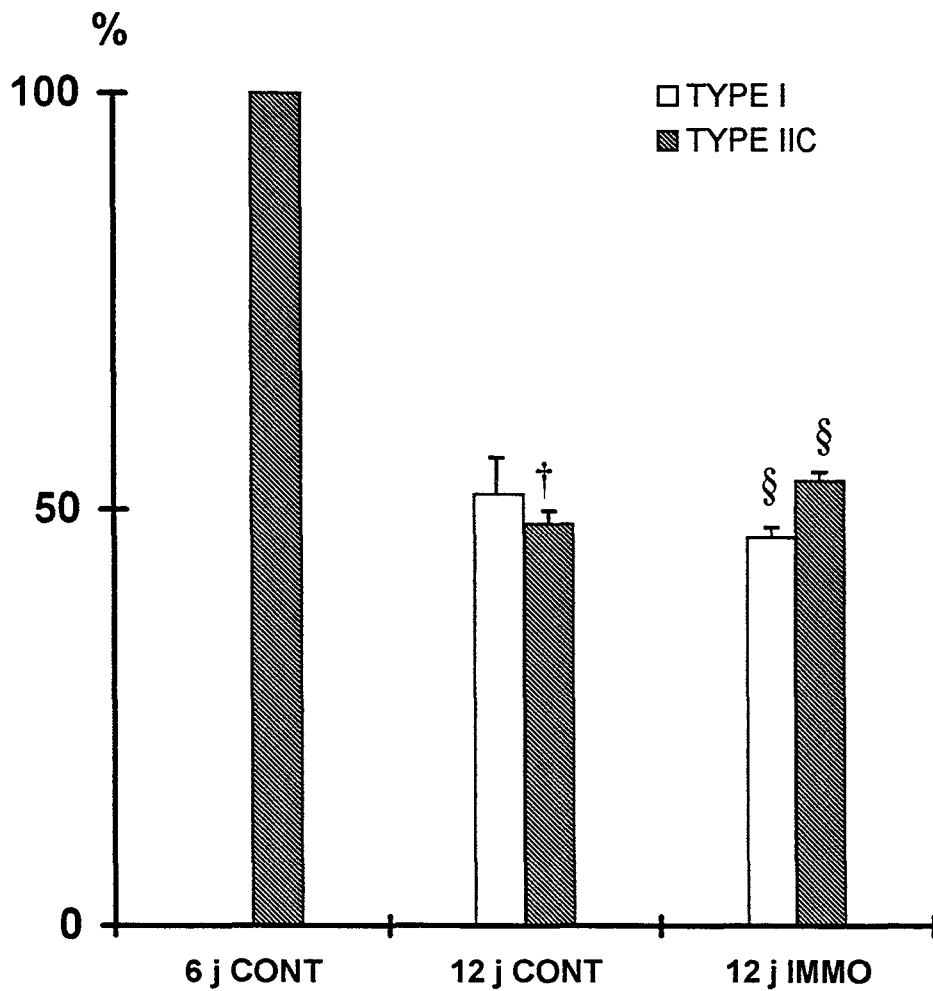


Figure 27 : Evolution des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT.

répartition en types de fibres montre à nouveau une prédominance du type indifférencié IIC (53.36 %) et une diminution des fibres de type I. Aux âges examinés, aucune fibre de type IIA ou IIB n'a été identifiée.

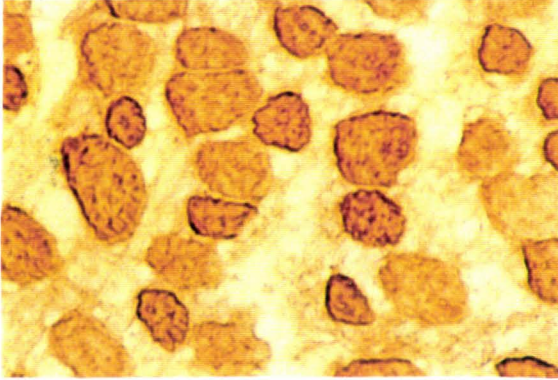
B - Immunohistochimie

Une analyse immunohistochimique a été réalisée sur les muscles soleus de rat des groupes 12 j CONT et 12 j IMMO préalablement soumis à un marquage ATPasique. Les résultats sont illustrés par les figures 28 et 29. L'absence de myosine embryonnaire a été confirmée par la réaction négative de l'anticorps 2B6 sur les groupes 6 et 12 j CONT et le groupe 12 j IMMO.

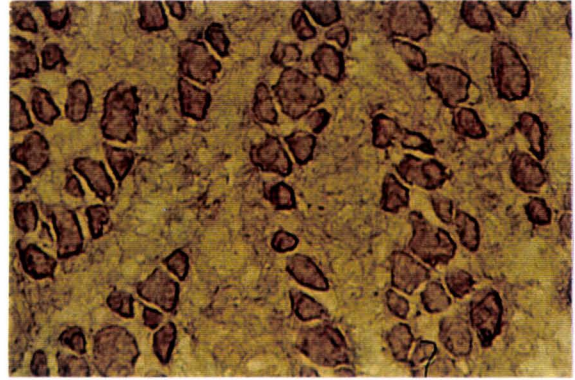
La réaction positive de l'anticorps NCL-MHCd ne peut par conséquent être attribuée qu'à la présence de MHC néo. Ce résultat est confirmé par la réaction de l'anticorps NN7. Pour des soucis de clarté et de simplification, la réaction de l'anticorps NCL MHCd sera seule illustrée ici.

Alors que la réaction ATPasique ne permet de distinguer que 2 types différents de fibres, la réaction immunohistochimique affine ce classement en faisant apparaître 4 populations de fibres différentes en fonction de leur positivité aux anticorps. Le type I en ATPase correspond en fait à 2 sous populations de fibres : LN (exprimant la MHC I et la MHC néo) et LNR (MHC I, MHC néo, MHC IIA/IIB), et le type IIC à LNR et NR (MHC I et MHC IIA/IIB exprimées). Concernant le groupe 12 j CONT, il apparaît que toutes les fibres, quel que soit leur type ATPasique, expriment encore la MHC néo. Ce serait l'isoforme adulte lente qui imposerait le type ATPasique I, alors que le type IIC est davantage le résultat de la coexpression des isoformes de MHC IIA et MHC néo.

A : Anticorps NCL MHCd

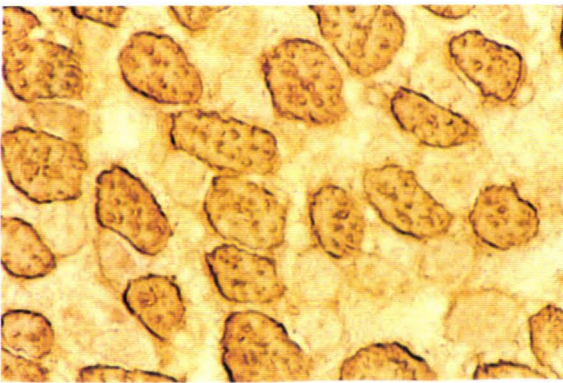


1 : soleus 12 j CONT, G x 50

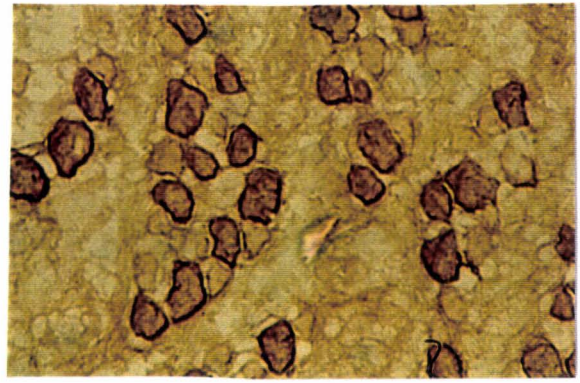


2 : soleus 12 j IMMO, G x 50

B : Anticorps NCL MHCs

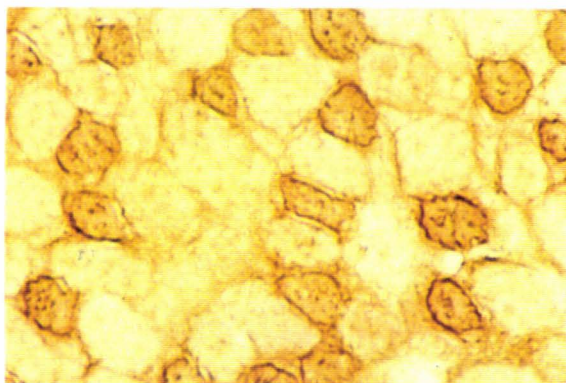


1 : soleus 12 j CONT, G x 50



2 : soleus 12 j IMMO, G x 50

C : Anticorps NCL MHCf



1 : soleus 12 j CONT, G x 50



2 : soleus 12 j IMMO, G x 50

Figure 28 : Identification des isoformes de MHC par immunohistochimie, pour les groupes 12 j CONT et 12 j IMMO. Les coupes ont été incubées avec les anticorps indiqués en A, B et C.

Tableau récapitulatif de la réactivité des anticorps face aux différentes isoformes de myosine

ANTICORPS	MHC I	MHC IIA + IIB	MHC néo	MHC emb
NCL-MHCs	+	-	-	-
NCL-MHCf	-	+	-	-
NCL-MHCd *	-	-	+	+
2 B6	-	-	-	+
NN 7	-	-	+	-

* Aux stades post-natals étudiés, cet anticorps reconnaît uniquement la MHC néo.

Désignation de la réactivité positive aux anticorps

ANTICORPS	MHC identifiée	DESIGNATION
NCL-MHCs	MHC I	L
NCL-MHCf	MHC IIA + IIB	R
NCL-MHCd	MHC néo	N

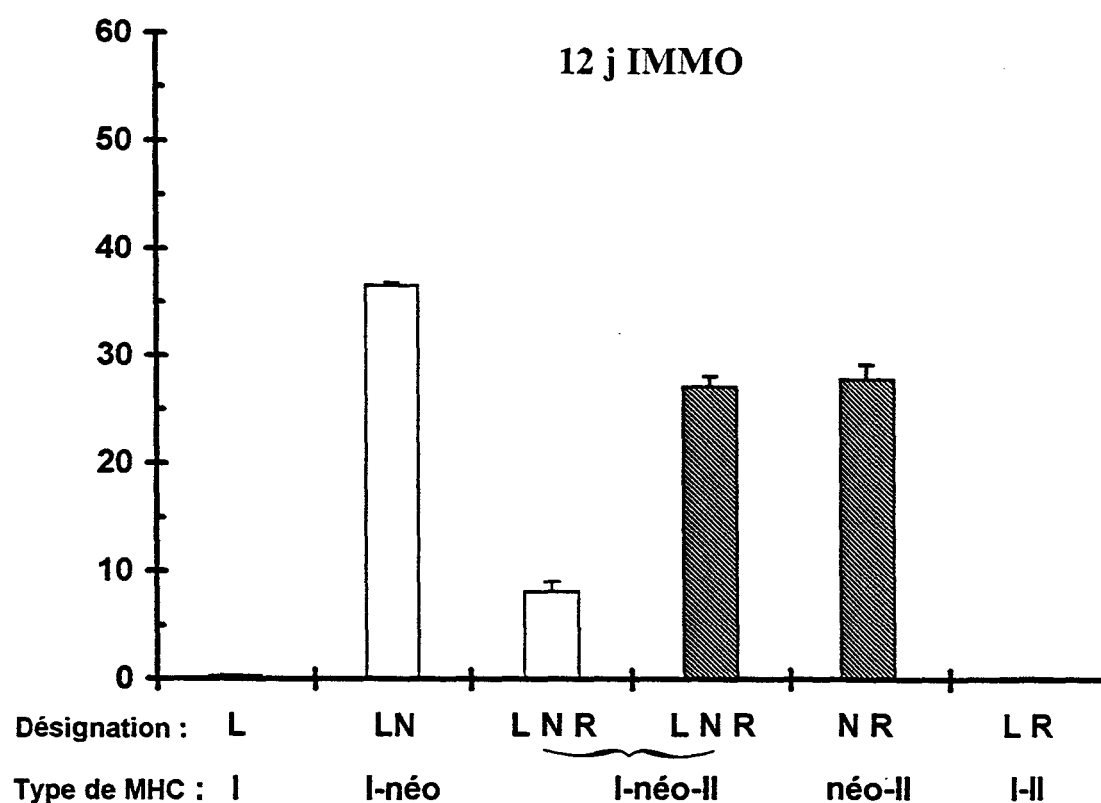
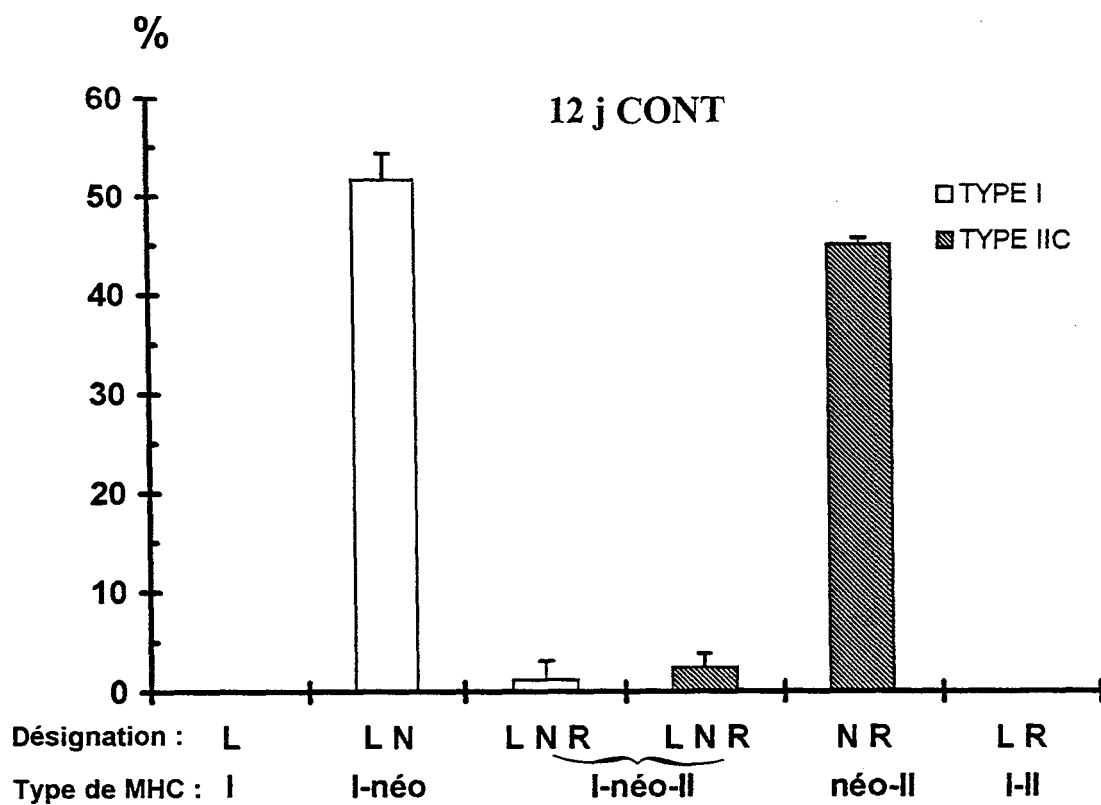


Figure 29 : Corrélation entre les différents types de fibres (déterminés par typage ATPasique) et la composition en isoformes de MHC, déterminée par immunohistochimie du muscle soleus après une période d'immobilisation du 6ème au 12ème jour post-natal. Nous avons désigné l'expression d'isoformes de MHC rapides par MHC II puisque l'anticorps utilisé NCL MHCf reconnaît indifféremment les isoformes IIA et IIB.

Suite à une période d'immobilisation de 6 jours, en immunohistochimie, 2 sous populations nouvelles apparaissent, l'une exprimant la MHC I (L) et l'autre coexprimant les MHC I et IIA/IIB (LR). La MHC néo reste exprimée dans la quasi totalité des fibres de soleus immobilisés. Globalement, il se produit un "glissement" dans le typage après 6 jours d'immobilisation vers des populations de fibres exprimant à la fois la MHC néo et la MHC IIA (ou IIB) qui en ATPase sont identifiées comme le type IIC indifférencié. Ainsi, la forme LNR en histochimie est renforcée, tout spécialement celle correspondant aux fibres identifiées IIC en ATPase. D'après ces résultats, le muscle semble "se réorienter" vers un état indifférencié.

En outre, lorsque l'on considère uniquement la population de fibres dans lesquelles sont exprimées des MHC rapides, il se produit après immobilisation une surexpression de ces isoformes rapides : 63.19 % de fibres comportent la MHC IIA (ou IIB) pour le soleus immobilisé contre 48.49 % pour le soleus contrôle.

C - Analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine

Une analyse de la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine a été réalisée sur les faisceaux de fibres de soleus de rats immobilisés. Les faisceaux utilisés dans cette étude comportent d'une part, les faisceaux préalablement typés par le test strontium (voir III) et d'autre part, compte-tenu de la faible quantité de protéines présente dans chaque faisceau et de plus d'une perte de matière après immobilisation, de faisceaux non identifiés fonctionnellement.

Un exemple de profil de migration électrophorétique est présenté à la figure 30. L'histogramme de la figure 31 illustre pour chaque groupe la composition en isoformes de MHC, déterminée par analyse densitométrique.

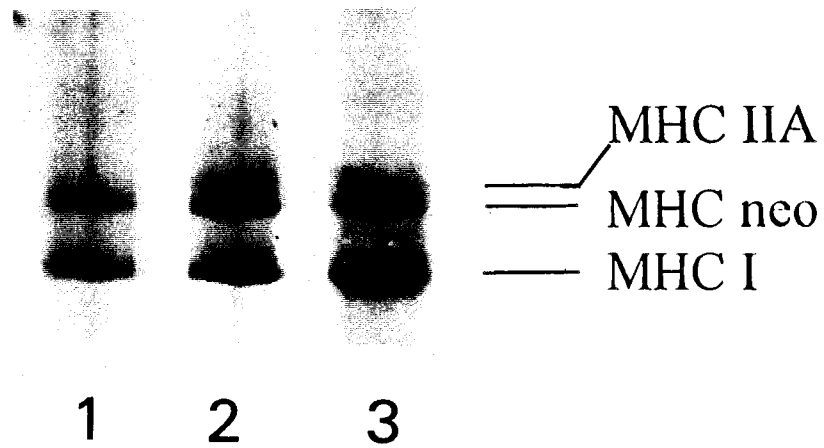


Figure 30 : Profil de migration électrophorétique des isoformes de MHC. Les numéros indiquent les puits :
1 : faisceau du groupe 6 j CONT, 2 : faisceau du groupe 12 j CONT, 3 : faisceau du groupe 12 j IMMO.

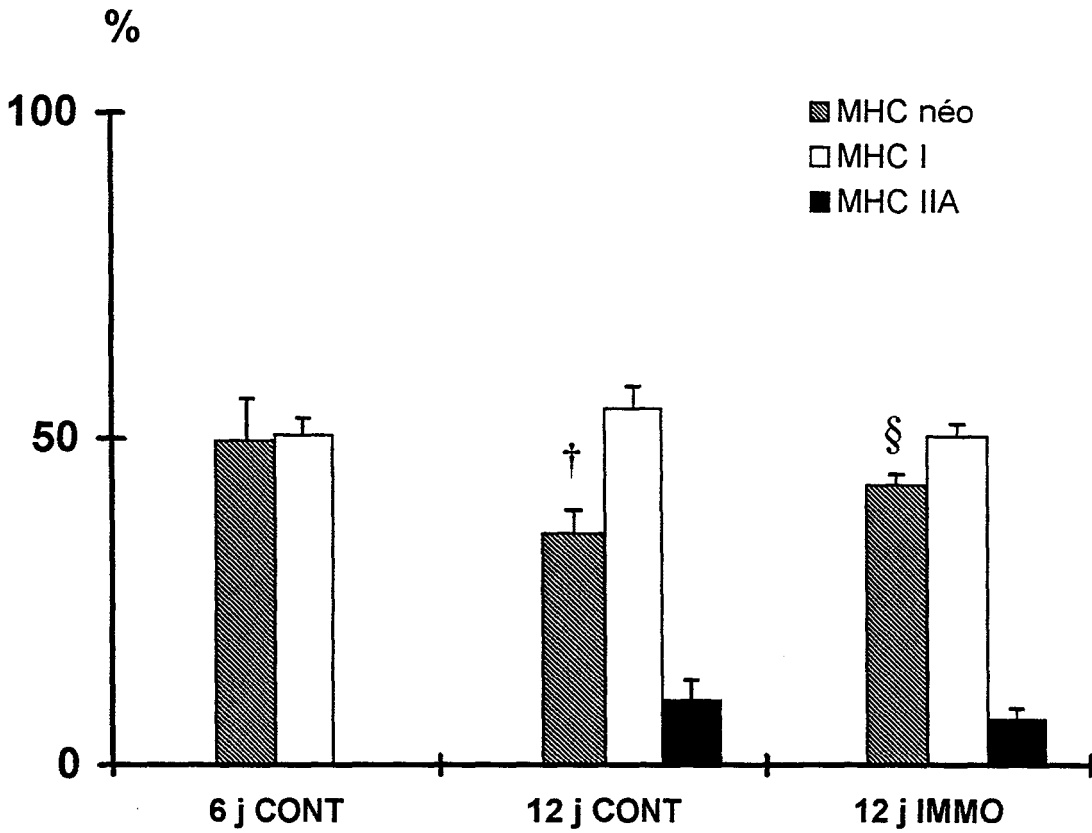


Figure 31 : Evolution de la composition en isoformes de MHC après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats exprimés sous forme de moyenne \pm ESM ont été établis respectivement à partir de 27, 38 et 26 faisceaux de fibres, pour les groupes 6 j CONT, 12 j CONT et 12 j IMMO.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT, § avec le groupe 12 j CONT.

Après une période d'immobilisation, les isoformes de MHC adultes, I et IIA du groupe 12 j IMMO présentent une légère diminution par rapport au groupe 12 j CONT. Pour le groupe 12 j IMMO, la MHC I atteint ainsi 50 %, contre 54 % pour 12 j CONT, et la MHC IIA, 7 % (contre 10 % pour 12 j CONT). Cette diminution reste cependant non significative.

Parallèlement, se produit une augmentation significative de la MHC néo (43 % pour 12 j IMMO contre 35 % pour 12 j CONT) qui retrouve alors une proportion équivalente à celle du groupe 6 j CONT.

III - EVOLUTION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS DE RAT IMMOBILISE ENTRE 6 ET 12 JOURS POST-NATALS

A - Tensions maximales

Le tableau 7 récapitule les résultats obtenus pour les faisceaux de fibres des groupes 6 j CONT, 12 j CONT et 12 j IMMO.

Du 6ème au 12ème jour post-natal, une augmentation graduelle de la force est observée. Après 6 jours d'immobilisation, il se produit une perte significative de force par rapport au groupe 12 j CONT. P_0 atteint alors un niveau de force comparable à celui observé à 6 j CONT. Parallèlement à cette perte de force, rappelons qu'après immobilisation, il se produit une atrophie significative attestée par la diminution de la surface de la section transversale des fibres (voir I-B).

	P_0 kN/m ²
6 j CONT (20)	57.37 ± 4.19
12 j CONT (30)	64.97 ± 4.07
12 j IMMO (20)	50.70 ± 4.54 §

Tableau 7 : Evolution des tensions maximales P_0 exprimées en kN/m² des faisceaux de rats nouveau-nés. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de faisceaux étudiés.

A partir de $P < 0.05$, § indique une différence significative avec le groupe 12 j CONT.

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

La figure 32 présente l'histogramme de répartition des valeurs de Δ et la figure 33 les relations T/pCa obtenus sur les faisceaux de fibres des groupes d'animaux contrôles (groupe 6 et 12 j CONT) et immobilisés (groupe 12 j IMMO). Le tableau 8 récapitule les caractéristiques d'activation par le Ca^{2+} .

Comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent (figure 23), les valeurs de Δ (pCa₅₀-pSr₅₀) sont localisées entre celles obtenues classiquement sur un muscle soleus pour des fibres lentes et rapides et révèle la présence d'une population homogène de faisceaux de fibres de type intermédiaire.

Après 6 jours d'immobilisation, la moyenne des valeurs de Δ augmente significativement tout en restant dans une gamme de valeurs intermédiaires.

L'étude des paramètres dérivés des relations T/pCa (figure 33) montre qu'après immobilisation, les faisceaux du groupe 12 j IMMO présentent des caractéristiques d'activation calciques différentes des groupes contrôles (tableau 8) :

- le seuil d'activation calcique se situe entre les groupes 6 et 12 j CONT, bien que cette différence ne soit pas significative. La valeur du seuil se rapproche de celle observée pour le groupe 6 j CONT ;

- la pCa₅₀ présente une évolution vers des valeurs de pCa plus fortes, donc des gammes de concentration en Ca plus faibles. Elle se rapproche de façon significative de la valeur de pCa₅₀ du groupe 6 j CONT ; l'affinité des protéines contractiles pour le Ca semble donc modifiée après 6 jours d'immobilisation ;

- la pente (n) ne présente pas de modification sensible après immobilisation.

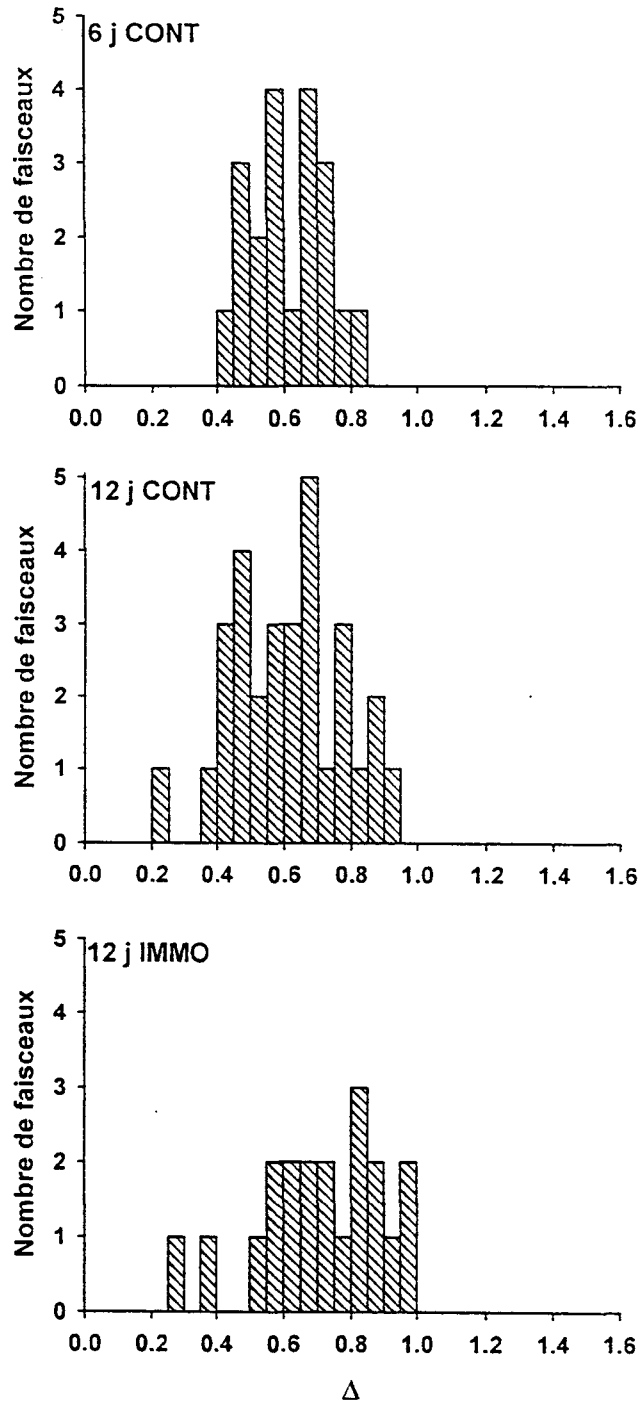


Figure 32 : Modification de la distribution des valeurs de Δ (pCa₅₀-pSr₅₀), déterminées pour les faisceaux de fibres de rats nouveau-nés suite à une immobilisation du 6ème au 12ème jour post-natal.

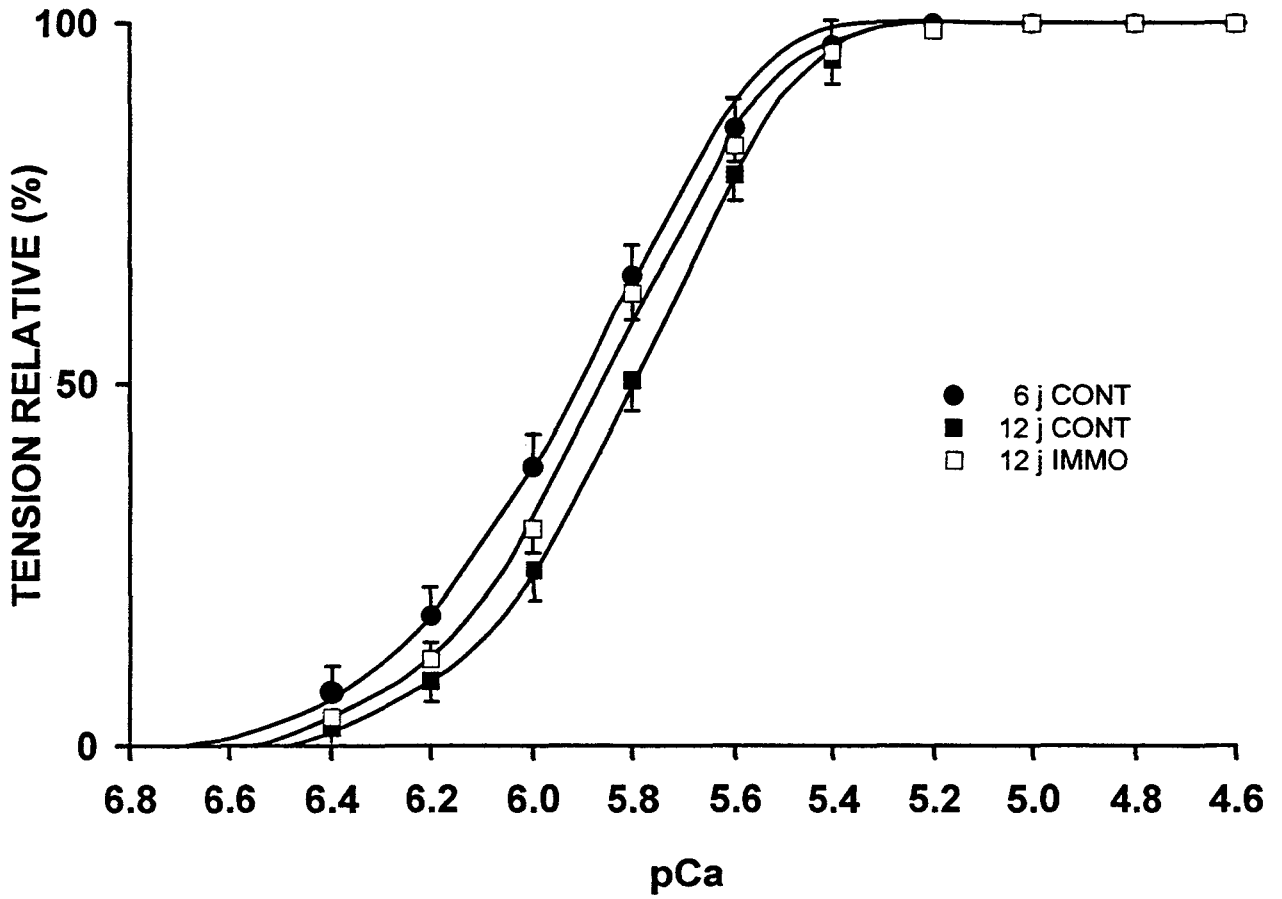


Figure 33 : Relations Tension/pCa établies pour les groupes 6 j CONT, 12 j CONT et 12 j IMMO. Chaque point expérimental est exprimé sous forme de moyenne \pm ESM. Chaque courbe est établie suivant l'équation théorique de Hill.

	pCa _{seuil}	pCa ₅₀	Δ	n
6 j CONT (20)	6.76 ± 0.06	5.90 ± 0.03	0.62 ± 0.03	3.28 ± 0.31
12 j CONT (30)	6.57 ± 0.04 †	5.80 ± 0.02 †	0.60 ± 0.03	3.40 ± 0.24
12 j IMMO (20)	6.69 ± 0.04	5.87 ± 0.03 †§	0.71 ± 0.03 †§	3.04 ± 0.14

Tableau 8 : Evolution des propriétés d'activation par le Ca et le Sr après une période d'immobilisation de 6 jours. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de faisceaux sur lesquels l'étude a été réalisée. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe 6 j CONT ; § avec le groupe 12 j CONT.

CHAPITRE 3

EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT NOUVEAU-NE APRES UNE IMMOBILISATION DE SIX JOURS EN ETAT D'INNERVATION MONOSYNAPTIQUE.

L'immobilisation a été imposée au membre postérieur du rat entre 17 jours et 23 jours post-natals.

I - CRITERES D'ATROPHIE MUSCULAIRE

A - Evolution des masses corporelles et musculaires

Le tableau 9 présente l'évolution du poids corporel (BW en g), et du poids musculaire (MW en mg). Après 6 jours d'immobilisation, le poids corporel du rat montre une évolution normale alors que le muscle présente une atrophie de 38.50 % par rapport au groupe 23 j CONT. Il acquiert alors un poids comparable à celui des muscles soleus du groupe 17 j CONT.

B - Surface des fibres

L'histogramme de la figure 34 présente l'évolution de la surface des fibres selon leur typage ATPasique. De 17 à 23 jours contrôles, tous les types de fibres du soleus présentent un accroissement de leur surface, bien que les variations ne soient pas significativement différentes. Une immobilisation de 17 à 23 jours post-natals provoque une atrophie significative de tous les types de fibres observés.

	BW (g)	MW (mg)
17 j CONT (16)	34.28 ± 0.30	11.66 ± 0.37
23 j CONT (19)	55.98 ± 1.17 #	20.70 ± 0.47 #
23 j IMMO (15)	56.14 ± 1.85 #	12.73 ± 0.78 ‡

Tableau 9 : Evolution du poids corporel du rat (BW en g) et du muscle soleus (MW en mg).

Les moyennes ont été obtenues à partir du nombre d'animaux entre parenthèses.

A partir de $P < 0.05$, # indique une différence significative avec le groupe 17 j CONT, ‡ avec le groupe 23 j CONT.

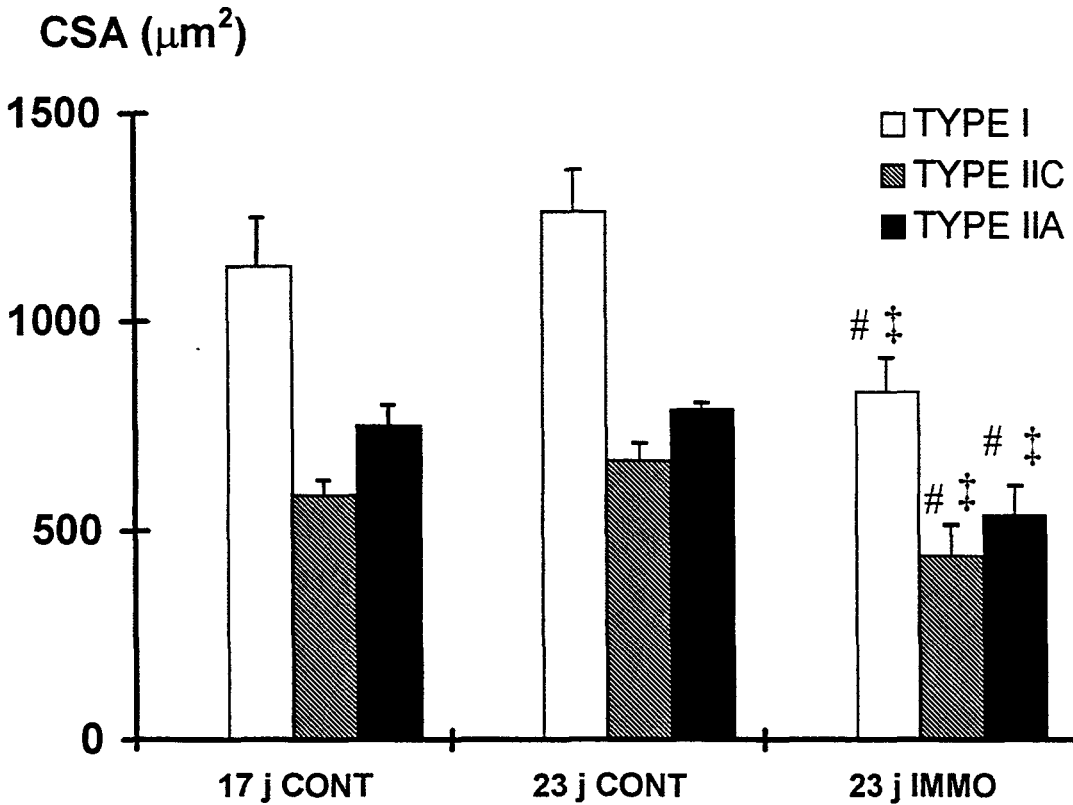


Figure 34 : Evolution des sections transversales (CSA en μm^2) des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM.

A partir de $P < 0.05$, # indique une différence significative avec le groupe 17 j CONT, ‡ avec le groupe 23 j CONT.

II - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 17 A 23 JOURS POST-NATALS

A - Typage ATPasique

L'histogramme de la figure 35 illustre l'évolution des typages ATPasiques du muscle soleus après une immobilisation du 17ème au 23ème jour.

Du 17ème au 23ème jour, l'évolution normale du soleus correspond à un renforcement du nombre de fibres du type I et une diminution de celles du type IIC. Après une période d'immobilisation, la proportion du type I diminue (63.40 % pour le groupe 23 j CONT et 50.96 % pour le groupe 23 j IMMO), mais l'effet est encore plus marqué pour le type IIC (34.20 % pour le groupe 23 j CONT et 3.95 % pour le groupe 23 j IMMO). Une surexpression très importante du type IIA est observée après immobilisation. La population des fibres de type IIA atteint 45 % (contre 2.40 % pour le groupe 23 j CONT).

B - Immunohistochimie

L'analyse immunohistochimique a été réalisée sur les muscles de rats 23 j CONT et 23 j IMMO soumis à une ATPase. Les résultats sont matérialisés par les figures 36 et 37. L'encart de la figure 36 illustre l'importance de l'atrophie constatée. Sur les animaux contrôles, l'absence de MHC emb a été confirmée par la réaction négative de l'anticorps 2B6. La réaction positive de l'anticorps NCL MHCd ne peut donc être attribuée qu'à la présence de la MHC néo.

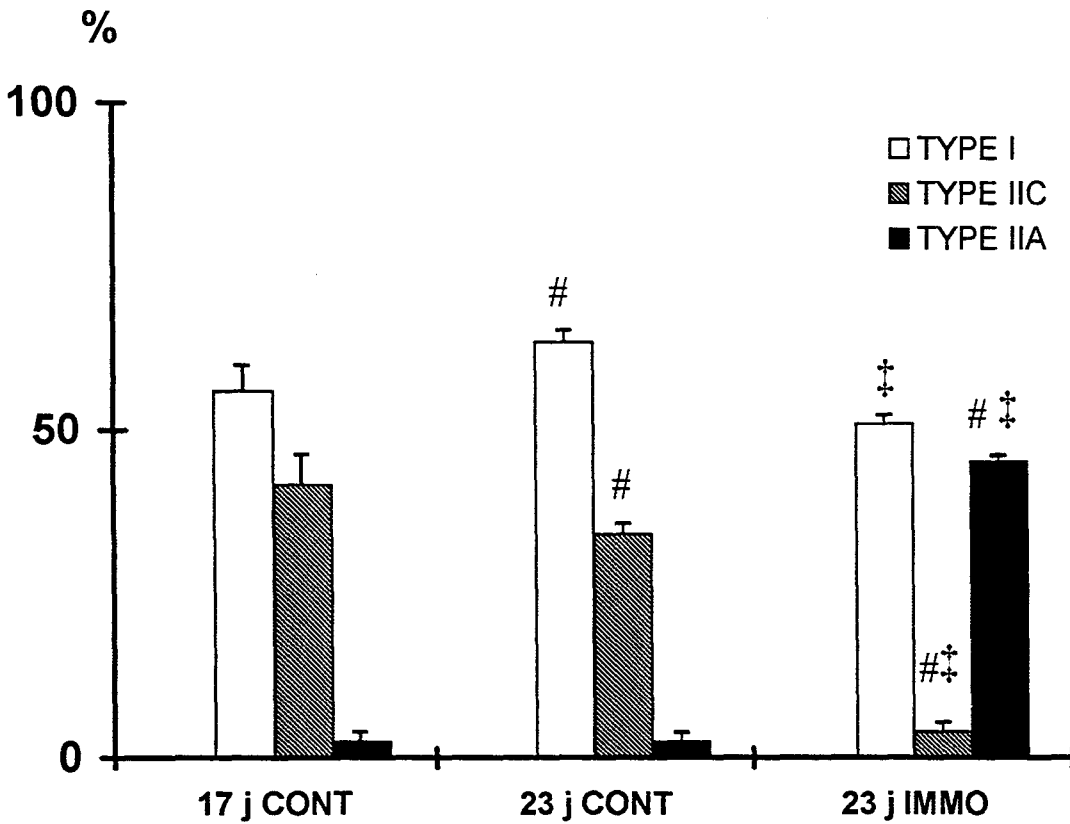
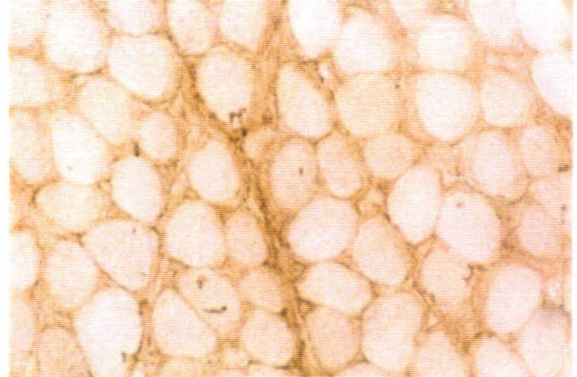


Figure 35 : Evolution des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM. A partir de $P < 0.05$, # indique une différence significative avec le groupe 17 j CONT, ‡ avec le groupe 23 j CONT.

A : Anticorps NCL MHCd



1 : soleus 23 j CONT, G x 20



2 : soleus 23 j IMMO, G x 50

B : Anticorps NCL MHCs

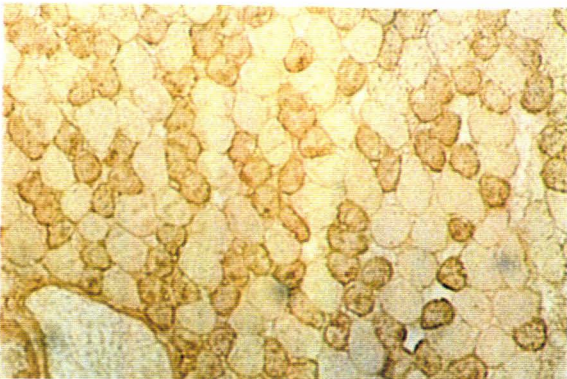


1 : soleus 23 j CONT, G x 20

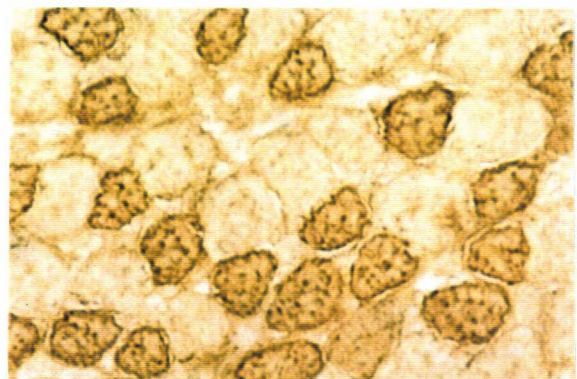


2 : soleus 23 j IMMO, G x 50

C : Anticorps NCL MHCf



1 : soleus 23 j CONT, G x 20



2 : soleus 23 j IMMO, G x 50

Figure 36 : Identification des isoformes de MHC par immunohistochimie, pour les groupes 23 j CONT et 23 j IMMO. Les coupes ont été incubées avec les anticorps indiqués en A, B et C.

Bien que les typages ATPasiques ne présentent que 3 populations dans le groupe 23 j CONT, les réactions immunohistochimiques révèlent en fait 7 populations de fibres avec différentes coexpressions de MHC. Ainsi à 23 j CONT, 52.84 % des fibres de type I expriment uniquement la MHC I. La MHC néo est exprimée dans 45.80 % des fibres et est coexprimée avec les isoformes adultes MHC I et/ou MHC II. Dans le cas d'une coexpression avec l'isoforme lente, il semblerait que ce soit celle-ci qui impose le typage I, alors que dans le cas d'une coexpression avec l'isoforme II, la fibre s'oriente vers un type intermédiaire IIC. Lorsque la coexpression de la MHC néo s'effectue avec les 2 isoformes adultes (donc présence d'au moins 3 isoformes de MHC), le typage des fibres s'oriente vers le type I lorsque la MHC I est prédominante par rapport aux autres isoformes alors que le typage s'oriente vers un état indifférencié lorsque l'isoforme II est prédominante. Ainsi le type IIC déterminé par marquage ATPasique correspond à des fibres exprimant à la fois soit MHC néo + MHC I + MHC II, soit MHC néo + MHC II, soit MHC I + MHC II.

Après immobilisation, la réaction négative de l'anticorps 2B6 indique que la MHC emb n'est pas réexprimée. De plus, l'anticorps NCL MHCd produit une réaction négative montrant la totale disparition de la MHC néo. A 23 j IMMO, le soleus ne comporte plus que les isoformes MHC I et IIA/IIB. Il présente encore en ATPase les 3 types, I, IIC et IIA. La quantité de MHC I ne semble pas varier, mais la MHC IIA (ou IIB) est surexprimée après immobilisation.

Le soleus semble donc acquérir plus rapidement après immobilisation les isoformes adultes de MHC et s'orienter vers un typage plus proche de celui décrit pour l'adulte.

Tableau récapitulatif de la réactivité des anticorps face aux différentes isoformes de myosine

ANTICORPS	MHC I	MHC IIA + IIB	MHC néo	MHC emb
NCL-MHCs	+	-	-	-
NCL-MHCf	-	+	-	-
NCL-MHCd *	-	-	+	+
2 B6	-	-	-	+
NN 7	-	-	+	-

* Aux stades post-natals étudiés, cet anticorps reconnaît uniquement la MHC néo.

Désignation de la réactivité positive aux anticorps

ANTICORPS	MHC identifiée	DESIGNATION
NCL-MHCs	MHC I	L
NCL-MHCf	MHC IIA + IIB	R
NCL-MHCd	MHC néo	N

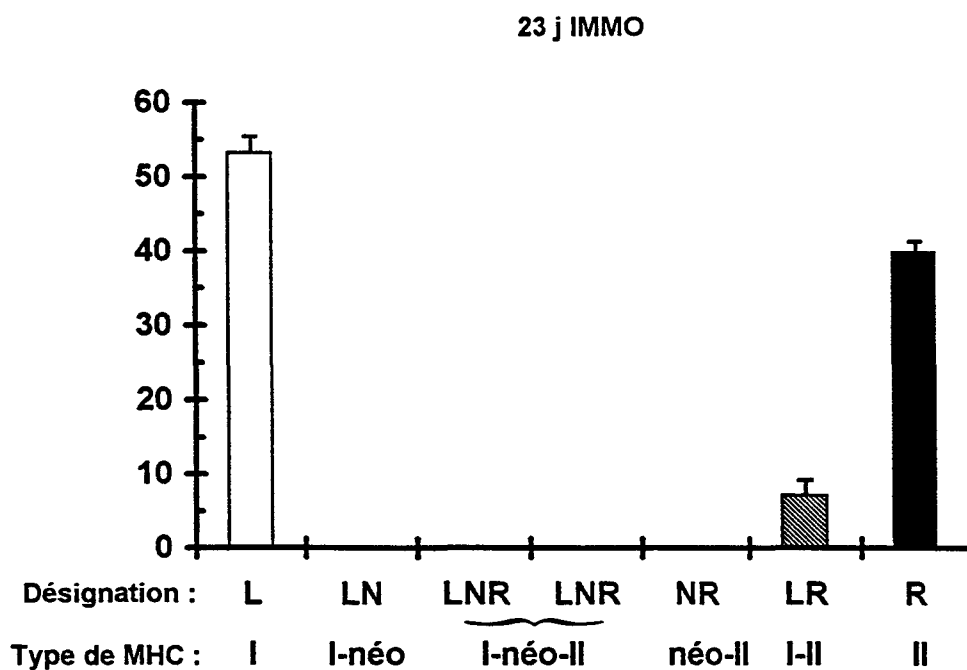
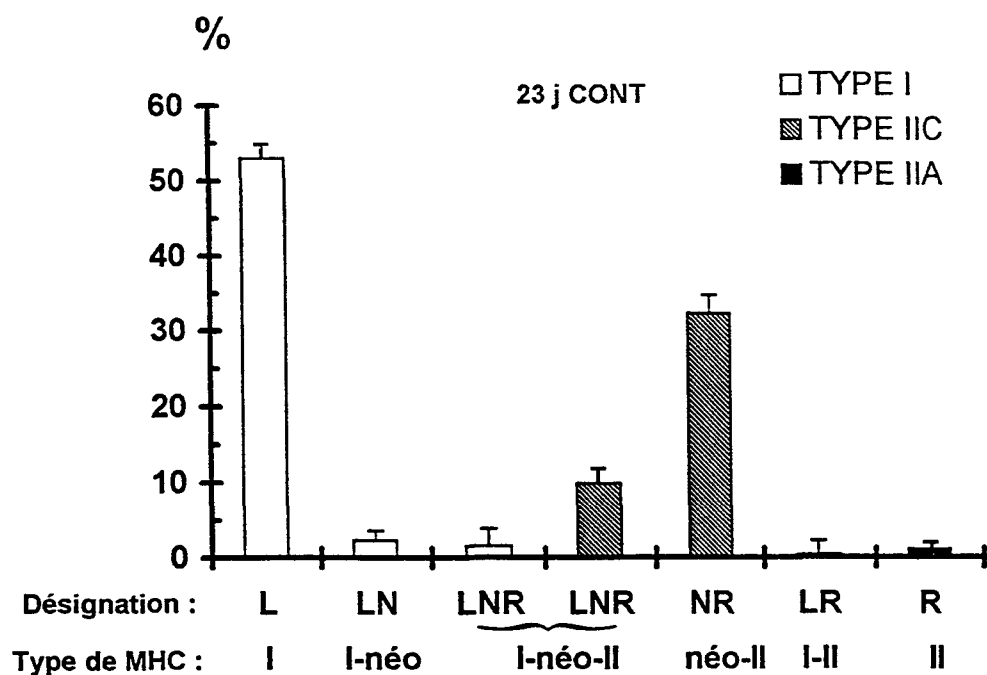


Figure 37 : Corrélation entre les différents types de fibres (déterminés par typage ATPasique) et la composition en isoformes de MHC, déterminée par immunohistochimie du muscle soleus après une période d'immobilisation du 17ème au 23ème jour post-natal. Nous avons désigné l'expression d'isoformes de MHC rapides par MHC II puisque l'anticorps utilisé NCL MHCf reconnaît indifféremment les isoformes IIA et IIB.

C - Analyse électrophorétique des isoformes de chaînes lourdes de myosine

La détermination électrophorétique des isoformes de MHC a été réalisée sur les faisceaux de fibres préalablement identifiés par le strontium. Un exemple de profil de migration est illustré à la figure 38. Compte-tenu d'une perte importante de matière due à l'immobilisation, l'analyse densitométrique des faisceaux du groupe 23 j IMMO n'a pu être réalisée. Le nombre de faisceaux exploitable était en effet trop peu important pour permettre une analyse densitométrique statistiquement fiable.

De 17 à 23 j CONT, l'analyse électrophorétique révèle le maintien de la MHC I, la disparition progressive de la MHC néo contrebalancée par l'augmentation de la MHC IIA. A ces âges, la MHC IIB n'a pas été identifiée ; en conséquence la réaction de l'anticorps NCL MHCf (précédemment décrite) ne peut être attribuée qu'à l'isoforme MHC IIA.

Après une période d'immobilisation de 6 jours, la répartition des isoformes de MHC montre un maintien de la MHC I, une disparition totale de la MHC néo, et parallèlement une surexpression de la MHC IIA. De plus, une isoforme de MHC rapide non exprimée précédemment apparaît. Il s'agit de la MHC IIB dont la migration électrophorétique est située entre la MHC néo et la MHC I.

Après immobilisation, la réaction positive de l'anticorps NCL MHCf peut être attribuée à l'une ou l'autre des deux isoformes de MHC rapides : MHC IIA et MHC IIB. Cependant, aucun type IIB n'a pu être identifié après ATPase.

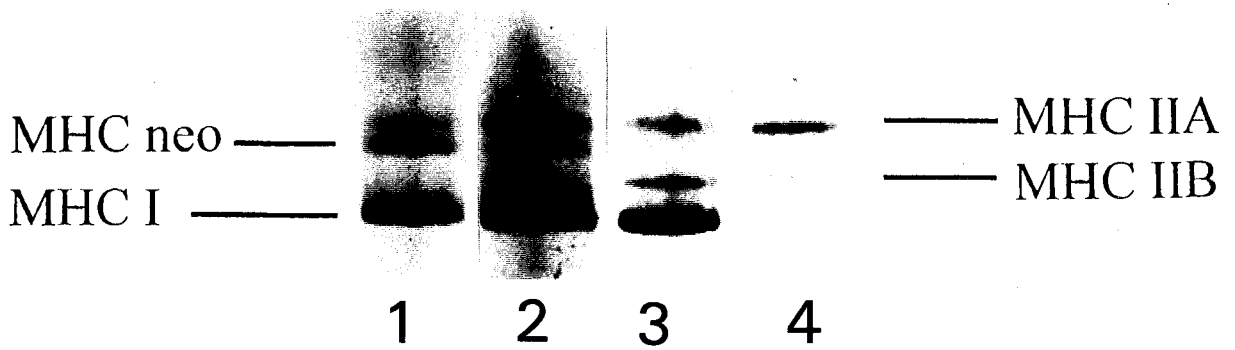


Figure 38 : Profils de migration électrophorétique des isoformes de MHC. Les numéros indiqués font référence aux puits :

1 : faisceau du groupe 17 j CONT, 2 : faisceau du groupe 23 j CONT, 3 : faisceau du groupe 23 j IMMO, 4 : fibre d'EDL adulte.

III - EVOLUTION DES PROPRIETES FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 17 A 23 JOURS POST-NATALS

A - Tensions maximales

Les valeurs de tensions maximales (P_0) rapportées à l'unité de surface et exprimées en kN/m^2 pour les groupes 17 j CONT, 23 j CONT et 23 j IMMO sont reportées dans le tableau 10. Du 17ème au 23ème jour post-natal, le niveau de force reste stable. Après immobilisation, il se produit une légère perte de force qui reste cependant non significative.

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

Le tableau 11 récapitule les paramètres d'activation par le Ca et le Sr des faisceaux de fibres des groupes 17 j CONT, 23 j CONT et 23 j IMMO, la figure 39 donne l'histogramme de répartition des valeurs de Δ et la figure 40 les relations T/pCa.

D'après la loi d'anamorphose, ces histogrammes montrent à 17 j et 23 j CONT l'existence d'une seule population de type intermédiaire (valeurs moyennes de Δ respectivement égale à 0.57 et 0.47). Néanmoins, à 23 j CONT, l'histogramme semble s'orienter vers une distribution bimodale (présence de quelques faisceaux à valeur de Δ faible), témoin de l'affirmation du typage lent du muscle soleus.

Après 6 jours d'immobilisation, l'histogramme montre un resserrement des valeurs de Δ . La valeur moyenne de Δ n'est cependant pas modifiée significativement.

	P_0 kN/m ²
17 j CONT (20)	80.21 ± 6.81
23 j CONT (20)	79.66 ± 3.96
23 j IMMO (20)	66.85 ± 6.34

Tableau 10 : Evolution des tensions maximales P_0 exprimées en kN/m² des faisceaux de rats nouveau-nés. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de faisceaux étudiés.

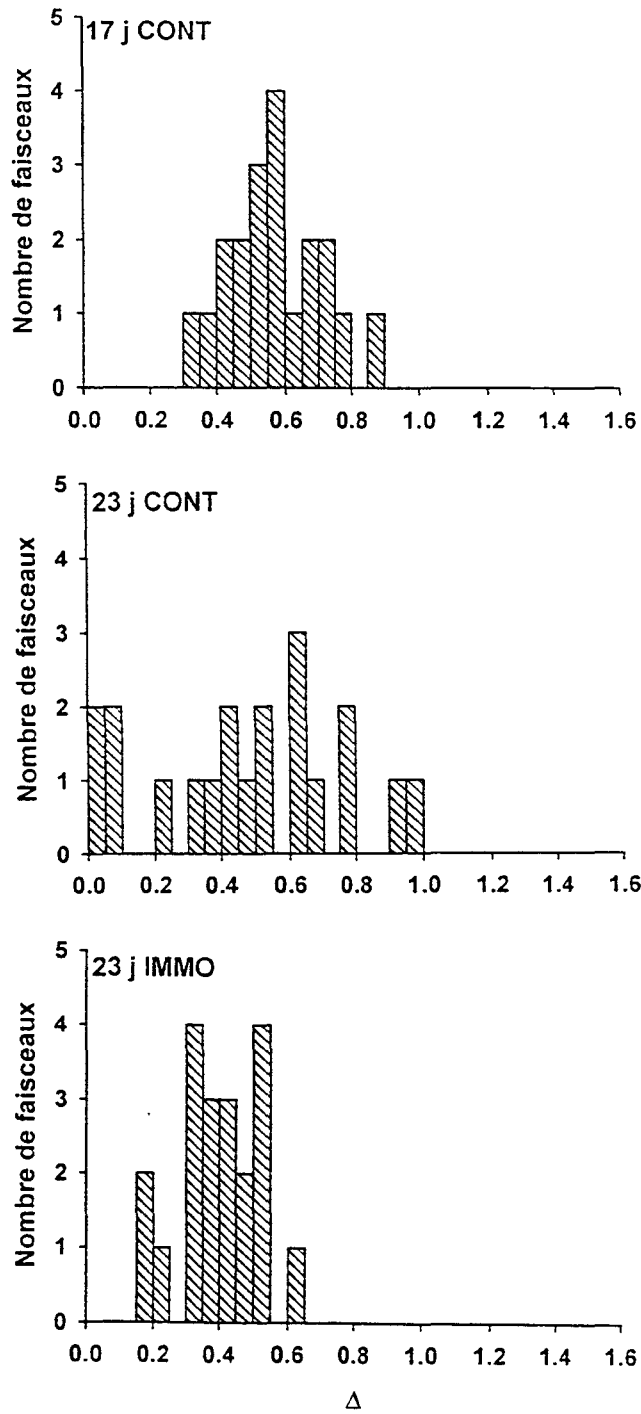


Figure 39 : Modification de la distribution des valeurs de Δ (pCa₅₀-pSr₅₀), déterminées pour les faisceaux de fibres de rats nouveau-nés suite à une immobilisation du 17ème au 23ème jour post-natal.

Les relations T/pCa (figure 40) et les paramètres d'activation par le calcium qui en découlent (tableau 11) montrent qu'après immobilisation, les faisceaux de fibres du groupe 23 j IMMO ont :

- un seuil d'activation calcique plus haut (valeur de pCa plus faible) que celui du groupe 23 j CONT. Le seuil d'activation se rapproche de celui du groupe 17 j CONT ;

- la valeur de pCa₅₀ présente une évolution vers des valeurs de pCa plus forte ;

- la pente de la relation (n) est très nettement augmentée par rapport aux groupes contrôles.

Ces résultats indiquent que suite à une immobilisation du muscle soleus intervenant dès l'installation de l'innervation définitive, celui-ci acquiert certaines caractéristiques le rapprochant du phénotype semblable d'un muscle adulte.

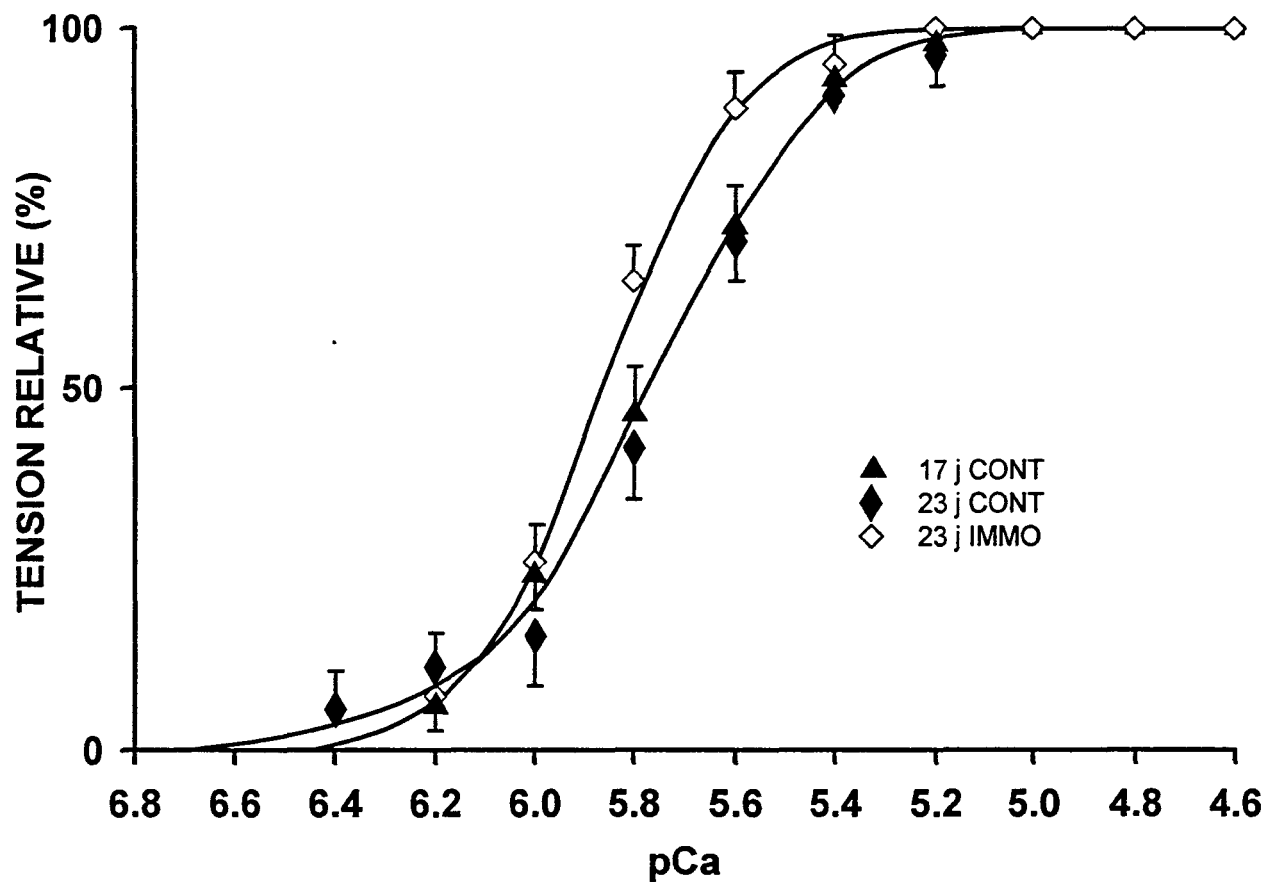


Figure 40 : Relations Tension/pCa établies pour les groupes 17 j CONT, 23 j CONT et 23 j IMMO. Chaque point expérimental est exprimé sous forme de moyenne \pm ESM. Les courbes ont été établies selon l'équation théorique de Hill.

	pCa _{seuil}	pCa ₅₀	Δ	n
17 j CONT (20)	6.62 ± 0.06	5.77 ± 0.03	0.57 ± 0.03	2.32 ± 0.13
23 j CONT (20)	6.67 ± 0.04	5.79 ± 0.02	0.47 ± 0.06	2.59 ± 0.16
23 j IMMO (20)	6.55 ± 0.04 ‡	5.88 ± 0.02 ‡	0.39 ± 0.03 #	3.86 ± 0.37 #‡

Tableau 11 : Evolution des propriétés d'activation par le Ca et le Sr après une période d'immobilisation de 6 jours. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de faisceaux sur lesquels l'étude a été réalisée. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM.

A partir de $P < 0.05$, # indique une différence significative avec le groupe 17 j CONT ; ‡ avec le groupe 23 j CONT.

CHAPITRE 4

EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU SOLEUS DE RAT ADULTE SOUMIS A UNE IMMOBILISATION D'UNE DUREE DE SIX JOURS (ETAT D'INNERVATION MONOSYNAPTIQUE)

L'immobilisation a été imposée au membre postérieur du rat entre 91 et 97 jours post-natals.

I - CRITERES D'ATROPHIE MUSCULAIRE

A - Evolution des masses corporelles et musculaires

Le tableau 12 présente l'évolution du poids corporel (BW en g) et du poids musculaire du soleus (MW en mg) des groupes ADULTE CONT et ADULTE IMMO.

Après une période d'immobilisation de six jours (du 91ème au 97ème jour post-natal), le groupe ADULTE IMMO montre une diminution significative du poids corporel et du poids musculaire, bien que les animaux des groupes ADULTE CONT et ADULTE IMMO soient issus du même lot d'animaux (âgés de 91 jours) et qu'aucune différence significative dans la prise de nourriture n'ait été constatée. Néanmoins, lorsque l'on exprime ces données selon le rapport poids musculaire/poids corporel (en mg/g), le groupe ADULTE IMMO présente une diminution significative de 17.40 % par rapport au groupe ADULTE CONT, ce qui indique que la masse musculaire diminue davantage que la masse corporelle.

	BW (g)	MW (mg)	MW/BW (mg/g)
ADULTE CONT (12)	423.25 ± 9.48	193.05 ± 5.39	0.46 ± 0.01
ADULTE IMMO (16)	378.13 ± 10.48 †	142.92 ± 7.30 †	0.38 ± 0.01 †

Tableau 12 : Evolution du poids corporel du rat (BW en g), du muscle soleus (MW en mg) et du rapport masse du muscle/masse corporelle (MW/BW) en mg/g. Les résultats ont été obtenus à partir du nombre d'animaux indiqué entre parenthèses.

A partir de $P < 0.05$, † indique une différence significative avec le groupe ADULTE CONT

B - Surface des fibres

La figure 41 présente les surfaces de chaque type de fibres identifié par la technique de la myosine ATPase. Après une immobilisation de six jours, il apparaît que les fibres du groupe ADULTE IMMO quel qu'en soit le type présentent une tendance à une diminution de leur surface. Cette diminution n'est cependant pas significative.

II - MODIFICATIONS DES PROPRIETES STRUCTURALES

A - Typage ATPasique

La figure 42 illustre la répartition des différents types de fibres identifiés par typage ATPasique sur coupe de muscles entiers. Le typage du groupe ADULTE CONT est conforme à celui classiquement observé sur les muscles soleus adultes, c'est à dire une forte majorité de fibres de type I (72 %) et une plus faible proportion de fibres de type IIC (6.50 %) et de type IIA (21.50 %). Après immobilisation, il se produit une diminution non significative des fibres de type I (64 %) au profit d'une augmentation des fibres de type rapide IIA (31.5 %).

B - Analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine

L'analyse de la composition en isoformes de chaînes lourdes de myosine a été réalisée sur les fibres caractérisées par le test strontium et provenant des muscles contrôlés en typage ATPasique. La figure 43 présente un exemple de profil de migration électrophorétique et la figure 44 rend compte de l'analyse densitométrique des isoformes de MHC.

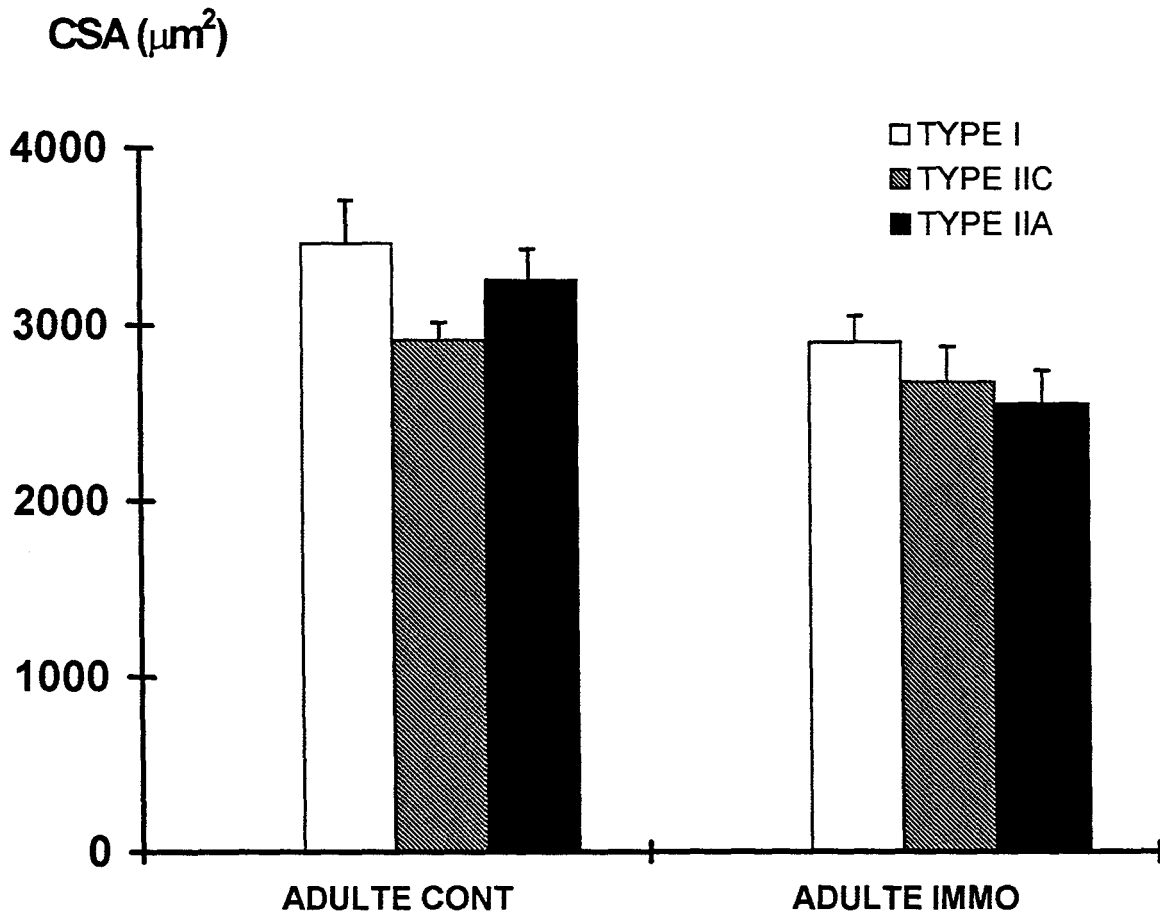


Figure 41 : Evolution des sections transversales (CSA en μm^2) des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM.

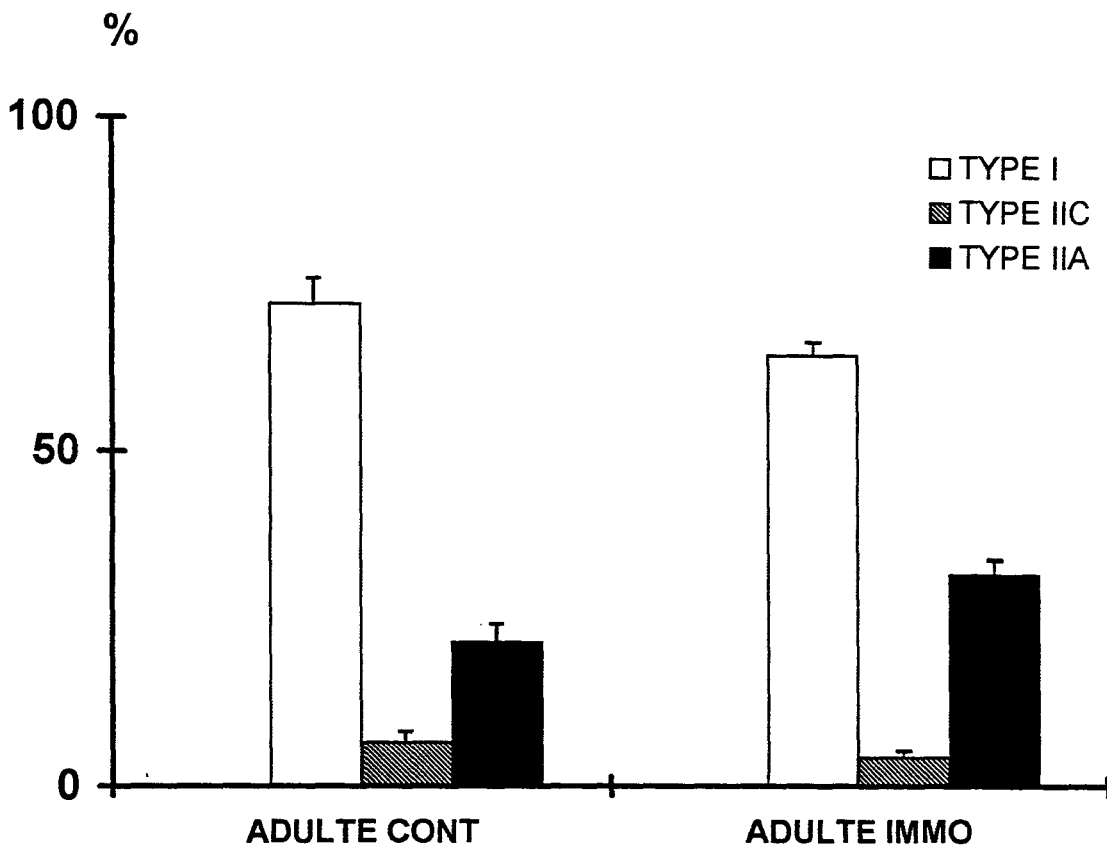


Figure 42 : Evolution des différents types de fibres déterminés par typage ATPasique du muscle soleus adulte après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats (5 muscles/groupe) sont exprimés sous forme de moyenne \pm ESM.

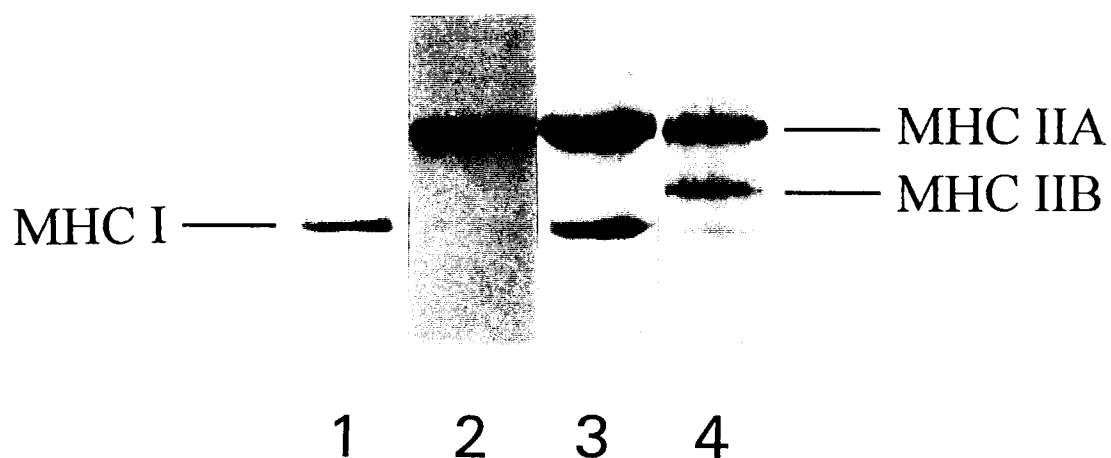
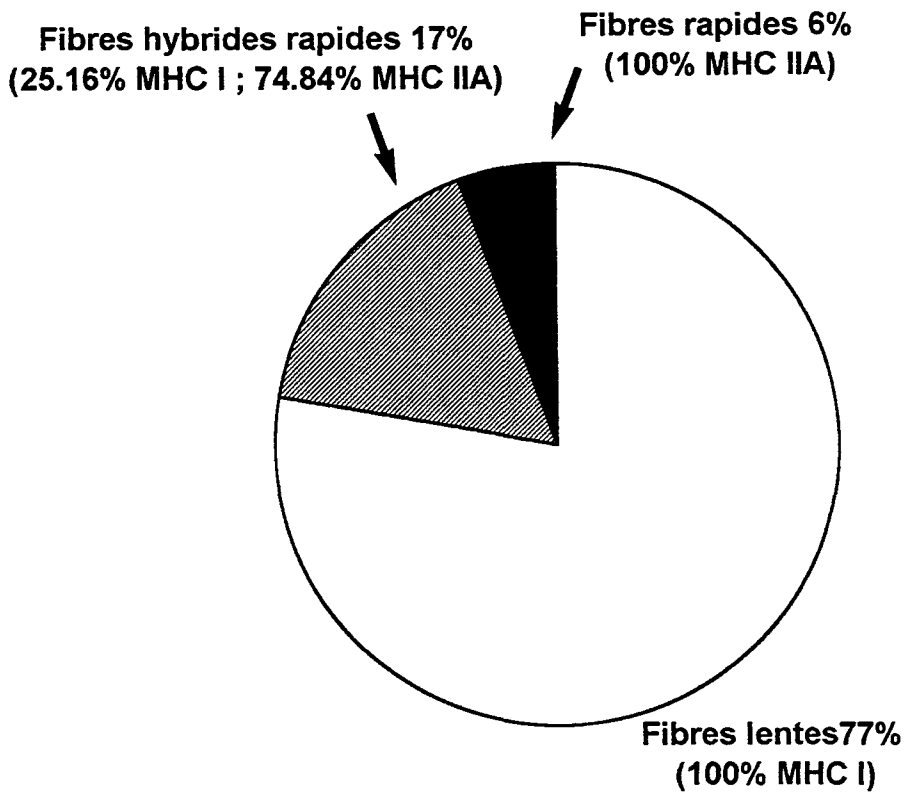


Figure 43 : Profils de migration électrophorétique des isoformes de MHC du groupe ADULTE CONT. Les numéros renvoient aux numéros des puits :

1 : fibre adulte lente contrôle, 2 : fibre adulte rapide contrôle, 3 : fibre adulte hybride rapide contrôle, 4 : fibre d'EDL.

Les différentes populations de fibres du groupe ADULTE IMMO présentent le même profil électrophorétique que les fibres adultes contrôle et n'ont pas été illustrées ici.

ADULTE CONT



ADULTE IMMO

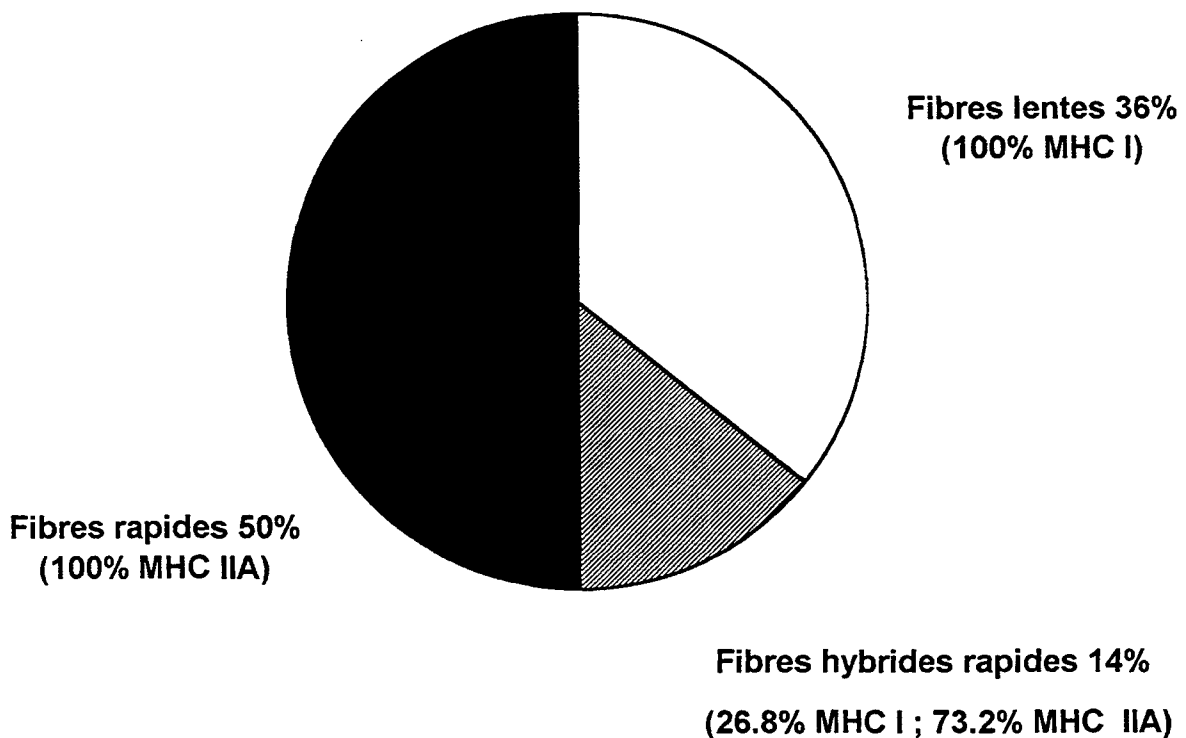


Figure 44 : Evolution de la composition en isoformes de MHC après une période d'immobilisation de six jours. Les résultats sont exprimés en pourcentage du total des fibres étudiées.

L'analyse densitométrique montre pour le groupe ADULTE CONT une forte proportion de fibres exprimant la MHC I (77 %) et classées lentes d'après le test strontium. Ce résultat est en parfait accord avec le typage ATPasique précédemment réalisé. Cependant, la figure 44 fait ressortir deux sous populations de fibres parmi celles qui sont identifiées comme "rapides" (23 %) d'après le test strontium, 6 % sont purement rapides puisqu'elles n'expriment que la MHC IIA, alors que 17 % coexpriment MHC I et MHC IIA avec une forte prédominance de la MHC IIA ; ces dernières fibres ont été appelées "hybrides rapides".

Après immobilisation, sur les 40 fibres testées, 14 ont permis une analyse densitométrique fiable. En effet, suite à une immobilisation par plâtrage en position de flexion plantaire, une perte importante des isoformes de MHC est couramment rapportée. On peut penser que les 26 fibres ne figurant pas dans l'analyse électrophorétique avaient subi une diminution importante des isoformes de MHC et que la quantité de protéines restant se situait en dessous du seuil de détection de la coloration à l'argent (voir Matériels et Méthodes).

Les fibres du groupe ADULTE IMMO montrent une nette diminution des fibres lentes (la population n'est plus que de 36 %), une stagnation des fibres hybrides rapides et une très forte augmentation des fibres purement rapides exprimant la MHC IIA. La MHC IIB n'a pas été détectée.

III - MODIFICATIONS DES PROPRIETES FONCTIONNELLES

A - Tensions maximales

Les valeurs des tensions maximales établies pour chaque type de fibres déterminé en fonction du critère strontium sont reportées dans le tableau 13. Sur les muscles ADULTE CONT, la force développée par les fibres rapides est supérieure (+ 9 %) à celle des fibres lentes bien que ceci ne soit pas significatif.

Après immobilisation, la valeur de la tension maximale est significativement diminuée, respectivement de 41 % et 58 % pour les 2 populations de fibres lentes et rapides. Il semblerait que ce soit les fibres identifiées rapides après immobilisation qui manifestent une atrophie plus marquée.

Etant donné que le groupe ADULTE IMMO ne présente pas de diminution significative de la surface de ses fibres, mais que celles-ci présentent néanmoins une diminution significative de la force rapportée à l'unité de surface, cette perte de force pourrait être attribuée, soit à une perte de force par pont formé entre l'actine et la myosine, soit à une diminution du nombre de ces ponts.

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

L'histogramme de répartition des valeurs de Δ des fibres des groupes ADULTE CONT et ADULTE IMMO est illustré à la figure 45. Les relations T/pCa établies pour les fibres contrôles et immobilisées sont présentées figure 46. Le tableau 14 récapitule les paramètres d'activation par le Ca et le Sr.

L'analyse des relations T/pCa et TpSr obtenues sur les fibres du groupe ADULTE CONT corrobore l'existence dans le soleus de 2 populations distinctes.

	P_0 kN/m ²
ADULTE CONT Lent (15)	88.15 ± 9.62
ADULTE CONT Rapide (5)	96.41 ± 7.07
ADULTE IMMO Lent (18)	51.59 ± 6.61 *
ADULTE IMMO Rapide (22)	40.51 ± 4.40 #†

Tableau 13 : Evolution des tensions maximales P_0 exprimées en kN/m² des fibres de rats adultes après une période d'immobilisation de 6 jours. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées.

A partir de $P < 0.05$, * indique une différence significative avec le groupe ADULTE CONT Lent, # avec le groupe ADULTE CONT Rapide, † avec le groupe ADULTE IMMO Lent.

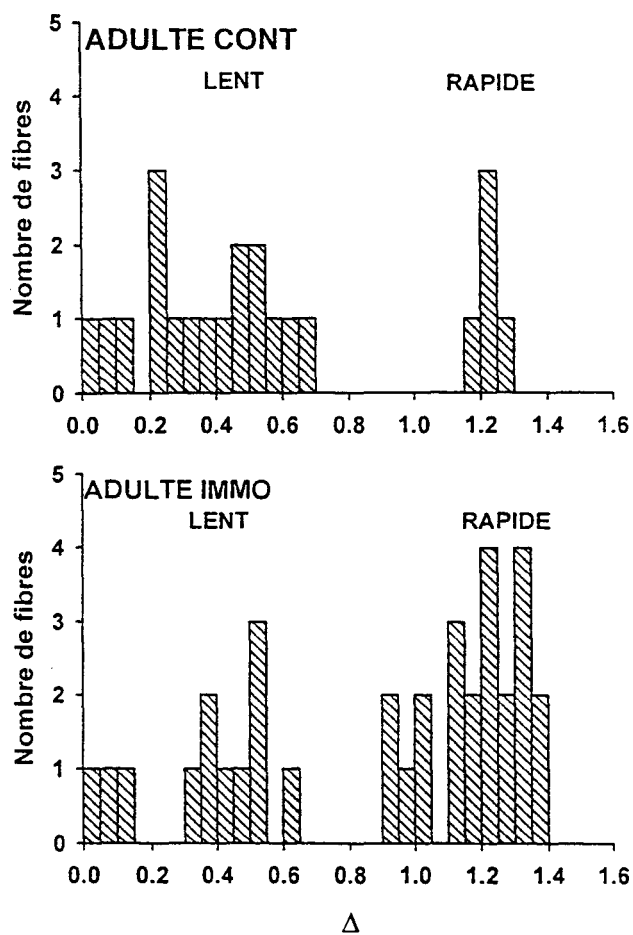


Figure 45 : Modification de la distribution des valeurs de Δ (pCa_{50} - pSr_{50}), déterminées pour les fibres de rats adultes suite à une immobilisation du 91ème au 97ème jour post-natal.

Pour 15 fibres étudiées, la relation T/pSr est très proche de la relation T/pCa. La valeur de Δ ($pCa_{50}-pSr_{50}$) est donc faible et se situe dans une gamme comprise entre 0 et 0.7 (figure 45). Ce faible décalage (Δ moyen = 0.32) caractérise les fibres de type lent. Les 5 autres fibres du groupe ADULTE CONT présentent des valeurs de Δ plus importantes (Δ moyen = 1.22) et donc une relation T/pSr décalée par rapport à la relation T/pCa. Ces fibres sont de type rapide. Le critère strontium ne permet pas ici la distinction de fibres de type intermédiaire avec des valeurs de Δ se situant dans une gamme de valeurs intermédiaires.

Après immobilisation, les 2 populations de fibres lentes et rapides sont toujours présentes. Cependant, au sein de l'échantillon étudié, les fibres de type rapide sont prédominantes (22 fibres rapides sur 40 fibres étudiées). Elles présentent toujours une valeur moyenne de Δ supérieure à 1.00 alors que les fibres lentes ($n = 18$) ont une valeur moyenne de Δ de 0.33. Il n'existe donc pas après immobilisation de modification sensible du critère Δ . Par contre, les fibres du groupe ADULTE IMMO présentent quel que soit leur type fonctionnel :

- un seuil d'activation plus élevé (valeur de pCa plus faible) ;
- une pCa_{50} plus faible (valeur de la concentration en Ca plus élevée) ;
- une pente (n) plus élevée après immobilisation.

Ces résultats montrent qu'après immobilisation, les fibres lentes et rapides présentent un décalage vers la droite (vers des concentrations calciques plus fortes) de leurs relations T/pCa. Il se produit donc une perte d'affinité et de sensibilité au Ca. Le degré de coopérativité entre les protéines (n) est plus élevé après immobilisation, bien que cette hausse ne soit pas significative quel que soit le type de fibres.

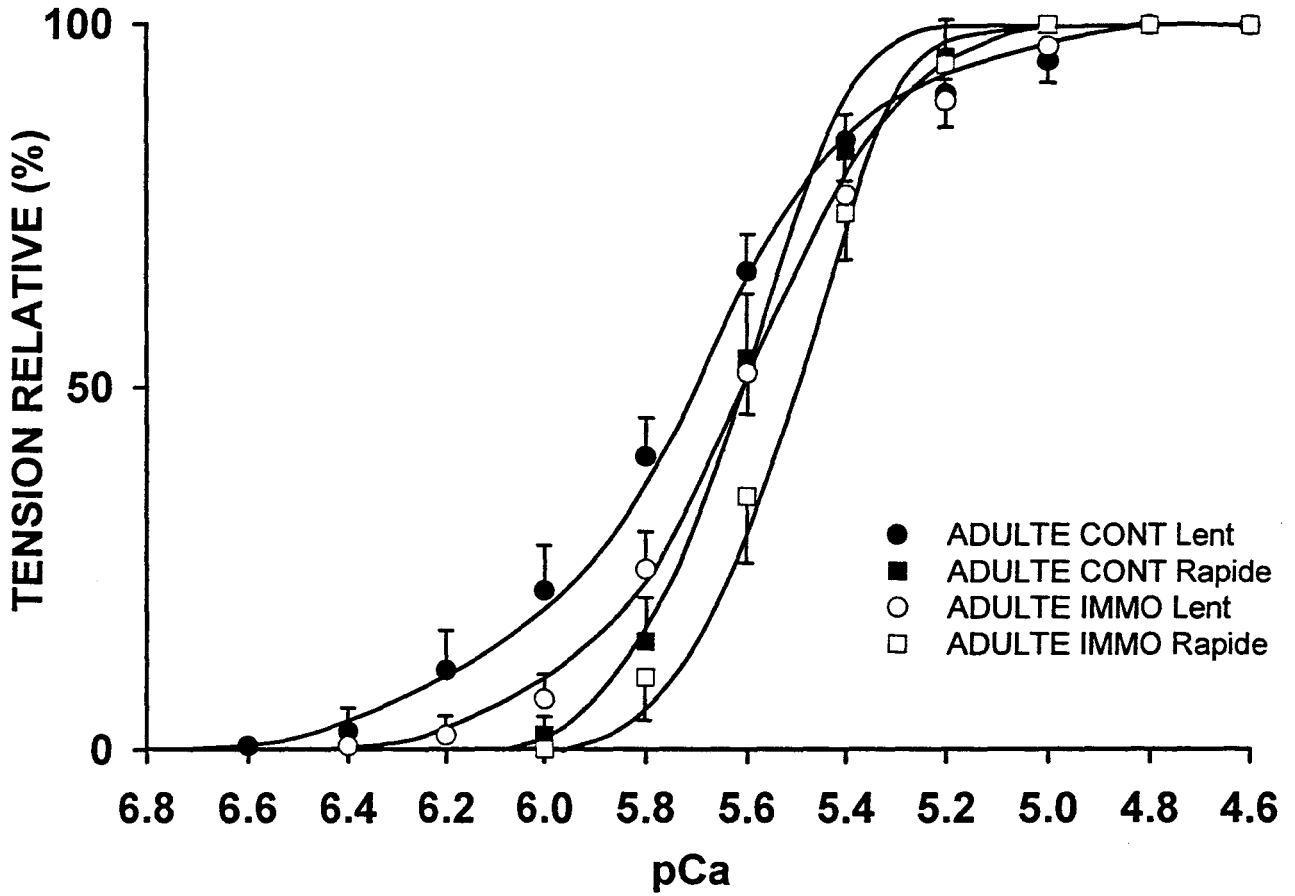


Figure 46 : Relations Tension/pCa établies pour les groupes ADULTE CONT et ADULTE IMMO. Chaque point expérimental est exprimé sous forme de moyenne \pm ESM. Chaque courbe est établie suivant l'équation théorique de Hill.

	pCa _{seuil}	pCa ₅₀	Δ	n
ADULTE CONT Lent (15)	6.81 ± 0.06	5.70 ± 0.03	0.32 ± 0.05	2.08 ± 0.18
ADULTE CONT Rapide (5)	6.28 ± 0.07 *	5.63 ± 0.04	1.22 ± 0.02 *	3.80 ± 0.50 *
ADULTE IMMO Lent (18)	6.59 ± 0.08 *	5.59 ± 0.02 *	0.33 ± 0.03	2.67 ± 0.23
ADULTE IMMO Rapide (22)	6.17 ± 0.05	5.52 ± 0.02 #†	1.18 ± 0.03 †	4.26 ± 0.39 †

Tableau 14 : Evolution des propriétés d'activation par le Ca et le Sr après une période d'immobilisation de 6 jours. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres sur lesquelles l'étude a été réalisée. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± ESM.

A partir de $P < 0.05$, * indique une différence significative avec le groupe ADULTE CONT Lent, # avec le groupe ADULTE CONT Rapide, † avec le groupe ADULTE IMMO Lent.

DISCUSSION

Répartition des isoformes de MHC

Groupes expérimentaux	MHC néo (%)	MHC I (%)	MHC IIA (%)	MHC IIB (%)
6 j CONT	49.5	50.5	-	-
12 j CONT	35.5	54.5	10	-
12 j IMMO	42.8	50.2	7	-
17 j CONT	17.6	65.4	17	-
23 j CONT	11.7	66	22.3	-
23 j IMMO	-	+	++	++
ADULTE CONT lent	-	100	-	-
ADULTE CONT hybride	-	25.15	74.85	-
ADULTE CONT rapide	-	-	100	-
ADULTE IMMO lent	-	100	-	-
ADULTE IMMO hybride	-	26.8	73.2	-
ADULTE IMMO rapide	-	-	100	-

Le tableau ci-dessus résume la répartition, obtenue par densitométrie, en isoformes de myosine de chaque groupe expérimental. Le groupe 23 j IMMO n'ayant pu faire l'objet de mesures de densitométries fiables, la surexpression éventuelle des isoformes de MHC est indiquée par le signe ++.

EVOLUTION STRUCTURALE ET FONCTIONNELLE DU MUSCLE SOLEUS AU COURS DU DEVELOPPEMENT POST-NATAL

I - EVOLUTION STRUCTURALE

D'après l'analyse histochimique, la différenciation des types de fibres au cours du développement post-natal peut être divisée en 2 étapes essentielles. La première étape, du 6ème au 12ème jour post-natal, est la période durant laquelle toutes les fibres du soleus qui étaient de type ATPasique indifférencié IIC acquièrent progressivement des typages distincts. Au 12ème jour post-natal, la maturation des fibres de type I est achevée. L'ensemble est réparti alors en égales proportions entre fibres de type I et de type IIC, répartition déjà décrite par de nombreux auteurs (Rubinstein et Kelly, 1981 ; Umezū et coll., 1992). La deuxième étape correspond essentiellement à l'apparition de fibres de type IIA, vers le 17ème jour post-natal. La période qui suit (du 17ème jour post-natal jusqu'à l'âge adulte) consiste en une suite de transitions entre les trois types ATPasiques I, IIA et IIC, pour aboutir au typage final du muscle adulte.

L'apparition de la diversité au sein des fibres musculaires est un phénomène qui semble varier d'une espèce animale à l'autre, voire d'un muscle à l'autre. Ainsi, Dubowitz (1966) a démontré sur des muscles humains, l'existence d'une différenciation avancée des types de fibres en termes de typage ATPasique dès la 20ème semaine de gestation. Plus récemment, Thornell et coll. (1984), par utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre les isoformes de myosine, ont précisé que cette différenciation s'amorçait chez l'homme vers la 15ème semaine de gestation. Par contre, en ce qui concerne le

développement musculaire du rat, il apparaît qu'à la naissance, toutes les fibres sont encore de type indifférencié. La différenciation des types de fibres IIC en type I débiterait vers le 5ème jour post-natal selon Okada et coll. (1984) et pour Umezu et coll. (1992), seulement à partir du 12ème jour post-natal. Cette dernière hypothèse est plus conforme à nos résultats puisque nous avons vu que la diversité des fibres d'un point de vue structural et fonctionnel, est exprimée au 12ème jour post-natal alors qu'elle ne l'est pas encore au 6ème jour. En outre, les fibres de type histochimique IIA ne sont détectées qu'à partir du 17ème jour post-natal, résultat en accord avec celui de Okada et coll. (1984) qui décèlent une apparition du type IIA vers le 15ème jour post-natal.

Il semblerait que l'apparition de différents types histochimiques coïncide avec le développement de la posture et la maturation de l'innervation. En effet, la mise en place de l'innervation définitive sous une forme monosynaptique évolue parallèlement à une modification de l'activité électromyographique (EMG) du muscle soleus. Westerga et Gramsbergen (1994) ont en effet décrit des modifications de l'EMG du soleus au cours du développement post-natal. Ainsi, à 11 jours post-natals, le soleus présente une activité uniquement de type phasique. Le début d'une activité tonique ne se manifeste qu'à partir du 12ème jour et celle-ci s'amplifie avec l'âge. Ces auteurs considèrent que le "pattern" d'activité du muscle soleus devient à 16 jours post-natals comparable à celui d'un muscle soleus adulte. En même temps, l'activité posturale se développe et une réduction de la taille des unités motrices a lieu. Ces données soulignent l'importance de la mise en place de l'innervation définitive dans les transformations du muscle et l'apparition de la diversité des fibres. Toutefois, l'existence des différentes isoformes de myosine n'est pas complètement soumise à un état d'innervation mature, puisque des isoformes différentes

de MHC ont déjà été identifiées au cours du développement embryonnaire (Narusawa et coll., 1987).

Depuis la classification établie par Termin et coll. (1989 a), il est possible de corréler le typage ATPasique à l'expression des isoformes de MHC. En rapprochant d'une part, le résultat des typages ATPasiques et d'autre part, l'analyse densitométrique, on peut affirmer que les fibres adultes de type I et IIA expriment respectivement la MHC I et la MHC IIA, et les fibres adultes IIC à la fois la MHC I et la MHC IIA. On peut de plus penser qu'à 6 jours post-nataux, les fibres de type IIC contiennent la MHC I et la MHC néo en quantités équivalentes, comme le suggèrent les résultats obtenus en densitométrie. D'après la classification de Termin et coll. (1989 a), une fibre de type IIC comporte nécessairement une isoforme de MHC lente et une isoforme de type rapide. A 6 jour post-nataux, la MHC I est déjà présente. Etant donné qu'au même âge, les fibres musculaires présentent un typage IIC, on peut raisonnablement envisager que la MHC néo serait proche d'une isoforme rapide, au moins en ce qui concerne ses propriétés ATPasiques. Une telle similitude avait déjà été suggérée, entre les isoformes de MHC rapides et la MHC néo, puisque les premiers anticorps utilisés en immunohistochimie reconnaissent indifféremment ces isoformes (Thompson et coll., 1984).

De 12 à 23 jours post-nataux, trois isoformes de MHC (I, IIA et néo) sont exprimées et le typage ATPasique met en évidence plusieurs types de fibres (alors qu'à 6 j CONT seul le type IIC existe). De façon à identifier les MHC présentes au sein de chaque type de fibre, une analyse immunohistochimique a été en outre réalisée.

Ainsi, à 12 j CONT (voir figure 29) : i) le type ATPasique I observé sur 50 % des fibres est en fait le résultat de la coexpression de plusieurs isoformes de MHC : soit lente et néonatale (LN), soit lente, néonatale et rapide (LNR), ii) le typage ATPasique IIC correspond soit à l'expression des isoformes LNR, soit aux isoformes NR (néonatale et rapide). Lorsque la MHC néo est coexprimée avec la MHC I, il apparaît que c'est cette dernière qui impose à la fibre son typage ATPasique. La coloration immunohistochimique n'étant que qualitative, elle ne permet pas de connaître la proportion relative de chaque isoforme, mais au vu du typage ATPasique, il est possible que ce soit l'isoforme dominante en quantité qui ait imposé son typage à la fibre. Les fibres de type I correspondraient donc aux classes LN et LNR avec l'isoforme lente dominante. Lorsque les fibres apparaissent de type I ou IIC par typage ATPasique, dans la population LNR, on peut alors envisager une prédominance dans chaque type respectivement de l'isoforme lente (I) ou rapide (II ou néo). Enfin une dernière population (NR) est identifiée de type IIC en marquage ATPasique. Elle correspond à l'association de la MHC néo avec seulement une MHC de type rapide. Il est à noter que cette population ne s'inscrit pas dans le cadre défini par la terminologie de Termin et coll. (1989 a) qui prévoient qu'à un type IIC correspond la coexistence d'une myosine lente et d'une myosine rapide.

A 17 j CONT, l'analyse densitométrique révèle la diminution importante de la MHC néo contrebalancée par une augmentation de la MHC IIA. Ainsi, la proportion de MHC IIA devient suffisante pour correspondre à un type IIA en ATPase. Le nombre de fibres de type IIC subit une diminution importante entre le 12ème jour et le 17ème jour post-natal, probablement causée par la réduction de l'expression de l'isoforme

développementale de MHC, la MHC néo. En outre, la MHC I est exprimée à un taux plus important. Les travaux récents de Gao et Kennedy (1992) ont montré qu'une baisse du taux d'expression des isoformes de MHC développementales au profit d'une augmentation de l'expression des isoformes de myosine lente ou rapide nécessitait la présence de l'innervation mature. Nos résultats suggèrent une interprétation identique.

A 23 j CONT, le taux d'expression de la MHC I se maintient, la MHC néo continue à décroître et la MHC IIA est augmentée. L'immunohistochimie montre qu'à 23 j CONT contrairement à 12 j CONT, l'isoforme de MHC néo n'est plus exprimée dans la totalité des fibres étudiées (voir figure 37). Une population de fibres purement lentes (exprimant 100 % de MHC I) s'affirme (~ 53 %). En ATPase, celle-ci n'est en aucun cas différente de la population LN décrite à 12 j CONT et ne peut être différenciée de celle-ci que par immunohistochimie. La diminution importante de l'expression de la MHC néo est vraisemblablement la cause de la diminution de la population LN. La population LNR à dominance lente (type I en ATPase) reste présente à un taux quasi identique à celui du groupe 12 j CONT. Par contre, on peut constater un renforcement de la population LNR à typage IIC en ATPase (environ 5 %) par comparaison au groupe 12 j CONT. Etant donné que la MHC néo subit à 23 j CONT une forte diminution, les isoformes L et R deviendraient prépondérantes et ce serait la coexpression des isoformes adultes lente et rapide qui rendrait compte du type IIC qui, ici, serait classique selon la terminologie de Termin et coll. (1989 a).

La population NR à typage ATPasique IIC est encore fortement exprimée à 23 jours (~ 32 %).

Enfin, lorsque la MHC néo n'est plus exprimée dans certaines fibres (ou en quantité trop faible pour être décelable), seules les isoformes de MHC lente et rapides coexistent, ce qui constitue la population LR. Une population de fibres de type IIA réagissant uniquement à l'anticorps NCL MHCf a pu être détectée. En considérant le typage IIA en ATPase, on peut en déduire que dans ce cas, l'anticorps NCL MHCf a reconnu uniquement la MHC IIA, puisque la MHC IIB n'a pu être décelée sur le soleus contrôle.

En ce qui concerne le groupe ADULTE CONT, le typage ATPasique établi est conforme aux données de la littérature. Le pourcentage de fibres de type IIA est relativement élevé mais les rats utilisés étaient de souche Sprague Dawley qui comporte davantage de MHC rapides par rapport à la souche Wistar (Bar et Pette, 1988). De plus, nous avons observé une population de fibres hybrides (17 %) présentant de façon prépondérante l'isoforme de MHC IIA. De telles fibres avaient précédemment été identifiées sur le muscle soleus de singe (Cordonnier et coll., 1995).

Nos résultats montrent donc que le type IIC en ATPase est avant tout un type intermédiaire, "hybride", pouvant comporter à la fois un mixage d'isoformes de MHC adultes et un mixage d'isoformes de MHC adultes et développementales. Ce type est décrit par beaucoup d'auteurs pour des muscles en cours de transformation (Maier et coll., 1988) comme le prouvent nos résultats sur l'évolution du soleus au cours du développement post-natal. Toutefois, nos résultats montrent également que ce type hybride est présent sur des muscles adultes normaux.

II - EVOLUTION FONCTIONNELLE

L'analyse des tensions maximales P_0 montre une augmentation graduelle de la force au cours du développement post-natal. Une augmentation similaire de la force tétanique du muscle soleus entier a déjà été observée par Elmubarak et Ranatunga (1988). De plus, sur fibre isolée et pelée, Reiser et coll. (1988) observent également un accroissement de la force rapportée à l'unité de surface. D'après ces travaux, P_0 exprimée en kN/m^2 double entre le 3ème jour post-natal et le 5ème mois. Nos résultats confortent ces données. Nous observons en effet une augmentation de la force d'environ 70 % entre le groupe 6 j CONT et le groupe ADULTE CONT rapide et une évolution progressive de la force au cours des trois premières semaines post-natales. Au stade adulte, les valeurs de P_0 des fibres lentes et rapides ne présentent pas de différence significative.

Afin de déterminer le typage fonctionnel des faisceaux de fibres, nous avons utilisé la valeur de l'affinité relative au Ca et au Sr ($\Delta = p\text{Ca}_{50} - p\text{Sr}_{50}$).

En ce qui concerne le groupe ADULTE CONT, la répartition des valeurs de Δ montre des résultats conformes à la littérature (Cordonnier et coll., 1995), c'est-à-dire une majorité de fibres lentes (75 %) caractérisées par des valeurs de Δ faibles indiquant des affinités au Ca et au Sr peu différentes, et une population de fibres (25 %) possédant des valeurs de Δ élevées (> 0.90) nettement plus affines au Ca qu'au Sr. Aucune fibre présentant des valeurs intermédiaires de Δ n'a été identifiée. Les expérimentations menées sur le rat nouveau-né ont été réalisées sur des faisceaux de fibres et non sur des fibres isolées. Les valeurs de Δ et des paramètres d'activation par le Ca ne sont donc pas directement comparables à celles des fibres de rat adulte. Cependant, les résultats

obtenus sur les muscles adultes nous ont permis d'établir une répartition bimodale des valeurs de Δ caractérisant des fibres lentes et rapides. A partir de cela, le typage fonctionnel des faisceaux de fibres des rats nouveau-nés a pu être évalué. Ainsi, en fonction des histogrammes de répartition des valeurs de Δ , nous avons établi que de 6 à 17 jours contrôles, les valeurs de Δ des faisceaux de fibres se répartissent dans une gamme intermédiaire, localisée entre celles des fibres adultes lentes et rapides. A partir du 12eme jour post-natal, l'histogramme présente une légère évolution vers des valeurs de Δ plus faibles, et à 23 j CONT, la distribution des valeurs de Δ , fortement décalée vers la gauche, illustre bien la maturation du muscle soleus vers un type lent.

Il apparaît que les valeurs moyennes de Δ évoluent à chaque stade post-natal étudié en parallèle avec la composition moyenne de chaque isoforme de MHC. En effet, l'augmentation progressive de la MHC I et dans le même temps, la diminution de l'expression de la MHC néo, illustrent tout à fait la diminution des valeurs de Δ qui sont alors plus caractéristiques d'un type lent. Les différentes isoformes de MHC pourraient ainsi influencer la position relative des relations T/pCa et T/pSr.

Néanmoins, en examinant, pour un âge post-natal donné la valeur de Δ et la composition en isoformes de MHC pour chaque faisceau, aucune corrélation n'est réellement détectée avant le 17ème jour post-natal. Une relation importante entre les isoformes de myosine et le critère Δ n'est établie qu'après l'installation de l'innervation définitive (vers le 17ème jour post-natal). La MHC néo montre une bonne corrélation avec le critère Δ à 17 jours post-nataux puis la valeur de ce coefficient de corrélation diminue fortement à 23 jours post-nataux. Ce phénomène peut aisément s'expliquer par une diminution importante de la quantité de MHC néo après le 17ème jour, c'est-à-dire

lorsque l'innervation monosynaptique est installée. La disparition de cette isoforme serait donc en étroite relation avec l'état d'innervation du muscle. A partir de 23 jours post-natals, ce sont alors les isoformes de MHC caractérisant le muscle adulte (MHC I et IIA) qui présentent le meilleur taux de corrélation avec Δ . Le taux de corrélation de chaque isoforme dépend donc fortement de l'âge post-natal étudié. Il semble que les isoformes de MHC, dont les fréquences d'apparition et de disparition paraissent en relation étroite avec l'état d'innervation, influencent l'affinité relative au Ca et au Sr et par là-même peuvent jouer sur la position de la relation T/pCa. Il a été en effet suggéré précédemment par Danieli-Betto et coll. (1990) que les isoformes de myosine présentes dans une fibre pouvaient moduler son affinité au calcium et par conséquent, influencer sur la valeur de pCa_{50} .

Au cours du développement post-natal, l'affinité des protéines contractiles au Ca (pCa_{50}) et la pente de la relation T/pCa (n) diminuent avec l'âge et se rapprochent sensiblement des valeurs de pCa_{50} et n des fibres adultes lentes. Une baisse d'affinité du système contractile se produit au cours du développement post-natal. La modification de ces deux paramètres contribue à l'affirmation du type lent du muscle soleus. Cependant, les changements significatifs de ces deux paramètres ont lieu à des étapes différentes du développement post-natal : pCa_{50} diminue à partir du 12ème jour post-natal, alors que n ne commence à décroître qu'à partir du 17ème jour post-natal, lorsque la mise en place de l'innervation définitive est nettement achevée. Il apparaît donc que la pente de la relation T/pCa, au contraire de la pCa_{50} , ne soit pas uniquement sous la dépendance directe de l'innervation. Cette perte d'affinité et la modification de la pente de la relation ne peuvent être uniquement soumises aux transitions d'isoformes de myosine, puisque entre 12 et 17 jours post-natals, période d'installation de l'innervation définitive, aucune

transition importante n'a lieu en ce qui concerne les isoformes de MHC. Il est donc indispensable de considérer que les caractéristiques des relations T/pCa sont également modulées par les protéines régulatrices (troponines et tropomyosine). La pente de la relation T/pCa est habituellement corrélée au complexe TM - TnT (Schachat et coll., 1987), alors que la pCa_{50} est davantage sous la domination de l'isoforme de TnC. Il a été démontré, sur des fibres rapides, qu'un changement d'isoformes rapides de TnT entraînait un décalage de la relation T/pCa (Nassar et coll., 1991 ; Reiser et coll., 1992). Cependant, de telles modifications n'ont pas été décrites sur un muscle lent où la proportion de TnT rapide reste très faible (10 % de TnT rapide chez le muscle soleus à 2 jours post-nataux selon Leeuw et coll., 1994). D'autre part, indépendamment de l'âge considéré, une dénervation n'entraîne pas de modification sensible des isoformes de TnT du muscle soleus. Enfin, il a été montré que la TnC est sous influence directe de l'innervation, puisqu'une dénervation néonatale entraîne une surexpression de l'isoforme rapide de la TnC (Leeuw et coll., 1994).

En accord avec ces travaux, nous pouvons suggérer que l'évolution temporelle différente au cours du développement post-natal de la pCa_{50} et de n , en fonction de l'état d'innervation, peut être attribuée respectivement à la TnC et au complexe TM-TnT.

MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS IMMOBILISE DE 6 A 12 JOURS POST-NATALS

I - ATROPHIE MUSCULAIRE

La réponse du muscle soleus à une période d'immobilisation de 6 jours se manifeste par une chute de masse. La chute de masse musculaire est en général expliquée davantage par une diminution de diamètre des fibres que par une perte de fibres. Nous avons en effet constaté que le nombre de fibres des muscles immobilisés restait comparable à celui des muscles contrôles et l'examen des CSA corrobore l'hypothèse de la réduction de la surface des fibres. De tels résultats ont déjà été observés sur des muscles dénervés à la naissance (Lowrie et Vrbova, 1984). En effet, il a été montré, sur muscles atrophiés, que la quantité totale d'ADN restait identique alors que le contenu en ARN messenger présentait une importante diminution (Steffen et Musacchia, 1984). En ce qui concerne les muscles immobilisés par plâtrage, ces modifications seraient maximales au bout de 6 jours (Goldspink, 1977). Elles sont de plus attribuées à une augmentation du catabolisme et une réduction de la synthèse protéique qui engendrent globalement une réduction de la quantité totale de protéines (Thomason et Booth, 1990). Sur les muscles de nouveau-nés, nos résultats montrent que l'atrophie la plus sévère touche les fibres de type I.

La perte de masse musculaire est ici associée à une perte de force musculaire. Cette diminution de la force persiste lorsqu'elle est exprimée par rapport à la surface du

faisceau étudié et révèle l'existence d'une perte de matière associée à une diminution de la force développée par chaque pont actine-myosine.

II - MODIFICATIONS STRUCTURALES

L'analyse des typages ATPasiques montre après immobilisation du 6ème au 12ème jour post-natal une augmentation du nombre des fibres de type IIC. Cette population de fibres devient prédominante dans le muscle. En ce qui concerne la répartition des isoformes de MHC mesurée par densitométrie, celle-ci se traduit par une diminution de la MHC I au profit de l'augmentation de la MHC néo qui retrouve alors un niveau d'expression comparable à celui du groupe 6 j CONT.

L'analyse des résultats immunohistochimiques montre la présence de trois isoformes de MHC : lente, néonatale et rapide. L'immobilisation provoque d'une part une surexpression de la population LNR et d'autre part un renforcement dans l'expression de la MHC néo. L'augmentation de la classe LNR est particulièrement importante pour les fibres à typage ATPasique IIC. C'est donc cette population qui contribue fortement à l'augmentation globale du type IIC puisque la population NR, après immobilisation, présente une nette diminution par rapport aux muscles contrôles. L'immobilisation de six jours avant innervation définitive provoque donc soit un ralentissement du développement du muscle soleus vers un type lent, soit un retour du muscle vers un état indifférencié. Il a été en effet montré qu'une immobilisation de muscle normalement lent en position raccourcie entraînait une expression accrue des gènes de chaîne lourde de myosine rapide (Loughna et coll., 1990). On peut donc envisager qu'à un état précoce du

développement post-natal, toutes les fibres gardent la capacité d'exprimer un phénotype rapide tant qu'elles ne sont pas soumises à un étirement ou appelées à développer un niveau de force. Ainsi, de nombreux auteurs ont montré que lorsque le soleus est immobilisé en position raccourcie (Loughna et coll., 1990), soumis à des conditions d'hypogravité (Oganov et Potapov, 1976) ou dénervé par spinalisation (Jiang et coll., 1990), celui-ci retourne vers un "état jeune" en exprimant des isoformes de myosines rapides qui sont réprimées lors d'un développement normal. Lorsque le muscle n'est ni soumis à un étirement, ni en état de générer une force, les gènes de myosines rapides sont alors exprimés par "défaut" (Swynghedaw, 1986).

Ces données étayent nos propres résultats, puisque nous constatons une surexpression de la MHC néo qui est considérée comme proche d'une myosine de type rapide.

III - MODIFICATIONS FONCTIONNELLES

Nos résultats ont montré que les relations T/pCa du muscle soleus sont modifiées après immobilisation. Le seuil d'activation au calcium et la pCa_{50} diminuent et se déplacent vers des concentrations calciques plus faibles, ce qui indique une augmentation de la sensibilité et de l'affinité des protéines au calcium. La valeur de n est moins élevée. Globalement la relation T/pCa présente un décalage vers des concentrations calciques plus faibles et se rapproche de la relation T/pCa des faisceaux du groupe 6 j CONT.

Ce résultat est en parfaite corrélation avec l'augmentation de la quantité de MHC néo : ainsi, après immobilisation, la MHC néo retrouve quasiment la proportion exprimée à 6 j CONT, et il semblerait que ce changement provoque un décalage de la T/pCa vers la position qu'elle occupait à 6 j CONT. Bien que les isoformes de myosines ne soient pas les seules protéines modulant la relation T/pCa, la surexpression de la MHC néo semble provoquer un retour de la T/pCa vers la position caractéristique d'un état indifférencié. Ceci est en accord avec les travaux de Danieli-Betto et coll. (1990) qui montrent qu'une modification des isoformes de myosine peut altérer la pente et le positionnement des courbes T/pCa.

La relation T/pCa est également sous la dépendance des protéines régulatrices (troponines et tropomyosines). Au cours du développement post-natal, le déplacement de la relation T/pCa vers des concentrations calciques plus fortes, peut refléter les changements intervenant dans l'expression des isoformes de troponines et plus particulièrement la prédominance de l'isoforme lente, puisque la position de la relation T/pCa se rapproche de celle établie pour les fibres adultes lentes. L'immobilisation freinerait l'installation des isoformes lentes de troponines et par là-même, le décalage de la T/pCa vers des concentrations calciques plus élevées. Du 6ème au 12ème jour post-natal, elle serait un frein à l'évolution normale du soleus en le maintenant dans un état indifférencié.

**MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE
SOLEUS IMMOBILISE DE 17 A 23 JOURS POST-NATALS, EN ETAT
D'INNERVATION MONOSYNAPTIQUE**

I - ATROPHIE MUSCULAIRE

L'immobilisation du muscle soleus de 17 à 23 jours provoque une chute significative de masse. Cette atrophie musculaire se caractérise par une diminution de tous les types de fibres.

Le plâtrage du soleus en position raccourcie cause également une perte de force (P_0 en kN/m^2) qui reste cependant non significative. Le diamètre des faisceaux avant été fixé arbitrairement à une valeur constante, compte-tenu de la diminution de surface des fibres, on peut penser que le nombre de fibres contenu dans un faisceau augmente entre les groupes 23 j CONT et 23 j IMMO. Les fibres peuvent réagir à l'immobilisation de façon plus ou moins marquée. Ainsi, chaque fibre peut présenter, soit une réduction de la force (rapportée à l'unité de surface), soit un maintien de cette force. Ceci peut expliquer l'absence de différence significative avec la valeur de P_0 du groupe 23 j CONT. Lorsque P_0 diminue, on peut alors envisager qu'il s'est produit une perte de force pour chaque pont formé entre l'actine et la myosine, en plus de la perte de force due à la réduction du nombre de ces ponts.

II - MODIFICATIONS STRUCTURALES

L'examen des données histochimiques révèle d'importantes modifications structurales du muscle soleus. La proportion du type I diminue et l'effet de l'immobilisation est encore plus marqué sur les fibres de type IIC dont la proportion se réduit considérablement. Parallèlement à cela, une surexpression du type IIA se produit. La distribution des types ATPasiques du soleus acquiert alors essentiellement une configuration bimodale avec 2 types de fibres I et IIA fortement représentées.

L'analyse des données immunohistochimiques confirme ce résultat puisque l'anticorps reconnaissant les isoformes rapides de la myosine présente un taux de réaction plus important après immobilisation. Le nombre de fibres coexprimant plusieurs isoformes est en nette diminution. De plus, les données immunohistochimiques font apparaître la totale disparition de la MHC néo, ce qui ne pouvait être détecté avec le seul typage ATPasique. L'examen des profils de migration électrophorétiques confirme cette disparition mais montre l'apparition d'une isoforme rapide de myosine, non détectée jusqu'à présent, la MHC IIB. L'immobilisation du muscle soleus en position raccourcie induit donc l'expression de la MHC IIB, isoforme exprimée préférentiellement dans les muscles rapides. Loughna et coll. (1990) puis Goldspink et coll. (1992) ont montré en effet que le muscle soleus de rat nouveau-né de 7 jours active la transcription du gène de MHC IIB à un taux élevé dès que le muscle est en position raccourcie. Ainsi, des surexpressions importantes d'ARN messager de MHC IIB peuvent être détectées dès le 2ème jour d'immobilisation. D'après ces auteurs, le gène MHC IIB serait réprimé et maintenu en état de quiescence, au cours du développement normal du muscle, et celui-ci serait activé et exprimé dès que les fibres musculaires ne seraient plus soumises à un état

d'étirement. Cependant, la protéine MHC IIB n'avait pas été identifiée sur soleus raccourci de nouveau-né. Une telle surexpression de MHC IIB a néanmoins déjà été mise en évidence sur des muscles soleus de rat adulte après une période de suspension de 15 jours (Cordonnier, 1994).

Comparativement à la MHC IIA, la MHC IIB est exprimée à un taux relativement faible après 6 jours d'immobilisation, puisqu'aucun type ATPasique IIB n'a été détecté. La MHC IIB est en outre exprimée conjointement avec d'autres isoformes. Schiaffino et coll. (1990) ont préalablement suggéré un ordre de transition (I → IIA → IIB) dans l'expression des isoformes de myosine, lorsque le muscle est en cours de transformation vers un muscle plus rapide. Nos résultats sont en accord avec cette hypothèse, puisque après 6 jours d'immobilisation, le muscle soleus présente une forte expression de MHC IIA et montre l'apparition de la MHC IIB. On peut supposer qu'une immobilisation de plus longue durée serait susceptible d'induire une expression plus forte de la MHC IIB.

Par conséquent, le muscle acquiert progressivement des isoformes de myosine présentes chez les muscles adultes rapides. L'immobilisation après installation de l'innervation définitive semble causer d'une part une "maturation accélérée" du muscle vers un phénotype plus proche de celui décrit pour des muscles adultes et d'autre part une perte accélérée des isoformes de MHC développementales.

III - MODIFICATIONS FONCTIONNELLES

Le typage fonctionnel des faisceaux de fibres est établi en fonction de l'affinité relative au Ca et au Sr (Δ). En ce qui concerne les groupes 17 j CONT et 23 j CONT, les relations T/pCa sont identiques et viennent se positionner dans une gamme de concentrations en calcium proche de celle des fibres lentes adultes (valeurs de pCa_{50} et n_H proches de l'adulte). Cependant, l'étude du critère Δ ($pCa_{50}-pSr_{50}$) indique que les faisceaux étudiés présentent encore une affinité relative au Ca et au Sr de type intermédiaire, bien que l'élargissement des histogrammes de répartition de Δ montre à 23 j CONT, un glissement vers d'une part des valeurs de Δ faibles (caractérisant un type lent) et d'autre part vers des valeurs plus élevées, signe que certains faisceaux acquièrent progressivement des caractéristiques des fibres de type rapide.

L'immobilisation provoque un resserrement des valeurs de Δ . Si l'on considère que ces valeurs reflètent la composition en isoformes de MHC d'un faisceau ou d'une fibre, on peut supposer que les faisceaux étudiés présentaient quasiment tous la même composition en isoformes de MHC. Comme l'ont montré les données immunohistochimiques, la disparition totale de la MHC néo après immobilisation provoque une diminution du nombre de populations de fibres dans le soleus, élément favorable au resserrement des valeurs de Δ . De plus, si seulement trois populations de fibres (L, LR et R) sont identifiées dans le soleus (voir figure 37), deux sont largement prédominantes (L et R).

En ce qui concerne la relation T/pCa elle-même, celle-ci présente après immobilisation un seuil décalé vers des concentrations en calcium plus fortes et une valeur de pente (n) nettement augmentée. La relation T/pCa acquiert un profil la

rapprochant d'une relation T/pCa de type rapide (seuil décalé par rapport aux T/pCa de fibres lentes et pente élevée). La valeur plus élevée de n indique une meilleure coopérativité entre les sites calciques de la TnC et/ou entre les différentes protéines du filament fin. En particulier, en accord avec Schachat et coll. (1987), n peut être rapporté à la composition du complexe TM-TnT. Ce paramètre n'apparaît donc probablement pas sous l'influence directe de l'innervation puisque l'augmentation de pente n'est observée qu'à 23 jours et après immobilisation.

MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DU MUSCLE SOLEUS ADULTE IMMOBILISE

I - ATROPHIE MUSCULAIRE

La réaction du muscle à une durée d'immobilisation de 6 jours se manifeste par une chute de masse. Cette diminution se confirme lorsque l'on prend en compte le rapport poids du muscle / poids corporel.

Il semble que, bien que la prise de nourriture n'ait pas été différente, les rats immobilisés ne prennent pas de poids au cours de la période d'immobilisation, comme l'ont montré Heslinga et Huijing (1992). Néanmoins, une atrophie réelle du muscle soleus existe après immobilisation en position de flexion plantaire (Goldspink, 1977 ; Spector, 1982 ; Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992).

Une diminution de la section transversale de chaque type de fibres se produit bien que celle-ci ne soit pas significative. Les valeurs de tension P_0 ramenée à l'unité de surface montrent d'une part une diminution significative par rapport aux contrôles, et d'autre part un niveau de tension des fibres rapides du groupe ADULTE IMMO inférieur à celui des fibres lentes du même groupe. Il semble donc que ce sont les fibres apparaissant rapides après immobilisation qui ont été les plus affectées.

La perte de force peut être attribuée à une diminution de la force de chaque pont actine-myosine. Elle peut résulter également de l'atrophie et donc d'une diminution du nombre de ponts ; en effet, des pertes de protéines contractiles (Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992), des lésions au niveau des sarcomères, une réduction du nombre de

ces sarcomères et une dégénérescence des stries Z ont fréquemment été rapportées chez l'adulte (Baker et Matsumoto, 1988). La perte de force pourrait donc être aussi liée à une dissolution ou une dégénérescence des protéines.

II - MODIFICATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES

Après immobilisation, un renforcement de la population de fibres de type rapide est mis en évidence et résulte d'un accroissement important de l'expression de la MHC IIA. Par ailleurs, l'analyse densitométrique nous a conduit à constater une perte importante relativement à la quantité globale de MHC présente. Ce résultat est en accord avec ceux de Szcapanowska et Jakubiec-Puka (1992) qui décrivent une perte importante de MHC après seulement 4 jours d'immobilisation du soleus en position raccourcie.

L'examen du critère Δ pour le groupe ADULTE CONT fait apparaître deux populations de fibres, l'une lente majoritaire et exprimant des valeurs de Δ faibles et une autre minoritaire, rapide, à valeur de Δ élevées. Lorsque l'on corrèle ces valeurs de Δ aux résultats obtenus en densitométrie, il apparaît que les fibres présentant des valeurs de Δ faibles sont purement lentes, puisqu'elles n'expriment que l'isoforme MHC I et les fibres présentant des valeurs de Δ élevées sont en fait d'une part, les fibres purement rapides (6 %) n'exprimant que la MHC IIA, et d'autre part les fibres hybrides rapides (17 %) coexprimant la MHC I et IIA mais avec une prédominance de la MHC IIA. Le critère Δ seul ne permet pas de distinguer des populations de fibres hybrides et il semble que ce soit l'isoforme dominante de MHC qui impose son affinité relative à l'ensemble de la

fibre La majeure partie des fibres identifiées rapides par le critère strontium apparaît en fait à l'électrophorèse, chez le muscle contrôle, composée de fibres hybrides rapides.

Après immobilisation (groupe ADULTE IMMO), il apparaît une prédominance de fibres présentant des valeurs élevées de Δ . Les fibres ayant des valeurs faibles de Δ et exprimant l'isoforme lente de myosine ne représentent plus qu'environ 40 % de l'échantillon étudié. L'analyse densitométrique indique que, si les fibres lentes présentent toujours uniquement la MHC I, les fibres identifiées rapides selon le critère strontium sont, après immobilisation, en forte majorité des fibres rapides "pures" ne présentant en effet que la MHC IIA.

Les relations Tension/pCa montrent, après immobilisation, pour les deux populations de fibres, classées lente et rapide en strontium, un seuil et une pCa₅₀ décalés vers la droite. Ce décalage indique une perte d'affinité du système contractile et particulièrement de la TnC puisque la valeur de pCa₅₀ traduisant l'affinité calcique du système contractile est habituellement corrélée à l'isoforme de TnC (Moss et coll., 1986). L'examen de la pCa₅₀ montre que les fibres lentes et rapides du groupe ADULTE IMMO présentent des valeurs de pCa₅₀ significativement différentes, contrairement aux fibres du groupe ADULTE CONT. Si l'on se réfère à l'analyse densitométrique, on s'aperçoit que les fibres rapides en strontium du groupe ADULTE IMMO sont de façon majoritaire purement rapides. Ces fibres contenant la MHC IIA expriment probablement des isoformes rapides de chaînes légères de myosine et de troponines dont la TnC. Une telle corrélation dans l'expression des isoformes de protéines contractiles a déjà été suggérée (Danieli-Betto et coll., 1990 ; Cordonnier et coll., 1995). L'immobilisation pourrait donc induire une expression accrue de la TnC rapide. La pCa₅₀ des fibres rapides correspond effectivement à la valeur de pCa₅₀ moyenne ; les fibres hybrides rapides sont ici très

minoritaires et ne semblent pas capables d'influer raisonnablement sur la position de la T/pCa moyenne.

L'immobilisation cause également une augmentation des pentes des relations Tension/pCa pour tous les types de fibres identifiés, ce qui indiquerait qu'un renforcement dans l'expression du complexe TM-TnT rapide a lieu.

A l'âge adulte, l'immobilisation par plâtrage du muscle soleus touche les protéines contractiles à des degrés divers : diminution de la quantité globale de MHC sans changement dans les types d'isoformes présentes mais avec accroissement du nombre de fibres exprimant la MHC IIA, diminution d'affinité du système contractile et surexpression probable des isoformes rapides de protéines régulatrices (troponines et tropomyosine).

CONCLUSION GENERALE

Cette étude contribue à mettre en évidence la grande plasticité du système musculaire, particulièrement pendant les stades précoces du développement post-natal ainsi que sa grande capacité d'adaptation à une situation déclenchant une atrophie, à différentes périodes-clés du développement.

Dans le cadre d'un développement musculaire normal, le rôle du système nerveux est prédominant pour l'acquisition et le maintien de caractéristiques musculaires structurales et fonctionnelles différentes. Ainsi, l'apparition d'une diversité dans les types de fibres est directement soumise à une maturation préalable de l'innervation. La diminution de l'isoforme développementale de myosine est un des facteurs décisifs dans la maturation musculaire. En effet, la disparition progressive de la MHC néo et du type ATPasique IIC qui la caractérise, au profit d'une affirmation des formes rapides constitue un des facteurs clés dans l'acquisition d'un phénotype musculaire adulte. Dans le même temps, l'activité posturale se développe. Une période d'immobilisation de six jours imposée à différents stades d'innervation du muscle a donc des répercussions très différentes.

L'immobilisation du muscle soleus, lorsque celui-ci est encore innervé polyneuralement, cause un frein à son évolution normale en induisant la réexpression du type IIC et de la myosine développementale, et le maintient en un état non mature, caractéristique des stades très précoces du développement post-natal. Au contraire, lorsque le muscle est immobilisé alors qu'il présente une innervation monosynaptique, il tend à évoluer vers un muscle de type rapide et acquiert des caractéristiques proches de celles couramment décrites chez l'adulte. Des protéines réprimées jusqu'alors au cours du développement normal sont activées et exprimées, aux dépens des formes développementales (MHC néo). La plasticité musculaire et sa capacité de réponse à une

situation de non-utilisation est donc telle qu'elle peut moduler le degré d'expression de certaines protéines, voire même activer des gènes maintenus jusque là en état de quiescence.

Ce travail montre également que la population des fibres de type IIC est en quelque sorte un "réservoir" de fibres hautement malléables en fonction de l'âge et de la situation d'utilisation ou de non-utilisation à laquelle le muscle doit faire face.

La nature des signaux activateurs de ces gènes reste encore obscure. Il pourrait donc être intéressant, dans des travaux futurs, de tenter d'apprécier dans quelle mesure la présence ou non de l'innervation peut influencer sur l'expression génique. L'immobilisation d'animaux dénervés à différentes périodes clés du développement post-natal permettrait d'approfondir l'importance du rôle de l'innervation dans la transformation musculaire.

De plus, des durées de plâtrage croissantes permettraient d'apprécier s'il existe ou non une cinétique de transformation des protéines contractiles.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALBERTS B., BRAY D., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K. & WATSON J.D. (1990). *Biologie Moléculaire de la cellulaire*. Ed. Flammarion.
- ARMSTRONG R.B. & PHELPS R.O. (1984). Muscle fiber type composition of the rat hindlimb. *Am. J. Anat.*, 171, 259-272.
- ASHLEY C.C. & MOISESCU C.U. (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.
- 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.
- BAKER J.H. & MATSUMOTO D.E. (1988). Adaptation of skeletal muscle to immobilization in a shortened position. *Muscle & Nerve*, 11, 231-244.
- BALDWIN K.M. (1984). Muscle development : Neonatal to adult. *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 12, 1-9.
- BALDWIN K.M., VALDEZ V., HERRICK R.E., MacINTOSH A.M. & ROY R.R. (1987). Biochemical properties of overloaded fast-twitch skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, 62, 467-472.
- BAR A. & PETTE D. (1988). Three fast myosin heavy chains in adult rat skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 235, 153-155.
- BARTON P.J.R. & BUCKINGHAM M.E. (1985). The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.* 231, 249-261.
- BARTON P.J.R., COHEN A., ROBERT B., FISZMAN M.Y., BONHOMME F., GUENET J.L., LEADER D.P. & BUCKINGHAM M.E. (1985 a). The myosin alkali light chains of mouse ventricular and slow skeletal muscle are indistinguishable and are encoded by the same gene. *J. Biol. Chem.* 260, 8578-8584.
- BARTON P.J.R., ROBERT B., FISZMAN M.Y., LEADER D.P. & BUCKINGHAM M.E. (1985 b). The same myosin alkali light chain gene is expressed in adult cardiac atria and in fetal skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motility.*, 6, 461-475.
- BENNET M.R. & PETTIGREW A.G. (1974). The formation of synapses in striated muscle during development. *J. Physiol. (London)*, 241, 515-545.
- 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., WEBER H., LUTZ H., HOWALD H., EPPENBERGER H.M. & JENNY E. (1980). Myosin types in human skeletal muscle fibres. *Histochemistry*, 65, 249-259.
- BIRAL D., SCARPINI E., ANGELINI C., SALVIATI G. & MARGRETH A. (1989). Myosin heavy chain composition of muscle fibers in spinal muscular atrophy. *Muscle & Nerve*, 12, 43-51.
- BOOTH F.W. & KELSO J.R. (1973). Effect of hindlimb immobilization on contractile and histochemical properties of skeletal muscle. *Pflügers Arch.*, 342, 231-238.
- 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.
- BOTTINELLI R., BETTO R.P., SCHIAFFINO S. & REGGIANI C. (1994). Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell Motility*, 15, 413-419.
- BRIGGS M.M., Mc GINNIS H.D. & SCHACHAT F. (1990). Transitions from fetal to fast troponin T isoforms are coordinated with changes in tropomyosin and α -actinin isoforms in developing rabbit skeletal muscle. *Dev. Biol.*, 140, 253-260.
- BRIGGS M.M. & SCHACHAT F. (1993). Origin of fetal troponin T : Developmentally regulated splicing of a new exon in the fast troponin T gene. *Dev. Biol.*, 158, 503-509.
- BROOKE M.H. & KAISER K.K. (1970). Muscle fiber types : how many and what kind ? *Arch. Neurol.* 23, 369-379.
- BROOKE M.H., WILLIAMSON E. & KAISER K.K. (1971). The behavior of four fiber types in developing and reinnervated muscle. *Arch. Neurol.*, 25, 360-366.
- BROWN M.C., JANSEN J.K.S. & VAN ESSEN D.C. (1976). Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. *J. Physiol. (London)*, 261, 387-422.
- BURKE R.E. (1981). Motor units : Anatomy, physiology and functional organization. In Brookout J.M. Mountcastle VB (eds) : "Handbook of Physiology. Section I. The Nervous System. Volume II. Motor Control, Part 1". Bethesda, MD : Am. Physiol. Soc., pp 345-422.
- BUTLER-BROWNE G.S., BUGAISKY L.B., GUENOUD S., SCHWARTZ K. & WHALEN R.G. (1982). Denervation of newborn rat muscles does not block the appearance of adult fast myosin heavy chain. *Nature*, 299, 830-833.
- BUTLER-BROWNE G.S., ERIKSSON P.O., LAURENT C. & THORNELL L.E. (1988). Adult human masseter muscle fibers express myosin isozymes characteristic of development. *Muscle & Nerve*, 11, 610-620.

- BUTLER-BROWNE G.S. & WHALEN R.G. (1984). Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.*, 102, 324-334.
- CARDASIS C.A. & COOPER G.W. (1975). An analysis of nuclear numbers in individual muscle fibers during differentiation and growth : a satellite cell-muscle fiber growth unit. *J. Exp. Zool.*, 191, 347-357.
- 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., CATANI C. & BIRAL D. (1979). Selective maintenance of neurotrophically regulated proteins in denervated diaphragm. *Exp. Neurol.*, 63, 468-475.
- CARRARO U., CATANI C., DALLA LIBERA L., VASCON M. & ZANELLA G. (1981). Differential distribution of tropomyosin subunits in fast and slow rat muscles and its changes in long-term denervated hemidiaphragm. *FEBS Lett.*, 128, 233-236.
- CLAYTON L., REINACH F.C., CHUMBLEY G.M. & MACLEOD A.R. (1988). Organization of the hTM_{mm} gene. *J. Mol. Biol.*, 201, 507-515.
- COLLINS J.H. (1976). Homology of DTNB light chain alkali chains, with alkali light chains, troponin C and parvalbumin. *Nature*, 259, 699-700.
- CONDON K., SILBERSTEIN L., BLAU H.M. & THOMPSON W.J. (1989). Development and innervation of muscle fiber types in the rat hindlimb. In "The Assembly of the Nervous System" (L. Landmesser, Ed.), pp. 57-63. A.R. Liss, New-York.
- CONDON K., SILBERSTEIN L., BLAU H.M. & THOMPSON W.J. (1990). Development of muscle fiber types in the prenatal rat hindlimb. *Dev. Biol.*, 138, 256-274.
- CORDONNIER C. (1994). Relation structure-fonction de fibres isolées de muscles squelettiques. Mémoire de Thèse d'Université. Université de Lille I. 156 pages.
- CORDONNIER C., STEVENS L., PICQUET F. & MOUNIER Y. (1995). Structure-function relationship of soleus muscle fibers from the rhesus monkey. *Pflügers Arch.*, 430, 19-25.
- CUMMINS P. & PERRY S.V. (1973). The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.*, 133, 765-777.
- CUMMINS P. & PERRY S.V. (1974). Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle. *Biochem. J.*, 141, 43-49.

- 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.
- 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., PANTALONI C. & BECHET J.J. (1979). An electrophoretic study of native myosin isozymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.*, 99, 261-272.
- DALLA LIBERA L. (1981). Myosin heavy chains in fast skeletal muscle of chick embryo. *Experientia*, 37, 1268-1270.
- 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.
- 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.
- DAVIES C.E., HARRIS J.B. & NICHOLSON L.V.B. (1991). Myosin isoform transitions and physiological properties of regenerated and re-innervated soleus muscles of the rat. *Neuromuscular Disorders*, 1, 411-421.
- 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.
- DUBOWITZ V. (1966). Histochemistry. Enzyme histochemistry of developing human muscle. *Nature*, 211, 884-885.
- ECOB-PRINCE M., HILL M. & BROWN W. (1989). Immunocytochemical demonstration of myosin heavy chain expression in human muscle. *J. Neurol. Sci.*, 91, 71-78.
- ELMUBARAK M.H. & RANATUNGA K.W. (1988). Differentiation of fast and slow muscles in the rat after neonatal denervation : a physiological study. *J. Muscle Res. & Cell Motility*, 9, 219-232.
- 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.
- FALEMPIN M. & FODILI S. (1995). Effect of the elimination of neural influence in the rat soleus muscle during unweighting. *Basic and Applied Myology*, 2, 155-161.

- FALEMPIN M., GOUBEL F. & MOUNIER Y. (1991). L'atrophie musculaire en situation de microgravité réelle ou simulée : analyse des propriétés contractiles et élastiques du complexe muscle-tendon. *Science et motricité*, 14, 34-45.
- FISCHBACH G.D. & ROBBINS N. (1969). Changes in contractile properties of disused soleus muscles. *J. Physiol. (London)*, 201, 305-320.
- FITTS R.H., BRIMMER C.J., HEYWOOD-COODSEY A. & TIMMERMAN R.J. (1989). Single muscle fiber enzyme shifts with hindlimb suspension and immobilization. *Am. J. Physiol.*, 256, C1082-C1091.
- FLADBY T. & JANSEN J.K.S. (1990). Development of homogeneous fast and slow motor units in the neonatal mouse soleus muscle. *Development*, 109, 723-732.
- FLICKER P.F., WALLIMANN T. & VIBERT P. (1983). Electron microscopy of scallop myosin. Location of regulatory light chains. *J. Mol. Biol.* 169, 723-741.
- FRANK G. & WEEDS A.G. (1974). The amino acid sequence of the alkali light chains of rabbit skeletal muscle myosin. *Europ. J. Biochem.*, 44, 317-345.
- FRANZINI-ARSMTRONG 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 Motility*, 9, 403-414.
- FURBY A., MOUNIER Y., STEVENS L., LETERME D. & FALEMPIN M. (1993). Effects of chronic electrostimulation on rat soleus skinned fibers during hindlimb suspension. *Muscle & Nerve*, 16, 720-726.
- GAMBKE B. & RUBINSTEIN N.A. (1984). A monoclonal antibody to the embryonic myosin heavy chain of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, 259, 12092-12100.
- GAO L. & KENNEDY J.M. (1992). Repression of the embryonic myosin heavy chain phenotype in regenerating chicken slow muscle is dependent on innervation. *Muscle & Nerve*, 46, 554-565.
- GAUTHIER G.F. & HOBBS A.W. (1982). Effects of denervation on the distribution of myosin isozymes in skeletal muscle fibers. *Exp. Neurol.*, 76, 331-346.
- GAUTHIER G.F. & LOWEY S. (1979). Distribution of myosin isoenzymes among skeletal muscle fiber types. *J. Cell Biol.*, 81, 10-25.
- GAUTHIER G.F., LOWEY S., BENFIELD P.A. & HOBBS A.W. (1982). Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibers. *J. Cell. Biol.*, 92, 471-484.
- GAUTHIER G.F., ONO R.D. & HOBBS A.W. (1984). Curare-induced transformation of myosin pattern in developing skeletal muscle fibers. *Dev. Biol.*, 105, 144-154.

- GIULIAN G.G., MOSS R.L. & GREASER M.L. (1983). Improved methodology for analysis and quantification of proteins on one dimensional silver stained slab gels. *Anal. Biochem.*, 129, 277-287.
- GOLDSPINK D.F. (1977). The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol. (London)*, 264, 267-282.
- GOLDSPINK G. (1983). Alterations in myofibril size and structure during growth, exercise, and changes in environmental temperatures. In : Peachey LD, Adrian RH, Geiger SR (Eds). *Handbook of physiology, section 10 : Skeletal muscle*. American Physiological Society, Bethesda, pp. 539-554.
- GOLDSPINK G., SCUTT A., LOUGHNA P.T., WELLS D.J., JEANICKE T. & GERLACH G.F. (1992). Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am. J. Physiol.*, 262, R356-R363.
- GORDON H. & VAN ESSEN D.C. (1985). Specific innervation of muscle fiber types in a developmentally polyinnervated muscle. *Dev. Biol.*, 111, 42-50.
- 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.
- GUTH L. & SAMATHA F.J. (1969). Qualitative differences between actomyosin ATPase of slow and fast mammalian muscle. *Exp. Neurol.*, 25, 138-152.
- HELFMAN D.M., CHELEY S., KUISMANEN E., FINN L.A. & YAMAWAKI K.Y. (1986). Nonmuscle and muscle tropomyosin isoforms are expressed from a single gene by alternative RNA splicing and polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 3582-3595.
- HESLINGA J.W. & HUIJING P.A. (1992). Effect of short length immobilization of medial gastrocnemius muscle of growing young adult rats. *Eur. J. Morph.*, 30, 257-273.
- HILL T.L., EISENBERG E. & GREENE L. (1980). Theoretical model for the cooperative equilibrium binding of myosin subfragment 1 to the actin-troponin-tropomyosin complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 3186-3190.
- HOLTZER H., RUBINSTEIN N., FELLINI S., YEOH G.H., CHI J., BIRNBAUM J. & OKAYAMA M. (1975). Lineages, quantal cell cycles and the generation of cell diversity. *Quart. Rev. Biophys.*, 8, 523-557.
- HOLTZER H., WEINTRAUB H., MAYNE R. & MOCHAN B. (1970). The cell cycle, cell lineages, and cell differentiation. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 5, 229-256.
- HUGHES S.M., CHO M., KARSCH-MIZRACHI I., TRAVIS M., SILBERSTEIN L., LEINWAND L.A. & BLAU H.M. (1993). Three slow myosin heavy chains sequentially expressed in developing mammalian skeletal muscle. *Dev. Biol.* 158, 183-199.

- HUXLEY A.F. (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys.*, 7, 255-318.
- HUXLEY H.E. (1962). In "The Cell", vol IV BRACHET & MIRSKY Eds, chap. 7, New-York Academic Press Inc.
- ISHIURA S., TAKAGI A., NONAKA I. & SUGITA H. (1981). Heterogeneous expression of myosin light chain 1 in a human slow-twitch muscle fiber. *J. Biochem.*, 90, 279-282.
- JIANG B., ROY R.R. & EDGERTON V.R. (1990). Expression of a fast fibre enzyme in the cat soleus after spinalization. *Muscle & Nerve*, 13, 1038-1049.
- JONES D.A. & ROUND J.M. (1990). Skeletal muscle in health and disease. A text book of muscle physiology. Manchester University Press.
- JONES, S.P., RIDGE R.M.A.P. & ROWLERSON A. (1987). The non-selective innervation of muscle fibres and mixed composition of motor units in a muscle of neonatal rat. *J. Physiol.*, 386, 377-394.
- KUCERA J. & WALRO J.M. (1989). Nonuniform expression of myosin heavy chain isoforms along the length of cat intrafusal muscle fibers. *Histochemistry*, 92, 291-299.
- LA FRAMBOISE W.A., DAOOD M.J., GUTHRIE R.D., BUTLER-BROWNE G.S., WHALEN R.G. & ONTELL M. (1990). Myosin isoforms in neonatal rat extensor digitorum longus, diaphragm, and soleus muscles. *Am. J. Physiol.*, 259, L116-L122.
- LAEMMLI U.K. (1970). Clearance of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- LARSSON L., EDSTROM L., LINDEGREN B., GORZA L. & SCHIAFFINO S. (1991). MHC composition and enzyme-histochemical and physiological properties of a novel fast-twitch motor unit type. *Am. J. Physiol.*, 261, C93-C101.
- LASZEWSKI-WILLIAMS B., LUFF R.L. & GORDON A.M. (1989). Influence of fiber type and muscle source on Ca²⁺ sensitivity of rat fibers. *Amer. J. Physiol. (London)*, 256, C420-C427.
- LAUFER R., FONTAINE B., KLARSFIELD A., CARTAUX J. & CHANGEUX J.P. (1989). Regulation of acetylcholine receptor biosynthesis during motor endplate morphogenesis. *News in Physiological Sciences*, 4, 5-9.
- LEEuw T., KAPP M. & PETTE D. (1994). Role of innervation for development and maintenance of troponin subunit isoform patterns in fast- and slow-twitch muscles of the rabbit. *Differentiation*, 55, 193-201.

- LEFEROVICH J.M., RUBINSTEIN N.A. & KELLY A.M. (1991). Expression of slow and fast myosin heavy chains in overloaded muscles of the developing rat. *J. Muscle Res. Cell. Motility*, 12, 247-253.
- LETERME D., CORDONNIER C., MOUNIER Y. & FALEMPIN M. (1994). Influence of chronic stretching upon rat soleus muscle during non-weight-bearing conditions. *Pflügers Arch.* 429, 274-279.
- LETERME D. & FALEMPIN M. (1994). Compensatory effects of chronic electrostimulation on unweighted rat soleus muscle. *Pflügers Arch.* 426, 155-160.
- LOMPRE A.M., NADAL-GINARD B. & MAHDAVI V. (1984). Expression of the cardiac ventricular α - and β -myosin heavy chain genes in developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.*, 259, 6437-6446.
- LOUGHNA P.T., ISUMO S., GOLDSPINK G. & NADAL-GINARD B. (1990). Rapid changes in sarcomeric myosin heavy chain gene and alpha-actin expression in response to disuse and stretch. *Development*, 109, 217-223.
- LOWEY S. & RISBY D. (1971). Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature*, 278, 81-85.
- 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.
- LOWRIE M.B. & VRBOVA G. (1984). Different pattern of recovery of fast and slow muscles following nerve injury in the rat. *J. Physiol. (London)*, 349, 397-410.
- MAIER A., GORZA L., SCHIAFFINO S. & PETTE D. (1988). A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast to slow fibre transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res.*, 254, 59-68.
- 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. Motility*, 3, 363-374.
- MASCARELLO F. & ROWLERSON A.M. (1992). Myosin isoform transitions during development of extra-ocular and masticatory muscles in the fetal rat. *Anat. Embryol.*, 185, 143-153.
- 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. *Biochem. Biophys. Acta.*, 546, 64-76.

- MOREY-HOLTON E.R. & VRONSKI T.J. (1981). Animal models for simulating weightlessness. *The Physiologist*, 24, S45-S48.
- MOSS R.L., ALLEN J.D. & GREASER M.L. (1986). 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., GIULIAN G.G. & GREASER M.L. (1982). Physiological effects accompanying the removal of myosin LC2 from skinned skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, 257, 8588-8591.
- MOSS R.L., REISER P.J., GREASER M.L. & EDDINGER T.J. (1990). Varied expression of myosin alkali light chains is associated with altered speeds of contraction in rabbit fast-twitch skeletal muscles. In : Pette D (ed) *The dynamic state of muscle fibers*. de Gruyter, Berlin, pp 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.
- NABESHIMA Y., NABESHIMA Y., NONONCURA Y. & FULJI-KURIYAMA Y. (1984). Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin heavy chains from one gene. *Nature (London)*, 308, 333-338.
- NARUSAWA M., FITZSIMONS R.B., IZUMO S., NADAL-GINARD B., RUBINSTEIN N.A. & KELLY A.M. (1987). Slow myosin in developing rat skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, 104, 447-459.
- NASSAR R., MALOUF N.N., KELLY M.B., OAKELEY A.E. & ANDERSON P.A.W. (1991). Force-pCa relation and troponin T isoforms of rabbit myocardium. *Circ. Res.*, 69, 1470-1475.
- OGANOV V.S. & POTAPOV A.N. (1976). On the mechanism of the changes in skeletal muscles in the weightless environment. *Life Sci. Space Res.*, 19, 137-143.
- OKADA S., NONAKA I & CHOU S.M. (1984). Muscle fiber type differentiation and satellite cell populations in normally grown and neonatally denervated muscles in rats. *Acta Neuropathol. (Berlin)*, 65, 90-98.
- ONTELL M. & DUNN R.F. (1978). Neonatal muscle growth : a quantitative study. *Am. J. Anat.*, 152, 539-556.
- ORENTLICHER M., BRANDT P.W. & REUBEN J.P. (1977). Regulation of tension in skinned muscle fibres : effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.*, 233, 127-134.
- ORENTLICHER M., REUBEN J.P., GRUNDFEST H. & BRANDT P.W. (1974). Calcium binding and tension development in detergent-treated muscles fibres. *J. Gen. Physiol.*, 63, 168-186.

- PERIASAMY M., STREHLER E.E., GARFINKEL I., GUBITS R.M., RUIZ-OPAZO N. & NADAL-GINARD B. (1984). Fast skeletal muscle myosin light chains 1 and 3 are produced from a single gene by a combined process of differential RNA transcription and splicing. *J. Biol. Chem.*, 259, 13595-13604.
- POLLACK G.H. (1990). *Muscles & Molecules : Uncovering the Principles of Biological Motion*. Ebner & Sons Publishers, Washington.
- POTTER J.D. & GERGELY J. (1974). Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca regulation of muscle contraction. *Biochemistry*, 13, 2697-2703.
- REINACH F.C. & MACLEOD A.R. (1986). Tissue-specific expression of the human tropomyosin gene involved in the generation of the *trk* oncogene. *Nature (London)*, 322, 648-650.
- REISER P.J., GREASER M.L. & MOSS R.L. (1992). Developmental changes in troponin T isoform expression and tension production in chicken single skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (London)*, 449, 573-588.
- REISER P.J., KASPER C.E., GREASER M.L. & MOSS, R.L. (1988). Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, 254, C605-C613.
- 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 Motility.*, 2, 415-438.
- RUBINSTEIN N.A. & KELLY A.M. (1978). Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in the rat. *Dev. Biol.*, 62, 473-485.
- RUBINSTEIN N.A. & KELLY A.M. (1981). Development of muscle fiber specialization in the rat hindlimb. *J. Cell. Biol.*, 90, 128-144.
- RUFF R.L. (1989). Calcium sensitivity of fast- and slow-twitch human muscle fibers. *Muscle & Nerve*, 12, 32-37.
- RUIZ-OPAZO N. & NADAL-GINARD B. (1987). α -Tropomyosin gene organization. Alternative splicing of duplicated isotype-specific exons accounts for the production of smooth and striated muscle isoforms. *J. Biol. Chem.*, 262, 4755-4765.
- SABRY M.A. & DHOOT G.K. (1991). Identification of and pattern of transitions of cardiac, adult slow and slow skeletal muscle-like embryonic isoforms of troponin T in developing rat and human skeletal muscles. *J. Musc. Res. Cell Motility.*, 12, 262-270.
- SALTIN B. & GOLLNICK P.D. (1983). Skeletal muscle adaptability : significance for metabolism and performance. In : L.D. Peachey, R.H. Adrian, & S.R. Geiger (Eds). *Handbook of Physiology*, section 10. Skeletal Muscle. American Physiological Society, Bethesda, pp. 555-631.

- 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. (1983). Myofibrillar-protein isoforms and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport activity of single human muscle fibres. *Biochem. J.*, 224, 215-225.
- SARTORE S., MASCARELLO F., ROWLERSON A., GORZA L., AUSONI S., VIANELLO M. & SCHIAFFINO S. (1987). Fibres types in extraocular muscles : a new myosin isoform in the fast fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motility*, 8, 161-172.
- 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.
- 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., GORZA L., AUSONI S., BOTTINELLI R., REGGIANI C., LARSON L., EDSTROM L., GUNDERSEN K. & LOMO T. (1990). Muscle fiber types expressing different myosin heavy chain isoforms. Their functional properties and adaptive capacity. In : Pette D (ed) *The dynamic state of muscle fibers*, de Gruyter, pp 329-341.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., SARTORE S., SAGGIN L., AUSONI S., VIANELLO M., GUNDERSEN K. & LOMO T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell. Motility*, 10, 197-205.
- SCHIAFFINO S. & REGGIANI C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins : gene regulation and functional significance. *Phys. Rev.*, 76, 371-423.
- SHEELER P. & BIANCHI D.E. (1980). In *Cell Biology : Structure, biochemistry and function*, John Wiley and sons eds., New-York.
- SOUSSE-YANICOSTAS N., BARBET J.P., LAURENT-WINTER C., BARTON P. & BUTLER-BROWNE G.S. (1990). Transition of myosin isozymes during development of human masseter muscle. Persistence of developmental isoforms during post-natal stage. *Development*, 108, 239-249.
- SOUSSE-YANICOSTAS N. & BUTLER-BROWNE G.S. (1991). Transcription of the embryonic light chain gene is restricted to type II muscle fibers in human adult masseter. *Dev. Biol.*, 147, 374-380.

- SPECTOR J.A., SIMARD C.P., FOURNIER M., STERNLICHT E. & EDGERTON V.R. (1982). Architectural alterations of rat hindlimb skeletal muscle immobilized at different lengths. *Exp. Neurol.*, 76, 94-110.
- 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. & PETTE D. (1987 a) 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. (1987 b). The multiplicity of myosin light and heavy chain combinations in histochemically typed single fibres. Rabbit tibialis anterior muscle. *Biochem. J.*, 243, 695-699.
- STEFFEN J.M. & MUSACCHIA X.J. (1984). Effects of hypokinesia and hypodynamia on protein, RNA and DNA in rat hindlimb muscles. *Amer. J. Physiol.*, 247, R728-R732.
- STEVENS L., MOUNIER Y. & HOLY X. (1993). Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am. J. Physiol.*, 264, R770-R776.
- STROHMAN R.C., MICOU-EASTWOOD J., GLASS C.A. & MATSUDA R. (1983). Human fetal muscle and cultured myotubes derived from it contain a fetal-specific myosin light chain. *Science*, 221, 955-957.
- SWYNGHEDAW B. (1986). Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, 66, 710-771.
- SZCZEPANOWSKA J. & JAKUBIEC-PUKA A. (1992). Myosin heavy chains in striated muscle after immobilization. *Basic and Applied Myology*, 2, 97-105.
- TAKAGI A. & ENDO M. (1977). Guinea pig soleus and extensor digitorum longus : A study of single-skinned fibers. *Exp. Neurol.*, 55, 95-101.
- TERMIN A., STARON R.S. & PETTE D. (1989 a). Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochemistry*, 92, 453-457.
- TERMIN A., STARON R.S. & PETTE D. (1989 b). Changes in myosin heavy chain isoforms during chronic low-frequency stimulation of rat fast hindlimb muscles - a single fiber study. *Eur. J. Biochem.*, 186, 749-754.
- TERMIN A., STARON R.S. & PETTE D. (1990). Myosin heavy chain isoforms in transforming rat muscle. In : Pette D (ed) *The dynamic state of muscle fibers*, de Gruyter, Berlin, pp 463-472.
- THOMASON D.B. & BOOTH F.W. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.*, 68, 1-12.

- THOMPSON W.J., CONDON K. & ASTROW S.H. (1990). The origin and selective innervation of early muscle fiber type in the rat. *J. Neurol. Biol.*, 21, 212-222.
- THOMPSON W.J., SUTTON L.A. & RILEY, D.A. (1984). Fibre type composition of single motor units during synapse elimination in neonatal rat soleus muscle. *Nature*, 309, 709-711.
- THORNELL L.E., BILLETER R., BUTLER-BROWNE G.S., ERIKSSON P.O., RINGQUIST M. & WHALEN R.G. (1984). Development of fiber types in human fetal muscle. An immunocytochemical study. *J. Neurol. Sci.*, 66, 107-115.
- TIMSON B.F. & DUDENHOEFFER G.A. (1990). Skeletal muscle fibre number in the rat from youth to adulthood. *J. Anat.*, 173, 33-36.
- UMEZU Y., HACHISUKA K., UEDA H., YOSHIZUKA M., OGATA H. & FUJIMOTO S. (1992). Histochemical and immunological analyses of differentiating skeletal muscle fibers of the postnatal rat. *Acta Anatomica*, 143, 1-6.
- VRBOVA G. & LOWRIE M. (1989). Role of activity in developing synapses, search for molecular mechanism. *News in Physiological Sciences*, 4, 75-78.
- WALLER G.S. & LOWEY S. (1985). Myosin subunit interactions. Localization of the alkali light chains. *J. Biol. Chem.*, 261, 14368-14373.
- WATCHKO J.F., DAOOD M.J., VAZQUEZ R.L., BROZANSKI B.S., LA FRAMBOISE W.A., GUTHRIE R.D. & SIECK G.C. (1992). Postnatal expression of myosin isoforms in an expiratory muscle-external abdominal oblique. *J. Appl. Physiol.*, 73, (5), 1860-1866.
- WEEDS A.G. & LOWEY S. (1971). Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J. Mol. Biol.* 61, 701-725.
- WESTERGA J. & GRAMSBERGEN A. (1994). Development of the EMG of the soleus muscle in the rat. *Dev. Brain Res.*, 80, 233-243.
- 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-chain 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. & NADAL G.B. (1988). The rat alpha-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.
- 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.
- YOUNG O.A. & DAVEY C.L. (1981). Electrophoretic analysis of proteins from single bovine muscle fibres. *Biochem. J.*, 195, 317-327.



PUBLICATIONS

LISTE DES PUBLICATIONS

A - MEMOIRE :

PICQUET, F. (1992)

Etude de la relation structure/fonction des protéines contractiles du muscle soleus de singe

Memoire de DEA, Sciences de la Vie et de la Santé, option Neurosciences, Lille. 37 p.

B - ARTICLES :

- 1 CORDONNIER, C., STEVENS, L., PICQUET, F. & MOUNIER, Y. (1995)
Structure-function relationship of soleus fibres from the rhesus monkey.
Pflügers Arch., 430, 19-25.
- 2 MOUNIER, Y., STEVENS, L., PICQUET, F., CATINOT, M.P. & MONTEL, V. (1997)
Differential adaptation to weightlessness of functional and structural characteristics of rat hindlimb muscles.
J. Gravitational Physiol. (In press).
- 3 PICQUET, F., STEVENS, L., BUTLER-BROWNE, G.S. & MOUNIER, Y. (1997)
Contractile properties and myosin heavy chain composition of newborn rat soleus muscles at different stages of postnatal development.
J. Muscle Res. Cell. Motility, 18, 1-9

STEVENS, L., PICQUET, F., MONTEL, V. & MOUNIER, Y. (1996)

Functional plasticity of monkey triceps muscle fibers in immobilization conditions.

Soumis à *J. Muscle Res. Cell. Motility*.

C - COMMUNICATIONS AYANT FAIT L'OBJET D'UNE NOTE PUBLIEE:

MOUNIER, Y., STEVENS, L., CORDONNIER, C. & PICQUET, F. (1993)

Differential adaptation of rat skeletal muscles to weightlessness.

Symposium Animals in space. Bordeaux, 15-17 mars.

PICQUET, F., CORDONNIER, C., STEVENS, L. & MOUNIER, Y. (1993)

Structure-function relationship of different muscle fiber types.

Proceedings of the International Union of Physiological Sciences, Glasgow, Août 1993.

MOUNIER, Y., CORDONNIER, C., PICQUET, F. & STEVENS, L. (1993)

Relationship between contractile and structural properties of monkey soleus fibers.

Arch. Int. Physiol. Bioch. Bioph., 104, A 101.

CORDONNIER, C., STEVENS, L., PICQUET, F. & MOUNIER, Y. (1993)

Analysis of structure-function relationship on soleus atrophied fibers.

European Conference on Muscle Contraction and Cell Motility, Bern.
J. Muscle Research and Cell Motility, 15, p. 177 - 1994.

MOUNIER, Y., CORDONNIER, C., HELLEC, S., MONTEL, V., PICQUET, F. & STEVENS, L. (1993)
Evolution of the structure-function relationship of the contractile proteins of monkey triceps muscle in weightlessness conditions (Biocosmos 2229).
International Biocosmos Symposium, Moscou, 15-18 décembre.

STEVENS, L., PICQUET, F. & MOUNIER, Y. (1994)
Effect of six day immobilization on the structure-function relationship in the soleus of new-born rats.
European Muscle Congress, Bochum, 11-14 septembre.

STEVENS, L., PICQUET, F. & MOUNIER, Y. (1995)
Evolution de la relation structure/fonction des protéines contractiles de soleus de rat au cours du développement post-natal.
Réunion des physiologistes (Muscle), Azay-Le-Ferron, 18 et 19 mai.

PICQUET, F., STEVENS, L. & MOUNIER, Y. (1995)
Evolution des propriétés contractiles du soleus de rat à différents stades du développement post-natal.
63ème Congrès de la Société de Physiologie, Strasbourg, 20-22 Décembre.

PICQUET, F., STEVENS, L. & MOUNIER, Y. (1996)
Effects of a six day immobilization on functional characteristics and MHC composition in new born rat soleus muscles.
European Muscle Congress, Montpellier, 14-17 Septembre.

PICQUET, F., STEVENS, L. & MOUNIER, Y. (1996)
Contractile properties and MHC composition on rat skinned fibre bundles during postnatal development in relation with the innervation state.
European Muscle Congress, Montpellier, 14-17 Septembre.

MOUNIER, Y., PICQUET, F. & STEVENS, L. (1996)
Postnatal muscle development in unloading conditions.
Int. J. Sports Medicine (Bern).

Cordonnier · L. Stevens · F. Picquet
Mounier

Structure-function relationship of soleus muscle fibres from the rhesus monkey

Received: 25 July 1994/Received after revision and accepted: 13 October 1994

Abstract Functional and structural properties of rhesus monkey skinned fibres were studied in order to examine the relationship between calcium/strontium (Ca/Sr) activation characteristics and protein composition. The fibres were classified according to their Ca/Sr affinity into slow (61%) and fast groups (39%). According to the myosin isoform composition, two additional hybrid fibres were defined. Thus, four profiles were characterized: two corresponding to slow (S) and fast (F) isoforms and two corresponding to a mixed proportion of slow and fast isoforms. They were called hybrid slow (HS) or hybrid fast (HF) based on the predominant myosin isoform. Tension/pCa parameters and maximal shortening velocities were determined. S fibres showed a higher V_{max} threshold and affinity as well as shallower slopes of their tension/pCa curve than did F fibres. HS and HF fibres exhibited tension/pCa curves which were positioned close to those of S and F fibres, respectively. No significant difference was observed between S and HS fibres or between F and HF fibres. Maximal shortening velocity values were higher for fibres expressing predominantly fast myosin isoforms. We suggest that when both S and F isoforms of myofibrillar proteins are expressed in a muscle fibre, the functional properties are mainly governed by the predominant isoform.

Key words Rhesus monkey · Soleus muscle · Skinned fibres · Calcium and strontium activation · Contraction velocity · Myofibrillar proteins

Introduction

The skeletal muscle of the rhesus monkey has been examined in spaceflight studies, especially for its archi-

tectural and histochemical properties [1, 24]. However, virtually no data exist concerning the contractile properties of monkey muscle, even from control animals.

It has been shown previously that interesting and important information about the contractile and regulatory proteins of striated muscle can be obtained by activating single skinned muscle fibres with calcium (Ca) and strontium (Sr) ions. Indeed, it is well known that the relative Ca/Sr affinity for tension generation is different in slow-twitch (S) and fast-twitch (F) fibres [10, 32]. These differences are supposed to be attributed mainly to the different composition of the myofibrillar proteins [17]. Moreover, the composition of myofibrillar proteins is evoked in differentiating the shortening velocity of S and F fibres [23, 30].

This work was undertaken with the aim of providing information about the functional properties of single muscle fibres from monkey soleus (SOL) muscles and, moreover, of trying to correlate the functional characteristics with the myofibrillar composition. In this study, single fibres were examined for their Ca- and Sr-activated tension characteristics, as well as for their maximal shortening velocity (V_{max}). The fibres were identified according to both Ca/Sr relative affinity and electrophoretic analysis of myofibrillar protein composition.

All the data indicate that when both S and F isoforms of myofibrillar proteins are expressed in a muscle fibre, the functional properties are governed mainly by the predominant isoform.

Materials and methods

Animals and samples

SOL muscle biopsies were removed from five male adult (body weight 14–16 kg) rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) provided by NASA (National Aeronautics and Space Administration) and CNES (Centre National d'Etudes Spatiales). Monkeys were anaesthetized by halothane and biopsies (about 10–15 mg) were removed from the

Cordonnier (✉) · L. Stevens · F. Picquet · Y. Mounier
Laboratoire de Physiologie des Structures Contractiles,
Département SN4, Université des Sciences et Technologies de Lille,
59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

middle third of the SOL, following the longitudinal axis from the deep portion of this muscle. The experiments, as well as the maintenance conditions of the animals, received authorizations from both the Ministry of Agriculture and the Ministry of Education (veterinary service of health and animal protection; authorization 03805).

Dissection and skinning

Bundles of several fibres were isolated from the SOL muscle biopsies. They were chemically skinned by exposure to an "EGTA skinning solution" (see section entitled "Solutions") for 24 h and were stored at -20°C in a 50% glycerol skinning solution (storage solution), as described by Mounier et al. [20]. Experiments were performed on single fibre segments isolated from the skinned bundles. Before each experiment, the isolated fibre was bathed twice for 10 min in a 2% Brij solution (see section entitled "Solutions") to eliminate irreversibly the function of the sarcoplasmic reticulum (SR), whereas the actomyosin system remained intact [21]. This Brij treatment prevented a possible effect of the SR on the tension developed by the myofilaments.

Experimental set up

An individual fibre was transferred to the experimental chamber containing the relaxing solution (solution R). A segment (2–3 mm long) was glued between the hook of a force transducer (AE 801 element, Sensoror, Horten, Norway) and the arm of a vibrator (GWV2, Gearing and Watson Electronics).

Fibre diameter was measured in solution R using a binocular micrometer. The average diameter of the fibres used in this analysis, regardless of the group to which they belonged, was equal to $91.70 \pm 3.00 \mu\text{m}$ ($n = 41$). The relaxed fibre was stretched to a sarcomere length (SL) of $2.8 \mu\text{m}$, measured by the light diffraction of a HeNe laser beam, a length at which the maximal isometric force could be elicited. This SL was maintained constant and was checked throughout the entire experiment.

Experimental procedure and force measurements

All the experiments were conducted at 18°C . At the beginning of each experiment, a maximal tension (P_0) was elicited by applying a fully activating solution with a pCa ($-\log [\text{Ca}]$) of 4.2. Tension/pCa and tension/pSr relationships (T/pCa and T/pSr) were established as described previously [28, 29]. Briefly, each amplitude of tension (P) obtained in solutions of various pCa values was normalized to P_0 . The ratio P/P_0 was related to the pCa. The same procedure was performed to obtain the Sr contractile activation properties (T/pSr), except that the fibre was maximally activated in pSr 3.4 solution.

Physiological fibre type identification: Ca and Sr affinity

As described in a previous study [29], fibre type was determined according to the difference of Ca and Sr activation characteristics between fast and slow skeletal muscle fibres. Indeed, it is generally assumed that fast skeletal muscle fibres are less sensitive to Sr than are slow fibres [10, 32]. From the T/pCa (T/pSr) relationship, several characteristics can be derived, including the pCa_{50} (pSr_{50}). This value represents the pCa (pSr) necessary to develop 50% of the maximum Ca- (Sr-) activated tension response. pCa_{50} and pSr_{50} are indicators of the affinity of the contractile apparatus for Ca and Sr, respectively. The difference ($\text{pCa}_{50} - \text{pSr}_{50}$) or Δ criterion was used to reflect the relative affinity of a fibre to Ca and Sr. According to the

frequency distribution of the Δ criterion values determined for the 41 studied fibres (data not shown), it was established that a fibre showing a Δ criterion of no more than 0.8 was identified as being slow, whereas a fibre exhibiting a Δ criterion of no less than 1 was identified as being fast.

Determination of fibre type by electrophoretic analysis

The fibre type was also identified by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the myofibrillar protein content. After physiological measurements, all the single fibre segments were analysed by electrophoresis. Myosin heavy (MHC) and light (MLC) chains as well as regulatory proteins (i.e. troponin C and the troponin T-tropomyosin complex or TnC, TnT-TM complex) were studied. One part of the fibre was used for MHC separation on a 6% polyacrylamide slab gel [5, 6] and the other part was loaded on a 12% polyacrylamide gel [13] for MLC and regulatory protein separation. After the gel run, the gel slabs were silver stained according to Giulian's procedure [13]. A laser scanning densitometer (QuantiScan Microvial Systems, Biosoft, UK) was used to determine the relative proportion of MHC and MLC in each fibre.

V_{\max} determination

V_{\max} of single fibre was determined by the slack test method [8, 19]. The fibre was fully activated in the pCa 4.2 solution. When P_0 had reached its steady state, the fibre was released quickly to a shorter length such that tension fell to baseline. The fibre shortened under zero load until the slack was taken up, after which tension began to re-develop. The fibre was re-extended to its original length and replaced in solution R. Each fibre was activated and slackened four to six times by using different length steps. The duration of unloaded shortening, or the time between the onset of slack and re-development of tension, was measured for each step length. The amount of length change was plotted as a function of the unloaded shortening duration. V_{\max} [fibre length (FL/s)] was calculated by dividing the slope of the fitted straight line by the fibre segment length and was normalized to the SL [12].

Solutions

The composition of all the solutions was calculated by the computer program of Fabiato [9], using the stability constants listed by Orentlicher et al. [22] for Ca and by Moisescu and Thieleczek [18] for Sr, with a final ionic strength of 200 mM and a pH of 7.00. The EGTA [ethylenedis (oxonitrilo)-tetraacetic acid] skinning solution was composed of ATP (2.5 mM), morpholinopropane sulphonic acid (MOPS, 20 mM), potassium propionate (170 mM), magnesium acetate (2.5 mM), and $\text{K}_2\text{-EGTA}$ (5 mM). The following solutions were used for the experimental procedure: a washing solution (W) composed of ATP (2.5 mM), MOPS (20 mM), potassium propionate (185 mM) and magnesium acetate (2.5 mM); solution R, similar to the skinning solution; pCa- (pSr-) activating solutions consisting of solution W plus various concentrations of free Ca (Sr) (from CaCO_3 or SrCl_2 , respectively) buffered with EGTA and added in determined proportions to obtain the different pCa (pSr) values; and a Brij solution made up of solution R plus 2% Brij 58.

Statistical analysis

The data relating pCa (pSr) force as well as V_{\max} values were statistically analysed using the Student's *t*-test. The data were

resented as means \pm SEM. $P < 0.05$ was chosen as the level of significance.

Results

Fibre type identification

A total of 41 fibres (about eight fibres per monkey) were isolated from the SOL muscle biopsies removed from the five rhesus monkeys. According to the Ca/Sr relative affinity or Δ criterion (see Materials and methods section), two populations of fibres were determined in the monkey SOL muscles (Table 1, part A). A large majority (61%) of the 41 SOL fibres was identified as being type S since the Δ criterion was equal to 0.43 ± 0.04 . The remaining fibres (39%) had a Δ criterion value of 1.14 ± 0.06 , indicative of being type F.

The electrophoretic analysis of the myofibrillar composition of the same 41 fibres revealed not only S and F type fibres, but two additional hybrid subtypes. According to densitometric analysis, four characteristic profiles were defined, depending on their composition of S and F MHC and MLC isoforms. S fibres exhibited type I MHC and a slow MLC set (MLC_{1s} , MLC_{2s}). Type F fibres expressed type IIA MHC associated with a fast MLC set (MLC_{1f} , MLC_{2f} and MLC_3). Hybrid fibres co-expressed both S and F isoforms of both

MHC and MLC. In this group of hybrid fibres, generally one MHC isoform was expressed predominantly. Therefore, hybrid fibres were classified into two subtypes, hybrid slow (HS) and hybrid fast (HF), according to the predominant isoform. Figure 1 illustrates the four typical profiles determined by SDS-PAGE. This illustration also shows the migration of the TnC and TnT-Tm complex. We were able to detect the S isoform

Table 1 Fibre type identification: correlation between Ca/Sr affinity indicator and electrophoretic analysis. (S slow, HS hybrid slow, HF hybrid fast, F fast type fibres). Δ criterion is the relative difference between Ca and Sr affinities, i.e. $pCa_{50} - pSr_{50}$. % value is the number of fibres in each group as a % of the total number ($n = 41$).

Fibre type	Fibre type identification			
	A: Ca/Sr affinity		B: Ca/Sr affinity and electrophoresis	
	%	Δ criterion value	%	Δ criterion value
S	61	0.43 ± 0.04	41	0.41 ± 0.04
HS	—	—	20	0.35 ± 0.03
HF	—	—	22	$1.08 \pm 0.10^{\dagger}$
F	39	$1.14 \pm 0.06^*$	17	$1.22 \pm 0.04^{*}$

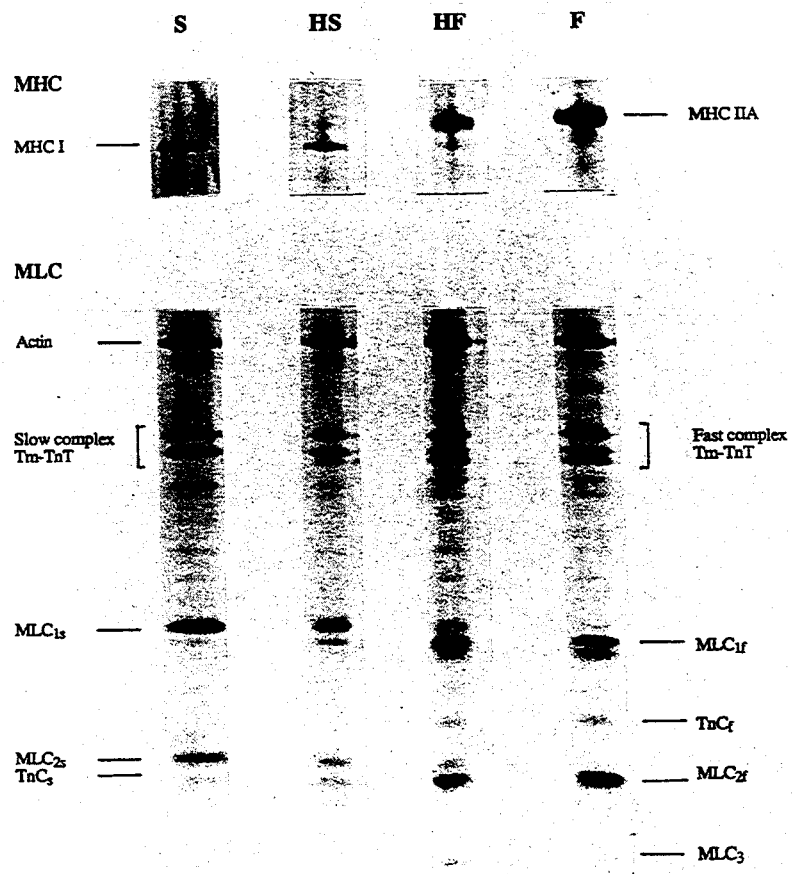
* F significantly different from S,

† HF significantly different from S,

§ HF significantly different from HS,

• F significantly different from HS

Fig. 1 Representative profiles for S, HS, HF and F fibres as determined by electrophoretic analysis of myosin heavy chain (MHC) isoforms and low molecular weight myofibrillar proteins. Upper panel shows SDS-PAGE (6%) slab gel electrophoresis; only the MHC region is shown. Lower panel shows SDS-PAGE (12%) slab gel electrophoresis of the same fibres; only the region below actin is shown. (s and f slow and fast type, MLC myosin light chain, Tm tropomyosin, TnT troponin T, TnC troponin C)



of TnC (TnC_s) only in the S type fibres, since, in the fibres expressing fast isoforms (HS, HF and F), it co-migrates with MLC_{2f}. The F isoform of TnC (TnC_f) was expressed in the HF and F fibre types. Thus, our methods did not allow us to discuss the presence of both S and F isoforms of TnC in the HS and HF hybrid types. In the same way, no affirmation about the co-expression of the Tm-TnT complex in the hybrid types could be made.

The Table 1 (part B) summarizes the results of fibre identification according to both Ca/Sr affinity and electrophoresis. It appeared that the population defined as being slow-twitch according to the Ca/Sr criterion corresponded to the S and HS fibres following electrophoresis, and the population defined as being fast-twitch, according to functional analysis, included HF and F fibres. Indeed, no significant difference was observed either between the Δ criterion values of S and HS fibres, or between those of HF and F fibres.

Ca activation characteristics

The four groups of fibres (S, HS, HF and F), identified on the basis of their differences in protein composition, were examined for their differences in P_0 generated per unit surface area and Ca activation parameters. Two characteristics other than Ca affinity (pCa_{50}) could be derived from the T/pCa curves: the threshold for activation by Ca (pCa) threshold and the steepness of the curve, indicated by the Hill coefficient. As described in [28], the Hill coefficient was calculated according to the following equation: $P/P_0 = ([Ca^{2+}]/K^n) / [1 + ([Ca^{2+}]/K^n)]$, where P/P_0 is the normalized tension, n_H the Hill coefficient (denoted simply as n in equation), and K the apparent dissociation constant ($pK = -\log K = pCa_{50}$). The steepness (n_H) of the T/pCa curves was better represented by two Hill coefficients, n_1 (denoted simply as n in equation) for

$P/P_0 > 0.50$ and n_2 (again denoted simply as n in equation) for $P/P_0 < 0.50$. The results are summarized in Table 2. The T/pCa measurements are illustrated by the curves of Fig. 2. The T/pSr relationships are not represented here since they are principally used for the fibre type identification (determination of pSr_{50} parameter, see Table 1).

The P_0 value expressed per unit surface area (kN/m^2) was invariant among the S, HS, HF and F fibres. For the T/pCa parameters, the greater differences were found between the typical S and F fibre populations. The S fibres had characteristic T/pCa parameters, i.e. a higher pCa threshold, a higher affinity and lower Hill coefficients. On the contrary, the F fibres were less sensitive to Ca (lower pCa threshold and lower Ca affinity) and presented higher Hill coefficients.

The HS and HF populations showed, for all parameters except n_1 , positions of their T/pCa curves which were intermediate between those of S and F fibres in the following order: S \rightarrow HS \rightarrow HF \rightarrow F. However, no significant differences were found between S and HS or between F and HF fibres.

Finally, it should be noticed that, in all cases, the value of the Hill coefficient n_2 was higher than that of n_1 .

V_{max} measurements

V_{max} was measured in 27 fibres taken from the 41 total fibres. According to the electrophoretic analysis, these 27 fibres are comprised of 17 S fibres, 3 HS fibres and 7 HF fibres. Figure 3 illustrates the distribution of these fibres in terms of V_{max} associated with myofibrillar protein composition. The V_{max} values obtained for the S and HS fibres were distributed between 0.4 and 2.8 FL/s. The average V_{max} values were not significantly different between S and HS fibres (1.25 ± 0.15 FL/s, $n = 17$; 1.08 ± 0.20 FL/s, $n = 3$, respectively). This

Table 2 Ca activation characteristics of single fibres from the four different profiles (i.e. S, HS, HF and F) identified in the monkey soleus (SOL) muscle. Values are expressed as mean \pm SEM; (n Number of fibres, P_0 maximal tension expressed per unit surface

area (kN/m^2), pCa threshold threshold for Ca activation, pCa_{50} pCa at which tension is half maximal, n_H , n_1 , n_2 slopes of the fitted line for the curve, for $P/P_0 > 0.5$ and for $P/P_0 < 0.5$, respectively.

Parameter	Fibre type			
	S ($n = 17$)	HS ($n = 8$)	HF ($n = 9$)	F ($n = 7$)
P_0 (kN/m^2)	88 \pm 9	71 \pm 4	64 \pm 13	80 \pm 10
pCa threshold	6.78 \pm 0.06	6.63 \pm 0.35	6.48 \pm 0.05 [†]	6.48 \pm 0.08*
pCa_{50}	5.96 \pm 0.04	5.86 \pm 0.41	5.79 \pm 0.04 [†]	5.79 \pm 0.05*
n_H	1.89 \pm 0.12	1.98 \pm 0.20	2.35 \pm 0.14 [†]	2.69 \pm 0.46*
n_1	1.82 \pm 0.16	1.60 \pm 0.16	2.46 \pm 0.16 ^{†§}	2.41 \pm 0.51*
n_2	2.05 \pm 0.15	2.38 \pm 0.23	3.05 \pm 0.81	4.10 \pm 0.72*

* F significantly different from S,

[†] HF significantly different from S,

[§] HF significantly different from HS,

[·] F significantly different from HS

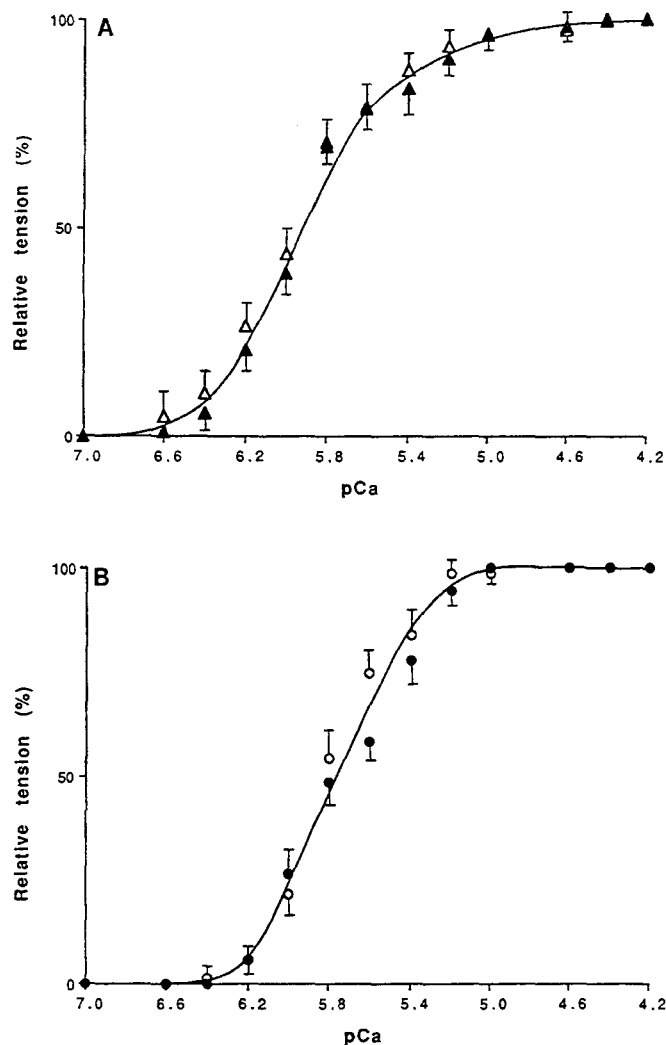


Fig. 2A, B Plots of tension/pCa (T/pCa) curves of the different fibre groups from monkey SOL muscles. The curves are drawn according to the Hill equation. Each experimental data point represents mean \pm SEM. The number of fibres as well as the mean values of all the T/pCa parameters in each group are indicated in Table 2. A T/pCa curves of S (Δ) and HS (\blacktriangle) fibres. B T/pCa curves of F (\circ) and HF (\bullet) fibres

showed that S and HS fibres cannot be discriminated according to their V_{max} value. HF V_{max} values were distributed between 1.0 and 5.8 FL/s. These HF fibres had an average V_{max} (3.03 ± 0.60 FL/s, $n = 7$) that was significantly higher than that of the S or HS fibres.

Discussion

Based on the Ca and Sr activation characteristics, our results showed that the monkey SOL fibres could be classified in two groups: a slow one (61%) and a fast one (39%). Compared to other studies [11, 34], no intermediate fibre group significantly different from S and F could be distinguished according to Ca/Sr

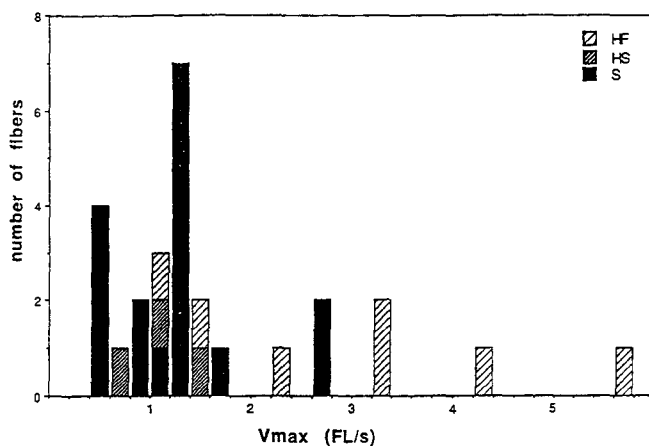


Fig. 3 Distribution of maximal shortening velocity (V_{max}) in fibre length/s (FL/s), measured in single fibres from the monkey SOL muscle. The fibre type was determined by the electrophoretic profile

activation characteristics. Here, intermediate populations were discriminated only when the classification of the SOL fibres was performed using electrophoretic analysis. Two additional populations were found: hybrid populations composed of a mixed proportion of S and F myofibrillar proteins. Thus the SOL typing was established as follows: 61% of S fibres were composed of 41% "pure" S and 20% HS; and 39% of F fibres were composed of 17% "pure" F and 22% HF. This result concerning the SOL fibre typing was in agreement with the literature, in so much as the SOL contained a majority of S fibres. We found a smaller proportion (61%) than that generally obtained from the monkey (90–95%) using ATPase staining [1, 24]. This could be attributed to the lower number of experimental fibres in our study ($n = 41$) when compared to the number of fibres typed with ATPase staining ($n > 500$). The fact that, for fibre identification, we used other criteria (Ca/Sr and electrophoresis) than those that were used in previous works could also explain this discrepancy. Nevertheless, this fibre type distribution of the SOL, i.e. predominantly S type fibres, was similar to that reported for a majority of mammals, including human or other primates. This fibre type composition was an indication that the SOL was heavily recruited during postural and low level activity [24].

Many results have been reported concerning the P_0 value developed by single skinned fibres, but, to our knowledge, no data from the rhesus monkey were available. The values of P_0 ranged from 64 kN/m² to 88 kN/m² and, thus, were not significantly different from those that we found for rat fibres [29]. However these values were lower than those found for human muscle fibres (range 150–300 kN/m²) [11, 25, 31]. No significant difference in P_0 as expressed per unit surface area (P_0 in kN/m²) was found among the different fibre types identified in the monkey SOL muscle.

Examination of the literature revealed that the differences existing between the P_0 value developed by different fibre types depended strongly on the muscle species and even varied within given species. Indeed our results, i.e. no difference between P_0 values from subtypes, were in accordance with previous works on rat skinned fibres [15, 29], but were different from those of Bottinelli et al. [3]. When studying human fibres, no difference was generally found between the P_0 values of various fibre subtypes (Takagi [31] on the biceps brachii, Fink et al. [11] on the vastus lateralis, Ruff and Whittlesey [25] on the gastrocnemius lateralis).

The Ca activation parameters of monkey SOL S and F fibres were different according to the pCa threshold, the pCa₅₀ affinity parameter and the Hill coefficients. These typical differences were similar to those previously described for other mammalian muscle fibres [20, 27, 32] and could be attributed mainly to the different composition of myofibrillar proteins [7]. The presence of S or F isoforms of TnC has been considered as being responsible for the difference of Ca affinity between S and F fibre types [2, 19]. Moreover, it has been shown that the isoforms of TnT [15, 26], Tm [4, 26] and TnI [14], as well as the isoforms of MLC and MHC [16, 34], could affect the T/pCa relationship. The slopes (n_H , n_1 , n_2) of the S and F type fibre T/pCa curves were also different in so much as the F fibres presented steeper slopes than did S fibres. According to Brandt et al. [4], the slope values of the T/pCa curves supported the existence of a molecular mechanism of cooperativity in the Ca binding process. A determining role for the shape of the T/pCa relationship was given especially to the Tm–TnT complex [26]. It should be noticed that, for all the fibre groups, the n_2 coefficient value was greater than n_1 , a fact which has been described previously [12, 19].

In our study, S and F fibre populations, as identified by electrophoretic analysis, expressed respectively the S or F isoforms of MHC, MLC and regulatory proteins (Tm–TnT complex, TnC). An interesting finding of this study was the correlation between the expression of MHC and MLC. To date, this has not been shown in the primate, but has been well documented in other mammals, particularly in rabbits or humans [15, 33]. This favourable association was not only found in the “pure” S and F fibre types, but also in the HS and HF hybrid types. Indeed, both HS and HF hybrid fibres exhibiting predominantly the S and F MHC isoforms, co-expressed the predominant S and F MLC isoforms, respectively. Greaser et al. [15], using skinned fibres from rabbit plantaris muscles, also identified, among pure S and F groups, intermediate types containing a mixture of MHC and MLC isoforms. In our study, the HS and HF profiles could not be revealed according to their Ca/Sr relative affinity alone, in so much as the Ca/Sr characteristics of HS and HF fibres were not significantly different from those of the S and F fibres, respectively. We suggest that when both S and F iso-

forms of myofibrillar proteins are present in a fibre, contractile properties are dictated mainly by the predominant isoforms. This is not in agreement with Danieli-Betto et al. [7] who asserted that when analysing the T/pCa relationships of control rat SOL fibres exhibiting both F and S isoforms of MLC and regulatory proteins, their Ca sensitivity was predominantly affected by the F isoforms. However, even if the differences between S and HS fibres and between F and HF fibres were not significant, the hybrid fibres had Ca characteristics that were intermediate between “pure” S and F fibres, the HS and HF fibres having a greater resemblance to the S and F fibres, respectively. This intermediate position of the hybrid fibres was also found by Greaser et al. ([15], p 94, Table 2).

We showed that HS fibres exhibited slow functional properties and did not observe the F TnC isoform in HS fibres. According to these observations, even if no conclusion can be made about the presence of TnC_s in HF fibres (TnC_s co-migrates with MLC_{2f}, see Materials and methods), we could consider that Ca/Sr activation properties are dependent on the TnC isoform. Nevertheless, from our results, we cannot refute that Ca activation characteristics also depend on the myosin composition (MHC and MLC) since T/pCa and T/pSr curves of HS and HF fibres could be linked to the predominantly expressed MHC and MLC isoforms.

Our results showed that there was a continuum in V_{max} values among individual fibres of SOL muscles from the rhesus monkey. The values were distributed between 0.4 and 5.8 FL/s. This range of values was comparable to that measured in single fibres from human gastrocnemius lateralis by Ruff and Whittlesey [25]. Within this continuum, the values of three fibre groups (S, HS and HF) differing by their myosin composition were reported. Thus, as described previously for the other functional parameters, only the electrophoretic profile permits the discrimination of the different subtypes. However, considering the mean V_{max} values of each group, our results allowed us to distinguish HF from “pure” S and HS fibres. Even if there was no difference between S and HS groups, our data concerning HF and S were in agreement with those of Greaser et al. [15], in so much as these authors were able, by using V_{max} , to separate intermediate from S and F fibres.

Much evidence for a strong correlation between V_{max} and the MHC composition has been reported [3, 23, 30]. We showed that fibres expressing only, or predominantly, the slow MHC isoform exhibited low V_{max} values. This observation was not in accordance with Reiser et al. [23]. Nevertheless, when the fast MHC isoform was predominant, we measured greater V_{max} values. Moreover, contractile proteins other than MHC could be responsible for the variability that we observed in V_{max} values: a correlation was mentioned between MLC composition and V_{max} in F fibres [15, 30].

Acknowledgements The authors thank the National Aeronautics and Space Administration and the Centre National d'Etudes Spatiales for providing the rhesus monkey muscle samples used in this study. The technical assistance of V. Montel and F. Lefevre is gratefully acknowledged.

References

- Acosta L Jr, Roy RR (1987) Fiber-type compositions of selected hindlimb muscles of a primate (*Cynomolgus* monkey). *Anat Rec* 218:136–141
- Babu A, Lehman W, Gulati J (1989) Characterization of the Ca^{2+} -switch in skeletal and cardiac muscles. *FEBS Lett* 2:177–182
- Bottinelli R, Schiaffino S, Reggiani C (1991) Force-velocity relation and myosin heavy chain isoform composition in skinned fibres of rat skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 437:655–672
- Brandt PW, Diamond MS, Schachat FH (1984) The thin filament of vertebrate skeletal muscle co-operativity activates as a unit. *J Mol Biol* 180:379–384
- 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
- Danieli-Betto D, Zerbato E, Betto R (1986) Type 1, 2A and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibres. *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
- Edman KAP (1979) The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *J Physiol (Lond)* 291:143–159
- 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 RHA, Stephenson DG, Williams DA (1986) Calcium and strontium activation of single skinned muscle fibres of normal and dystrophic mice. *J Physiol (Lond)* 373:513–525
- Fink RHA, Stephenson DG, Williams DA (1990) Physiological properties of skinned fibres from normal and dystrophic (Duchenne) human muscle activated by Ca^{2+} and Sr^{2+} . *J Physiol (Lond)* 420:337–353
- Gardetto PR, Schluter JM, Fitts RH (1989) Contractile function of single muscle fibres after hindlimb suspension. *J Appl Physiol* 66:2739–2749
- Giulian GG, Moss RL, Greaser ML (1983) Improved methodology for analysis and quantification of proteins on one dimensional silver stained slab gels. *Anal Biochem* 129:277–287
- Grabarek Z, Leavis PC, 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
- Greaser ML, Moss RL, Reiser PJ (1988) Variations in contractile properties of rabbit single muscle fibres in relation to troponin T isoforms and myosin light chains. *J Physiol (Lond)* 406:85–98
- Hofmann PA, Metzger JM, Greaser ML, Moss RL (1990) Effects of partial extraction of light chain 2 on the Ca^{2+} sensitivities of isometric tension, stiffness, and velocity of shortening in skinned skeletal muscle fibres. *J Gen Physiol* 95:477–498
- Kerrick WGL, Malencik DA, Hoar PE, Potter JD, Coby RL, Pocinwong S, Fischer EH (1980) Ca^{2+} and Sr^{2+} activation: comparison of cardiac and skeletal muscle contraction models. *Pflügers Arch* 386:207–213
- Moisescu DG, Thieleczek R (1979) Sarcomere length effects of the Sr^{2+} and Ca^{2+} activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem Biophys Acta* 546:64–76
- Moss RL, Lauer MR, Gary GG, Greaser ML (1986) 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* 261:2096–6099
- 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
- Orentlicher M, Reuben JP, Grundfest H, Brandt PW (1974) Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibres. *J Gen Physiol* 63:168–186
- Orentlicher M, Brandt PW, Reuben JP (1977) Regulation of tension in skinned muscle fibres: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am J Physiol* 233:127–134
- Reiser PJ, Moss RL, Giulian GG, Greaser ML (1985) Shortening velocity in single fibres from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J Biol Chem* 260:9077–9080
- Roy RR, Bodine-Fowler SC, Kim J, Haque N, De Leon D, Rudolph W, Edgerton VR (1991) Architectural and fibre type distribution properties of selected rhesus leg muscles: feasibility of multiple independent biopsies. *Acta Anat* 140:350–356
- Ruff RL, Whittlesey D (1991) Ca^{2+} , Sr^{2+} -tension relationships and contraction velocities of human muscle fibres. *Muscle Nerve* 14:1219–1226
- Schachat FH, Diamond MS, Brandt PW (1987) Effect of different troponin T-tropomyosin combinations on this filament activation. *J Mol Biol* 198:551–554
- Stephenson DG, Forrest QG (1980) Different isometric force- $[\text{Ca}^{2+}]$ relationships in slow and fast twitch skinned muscle fibres of the rat. *Biochim Biophys Acta* 589:358–362
- Stevens L, Mounier Y (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:R770–R776
- Sweeney HL, Kushmerick MJ, Mabuchi K, Sreter FA, Gergely J (1988) Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlated with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibres. *J Biol Chem* 263:9034–9039
- Takagi A (1984) Studies of single muscles fibres in Duchenne muscular dystrophy. *Ital J Neurol Sci Suppl* 3:57–62
- Takagi A, Endo M (1977) Guinea pig soleus and extensor digitorum longus: a study of single-skinned fibres. *Exp Neurol* 55:95–101
- Wada M, Katsuka 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
- Wilson GJ, Stephenson DG (1990) Calcium and strontium activation characteristics of skeletal muscle fibres from the small marsupial *Sminthopsis macroura*. *J Muscle Res Cell Motil* 10:12–24

Contractile properties and myosin heavy chain composition of newborn rat soleus muscles at different stages of postnatal development

F. PICQUET^{1*}, L. STEVENS¹, G. S. BUTLER-BROWNE² and Y. MOUNIER¹

¹Laboratoire de Physiologie des Structures Contractiles, Université des Sciences et Technologies de Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex and ²Faculté de Médecine, UFR Bio-médicale, 45 rue des Sts-Pères, 75006 Paris, France

Received 2 January 1996; revised 3 September 1996; accepted 9 September 1996

Summary

This study was undertaken with the aim to correlate some of the functional characteristics with the myofibrillar composition in myosin heavy chain isoforms on newborn and adult rat soleus muscles. The following postnatal ages were chosen in order to determine the role of innervation in the establishment of the mature muscle phenotype: before (postnatal day 6), when (postnatal day 12), and after (days 17 and 23) the monosynaptic innervation appeared. The steady state of definitive innervation was controlled on adult muscles (i.e. ~13 weeks). Muscle maturation was followed by ATPase staining and fibre diversity was observed at postnatal day 12. The functional properties of skinned bundles isolated from newborn rats were determined by Calcium/Strontium activation characteristics (Tension/pCa and pSr relationships). From postnatal days 6 to 17, the soleus bundles exhibited Calcium/Strontium activation characteristics intermediate between slow and fast fibre populations previously described in muscles. At day 23, the Calcium/Strontium activation characteristics of the soleus were closer to those of a slow type. Moreover, we observed a decrease in Ca affinity concomitant with the installation of the monosynaptic innervation, and an increase of the slow type I during postnatal development. Finally, this work reported a greater correlation between the Calcium/Strontium activation parameters and the myosin heavy chain isoform composition at the postnatal days when the mature monosynaptic innervation pattern occurred.

Introduction

Several important changes occur during the first weeks of postnatal life in the mammalian neuromuscular system. For example, it is now well known that in the soleus which is a slow muscle, there is a gradual regression of the polyinnervation so that by day 12 all fibres receive a monosynaptic innervation (Condon *et al.*, 1989). This situation has also been described by Thompson and colleagues (1984), who identified by ATPase staining the fibre types innervated by single motor neurons in the rat soleus muscle at 8 and 16 days after birth. They concluded that at 8 days after birth soleus muscles are polyneuronally innervated, whereas at 16 days the polyneuronal innervation has been eliminated: the innervation becomes monosynaptic during this period of development. It has been reported that the rat soleus muscle was gradually transformed during the

postnatal development from a muscle containing equal proportions of slow type I and fast type II fibres to a muscle predominantly composed of type I fibres (Kugelberg, 1976; Condon *et al.*, 1989).

There is much evidence to show that the characteristic properties of skeletal muscle fibres are determined by the activity pattern imposed upon them by their motoneurons (Pette & Vrbova, 1985). In particular, the type of innervation that the muscle fibre receives will determine its myosin content. It is also well demonstrated that physical activity (Leferovich *et al.*, 1991; Goldspink *et al.*, 1992) or immobilisation (Goldspink and Williams, 1989) influence the myosin phenotypic expression. During development, marked transitions in the myosin content have been reported in rat and rabbit fast- and slow-twitch muscles (Swynghedaw, 1986). Different combinations of four known Myosin Heavy Chains (MyHC) (embryonic, neonatal, slow and fast) can be found in the soleus fibres

*To whom correspondence should be addressed.

pending on the stage of development (Butler-owne & Whalen, 1984; Nurusawa *et al.*, 1987; Albis *et al.*, 1989), while it is not the case for the yosin Light Chains (MyLC) which never exhibit the neonatal form (Whalen *et al.*, 1981).

It has been reported that the regulatory proteins do not express the same profile of isoform expression during postnatal development (Leeuw *et al.*, 1994). No developmental isoforms have been detected for Troponin C, which was found to vary in the relative proportion of the slow and fast isoforms both during development and according to the type of innervation. Many different Troponin T isoforms have been shown to be expressed during postnatal development but do not seem to be under neural influence. Finally, no developmental isoform and no neural influence were reported for Troponin I.

Therefore, since MyHC expression differs depending both on the developmental stage and the type of innervation, the analysis of MyHC transitions seemed to be the best marker for studying postnatal muscle properties. Moreover, the differences in MyHC composition are known to influence the contractile properties of slow and fast muscle fibres. The myosin filament has been reported to be implicated in the Ca^{2+} activation process and, in particular, to have a possible role on the parameters of the Tension/pCa relationship (Greaser *et al.*, 1988; Hofmann *et al.*, 1990; Cordonnier *et al.*, 1995).

During the last 10 years, many studies have been carried out on bundles or isolated skinned fibres in an attempt to correlate structural and functional properties but few of these have looked at developing muscle. Thus, the aim of this study was to examine some of these functional characteristics (Calcium and Strontium activation) in relation with the MyHC composition in newborn and adult rat soleus fibres.

The following postnatal ages were chosen in order to analyse the role of innervation in the determination of soleus characteristics: before the appearance of a monosynaptic innervation (6 days postnatal, Condon *et al.*, 1989), at the moment when innervation appears (12 days postnatal, Westerga & Grambergen, 1994), after the appearance of the final pattern of innervation (17 and 23 days, Condon *et al.*, 1989) and at a steady state of innervation (i.e. adult age ~13 weeks).

Our results indicate that significant changes occur in both functional and structural properties from postnatal day 12 i.e. when the definitive innervation was established. Moreover a greater correlation between functional properties (particularly relative Calcium/Strontium (Ca/Sr) affinity) and MyHC composition at the postnatal days was evidenced when the mature pattern of innervation had been established.

Materials and methods

Animals and samples

Male Sprague Dawley rats aged 6, 12, 17, 23 and 91 days (five animals per age) were used for this study. The soleus of each hindlimb was dissected out from anaesthetized rats (ethylcarbamate, 1.60 mg g^{-1}). For each age, the two soleus muscles of each rat were randomly distributed into two groups: one group ($n = 5$ muscles/age) on which ATPase staining or immunohistochemistry was performed and a second group ($n = 5$ muscles/age) that was examined for contractile and electrophoretic properties.

These investigations were approved both by the Ministry of Agricultural and Forestry and the Ministry of Education (Veterinary service for health and animal protection; authorization 03805).

Preparation of muscle fibres and bundles

All the soleus muscles examined for contractile properties were skinned by exposure to an EGTA skinning solution for 24 h prior to storage at -20°C in a 50% glycerol skinning solution (vol/vol), i.e. storage solution (Mounier *et al.*, 1989). This procedure allowed us to apply activating solutions of various calcium concentrations (pCa; $pCa = -\log[Ca^{2+}]$) directly to the contractile system. A protease inhibitor, leupeptin, was added to the storage solution ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Since, it has been established by Reiser and colleagues (1988) that addition to leupeptin, especially in newborn rats, prevented a decrease in tension.

For adult muscles (91 days), experiments were performed on single skinned fibres. However, for newborn muscles i.e. 6, 12, 17 and 23 days old, small bundles of fibres were used. The average diameter of these bundles was about $65 \mu\text{m}$, i.e., the diameter of one single adult fibre. Before each experiment, bundles or fibres were bathed for 20 min in a 2% detergent solution (Brij 58). This solution is known to eliminate irreversibly the function of the sarcoplasmic reticulum leaving the contractile system intact (Orentlicher *et al.*, 1974).

Apparatus

The apparatus has already been described in detail in our previous studies (Mounier *et al.*, 1989). Briefly, on the day of an experiment, an individual skinned fibre or bundle was transferred into the experimental chamber containing a relaxing solution (also called R, see: Solutions). A segment, about 2–2.5 mm long, was mounted between a pair of fixed forceps and a force transducer (Kulite, BG 10, sensitivity 10 V/g). The mounted fibre or bundle was viewed through a high magnifying binocular ($\times 80$), with a micrometer allowing diameter measurements.

Experimental procedure

While the adult fibre or newborn bundle was in the R solution, the length was adjusted to 120% of the resting length. At this length, the maximal isometric force was elicited. All the experiments were performed at 17°C (± 1). At the beginning of each experiment, a maximal tension (P_0) was induced by the application of pCa 4.2 solution, a calcium concentration large enough to saturate all the

binding sites of troponin C (TnC). Tension/pCa and tension/pSr relationships (T/pCa and T/pSr) were established as described previously (Stevens *et al.*, 1993). Briefly, each amplitude of tension (P) obtained in solutions of various pCa values was normalized to P_0 . The ratio P/P_0 was related to the pCa. The same procedure was performed to obtain the Sr activation properties (T/pSr), except that the fibre was maximally activated in pSr 3.4 solution.

Physiological identification of different bundle or fibre types

The criterion for fibre identification described by Fink and colleagues (1986) has been used in our previous studies (Stevens *et al.*, 1993). This criterion was based on the difference of Ca and Sr activation characteristics between slow and fast fibres. It is generally admitted that fast fibres are less sensitive to Sr than slow fibres. From the T/pCa and T/pSr relationships, several parameters can be derived, and particularly pCa_{50} and pSr_{50} . This value represents the pCa (pSr) necessary to develop 50% of the maximum Ca (Sr) activated tension response. pCa_{50} and pSr_{50} are indicators of the affinity of the contractile apparatus for Ca and Sr, respectively. The difference ($pCa_{50} - pSr_{50}$) or Δ criterion was used to reflect the relative affinity of a fibre to Ca and Sr. According to the statistical test of normality (anamorphosis law) of the Δ criterion values determined for the adult fibres studied ($n = 20$), two populations of fibres could be identified: one showing a Δ value of no more than 0.7 was identified as being slow, a second one exhibiting a Δ value greater than 1 was identified as being fast. Another parameter could be derived from the T/pCa relationship: the steepness of the curve indicated by the Hill coefficient (n_H). This Hill coefficient (n in the equation) was calculated according to the following equation (Brandt *et al.*, 1982); $P/P_0 = ([Ca^{2+}]/K)^n / [1 + ([Ca^{2+}]/K)^n]$ where P/P_0 is the normalized tension and K is the apparent dissociation constant ($pK = -\log K = pCa_{50}$). It was established that the fast type fibre could be distinguished from the slow type by a steeper T/pCa curve (higher n_H value). All the parameters derived from T/pCa and T/pSr relationships were also used in the characterization of the bundle types.

Solutions

The composition of all the solutions was calculated by the computer program of Fabiato (1988) with the stability constants listed by Orentlicher and colleagues (1977) for Ca and by Moisesescu and Thieleczek (1979) for Sr. The pH was adjusted at 7.00 ± 0.02 , and the final ionic strength fixed at 200 mM. The skinning solution was made up of ATP (2.5 mM), 3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid (MOPS, 20 mM), potassium propionate (170 mM), magnesium acetate (2.5 mM), and K_2EGTA (5 mM). The following solutions were used for the experimental procedure: a washing solution, also called W, composed of ATP (2.5 mM), MOPS (20 mM), potassium propionate (185 mM), and magnesium acetate (2.5 mM); a relaxing solution (R), similar to the skinning solution; pCa (pSr) activating solutions consisting of W + various concentrations of Ca (or Sr), from $CaCO_3$ and $SrCl_2$ respectively, buffered with EGTA, and added in

various proportions to obtain the different pCa (pSr) values. The Brij solution was composed to R solution +2% Brij 58.

Determination of myosin heavy chain isoform composition

After physiological measurements, both fibres and bundles were analysed by electrophoresis. The MyHC composition was determined using vertical sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with a 6% polyacrylamide concentration (Carraro & Catani, 1983; Danielli-Betto *et al.*, 1986). After the gel run, the gel slabs were silver stained according to the procedure of Giulian and colleagues (1983). A laser scanning densitometer (Quantiscan, Microvial systems, Biosoft, U.K.) was used to determine the relative proportion of the different types of MyHC isoforms in each fibre or bundle.

ATPase staining

Muscle maturation was followed by ATPase staining. At each age, one soleus of each rat was removed, mounted in embedding medium (TEK ACT Compound), frozen in isopentane precooled to its freezing point by liquid nitrogen, and stored at $-80^\circ C$ until analysis. Serial transverse sections (10 μm thick) were cut from the widest portion of the muscle belly on a microtome at $-30^\circ C$ and stained for myofibrillar adenosine triphosphatase (ATPase) activity, using the method of Brooke and Kaiser (1970) with acid (pH 4.3, 4.4) and alkali (pH 9.4) preincubations.

This histochemical method allows the characterization of the two major types of soleus fibres, type I (slow) and IIA (fast) as well as the intermediate type (type IIC). The soleus composition was expressed as the percentage of each fibre type in an examined section.

Immunohistochemistry

The expression of developmental MyHC on our postnatal muscle samples was verified by immunostaining. Two primary antibodies were used. NCL MHCd (Tebu/Novocastra), a preparation of mouse immunoglobulin G1, which recognizes embryonic MyHC in rat foetus and neonatal MyHC at postnatal days Davis *et al.*, 1991). The second antibody was 2 B6 which recognizes specifically embryonic MyHC (Gambke & Rubinstein, 1984), provided by G. S. Butler-Browne. Briefly, serial sections were incubated in goat serum in phosphate buffered serum (PBS) for 20 min. The primary antibody, 1/50 diluted, was applied to sections for 60 min in a humid chamber at $37^\circ C$. Slides were then washed in PBS (3×5 min) and reacted with a peroxidase conjugated antimouse immunoglobulin labelled secondary antibody (Vectastain ABC kit, Biosys SA) during 30 min at room temperature. The reaction was revealed using diaminobenzidine (DAB). The positive reaction of the antibody was controlled on foetus from rat hindlimb muscles at gestational day 18. At postnatal stages from 6 to 23 days, the reaction of 2 B6 antibody was negative whereas that using NCL MHCd antibody was positive (data not illustrated). This indicated that at these postnatal days, embryonic MyHC was no more expressed while MyHC neo was present.

tistical analysis

er one way analysis of variance, Student's *t*-test was used to establish the intergroup comparison. Differences were considered significant at $p < 0.05$. All the results are expressed as mean \pm SE.

sults

stochemical data

ie per cent distribution of soleus fibre types, determined using ATPase staining, is shown in Table 1. Between postnatal days 6–23 there was a progressive change in fibre type composition in the soleus muscle. At postnatal day 6, all the soleus fibres belonged to the intermediate type IIC and were considered to be undifferentiated. At day 12, about 52% of the soleus fibres were type I, and 48% were type IIC fibres. From postnatal day 12 to 23, we observed a gradual increase in the number of type I fibres and a decrease in the percentage of type IIC fibres. The first type IIA fibres became detectable at day 17 (2.40%). At day 23, the same proportion of type IIA fibre was found while it increased up to

21.5% in the adult muscle. At each age examined, no type IIB fibres were found.

Ca and Sr activation characteristics

The Ca and Sr activation characteristics were determined for all the bundles and fibres studied. The results are summarized in Table 2 and illustrated in Figs 1 and 2.

According to the distribution histogram of Δ criterion (i.e. difference between pCa_{50} and pSr_{50}), two populations of fibres were identified in the adult soleus muscle (Fig. 1A). A large majority (75%) of the 20 fibres studied were identified as being of the slow type since the mean Δ value was equal to 0.32 ± 0.05 (Table 2). The remaining population of fibres (25%) having a Δ value of 1.22 ± 0.02 was characterized as fast.

In the newborn bundles, from postnatal day 6 to 23, the Δ values were intermediate, i.e. located between those of adult slow and fast fibres (Fig. 1B). At these ages, the Δ values do not allow one to distinguish different populations. However, at postnatal day 23, bundles exhibited a larger range of Δ distributions evolving toward values of a slow type.

Table 1. Evolution of the fibre type distribution in the soleus muscle determined by ATPase staining

Developmental stages	No. muscles	Type I (%)	Type IIC (%)	Type IIA (%)
Newborn				
Postnatal day 6	5	–	100.00 \pm 0.00	–
Postnatal day 12	5	51.80 \pm 1.13	48.20 \pm 1.13 ^a	–
Postnatal day 17	5	55.90 \pm 1.91	41.60 \pm 1.59 ^a	2.40 \pm 1.41
Postnatal day 23	5	63.41 \pm 1.42 ^{bc}	34.20 \pm 1.58 ^{ac}	2.40 \pm 0.90
Adult	5	72.00 \pm 2.09 ^{bcd}	6.50 \pm 0.96 ^{abcd}	21.50 \pm 2.41 ^{cd}

Results are means \pm SE. Results are significantly different at $p < 0.05$. ^aindicates statistical difference with postnatal day 6 group; ^bwith postnatal day 12 group; ^cwith postnatal day 17 group; ^dwith postnatal day 23 group.

Table 2. Ca and Sr activation characteristics of newborn soleus bundles and adult soleus fibres

Developmental stages	pCa_{50}	$\Delta(pCa_{50} - pSr_{50})$	n_H
Newborn			
Postnatal day 6 (20)	5.90 \pm 0.03	0.62 \pm 0.03	3.28 \pm 0.31
Postnatal day 12 (30)	5.80 \pm 0.02 ^a	0.60 \pm 0.03	3.40 \pm 0.24
Postnatal day 17 (20)	5.77 \pm 0.03 ^a	0.57 \pm 0.03	2.32 \pm 0.13 ^{ab}
Postnatal day 23 (20)	5.79 \pm 0.03 ^a	0.47 \pm 0.06 ^{abc}	2.59 \pm 0.16 ^{ab}
Adult			
Slow Fibres (15)	5.70 \pm 0.03	0.32 \pm 0.05	2.08 \pm 0.18
Fast Fibres (5)	5.63 \pm 0.04	1.22 \pm 0.02 ^d	3.80 \pm 0.50 ^d

Results are means \pm SE, the number of bundles or fibres being given in parentheses. Results are significantly different at $p < 0.05$. ^aindicates statistical difference with postnatal day 6 group; ^bwith postnatal day 12 group; ^cwith postnatal day 17 group; ^dwith slow fibres from adult.

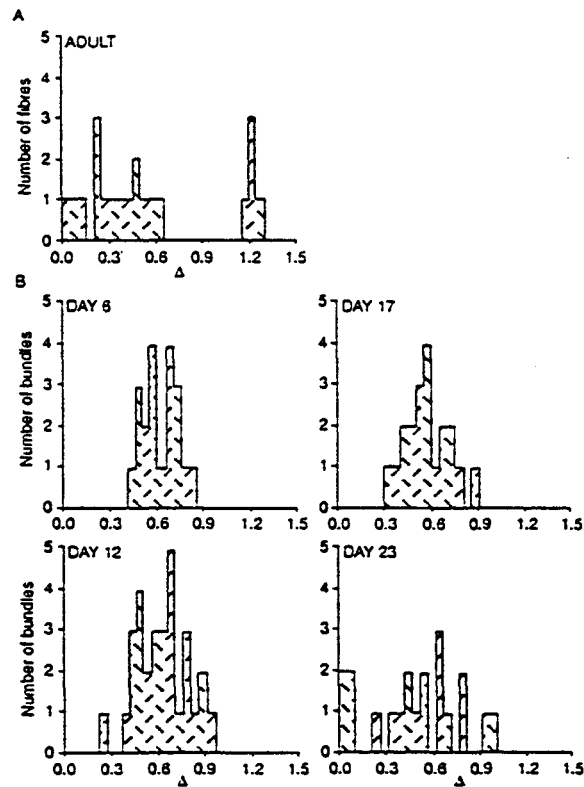


fig. 1. Distribution of Δ values (pCa₅₀-pSr₅₀) of soleus adult fibres (A) and soleus newborn bundles (B).

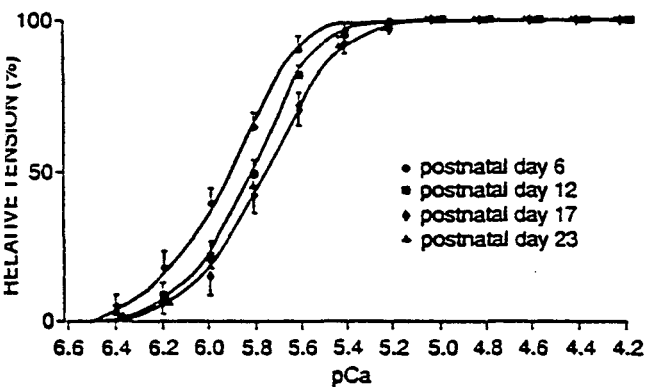


Fig. 2. T/pCa curves from newborn rat soleus. Each experimental data point represents means \pm SE. The number of bundles and T/pCa parameters are indicated in Table 2. The curves are fitted to the Hill equation. SE have not been reported when they merged with the data point.

The T/pCa relationships are illustrated in Fig. 2 and the Ca activation parameters are shown in Table 2. The T/pSr relationships, not represented here, were principally used for the fibre or bundle type identification (determination of Δ value). We observed a significant decrease in pCa₅₀ values (shift to the right of the T/pCa curve) between day 6 and 12. From day 12 to 23, the pCa₅₀ values did not

vary significantly. However, at postnatal day 23 the Δ value was significantly lower than that obtained for other newborn rats and was similar to that obtained for slow fibres of adult rats. At days 6 and 12, the Hill coefficient values were identical and larger than those at days 17 and 23, these latter being not significantly different from each other. For the adult soleus fibres, only the T/pCa parameters have been reported (Table 2) since the results were in complete agreement with those previously described, i.e. pCa₅₀ values not significantly different between slow and fast fibres and a higher steepness for the fast ones.

Electrophoretic and densitometric analysis

The electrophoretic analysis was performed on bundles and fibres studied for their functional properties. However, on bundles, there were fewer densitometric data than contractile property results, because some gels did not permit a correct densitometric analysis. The electrophoretic data are illustrated in Fig. 3 and the densitometric analysis is presented in Table 3. The proportions of myosin heavy chain isoforms were expressed as a relative percentage of the total amount of MyHC present in the bundles or fibres studied. Three types of MyHC could be detected in order of increasing electrophoretic mobility: fast (MyHC IIA), neonatal (MyHC neo) and slow (MyHC I) types. MyHC neo was identified by comparing its electrophoretic mobility with purified MyHC neo (Fig. 3, lanes 1 and 4). Myosin heavy chain I and IIA were identified by comparison with the migration of a mixing of different MyHC isoforms (Fig. 3, lane 7). Myosin heavy chain I and MyHC neo were detected from postnatal day 6 to 23. The densitometric data revealed that the proportion of MyHC I increased from day 6 to 17, while that of MyHC neo decreased. However, between day 17 and 23, MyHC I composition remained unchanged whereas MyHC neo continued to decrease. Myosin heavy chain IIA appeared at postnatal day 12 (Fig. 3, lanes 5 and 6) and its expression increased with age. All the adult fibres presented only one type of MyHC isoform i.e. MyHC I for slow fibres and MyHC IIA for fast fibres. Myosin heavy chain neo was never expressed in the adult fibres types.

Correlation between MyHC composition and Δ criterion

Figure 4A describes the relationship between the relative percentage of MyHC types (neo, I and IIA) and the mean Δ value established for each of the four developmental stages studied. Myosin heavy chain I expression was found to increase while Δ values decreased i.e. evolved towards a slow type. However it should be noted that from day 17 to 23, MyHC I composition remained unchanged whereas

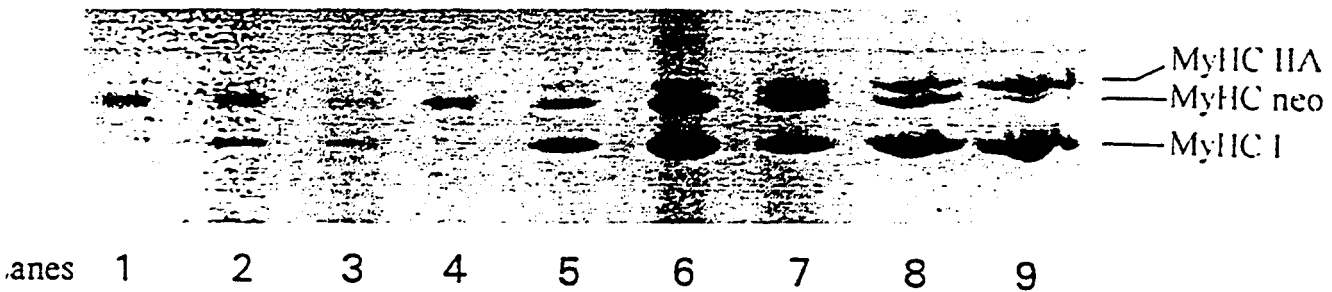


Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE) of soleus bundles. Lanes 1 and 4 are purified MyHC neo; Lanes 2 and 3, postnatal day 6 bundles; Lanes 5 and 6, postnatal day 12 (bundles); Lane 8, postnatal day 17 (bundle); Lane 9, postnatal day 23 (bundle). Lane 7 contains a mixing of purified MyHC neo, adult fast fibre and adult slow fibre.

Table 3. Densitometric analysis of MyHC isoform composition

Developmental stages	MyHC I (%)	MyHC neo (%)	MyHC IIA (%)
Newborn			
Postnatal day 6 (15)	43.20 ± 1.93	56.80 ± 1.93	-
Postnatal day 12 (14)	54.01 ± 2.63 ^a	37.06 ± 2.69 ^a	8.93 ± 1.78
Postnatal day 17 (7)	58.93 ± 0.74 ^a	23.05 ± 0.48 ^{ab}	18.02 ± 0.67 ^b
Postnatal day 23 (7)	58.54 ± 1.37 ^a	12.37 ± 2.23 ^{abc}	29.09 ± 2.53 ^{bc}
Adult			
Slow Fibres (15)	100.00 ± 0.00 ^{abcd}	-	-
Fast Fibres (5)	-	-	100.00 ± 0.00 ^{bcd}

Adult slow and fast fibres were identified by the functional Δ criterion (pCa_{50} - pSr_{50}). Results are means \pm SE, the number of bundles or fibres being given in parentheses. Results are significantly different at $p < 0.05$. ^aindicates statistical difference with postnatal day 6 group; ^bwith postnatal day 12 group; ^cwith postnatal day 17 group; ^dwith postnatal day 23 group.

continued to decrease. During postnatal development, the relative proportion of MyHC IIA increased at the expense of MyHC neo. The expression of these MyHC isoforms increased (for MyHC IIA) or decreased (for MyHC neo) gradually with Δ evolution. The table corresponding to Fig. 4B illustrates, at each postnatal age, the relationship between the percent MyHC composition and Δ values of individual bundles. The linear correlation coefficients were obtained from these relationships for each bundle. The results showed that the level of correlation depended on the postnatal age. No correlation appeared at days 6 and 12. At day 17 there was a good correlation of MyHC neo with Δ while at day 23 the better correlations of Δ with MyHC composition were established for the two predominant isoforms, I and IIA.

Discussion

Histochemistry versus electrophoresis

Based on the histochemical analysis, the differentiation of fibre types could be divided into two

essential stages. The first one corresponded to that between day 6 and 12 which was characterized by the maturation of type I fibres. At postnatal day 12, the number of type I and type IIC fibres was almost the same, as previously described by Rubinstein and Kelly (1981). In the second stage, from day 12 to 17, type IIA fibres appeared. The period between day 17 and day 91 could be characterized by transitions between the three fibre types I, IIA and IIC to obtain gradually the mature adult soleus fibre phenotype: 72% I, 21.50% IIA and 6.50% IIC. All these histochemical results are in agreement with those of Umezumi and colleagues (1992).

The correlation of these results with the electrophoretic analysis allowed one to evaluate the myosin composition (particularly in MyHC) of the different fibre types identified histochemically. According to our results and those proposed by Termin and colleagues (1989), for all ages, type I and IIA fibres contained only MyHC I and MyHC IIA, respectively. However, type IIC fibres may contain a mixing of MyHC I, MyHC IIA and MyHC neo, whose proportions vary according to age. At day 6, type IIC contained MyHC I and neo in equal proportions. From day 12 to 23, type IIC composi-

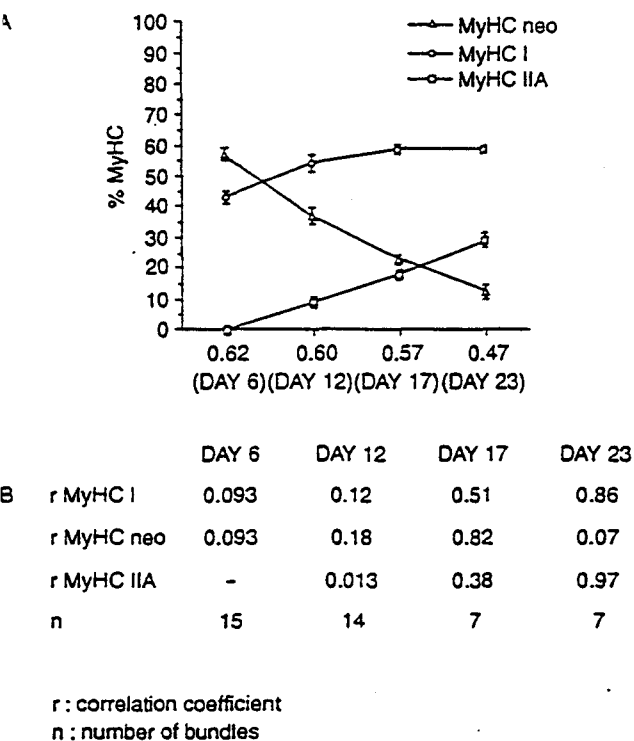


Fig. 4. Correlation between MyHC composition and Δ criterion during postnatal development. (A) Relationship between the mean percentages of MyHC (neo, I and IIA) composition and the mean Δ values at each postnatal day. The mean Δ values are reported in a decreasing order, representative of the evolution of the soleus bundles to a slow type. (B) Correlation coefficient values (r) for each type of MyHC isoform as a function of the postnatal age. r coefficients were calculated according to the regression lines established for each relationship between the percent MyHC composition and Δ values of individual bundles for 6, 12, 17 and 23 days.

tion could be the result of a coexpression of MyHC I with IIA and neo. From day 17 to 23, type IIC were mainly composed of MyHC I and IIA, since MyHC neo gradually decreased. In adult muscle, type IIC fibres usually corresponded to a coexpressed MyHC I with IIA, since MyHC neo was not detected in adult muscle. In the 20 adult fibres studied here for their functional properties, we did not observe any fibre with a mixture of MyHC I and MyHC IIA (hybrid fibres). However, in previous studies we have identified this hybrid type (Cordonnier *et al.*, 1995). The percentage of hybrid fibres, coexpressing two or more myosin heavy chains, has been reported to increase under conditions of induced fibre transformation (Maier *et al.*, 1988).

It has also been suggested that a reduction in developmental isoform expression in favour of slow or fast isoforms required the presence of innervation (Gao & Kennedy, 1992). Thus, considering our

results at postnatal day 12, the age when type IIC fibres began to decrease, this could coincide with the beginning of the appearance of a mature monosynaptic innervation.

Functional properties versus electrophoresis

To determine the bundle functional types, we used the Ca/Sr relative affinity parameter or pCa_{50} - pSr_{50} (Δ) value. For the adult soleus (data on isolated fibres), we found classical results i.e. 75% slow type fibres characterized by a low mean Δ value and 25% fast fibres (mean Δ value >1.00). The experiments on newborn rats were performed on fibre bundles and not on isolated fibres. So we cannot compare Δ values from newborn and adults. However, the data on adults permitted to obtain Δ values characteristic of typically slow and fast fibres and thus to evaluate the evolution of the functional typing during postnatal development. According to the Δ repartition histogram, we found that, at days 6, 12 and 17, the Δ values were intermediate between slow and fast types, the histograms at days 12 and 17 evolved slightly towards low Δ values. At day 23, the Δ histogram was clearly shifted to the left, showing a maturation of the soleus to a predominantly slow type muscle.

This work demonstrated that the Δ mean value, at each postnatal stage, evolved in parallel with the mean composition of each MyHC isoform type. Indeed, the increased proportion of MyHC I, concomitant with the decreased expression of MyHC neo, illustrated very well the decrease in Δ mean value, i.e. the evolution of the soleus to a slow type. However, when the Δ value was related to the type of MyHC of each bundle at a given age, no real correlations were detected before day 17. Thus, a correlation between the appearance of a given isoform and the Δ functional criterion was found once monosynaptic innervation had been established. For MyHC I and IIA, correlations with Δ appeared at day 17, and were greater at day 23, whereas for MyHC neo, the r coefficient decreased from day 17 to 23. So, the rate of correlation of each isoform was dependent on the postnatal age. This must be linked to the progressive decrease of developmental MyHC isoform (MyHC neo), concomitant with the progressive increase of adult MyHC isoforms (MyHC I and IIA) during these steps of development.

In the present study, both Ca affinity (pCa_{50}) and steepness (n_H) of the T/ pCa relationship decreased with age, and became close to those measured for adult slow fibres. Thus, these two parameters also evolved in the way of a transformation of the soleus towards a slow type. This was in good agreement with the changes in MyHC isoform profile during development. However, the evolution of pCa_{50} and

did not follow the same time course: pCa_{50} increased significantly at 12 days postnatal whereas pCa_{50} began to decrease at day 17 i.e. when the installation of the definitive innervation was already achieved. Thus, the steepness (n_H) value, as compared to pCa_{50} values, did not seem to be directly dependent on the muscle innervation state. Here, we chose to focus on the MyHC isoforms but it is known that the properties of the T/pCa relationship are also strongly governed by the thin filament regulatory complexes (Troponin-Tn: TnT, TnC and Tropomyosin-Tm: Tm subunits). The termination of Ca affinity parameter was generally related to the expression of TnC isoforms (Moss *et al.*, 1986). According to Schachat and colleagues (1987), the steepness of the T/pCa curve, which indicated the degree of cooperativity between the regulatory proteins along the thin filament, was better represented by variations in Tm-TnT complexes. It has been found by Leeuw and colleagues (1994), on soleus muscle after denervation, that TnC characteristics during postnatal development were strongly nerve dependent whereas the Tm-TnT complex was described to be only partially dependent on the nervous system. Thus, in agreement with these authors, we suggested that the differential evolution during development of pCa_{50} and n_H parameters as a function of the innervation state, could also be linked to TnC and Tm-TnT isoform expressions, respectively.

Conclusion

This study has contributed to establish the evolution of the contractile properties of newborn soleus muscles during the first weeks of development in relation to histochemical and myosin isoform changes. We suggested that the appearance of the mature monosynaptic innervation (at postnatal day 15) produced a loss of Ca affinity, related to the appearance of a diversity in fibre types.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Centre National d'Etudes Spatiales (agreement no. 95323, 1985).

References

- LANDT, P. W., COX, R. N., KAWAI, M. & ROBINSON, T. (1982) Effect of cross-bridge kinetics on apparent Ca^{2+} sensitivity. *J. Gen. Physiol.* **79**, 997-1016.
- LOOKE, M. H. & KAISER, K. K. (1970) Muscle fiber types: how many and what kind? *Arch. Neurol.* **23**, 369-79.
- MILLER-BROWNE, G. S. & WHALEN, R. G. (1984) Myosin isozyme transitions occurring during the postnatal development of the rat soleus muscle. *Dev. Biol.* **102**, 324-34.
- CARRARO, U. & CATANI, C. (1983) A sensitive SDS-PAGE method separating myosin heavy chain isoforms of rat skeletal muscle reveals the heterogeneous nature of the embryonic myosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 793-802.
- CONDON, K. W., SOILEAU, L. C., SILBERSTEIN, L., BLAU, H. M. & THOMPSON, W. J. (1989) Development and innervation of muscle fiber types in the rat hindlimb. In *The Assembly of the Nervous System* (edited by LANDMESSER, L.) pp. 51-63. New-York: A. R. Liss.
- CORDONNIER, C., STEVENS, L., PICQUET, F. & MOUNIER, Y. (1995) Structure-function relationship of soleus muscle fibers from the rhesus monkey. *Pflügers Arch.* **430**, 19-25.
- D'ALBIS, A., COUTEAUX, R., JANMOT, C. & ROULET, A. (1989) Specific programs of myosin expression in the postnatal development of rat muscles. *Eur. J. Biochem.* **183**, 583-90.
- DANIELI-BETTO, D., ZERBATO, E. & BETTO, R. (1986) Type 1, 2A and 2B myosin heavy chain electrophoretic analysis of rat muscle fibres. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **138**, 981-7.
- DAVIS, C., HARRIS, J. & NICHOLSON, L. (1991) Myosin isoform transitions and physiological properties of regenerated and re-innervated soleus muscles of the rat. *Neuromusc. Disorders* **1**, 411-21.
- FABIATO, A. (1988) Computer programs for calculating total 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.* **373**, 513-25.
- GAMBKE, B. & RUBINSTEIN, N. A. (1984) A monoclonal antibody to the embryonic Myosin Heavy Chain of rat skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **259**, 12092-100.
- GAO, L. & KENNEDY, J. M. (1992) Repression of the embryonic myosin heavy chain phenotype in regenerating chicken slow muscle is dependent on innervation. *Muscle Nerve* **46**, 554-65.
- GIULIAN, G. G., MOSS, R. L. & GREASER, M. L. (1983) Improved methodology for analysis and quantification of proteins on one dimensional silver stained slab gels. *Anal. Biochem.* **129**, 277-87.
- GOLDSPINK, G. & WILLIAMS, P. E. (1989) The effect of immobilisation on gene expression and postnatal determination of muscle fibre type in the mouse soleus muscle. *J. Physiol.* **415**, 52 P.
- GOLDSPINK, G., SCUTT, A., LOUGHNA, P. T., WELLS, D. J., JAENICKE, T. & GERLACH, G. F. (1992) Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am. J. Physiol.* **262**, R 356-63.
- 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.* **406**, 85-98.
- HOFMANN, P. A., METZGER, J. M., GREASER, M. K. & MOSS, R. L. (1990) Effects of partial extraction of light

- chain 2 on the Ca^{2+} sensitivities of isometric tension, stiffness, and velocity of shortening in skinned skeletal muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* 95, 477-98.
- MUGELBERG, E. (1976) Adaptative transformation of rat soleus motor units during growth. *J. Neurol. Sci.* 27, 269-89.
- DEEUW, T., KAPP, M. & PETTE, D. (1994) Role of innervation for development and maintenance of troponin subunit isoform patterns in fast- and slow-twitch muscles of the rabbit. *Differentiation* 55, 193-201.
- MEFEROVICH, J. M., RUBINSTEIN, N. A. & KELLY, A. M. (1991) Expression of fast and slow myosin heavy chains in overloaded muscles of the developing rat. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 8, 247-52.
- MAIER, A., GORZA, L., SCHIAFFINO, S. & PETE, D. (1988) A combined histochemical and immunohistochemical study on the dynamics of fast to slow fibre transformation in chronically stimulated rabbit muscle. *Cell Tissue Res.* 254, 59-68.
- MOISESCU, D. G. & THIELECZEK, R. (1979) Sarcomere length effects of the Sr^{2+} and Ca^{2+} activation curves in skinned frog muscle fibres. *Biochem. Biophys. Acta* 546, 64-76.
- MOSS, R. L., LAUER, M. R., GIULIAN, G. G. & GREASER, M. K. (1986) Altered dependence of tension development in skinned skeletal muscle fibers following modification of troponin by substitution with cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.* 261, 6096-9.
- MOUNIER, Y., HOLY, X. & STEVENS, L. (1989) Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflügers Arch.* 415, 136-41.
- NARUSAWA, M., FITZSIMONS, R. B., IZUMO, S., NADALGINARD, B., RUBINSTEIN, N. A. & KELLY, A. M. (1987) Slow myosin in developing rat skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 104, 447-59.
- DRENTLICHER, M., REUBEN, J. P., GRUNDFEST, H. & BRANDT, P. W. (1974) Calcium binding and tension development in detergent-treated muscle fibres. *J. Gen. Physiol.* 63, 168-86.
- DRENTLICHER, M., BRANDT, P. W. & REUBEN, J. P. (1977) Regulation of tension in skinned muscle fibres: effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.* 233, 127-34.
- PETTE, D. & VRBOVA, G. (1985) Invited review: Neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle & Nerve* 8, 676-89.
- REISER, P. J., KASPER, C. E., GREASER, M. L. & MOSS, R. L. (1988) Functional significance of myosin transitions in single fibers of developing soleus muscle. *Am. J. Physiol.* 254, C605-13.
- RUBINSTEIN, N. A. & KELLY, A. M. (1981) Myogenic and neurogenic contributions to the development of fast and slow twitch muscles in rat. *Dev. Biol.* 62, 473-85.
- 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, 551-4.
- STEVENS, L., MOUNIER, Y. & HOLY, X. (1993) Functional adaptation of different rat skeletal muscle to weightlessness. *Am. J. Physiol.* 264, R770-6.
- SWYNGHEDAW, B. (1986) Developmental and functional adaptation of contractile proteins in cardiac and skeletal muscles. *Physiol. Rev.* 66, 710-71.
- TERMIN, A., STARON, R. S. & PETTE, D. (1989) Myosin heavy chain isoforms in histochemically defined fiber types of rat muscle. *Histochem.* 92, 453-7.
- THOMPSON, W. J., SUTTON, L. A. & RILEY, D. A. (1984) Fibre type composition of single motor units during synapse elimination in neonatal rat soleus muscle. *Nature* 309, 709-11.
- UMEZU, Y., HACHISUKA, K., UEDA, H., YOSHIZUKA, M., OGATA, H. & FUJIMOTO, S. (1992) Histochemical and immunological analyses of differentiating skeletal muscle fibers of the postnatal rat. *Acta Anat.* 143, 1-6.
- WESTERGA, J. & GRAMSBERGEN, A. (1994) Development of the EMG of the soleus muscle in the rat. *Dev. Brain Res.* 80, 233-43.
- WHALEN, R. G., SELL, S. M., BUTLER-BROWNE, G. S., SCHWARTZ, K., BOUVERET, P. & PINSET-HARETROM, I. (1981) Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature* 292, 805-9.