

Université des Sciences et Technologies de LILLE I

THESE

présentée par

Thierry TOURSEL

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de LILLE I

en "Sciences de la Vie et de la Santé"



PLASTICITE DES CARACTERISTIQUES CONTRACTILES ET ELASTIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES LORS DE DYSFONCTIONNEMENTS NEUROMUSCULAIRES

Soutenu le 14 décembre 1999 devant le jury composé de :

Professeur A. FERRY, Université de Paris V	Rapporteur
Professeur F. GOUBEL, Université de Compiègne	Rapporteur
Docteur A. GÜELL, Responsable des Programmes Sciences de la Vie, CNES	Examineur
Professeur Y. MOUNIER, Université de Lille I	Directeur de thèse
Professeur D. PETTE, Université de Constance (Allemagne)	Examineur
Docteur L. STEVENS, Université de Lille I	Examineur
Professeur P. VERMERSCH, Université de Lille II	Examineur

Travail réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I.

A mes parents

A France et Corentin

A ma famille

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Plasticité Neuromusculaire (Université des Sciences et Technologies de Lille I) dirigé par Madame le professeur Y. MOUNIER à qui j'exprime toute mon estime.

Je vous remercie de m'avoir intégré dans votre équipe et de la confiance que vous m'avez témoignée au cours de ces années. Trouvez dans ce travail l'expression de ma reconnaissance.

A Monsieur le professeur A. FERRY

Votre venue en tant que rapporteur de cette thèse me fait extrêmement plaisir. Veuillez croire en l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le professeur F. GOUBEL

Vous m'avez fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt que vous portez à cette thèse et soyez assuré de ma profonde reconnaissance pour les précieux conseils que vous m'avez prodigués.

A Monsieur le docteur A GÜELL

Je tiens à vous exprimer toute ma reconnaissance pour avoir accepté d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Monsieur le Professeur D. PETTE

Malgré vos nombreuses obligations vous me faites l'honneur d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

A Mademoiselle le Docteur L. STEVENS

Je tiens à vous exprimer toute ma gratitude pour votre encadrement scientifique et votre disponibilité au cours de ces années. Vous me faites l'honneur d'être présente en tant qu'examinatrice de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur P. VERMERSCH

Vous me faites l'honneur d'être présent en tant qu'examinateur de cette thèse. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier tout particulièrement

Madame le Professeur G. LENSEL-CORBEIL pour sa disponibilité et ses précieux conseils face aux différents problèmes scientifiques rencontrés pendant ce travail.

L'ensemble des chercheurs et doctorants du laboratoire pour leur soutien moral, leurs conseils, leur bonne humeur et leur humour à toute épreuve.

Michèle MAYER pour avoir assuré la frappe de ce mémoire avec beaucoup de gentillesse.

Tous les membres de l'équipe technique pour leur aide.

J'adresse mes sincères remerciements au Centre National d'Etudes Spatiales et au Conseil Régional Nord Pas-de-Calais qui m'ont apporté un soutien financier pendant ces années de thèse.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES DE BASE

I - STRUCTURE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE	17
<u>A - ORGANISATION GENERALE</u>	17
<u>B - ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE</u>	18
<u>C - ULTRASTRUCTURE DES MYOFIBRILLES</u>	18
<u>D - ULTRASTRUCTURE DES MYOFILAMENTS</u>	22
1 - Le filament épais de myosine	22
<u>a - Structure</u>	22
<u>b - Diversité moléculaire</u>	25
2 - Le filament fin	26
<u>a - L'actine</u>	26
<u>b - La tropomyosine</u>	26
<u>c - Le complexe des troponines</u>	29
<i>i) la troponine T (TnT)</i>	29
<i>ii) la troponine C (TnC)</i>	31
<i>iii) la troponine I (TnI)</i>	34
3 - Association préférentielle de certaines protéines contractiles et régulatrices	34
4 - Le filament de titine (connectine)	36
<u>a - Historique</u>	36
<u>b - Structure</u>	36
<u>c - Expression différentielle dans les muscles cardiaques et squelettiques</u>	39
<u>d - Rôle structural de la titine</u>	42

II - PROPRIETES MECANQUES DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE	43
<u>A - LA CONTRACTION MUSCULAIRE</u>	45
<u>B - VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT (V_0)</u>	49
<u>C - ELASTICITE INSTANTANEE. PROPRIETES ELASTIQUES DE LA CES</u>	51
<u>D - ELASTICITE PASSIVE. PROPRIETES ELASTIQUES DE LA TITINE</u>	55
1 - Mise en évidence des propriétés élastiques de la titine	55
2 - Etirement de la molécule de titine et relation Tension passive/longueur de sarcomère	57
3 - Tension passive et isoformes de titine	61
III - PLASTICITE MUSCULAIRE ET CHAINES LOURDES DE MYOSINE	62
<u>A - MICROGRAVITE REELLE OU SIMULEE</u>	62
<u>B - TENOTOMIE ET IMMOBILISATION EN POSITION RACCOURCIE</u>	65
<u>C - DENERVATION</u>	66
<u>D - SUPPRESSION PHARMACOLOGIQUE DU MESSAGE NERVEUX</u>	68
<u>E - SECTION ET ISOLEMENT DE LA MOELLE EPINIÈRE</u>	69

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE	73
<u>A - MODELE D'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE</u>	73
1 - Animaux	73
2 - Muscles étudiés	73
<u>B - MODELE DE DEGENERESCENCE DU MOTONEURONE</u>	74
1 - Animaux	74
2 - Muscles étudiés	74
<u>C - PRELEVEMENTS</u>	75
1 - Animaux suspendus	75
2 - Souris wobbler	75
<u>D - PRINCIPE DU PELAGE</u>	75
II - MESURE DES PROPRIETES CONTRACTILES ET ELASTIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES	76
<u>A - ISOLEMENT ET MONTAGE</u>	76
<u>B - MESURE DE LA TENSION ISOMETRIQUE</u>	78
<u>C - MESURE DE LA VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT (V_0)</u>	83
<u>D - RELATIONS Tension/détente</u>	86
<u>E - ELASTICITE PASSIVE</u>	88
<u>F - DEPOLYMERISATION DU FILAMENT EPAIS DE MYOSINE</u>	90

III - TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES	91
<u>A - DISSOLUTION DES ECHANTILLONS</u>	91
<u>B - SEPARATION DES ISOFORMES DES CHAINES LOURDES DE MYOSINE (MHC)</u>	92
<u>C - SEPARATION DES ISOFORMES DES CHAINES LEGERES DE MYOSINE (MLC) ET DES ISOFORMES DE TROPONINE C (TnC)</u>	92
<u>D - SEPARATION DES ISOFORMES DE TITINE</u>	93
<u>E - COLORATION DES GELS</u>	93
<u>F - IMMUNOBLOTS</u>	94
IV – SOLUTIONS	95
V - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	96

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

Etude des propriétés contractiles et élastiques de fibres musculaires de soleus de rat après une période d'hypodynamie-hypokinésie.

I - MISE EN EVIDENCE DES TRANSFORMATIONS DU MUSCLE SOLEUS EN CONDITIONS D'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE	98
II - ATROPHIE MUSCULAIRE	101
<u>A - EVOLUTION DU POIDS DES SOLEUS</u>	101
<u>B - DIAMETRE DES FIBRES ET TENSIONS MAXIMALES</u>	104

III - PROPRIETES CONTRACTILES ET ELASTIQUES DE FIBRES MUSCULAIRES SOUMISES A UNE ACTIVATION CALCIQUE	104
<u>A - CARACTERISATION ELECTROPHORETIQUE DES FIBRES</u>	104
<u>B - RELATIONS Tension/pCa ET Tension/pSr</u>	108
<u>C - VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT (V_0)</u>	111
<u>D - PROPRIETES ELASTIQUES DES FIBRES ACTIVEES MAXIMALEMENT. RELATIONS Tension/détente</u>	111
IV - PROPRIETES ELASTIQUES PASSIVES	115
<u>A - COMPOSITION EN ISOFORMES DE TITINE DES MUSCLES ENTIERS</u>	115
<u>B - CARACTERISTIQUES DES FIBRES SOUMISES A CES EXPERIENCES</u>	118
<u>C - RELATIONS Tension passive/longueur de sarcomère</u>	120
<u>D - RELATIONS Tension passive/déformation</u>	128
<u>E - EXPERIENCES DE DEPOLYMERISATION</u>	131

DEUXIEME PARTIE

Etude des propriétés contractiles de fibres musculaires de souris atteintes d'une maladie dégénérative du motoneurone.

I - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES DES MUSCLES SOLEUS ET SCM DE SOURIS	137
<u>A - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES MUSCLES ENTIERS</u>	137
1 - Analyse des isoformes de MHC	140
2 - Analyse des isoformes de MLC	140
3 - Analyse des isoformes de TnC	141
<u>B - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES</u>	143

II - ATROPHIE MUSCULAIRE	145
<u>A - EVOLUTION DU DIAMETRE DES FIBRES</u>	145
<u>B - TENSIONS MAXIMALES</u>	145
III - RELATIONS Tension/pCa	147

DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

Etude des propriétés contractiles et élastiques de fibres musculaires de soleus de rat après une période d'hypodynamie-hypokinésie.

I - EVOLUTION STRUCTURALE	152
II - ATROPHIE MUSCULAIRE	154
III - PROPRIETES D'ACTIVATION CALCIQUE	155
IV - PARAMETRES CINETIQUES V_0 et τ	157
V - RELATIONS Tension/détente	159
VI - PROPRIETES ELASTIQUES PASSIVES	161
<u>A - EXPRESSION DES ISOFORMES DE TITINE</u>	162
<u>B - PROPRIETES ELASTIQUES PASSIVES</u>	163
<u>C - EFFETS DE LA DEPOLYMERISATION</u>	165

DEUXIEME PARTIE

Etude des propriétés contractiles de fibres musculaires de souris atteintes d'une maladie dégénérative du motoneurone.

I - EVOLUTION STRUCTURALE	168
II - ATROPHIE MUSCULAIRE	170
III - PROPRIETES D'ACTIVATION CALCIQUE	171

CONCLUSION GENERALE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

PUBLICATIONS

INTRODUCTION

Le muscle squelettique de mammifère est un tissu hétérogène composé d'une grande variété de fibres possédant des propriétés structurales et fonctionnelles différentes. Les propriétés contractiles du muscle résultent alors de la combinaison des propriétés individuelles et de la proportion des différents types de fibres entrant dans sa composition. De ce fait, chaque muscle est unique et cette hétérogénéité est à la base de la spécialisation d'un type de muscle pour un rôle physiologique précis.

Les fibres musculaires sont des structures dynamiques capables de modifier leur phénotype (transition type lent ↔ rapide) pour répondre à des stimuli particuliers. Elles permettent d'expliquer la capacité d'adaptation du système musculaire vis-à-vis de différents facteurs liés aux caractéristiques propres du muscle ou à son environnement. Nous étudierons plus particulièrement dans ce travail l'influence de l'activité du muscle et de l'innervation, sur les modifications des propriétés structurales et fonctionnelles de fibres de muscles squelettiques survenant au cours de dysfonctionnements entraînant une atrophie musculaire.

De nombreux travaux réalisés sur des animaux soumis à une période d'hypodynamie-hypokinésie se traduisant par une réduction de l'activité neuromusculaire, ont révélé une atrophie fonctionnelle consistant en une perte de masse et de force musculaire et se manifestant surtout sur les muscles lents à vocation posturale tels que le soleus. Cette atrophie musculaire se retrouve au niveau des fibres musculaires isolées. Il s'est également avéré que cette atrophie musculaire s'accompagnait de la transformation du soleus, muscle de phénotype initialement lent, vers un type plus rapide. On observe ainsi sur ce muscle une diminution importante du nombre de fibres de type lent au profit d'une augmentation des fibres de type rapide. Les modifications décrites jusqu'à ce jour concernent particulièrement les protéines contractiles comme la myosine.

Nous avons donc choisi d'analyser les propriétés d'activation calcique (relation Tension/pCa et vitesse maximale de raccourcissement) de fibres musculaires de soleus de rat soumis à une période d'hypodynamie-hypokinésie. L'existence de différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine dans le muscle adulte, de même que les transitions de l'expression de ces isoformes observées après suspension nous ont conduit à analyser le contenu en MHC des fibres. La contraction musculaire est, outre sous le contrôle des MHC, régulée par un ensemble de protéines dites régulatrices qui sont les chaînes légères de myosine et la troponine C. Cette dernière conditionne non seulement la position mais également la pente de la relation Tension/pCa. Il nous a paru intéressant d'examiner le

parallélisme de l'expression des MHC et de ces protéines régulatrices, en relation avec les propriétés fonctionnelles des fibres isolées de muscles soumis à des conditions d'atrophie.

La diversité des propriétés mécaniques des fibres musculaires est très documentée, mais très peu de travaux se sont intéressés à l'étude de leurs propriétés élastiques. De façon à approfondir nos connaissances dans ce domaine, nous avons donc étudié les propriétés élastiques de fibres contrôles et atrophiées soumises à une activation calcique.

Au cours de la dernière décennie, une nouvelle protéine sarcomérique, la titine ou connectine, a été décrite. Outre un rôle structural dans le maintien du filament épais au centre du sarcomère, cette protéine est douée de propriétés élastiques et est responsable de la génération de tension passive lors de l'étirement du sarcomère au repos. Par ailleurs, différents auteurs ont mis en évidence la présence d'isoformes différentes suivant le type de muscle. Ainsi, son rôle structural et physiologique important au sein du sarcomère, peut laisser penser que l'expression des isoformes de titine soit influencée au cours de dysfonctionnements musculaires, comme dans le cas de la MHC. Sur cette base, nous avons également analysé le contenu en isoformes de titine des muscles soleus et étudié les propriétés élastiques passives des fibres issues de ces muscles après suspension.

Il est bien connu que l'acquisition et le maintien des caractéristiques musculaires est sous la dépendance étroite de l'innervation. En outre, différents travaux notent 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. Une meilleure compréhension du rôle du message nerveux sur les caractéristiques de l'atrophie musculaire de non-utilisation, nous était offerte par l'analyse des transformations structurales et fonctionnelles des fibres musculaires au cours d'une atrophie développée cette fois par des animaux atteints d'une maladie neuromusculaire (souris wobbler). Les souris wobbler présentent une mutation autosomique récessive (mutation wobbler), caractérisée par une dégénérescence préférentielle des motoneurons au niveau de la moelle épinière cervicale. Les symptômes cliniques de la maladie se manifestent au niveau musculaire dès la quatrième semaine post-natale, par une atrophie très marquée des muscles des pattes antérieures et du cou qui se poursuit au niveau des muscles des pattes postérieures. L'étude a porté sur l'analyse électrophorétique de la composition en protéines contractiles (MHC) et régulatrices (MLC et TnC) des muscles sternocleidomastoïde (muscle du cou) et soleus (muscle de la patte postérieure) de souris âgées de 5 à 7 semaines. De plus, une étude

fonctionnelle (relation Tension/pCa) de fibres musculaires isolées de ces deux types de muscles a également été entreprise et les données corrélées à une analyse électrophorétique de la composition en isoformes de MHC.

Notre travail portera donc sur la plasticité des caractéristiques contractiles et élastiques de fibres musculaires squelettiques lors d'atrophies liées à des dysfonctionnements neuromusculaires.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES
DE BASE

L'activité motrice de déplacement et du maintien postural est assurée par la capacité des muscles squelettiques à se contracter plus ou moins rapidement. Un tel spectre de mouvements, de lents à rapides, est possible grâce à l'existence de caractéristiques variables selon les muscles. La diversité du muscle squelettique est liée à sa composition en fibres musculaires : aucun muscle squelettique n'est identique à un autre, et des muscles homologues montrent des différences de composition en fibres selon les espèces. L'hétérogénéité du tissu musculaire reflète en réalité son haut degré de spécialisation fonctionnelle et représente la base de sa plasticité.

Il existe cependant une unité dans la diversité. En effet, l'activité musculaire nécessite une organisation stricte et complexe tant en termes d'organisation anatomique générale que d'organisation moléculaire. Par ailleurs, dans tous les muscles, la contraction résulte d'une interaction entre l'actine et la myosine contrôlée par la concentration calcique interne et par un groupe de protéines régulatrices constitué de la tropomyosine et du complexe des troponines.

I - STRUCTURE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE

A - ORGANISATION GENERALE

Le muscle est constitué d'un ensemble de faisceaux de fibres musculaires (figure 1) réunis par du tissu conjonctif dense (épimysium). Chaque faisceau entouré de tissu conjonctif plus lâche (périmysium), est constitué d'un groupement de fibres musculaires. Chaque fibre musculaire est gainée à son tour d'un tissu conjonctif fin (endomysium) et comprend chez l'adulte plusieurs milliers de myofibrilles. Les réseaux de tissus conjonctifs s'unissent à chaque extrémité du muscle pour former les tendons. Ces structures assurent les insertions du muscle sur la charpente squelettique et transmettent la force musculaire produite lors de la contraction. Un réseau de vaisseaux sanguins assure l'apport en nutriments et en oxygène au muscle ainsi que l'épuration des métabolites. Il permet également l'action des hormones.

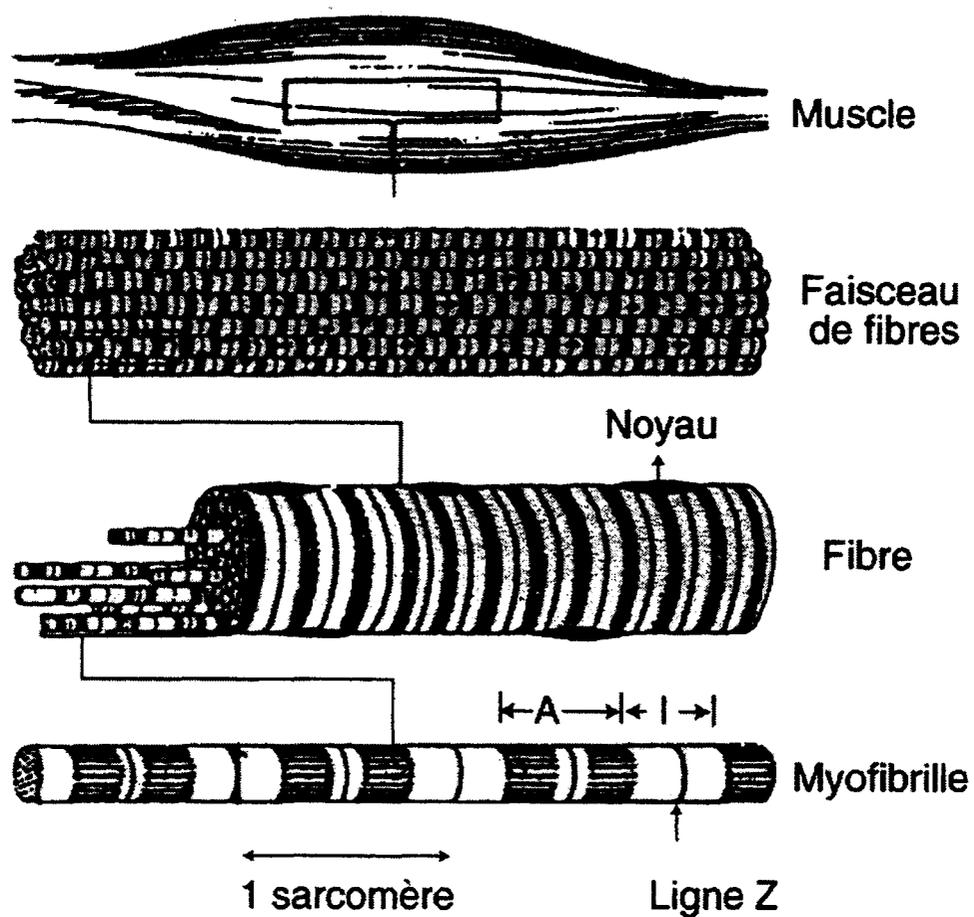


Figure 1 : Organisation générale du muscle strié squelettique (d'après Goubel et Linsel-Corbeil, 1998).

B - ULTRASTRUCTURE DE LA FIBRE MUSCULAIRE

La fibre musculaire squelettique est une cellule polynucléée de forme cylindrique. Sa section est comprise entre 10 μm et 100 μm et sa longueur varie de quelques millimètres à quelques dizaines de centimètres selon le muscle. La fibre musculaire est entourée d'une membrane excitable : le sarcolemme. Son cytoplasme ou sarcoplasme, comprend de nombreux organites tels que les noyaux, mitochondries, le réticulum sarcoplasmique et les myofibrilles. Ces dernières constituent l'appareil contractile et occupent environ 80 % du volume des fibres. Dans le sarcoplasme se trouvent également des grains de glycogène et de graisse qui constituent les réserves énergétiques de la cellule.

Périodiquement, le sarcolemme s'invagine pour former le système tubulaire transverse ou tubule T, venant ainsi entourer les myofibrilles (figure 2). Un système membranaire vient également envelopper chaque myofibrille, le réticulum sarcoplasmique, qui est la réserve en ions calcium indispensable à la contraction musculaire. L'association d'un tubule T et de deux vésicules de réticulum sarcoplasmique constitue une triade, élément clé du couplage excitation-contraction.

C - ULTRASTRUCTURE DES MYOFIBRILLES

Les myofibrilles sont des éléments cylindriques de 1 à 2 μm de diamètre. En microscopie électronique, on observe au niveau de chaque myofibrille une alternance de bandes sombres (bandes A, anisotropes) et de bandes claires (bandes I, isotropes) (figure 3). Chaque bande A est coupée en son centre par une bande plus claire ou bande H, elle-même divisée en 2 par une ligne sombre : la strie M. Au milieu des bandes I on remarque également une zone plus foncée appelée strie Z. La région d'une myofibrille comprise entre 2 stries Z successives est appelée sarcomère, c'est la plus petite unité contractile de la myofibrille.

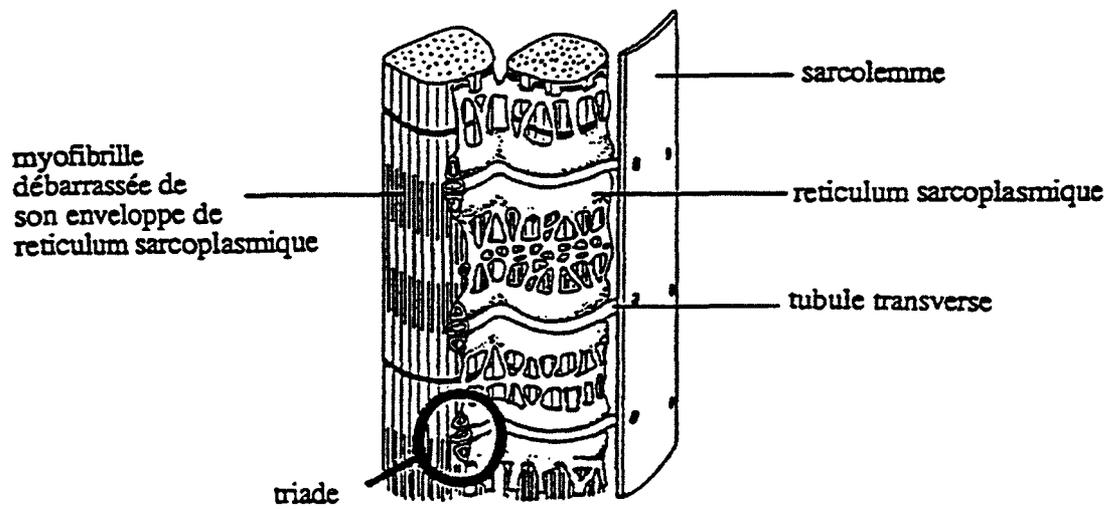


Figure 2 : Système de membranes internes impliquées dans le couplage excitation-contraction (d'après Jones et Round, 1990).

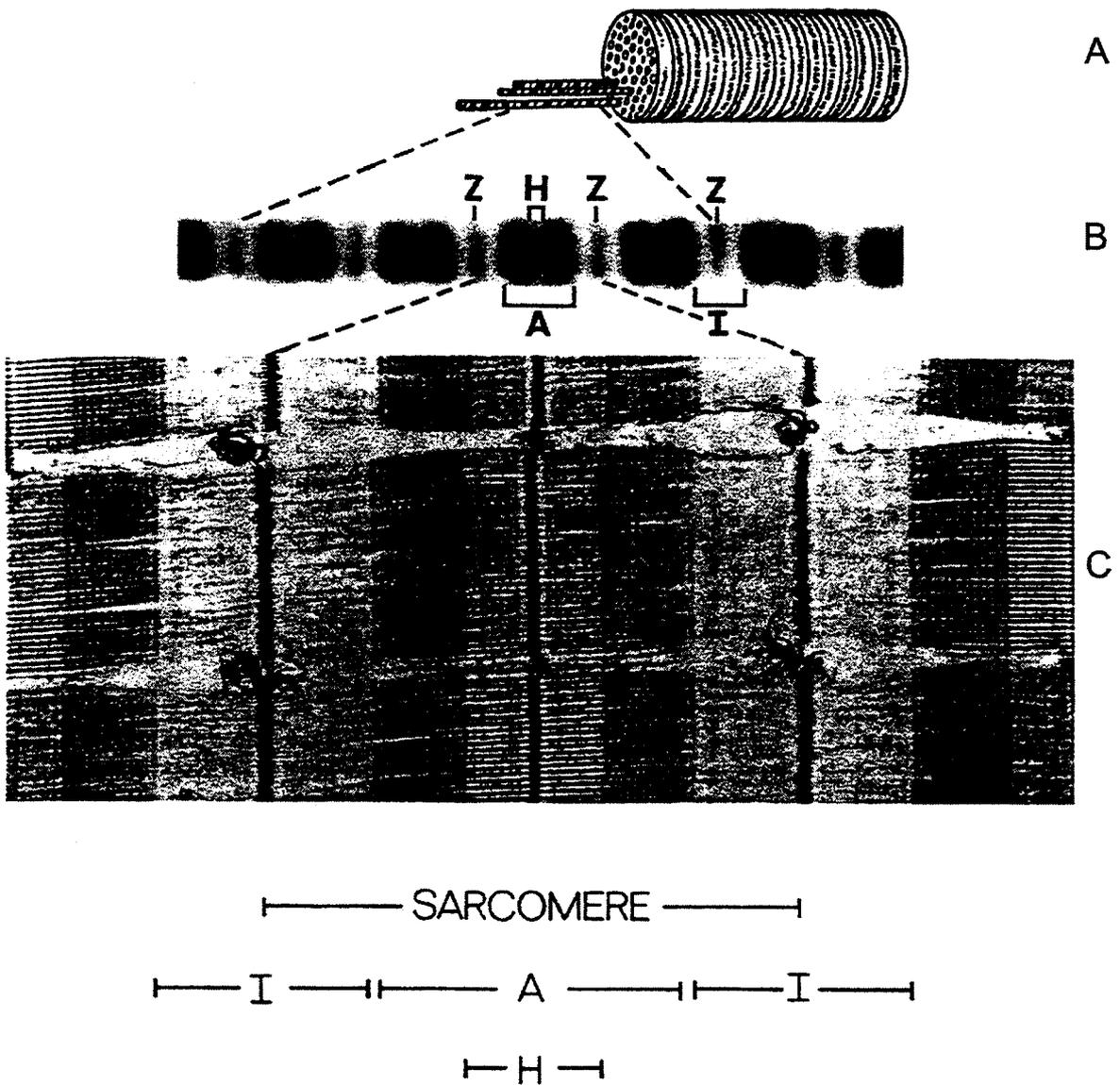


Figure 3 : Illustration de l'origine des striations au niveau du muscle squelettique (d'après Craig, 1994).

A : fibre musculaire et ses myofibrilles.

B : micrographie à contraste de phase d'une myofibrille (x 5400).

C : micrographie électronique d'une coupe longitudinale de myofibrilles (x 23000).

Au niveau moléculaire, l'alternance des bandes sombres et claires des myofibrilles est due à la disposition ordonnée de 2 types de myofilaments. Les filaments épais de myosine occupent la bande A, alors que les filaments fins d'actine s'étendent le long de la bande I et pénètrent en partie au niveau de la bande A (figure 4). Ils sont attachés à chaque extrémité du sarcomère au niveau des stries Z. Les filaments épais sont également reliés aux stries Z par l'intermédiaire d'une autre protéine structurale, la titine ou connectine, dotée de propriétés élastiques et assurant le positionnement centré du filament épais dans le sarcomère (figure 4).

D - ULTRASTRUCTURE DES MYOFILAMENTS

1 - Le filament épais de myosine

a - Structure

La myosine est une protéine hexamérique. Chaque molécule est constituée de 2 chaînes lourdes (MHC : myosin heavy chain) de poids moléculaire d'environ 200 kDa et de 4 chaînes légères (MLC : myosin light chain) de poids moléculaire de 18 à 22 kDa (Warrick et Spudich, 1987 ; Weeds et Lowey, 1971). Les chaînes lourdes s'enroulent en double hélice au niveau C terminal de la molécule, constituant ainsi une structure rigide correspondant à la queue de la molécule de myosine (LMM : méromyosine légère) (figure 5-A). Les parties NH₂-terminales des 2 chaînes lourdes se séparent pour se combiner chacune avec 2 chaînes légères (une essentielle et une régulatrice ou phosphorylable) pour former les têtes globulaires (HMM : méromyosine lourde). Ces dernières se subdivisent en 2 parties : le fragment S1 constitué des têtes globulaires proprement dit et le fragment S2 qui attache celles-ci au reste de la molécule.

Le fragment S1 possède l'activité enzymatique de la myosine et le site de liaison à l'actine. Le fragment S2 est une partie plus flexible qui assure la liaison entre le fragment S1 et le reste de la molécule (Elliott et Offer, 1978 ; Lowey et coll., 1969).

Dans le muscle strié squelettique, environ 300 molécules de myosine s'assemblent entre elles de manière antiparallèle pour former le filament épais d'environ 1.6 µm de long (figure 5-B) et 15 nm de diamètre (Huxley, 1963).

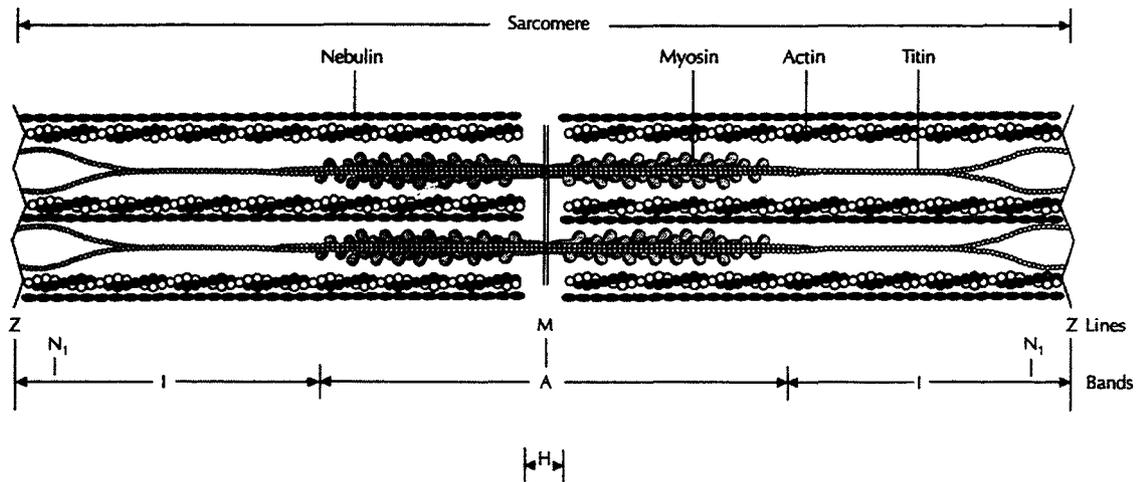
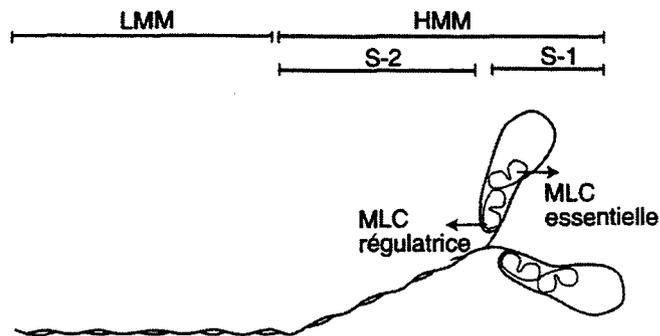


Figure 4 : Représentation schématique d'un sarcomère de muscle squelettique et son réseau des trois principaux filaments (d'après Keller, 1995).

A



B

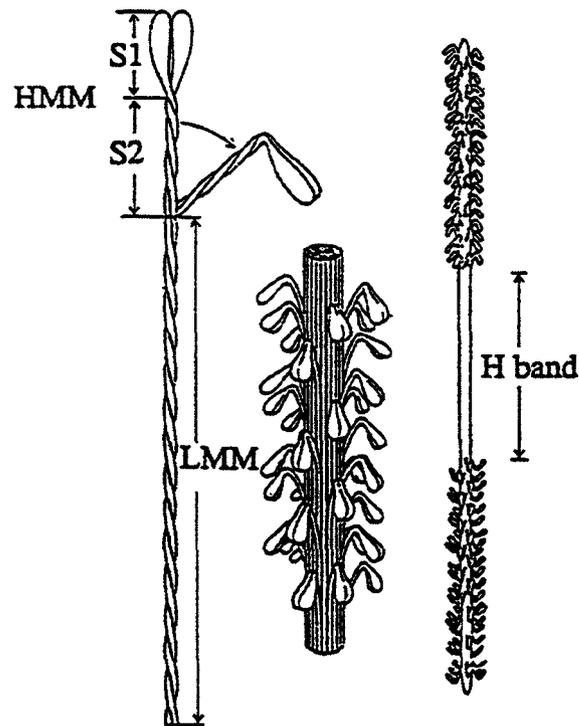


Figure 5 : A : Structure de la molécule de myosine. LMM, méromyosine légère. HMM, méromyosine lourde. MLC, chaîne légère de myosine. S1, tête globulaire de la myosine. S2, fragment élastique liant la tête S1 au reste de la molécule (d'après Goubel et Lenseil-Corbeil, 1998).

B : Structure du filament épais.

b - Diversité moléculaire

Les chaînes lourdes de myosine (MHC), de même que les chaînes légères (MLC) régulatrices et essentielles, comportent plusieurs isoformes codées par une famille multigénique. Dans les fibres musculaires squelettiques de mammifère adulte, quatre isoformes prédominantes des chaînes lourdes de myosine ont été déterminées. Il s'agit de la MHC I/β de type lent également exprimée dans le cœur et de 3 isoformes de type rapide : la MHC IIA, la MHC IID(X) et la MHC IIB (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996).

D'autres isoformes de MHC dont la distribution est spécifique du tissu musculaire ont également été décrites. Il s'agit de la MHC_{em} trouvée dans les muscles extraoculaires et du larynx, de la MHC "super rapide" (MHC 2M) exprimée dans les muscles maxillaires de carnivores et de primates, de la MHC I α identifiée dans le cœur et le masséter de même que dans les fibres intrafusales de rat et dans les muscles transformés (Hämäläinen et Pette, 1994 ; Peuker et Pette, 1995 ; Stevens et coll., 1999).

Au cours du développement, deux isoformes sont prédominantes dans les muscles, il s'agit de la MHC embryonnaire (MHC emb) et de la MHC néonatale (MHC neo) (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996).

Récemment, une quatrième isoforme lente de MHC (MHC Ia), dont la mobilité électrophorétique est un peu plus élevée que celle de la MHC I, a été identifiée (Fauteck et Kandarian, 1995 ; Galler et coll., 1997 ; Hämäläinen et Pette, 1996).

Les chaînes légères de myosine appartiennent à la famille des protéines EF-hand incluant la troponine C (Nakayama et Kretsinger, 1994). Cinq chaînes légères majeures régulatrices ou essentielles ont été identifiées dans les muscles squelettiques de mammifère (Barton et Buckingham, 1985). Les fibres musculaires de type lent expriment l'isoforme lente des chaînes légères régulatrices (MLC 2s) et des chaînes légères essentielles (MLC 1s). Les fibres musculaires de type rapide expriment quant à elles les isoformes rapides des chaînes légères régulatrices (MLC 2f) et essentielles (MLC 1f et MLC 3f).

Les différents types de fibres musculaires peuvent être identifiés sur la base de leur composition en MHC (lente ou rapide). De plus, il est actuellement bien établi qu'en plus des fibres ne contenant qu'une seule isoforme de MHC dites "pures" lentes ou "pures" rapides, il existe des fibres hybrides qui co-expriment différentes isoformes de MHC. Ainsi, l'association de la MHC I avec une ou plusieurs isoformes rapides, ou la combinaison en

proportion variable des différentes isoformes rapides élargissent le spectre des combinaisons de MHC possibles (Pette et Staron, 1988 ; Termin et Pette, 1992). Toutefois, certaines associations de myosines n'ont jamais été décrites. En outre, les différentes combinaisons des isoformes de MLC avec les MHC permettent également d'augmenter le nombre de types de fibres possibles (tableau 1).

2 - Le filament fin

Le filament fin est constitué de 3 polypeptides différents : l'actine, la tropomyosine et le complexe des troponines (figure 6-A).

a - L'actine

La forme monomérique appelée actine globulaire, ou actine G, est composée de 374 acides aminés (Elzinga et coll., 1973). La polymérisation de l'actine G forme un filament appelé actine filamentaire ou actine F. L'actine F, de poids moléculaire de 42 kDa est organisée en double hélice de 8 nm de diamètre et forme un filament d'environ 1 μm (Craig, 1994). L'actine musculaire existe sous deux isoformes : l'actine α -squelettique et l'actine α -cardiaque. Ces deux isoformes présentent une structure très conservée qui diffère uniquement sur quatre acides aminés au niveau NH_2 -terminal de la molécule (Vandekerckhove et Weber, 1979). Chez le rat et la souris, ces deux isoformes sont co-exprimées dans les muscles squelettiques et cardiaques au cours du développement, alors que chez l'adulte le muscle squelettique exprime uniquement l'isoforme α -squelettique et le muscle cardiaque l'isoforme α -cardiaque (Vandekerckhove et coll., 1986).

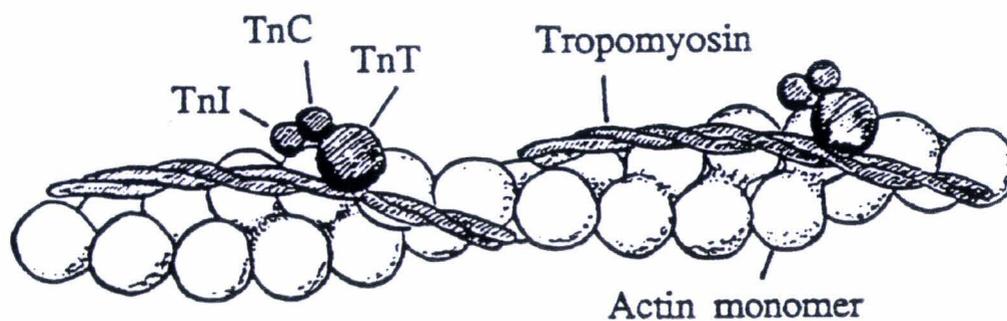
b - La tropomyosine

La molécule de tropomyosine se loge dans le sillon délimité par les 2 chaînes d'actine. Elle stabilise le filament d'actine et bloque stériquement l'interaction entre l'actine et la myosine (figure 6-A). C'est une protéine dimérique de poids moléculaire compris entre 65 et 70 kDa (Cohen et Holmes, 1963). Elle est constituée par l'assemblage de 2 chaînes hélicoïdales de type α ou β . Dans le muscle squelettique, 3 combinaisons sont possibles α/α et β/β homodimères ou α/β hétérodimère (Johnson et Smillie, 1975 ; Stewart, 1975). La proportion relative des sous unités α et β apparaît être dépendante de l'espèce (Cummins et

Combinaisons des chaînes légères		Combinaisons des chaînes lourdes		
		A	B	C
1	(LC1s) ₂ (LC2s) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
2	(LC1s) ₂ (LC1f) (LC2s) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
3	(LC1f) ₂ (LC2s) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
4	(LC1s) ₂ (LC2s) (LC2f)	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
5	(LC1s) (LC1f) (LC2s) (LC2f)	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
6	(LC1f) ₂ (LC2s) (LC2f)	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
7	(LC1s) ₂ (LC2f) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
8	(LC1s) (LC1f) (LC2f) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
9	(LC3f) ₂ (LC2s) (LC2f)	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
10	(LC3f) ₂ (LC2s) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
11	(LC1s) (LC3f) (LC2s) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
12	(LC1f) (LC3f) (LC2s) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
13	(LC1f) (LC3f) (LC2s) (LC2f)	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
14	(LC1s) (LC3f) (LC2f) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
15	(LC1s) (LC3f) (LC2s) (LC2f)	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
16	(LC1f) ₂ (LC2f) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
17	(LC1f) (LC3f) (LC2f) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
18	(LC3f) ₂ (LC2f) ₂	(HCI) ₂	(HCI) (HCIIa)	(HCIIa) ₂
19	(LC1f) ₂ (LC2f) ₂		(HCIIa) (HCIIb)	(HCIIb) ₂
20	(LC1f) (LC3f) (LC2f) ₂		(HCIIa) (HCIIb)	(HCIIb) ₂
21	(LC3f) ₂ (LC2f) ₂		(HCIIa) (HCIIb)	(HCIIb) ₂

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des différentes associations possibles entre les chaînes lourdes (HC) et légères (LC) de myosine obtenues sur des fibres de lapin (d'après Pette et Staron, 1990).

A



B

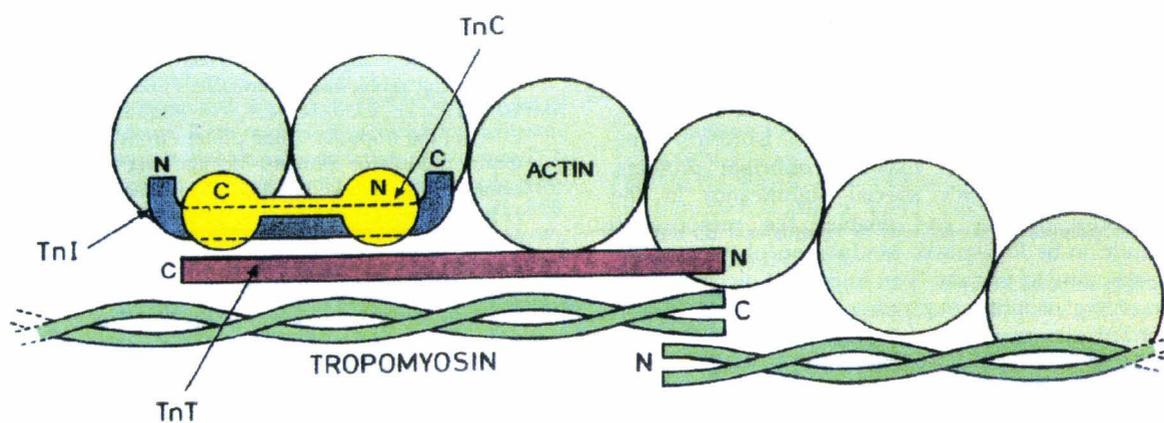


Figure 6 : A : Représentation schématique du filament fin (d'après Jones et Round, 1990).

B : Schématisation de l'interaction entre les différentes protéines du filament fin (d'après Perry, 1998).

Perry, 1973) et du muscle (Carraro et coll., 1981 ; Roy et coll., 1979). Des études ont montré la prédominance de l'expression de la sous unité β dans les fibres de type lent et celle de la sous unité α dans les fibres de type IIB (Salviati et coll., 1982). Par ailleurs, une isoforme lente et une isoforme rapide de la sous unité α ont été identifiées (Bronson et Schachat, 1982 ; Heeley et coll., 1983 ; Salviati et coll., 1982).

c - Le complexe des troponines

Les troponines ou protéines régulatrices, empêchent l'association permanente de la myosine à l'actine (inhibition de la contraction musculaire) et reçoivent le signal qui déclenche la levée de cette inhibition (Weber et Murray, 1973).

Ce complexe comprend 3 polypeptides : la troponine T (TnT), la troponine C (TnC) et la troponine I (TnI). Des études de diffraction aux rayons X (Haselgrove, 1983) ont montré que le complexe est distribué le long du filament fin avec une périodicité de 38.5 nm, correspondant à la fixation d'un complexe de troponines tous les 7 monomères d'actine G (figure 6-A). Par ailleurs, des études en microscopie électronique couplées à des études biochimiques (Flicker et coll., 1982) suggèrent que la TnC, la TnI et une partie de la TnT (fragment T2) sont liées à proximité de la Cys 190 de la tropomyosine et que le reste de la TnT (fragment T1) s'accroche vers la partie COOH-terminale de la molécule (figure 6-B).

i) la troponine T (TnT)

La troponine T, de poids moléculaire compris entre 30 et 35 kDa (Pearlstone et coll., 1977) assure la liaison du complexe des troponines à la tropomyosine.

De nombreuses isoformes de TnT ont été identifiées dans les muscles de mammifères. Elles sont le produit de l'expression de gènes distincts et spécifiques du type de muscle (Gahlmann et coll., 1987 ; Smillie et coll., 1988). Toutefois, on retrouve une forte homologie entre les isoformes de TnT du même type de muscle entre différentes espèces animales et entre les isoformes de TnT de différents types de muscles dans une même espèce (Perry, 1998). Les différentes isoformes de TnT résultent de l'épissage alternatif de la région NH₂-terminale de la protéine (figure 7). Ainsi, chez le rat, le gène codant pour la TnT rapide peut potentiellement donner 124 isoformes (Briggs et Schachat, 1993 ; Morgan et coll., 1993).

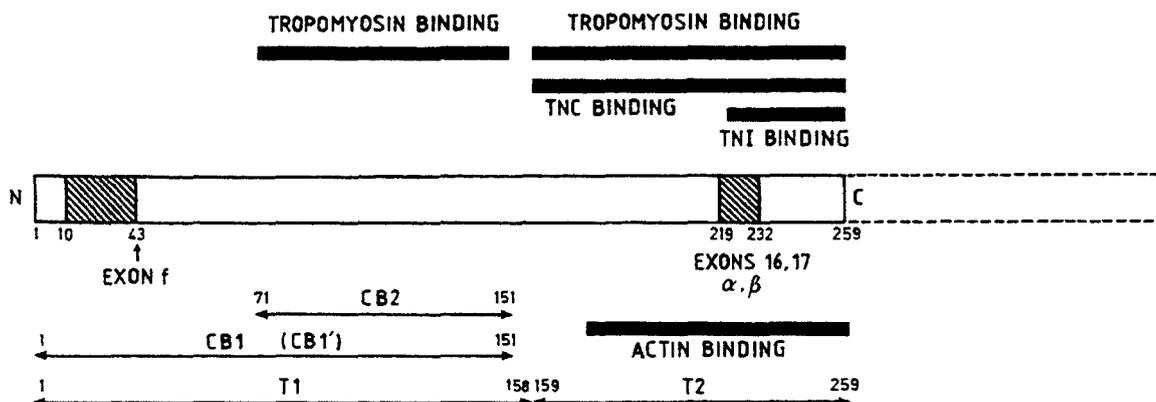


Figure 7 : Représentation de la séquence polypeptidique de la TnT de lapin (d'après Perry, 1998).

Les régions variables générées par épissage alternatif de l'ARN messager sont hachurées. Les régions de la molécule impliquées dans les liaisons avec les autres protéines du filament fin sont indiquées en gras. En pointillés est représentée la région COOH-terminale d'environ 100 acides aminés retrouvée uniquement dans certaines isoformes de TnT de muscle squelettiques d'invertébrés. CB1, CB1' et CB2 : peptides obtenus par clivage au bromure de cyanogène, T1 et T2 sont les fragments obtenus par clivage à la chymotrypsine de la TnT 2f de lapin.

Par ailleurs, il a également été montré que la région COOH-terminale de la protéine pouvait donner deux isoformes : l'isoforme β exprimée durant le développement et l'isoforme α présente dans les muscles adultes (Medford et coll., 1984). Enfin, un nombre limité d'isoformes lentes a été décrit. Celui-ci est dû à un nombre plus faible d'exons présents dans la région NH₂-terminale de la protéine.

Malgré le nombre important d'isoformes rapides possibles, seules 4 isoformes majeures : TnT 1f, TnT 2f, TnT 3f et TnT 4f et 2 isoformes mineures : TnT 5f et TnT 6f ont été identifiées dans les muscles de mammifères. Les isoformes lentes sont la TnT 1s et la TnT 2s (Härtner et coll., 1989 ; Schmitt et Pette, 1988).

ii) la troponine C (TnC)

La troponine C, de poids moléculaire d'environ 18 kDa, est la protéine responsable de la fixation du calcium. Cette fixation du calcium sur la TnC va augmenter l'interaction de la TnC avec la TnI et diminuer celle entre la TnI et l'actine. Le complexe tropomyosine/troponines bascule alors vers le centre du filament d'actine libérant le site de fixation de la myosine à l'actine, et rendant possible la création de ponts entre l'actine et la myosine (figure 8).

La TnC appartient à la famille des protéines fixatrices du calcium de type EF-hand. Il existe deux isoformes de TnC dans les muscles squelettiques, l'isoforme rapide et l'isoforme lente. Cette dernière est également exprimée dans le muscle cardiaque. Ces deux isoformes sont codées par deux gènes distincts issus d'un même gène (Parmacek et Leiden, 1991). Chaque isoforme possède 4 sites (I-IV) de type hélice-boucle-hélice pouvant fixer le calcium. Toutefois, l'isoforme lente/cardiaque a son site I inactif. En effet, une substitution de nucléotides dans la région du gène de la TnC lente codant pour ce site le rend non fonctionnel (Holroyde et coll., 1980 ; Johnson et coll., 1980). Les sites I et II, situés dans la partie NH₂-terminale de la protéine (figure 9) possèdent une faible affinité et une forte spécificité pour le calcium ($KCa \cong 10^5 M^{-1}$) et sont responsables de la régulation de la contraction musculaire. Les sites III et IV, situés dans la partie COOH-terminale de la protéine (figure 9) possèdent une très forte affinité et une faible spécificité pour le calcium ($KCa \cong 10^3 M^{-1}$). Ils sont dans les conditions physiologiques constamment occupés par un ion calcium ou magnésium et jouent un rôle structural (Grabarek et coll., 1992 ; Li et coll., 1995).

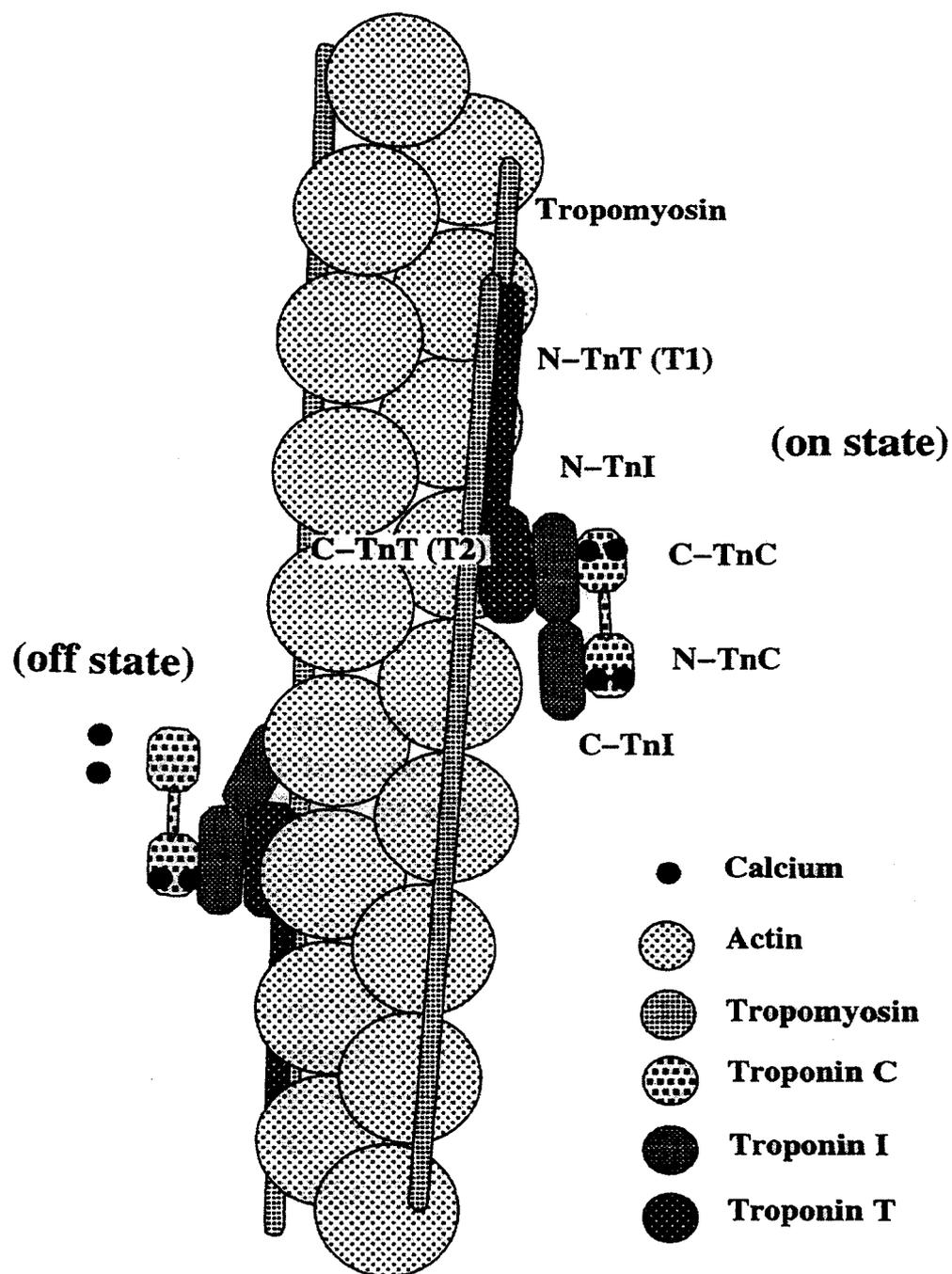


Figure 8 : Représentation de l'interaction entre les différentes sous-unités régulatrices du filament fin en absence (off state) ou en présence (on state) de calcium (d'après Reinach et coll., 1997).

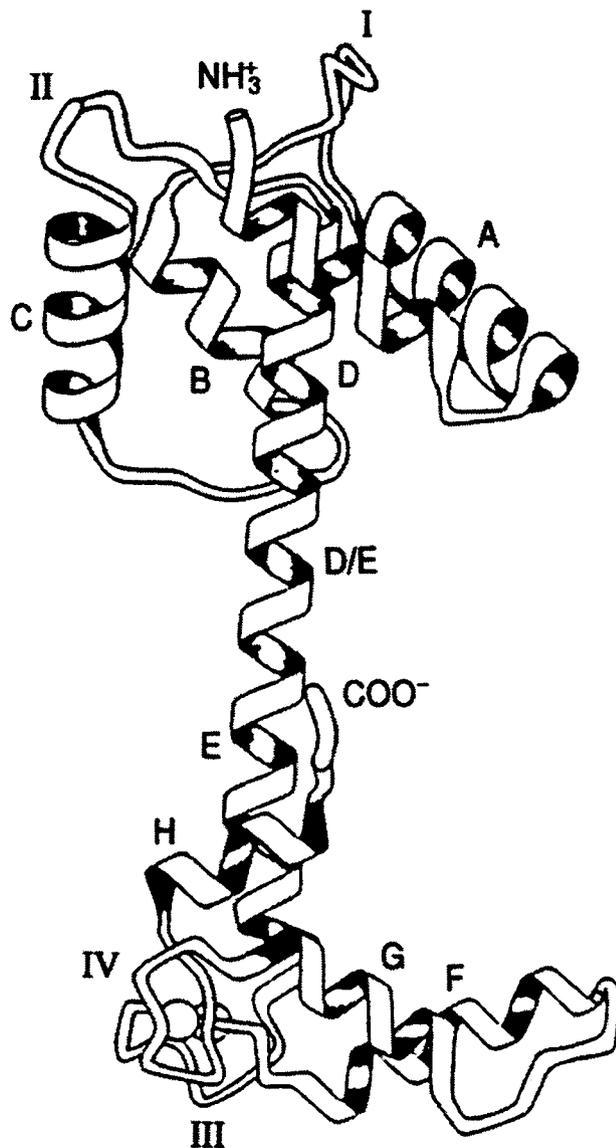


Figure 9 : Représentation en ruban de la chaîne polypeptidique de la troponine C (d'après Herzberg et James, 1985). Les sites fixateurs de calcium sont numérotés de I à IV. La partie NH_2 -terminale, avec les sites I et II, est le domaine qui fixe le calcium et est responsable de la régulation de la contraction. La partie COOH -terminale, avec les sites III et IV, est constamment occupée par un ion calcium ou magnésium et joue un rôle structural.

iii) la troponine I (TnI)

La troponine I, possède un poids moléculaire compris entre 21 et 23 kDa. Elle est fixée à l'actine, à la TnC et à la TnT. Elle inhibe l'interaction entre l'actine et la myosine et par conséquent l'activité ATPasique du complexe actomyosine. Trois isoformes ont été décrites dans les muscles striés : la TnI rapide, la TnI lente et la TnI cardiaque (Härtner et Pette, 1990). Ces trois isoformes diffèrent par leur extrémité NH₂-terminale, alors que leur partie COOH-terminale présente un fort degré d'homologie.

3 - Association préférentielle de certaines protéines contractiles et régulatrices

Les travaux du groupe de Schachat (Moore et coll., 1987 ; Schachat et coll., 1985a, 1985b) ont révélé l'existence d'un continuum d'expression des différentes isoformes de troponine et de tropomyosine, avec une tendance pour des combinaisons préférentielles de certaines isoformes de TnT et de tropomyosine dans différentes fibres (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996). On trouve ainsi, d'une part l'association préférentielle de la TnT 2f avec l'homodimère α/α de la tropomyosine et d'autre part, l'association préférentielle de la TnT 3f avec l'homodimère β/β ou l'hétérodymère α/β de la tropomyosine. De plus, une expression préférentielle de certaines isoformes de TnT avec des isoformes particulières de MHC a été soulignée (figure 10) : TnT 2f avec la MHC IIB, TnT 3f avec la MHC IIA, TnT 3f et TnT 4f avec la MHC IID(X) et la TnT 1s avec la MHC I (Schmitt et Pette, 1990).

Cette association préférentielle de certaines isoformes de protéines contractiles et régulatrices, permet de dresser un schéma global de distribution avec à l'une extrémité, les fibres de type IIB exprimant préférentiellement la MLC 3f, la TnT 2f et l'homodimère α/α de tropomyosine. A l'autre extrémité, on trouve les fibres de type IIA exprimant préférentiellement la TnT 3f et l'hétérodymère α/β de tropomyosine. Entre ces 2 types de fibres, on retrouve un continuum de co-expression des différentes isoformes des protéines contractiles et régulatrices qui donne naissance à une multitude de types de fibres musculaires, permettant au muscle de répondre à différentes fonctions (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996).

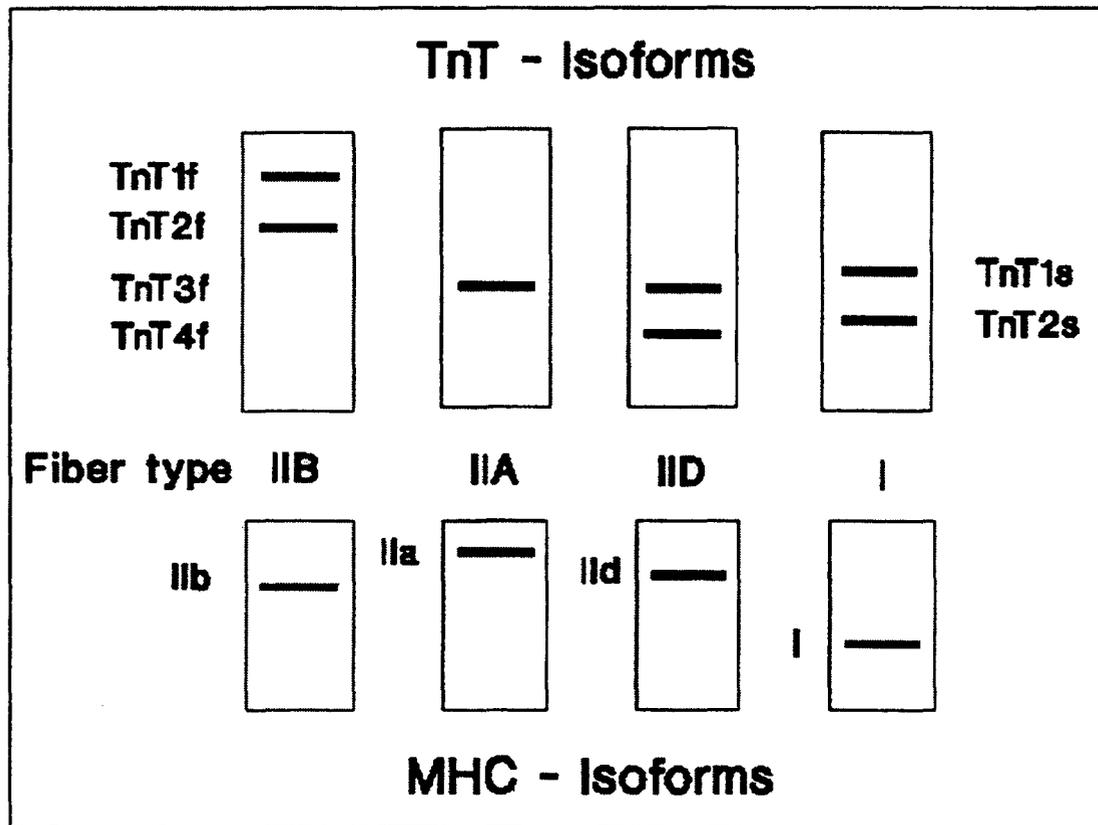


Figure 10 : Illustration schématique de l'expression préférentielle des isoformes de troponine T (TnT) avec certaines isoformes des chaînes lourdes de myosine (MHC) dans des fibres musculaires de lapin (d'après Smitt et Pette, 1990).

4 - Le filament de titine (connectine)

a - Historique

La structure du sarcomère du muscle strié est plus complexe que le modèle à deux filaments (actine et myosine). Dans la théorie des filaments glissants, Huxley et Hanson (1954) ont proposé la présence d'un filament élastique appelé filament S, liant les extrémités libres des filaments d'actine dans le sarcomère. Toutefois, ce filament élastique ne fût pas retenu dans le développement du modèle de la contraction musculaire. Plus tard, Sjöstrand (1962) observa de très fins filaments appelés "gap-filaments" à la jonction des filaments d'actine et de myosine quand le muscle était étiré au-delà du recouvrement des filaments fins et épais. Le groupe de Maruyama et Natori s'investit dans l'étude de cette nouvelle protéine, et la nomma connectine (Maruyama et coll., 1977). L'analyse électrophorétique sur muscle squelettique de poulet révéla une bande en doublet de très haut poids moléculaire ($\cong 1000$ kDa) qui fut nommée titine (Wang et coll., 1979). En 1984, Maruyama et coll. estimèrent la masse moléculaire de cette protéine à 2800 kDa, mais personne, à part quelques pionniers, ne crut à l'existence d'une protéine ayant un tel poids moléculaire. L'amélioration des techniques de microscopie électronique et électrophorétique, a largement contribué à l'acceptation de l'idée d'un troisième filament majeur dans le sarcomère des muscles striés squelettiques et, à la mise en évidence de cette nouvelle protéine myofibrillaire géante qu'est la titine ou connectine.

b - Structure

La titine est une protéine sarcomérique filamenteuse qui s'étend de la strie Z à la ligne M (Fürst et coll., 1988) dans chaque demi sarcomère (figure 11). La partie NH₂-terminale de la molécule est localisée dans la strie Z et la partie COOH-terminale dans la ligne M. Son poids moléculaire d'environ 3 MDa (Maruyama et coll., 1977) en fait le polypeptide le plus grand décrit à ce jour. La molécule de titine est composée à 90 % par la répétition de domaines de type fibronectine III (FN3) appelés motif I et de domaines de type immunoglobuline (Ig) appelés motif II (Labeit et Kolmerer, 1995). Ces domaines sont repliés en domaines globulaires composés de 7 feuillets β anti-parallèles (Leahy et coll., 1992 ; Pfühl et Pastore, 1995 ; Politou et coll., 1995).

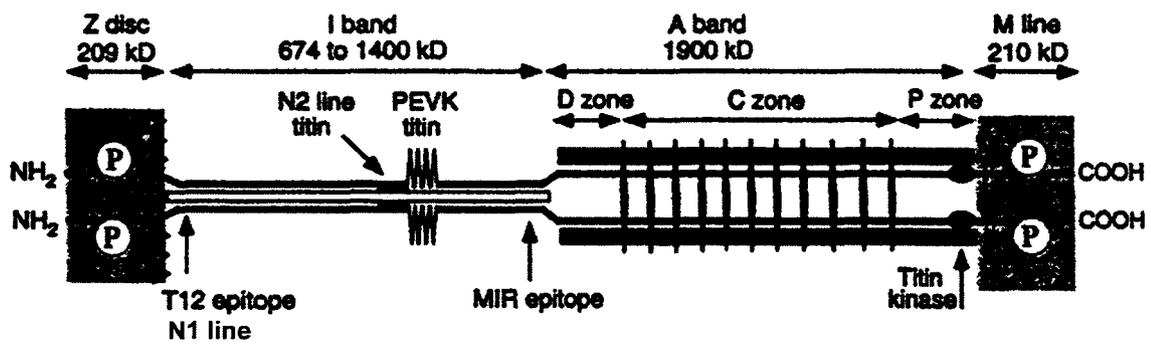


Figure 11 : Illustration de l'organisation de la molécule de titine au niveau du sarcomère (d'après Labeit et Kolmerer, 1995).

Dans la bande I, on trouve tout d'abord un segment constitué par la répétition de domaines de type Ig, suivie d'un inter-domaine au niveau de la ligne N2. Ensuite, il y a un domaine unique riche en acides aminés proline (P), glutamate (E), valine (V) et lysine (K) nommé PEVK (Labeit et Kolmerer, 1995), flanqué d'un autre segment constitué de domaines de type Ig (figure 11).

Dans la bande A, on trouve quatre zones (figure 11) dans lesquelles les domaines de motifs I et II sont arrangés en super-domaines :

- la zone D (II - I - I - II - I - I - I) 6
- la zone C (II - I - I - II - I - I - I - II - I - I - I) 11
- la zone P (II - II - I - I - II - II - I - domaine kinase)
- la ligne M comprenant 10 motifs de type II et 7 inter-domaines.

Dans la zone C, l'arrangement régulier des 11 super-domaines correspond à une périodicité de 43 nm et suit le pas de l'hélice du filament épais (Labeit et coll., 1992). Cette périodicité définit des zones de liaison entre la titine et la myosine par l'intermédiaire de protéines appartenant à la famille des protéines se fixant à la myosine telles que la protéine C (135 kDa) et la protéine H (74 kDa) (Itoh et coll., 1988 ; Soteriou et coll., 1993).

Dans la zone P, le domaine kinase est de type MLCK (myosine light chain kinase). Il a été suggéré que ce domaine pourrait agir comme une kinase du fait de l'autophosphorylation de la titine en présence d'ATP (Takano-Ohmuro et coll., 1992) et qu'il serait actif au cours du développement musculaire (Mayans et coll., 1998). Par ailleurs, plusieurs sites phosphorylés ont été trouvés dans les parties NH₂ et COOH-terminales de la molécule (Labeit et Kolmerer, 1995).

Les extrémités NH₂ et COOH-terminales de la titine sont uniquement composées de domaines Ig espacés par des séquences uniques (Gregorio et coll., 1999). Par ailleurs, celles-ci possèdent des sites de fixation pour de nombreuses protéines myofibrillaires telles que l' α actinine et la téléthonine dans la strie Z, ainsi que pour la myoméline et la protéine M dans la bande M (Gregorio et coll., 1999).

c - Expression différentielle dans les muscles cardiaques et squelettiques

Utilisant la technique électrophorétique sur gel SDS, Hu et coll. (1986) ont mis en évidence différentes isoformes de titine dans les muscles striés squelettiques et cardiaques de vertébrés. L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis à Labeit et Kolmerer (1995) de proposer que les isoformes de titine étaient probablement générées par épissage alternatif. Ainsi, pour les isoformes de titine de muscle cardiaque, deux types de régions au niveau de la ligne N2 existent (N2-A et N2-B) qui diffèrent par la taille du segment N2 présent avant la région PEVK (figure 12). Dans le muscle squelettique, l'isoforme de titine présente 53 motifs de type Ig supplémentaires juste avant le segment N2 et un segment PEVK plus grand. La masse moléculaire de la titine varie alors en fonction du muscle, elle est de 2993 kDa pour le muscle cardiaque et de 3700 kDa pour le muscle soleus humain (Labeit et Kolmerer, 1995 ; Labeit et coll., 1997 ; Maruyama, 1997). Par ailleurs, il a été montré récemment que la partie COOH-terminale du domaine PEVK était très conservée au sein des vertébrés, alors que la partie NH₂-terminale était variable (Witt et coll., 1998). De plus, il apparaît que les domaines Ig situés dans la bande I de la molécule de titine seraient arrangés en sous groupes tissus spécifiques (Witt et coll., 1998).

La découverte dans la molécule de titine de sites spécifiques pour la protéase p94 de type calpaine (Sorimachi et coll., 1995), pourrait être importante pour la compréhension du processus de dégradation/régénération de la protéine, d'autant plus que cette protéase est exclusivement exprimée dans les tissus musculaires. Le premier site (figure 13) est localisé dans la région centrale de la portion de titine située dans la bande I. Le clivage de la titine à cet endroit par la protéase p94 pourrait expliquer pourquoi la titine est très facilement dégradée en titine dite T2 (ou β -connectine) (Maruyama, 1994). Ce fragment T2 pourrait être un produit de dégradation physiologique généré au cours du "turn-over" myofibrillaire (Labeit et coll., 1997). Le deuxième site d'action de la protéase p94 est localisé dans la partie COOH-terminale de la titine (figure 13), au niveau de son insertion dans la ligne M et serait tissu spécifique (Kolmerer et coll., 1996). Le rôle de ces deux sites dans la molécule de titine n'est actuellement pas défini.

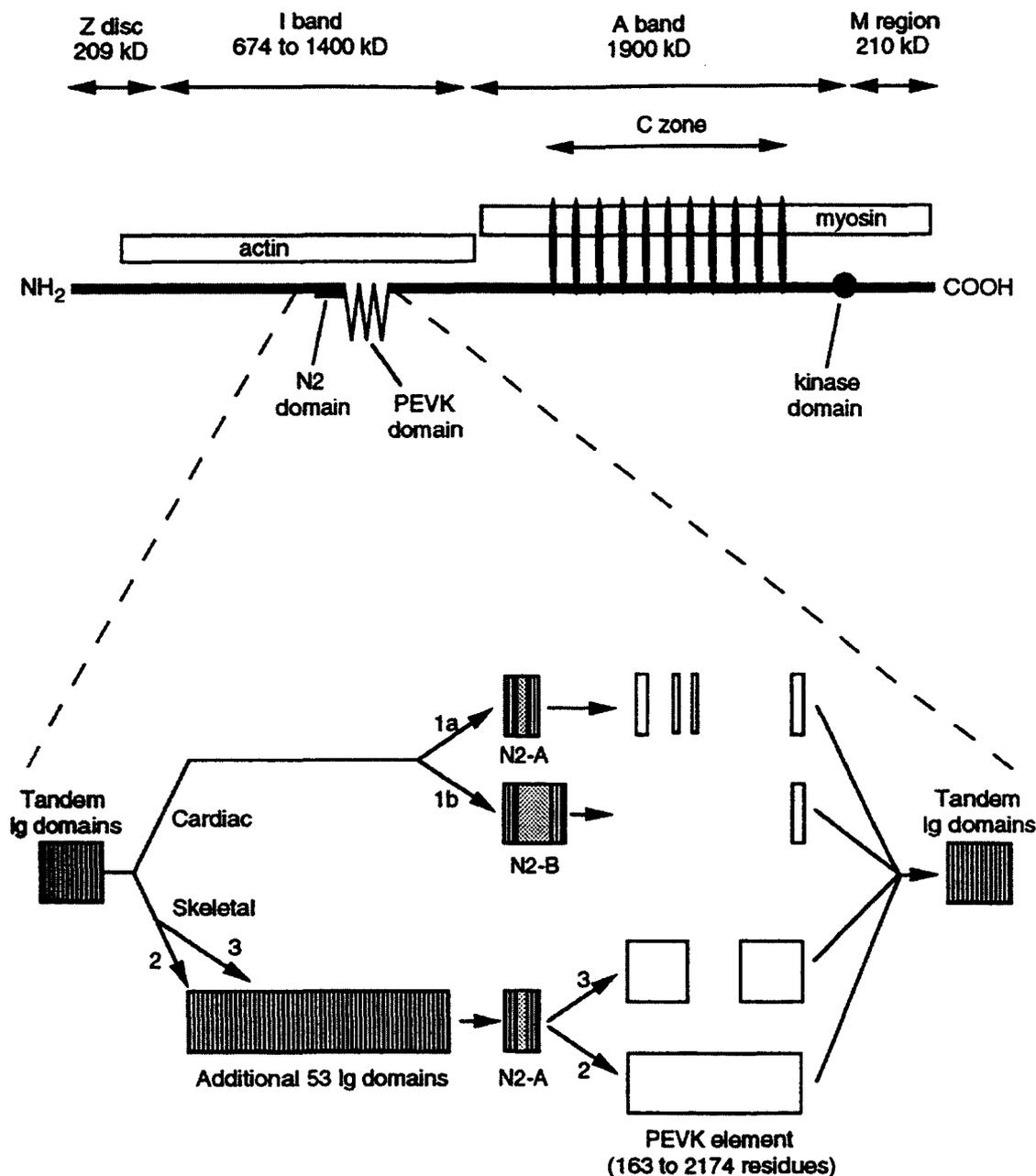


Figure 12 : Schéma de la structure de la titine et des différentes isoformes issues de l'épissage alternatif de la portion de la molécule comprise dans la bande I (d'après Labeit et Kolmerer, 1995).

Dans le muscle cardiaque, deux isoformes différentes peuvent être générées par épissage alternatif (voies 1a et 1b). Celles-ci diffèrent par la taille des domaines N2 et PEVK, ce dernier ne comporte que 163 résidus pour l'isoforme N2-B. Le muscle squelettique présente également deux voies d'épissage alternatif variables (2 et 3). La voie 2 est trouvée pour les muscles soleus et diaphragme humains. Elle est caractérisée par la présence additionnelle de 53 domaines Ig qui sont absents dans l'isoforme cardiaque et d'une séquence PEVK de 2174 résidus. La voie 3 est observée pour le muscle psoas et présente l'exclusion de quelques domaines Ig et un segment PEVK plus court.

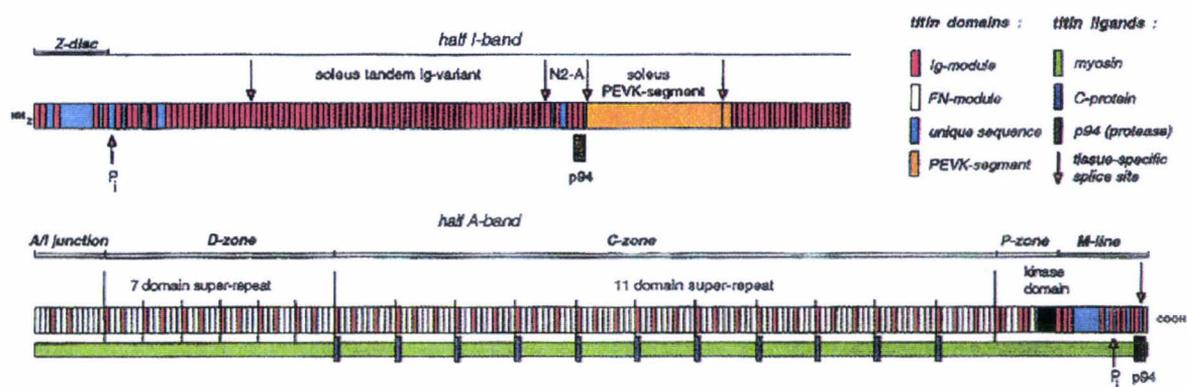


Figure 13 : Architecture de la molécule de titine de soleus humain (3.7 MD). Les différents domaines de la molécule sont représentés à partir de l'ARN messager (100-kb) (d'après Labeit et coll., 1997).

d - Rôle structural de la titine

Les récents progrès dans l'étude de la titine, ont permis de révéler les propriétés physiologiques de cette protéine dans la structure et la fonction du muscle strié. Il a ainsi été montré que ce troisième filament, additionnel aux filaments d'actine et de myosine, possédait des propriétés élastiques. Nous aborderons plus loin dans le chapitre des propriétés mécaniques (paragraphe II-D) la relation entre cette caractéristique élastique de la titine et son rôle dans le développement d'une tension passive.

En outre, le filament de titine possède un rôle structural important. Il est essentiel au maintien de l'organisation radiale et axiale du filament épais dans le sarcomère, nécessaire au bon développement de la tension active (Higuchi, 1992 ; Horowitz et coll., 1986). La molécule de titine maintient donc le filament épais au centre du sarcomère dans les fibres au repos et permet également son remplacement central après chaque activation, évitant ainsi toute dissymétrie lors d'activations prolongées ou répétées (Horowitz et Podolsky, 1988).

Par ailleurs, il semblerait que la titine joue un rôle important lors de la formation des fibres musculaires. En effet, celle-ci définirait la position des autres protéines sarcomériques en leur fournissant des sites de fixation spécifiques dans l'espace et dans le temps (Maruyama, 1997 ; Trinick, 1994, 1996). Il a ainsi été montré que la titine était l'une des premières protéines sarcomériques synthétisées dans les stries Z lors de la formation des myofibrilles (Fürst et coll., 1989 ; Lin et coll., 1994 ; Wang et coll., 1988). De plus, l'élongation de la molécule de titine dans les sarcomères naissants commence avec l'assemblage de la partie NH₂-terminale dans les stries Z, puis s'étend vers la partie COOH-terminale localisée dans la ligne M (Fürst et coll., 1989 ; Van der Loop et coll., 1996).

II - PROPRIETES MECANIQUES DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE

L'existence d'un grand nombre d'isoformes de protéines contractiles, de même que la possibilité de co-expression de différentes isoformes au sein d'une même fibre, donne une grande variété de types de fibres musculaires possédant des propriétés mécaniques propres (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996). La modélisation du comportement mécanique de la fibre musculaire permet d'en déduire ses caractéristiques physiologiques. C'est ainsi que le modèle musculaire présenté par Hill (1938) puis modifié par Shorten (1987), propose que le muscle soit assimilé à un modèle à trois composantes : une composante purement contractile (CC), une composante élastique parallèle (CEP) et une composante élastique série (CES) (figure 14).

La composante contractile est localisée au niveau du sarcomère, elle représente le processus générateur de tension et correspond anatomiquement aux ponts actine-myosine.

La composante élastique série est l'élément de transmission de la force contractile. Elle lie la composante contractile à la périphérie. Elle comprend une partie passive localisée dans les structures tendineuses et une partie active située au niveau des ponts actine-myosine, plus particulièrement dans le fragment S2 reliant la tête S1 à la queue de la myosine (Bressler et Clinch, 1975 ; Jewell et Wilkie, 1958).

La composante élastique parallèle rend compte des propriétés élastiques du muscle à l'état de repos. Cette composante est traditionnellement localisée au niveau du sarcolemme et du tissu conjonctif (Borg et Caulfield, 1980). Elle correspond également à l'interaction résiduelle entre l'actine et la myosine sur le muscle au repos (Hill, 1968) et à certains polypeptides tels que la titine.

Ce modèle à trois composantes reste encore aujourd'hui le modèle le plus fréquemment utilisé pour rendre compte des propriétés contractiles mais aussi élastiques du muscle strié.

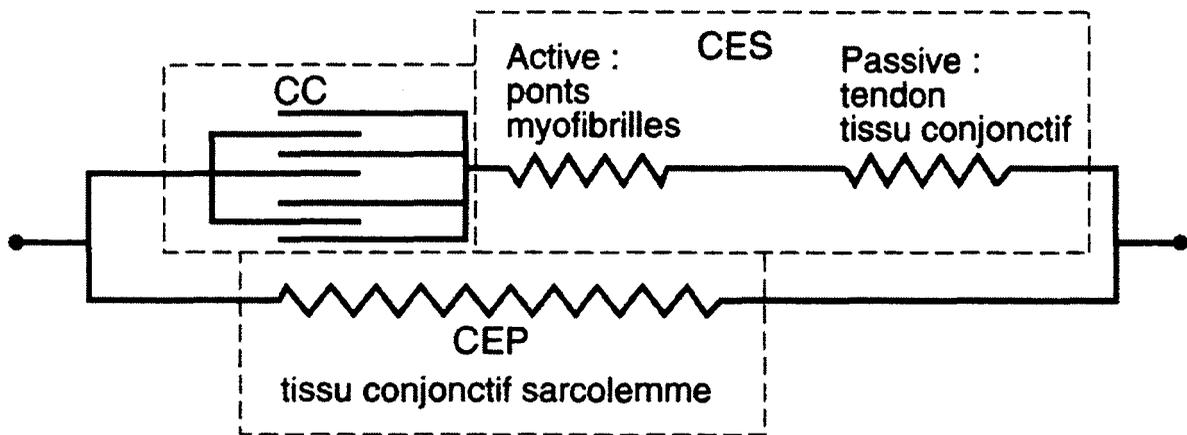


Figure 14 : Modèle musculaire à trois composantes (d'après Shorten, 1987).

CC : composante contractile.

CES : composante élastique série.

CEP : composante élastique parallèle.

A - LA CONTRACTION MUSCULAIRE

La création de la force musculaire provient de la propriété de la composante contractile à transformer l'énergie chimique en énergie mécanique. D'après la théorie d'Huxley (1957), la contraction musculaire résulte du glissement du filament fin par rapport au filament épais (théorie des filaments glissants), dû à la création cyclique de ponts d'union entre l'actine et la myosine.

La contraction musculaire est sous le contrôle direct des protéines régulatrices (tropomyosine et troponines) sensibles aux variations de concentration du calcium intracellulaire. Lorsque la fibre est au repos, le taux de calcium intracellulaire est très bas ($[Ca] = 10^{-7} M$) et le complexe tropomyosine/troponines masque par la troponine I le site de fixation de la myosine à l'actine (figure 15). Quand la concentration de calcium intracellulaire augmente ($[Ca] = 10^{-5} M$), la troponine C fixe le calcium et induit une diminution de l'affinité de la troponine I pour l'actine et renforce la liaison entre les trois sous-unités de la troponine. Ceci va provoquer un changement de conformation du complexe tropomyosine/troponines qui va basculer dans la gorge formée par le double filament d'actine et libérer ainsi le site de fixation de la myosine à l'actine (figure 15). Les cycles d'attachement/détachement de la myosine à l'actine vont pouvoir avoir lieu grâce à l'hydrolyse d'une molécule d'ATP par cycle.

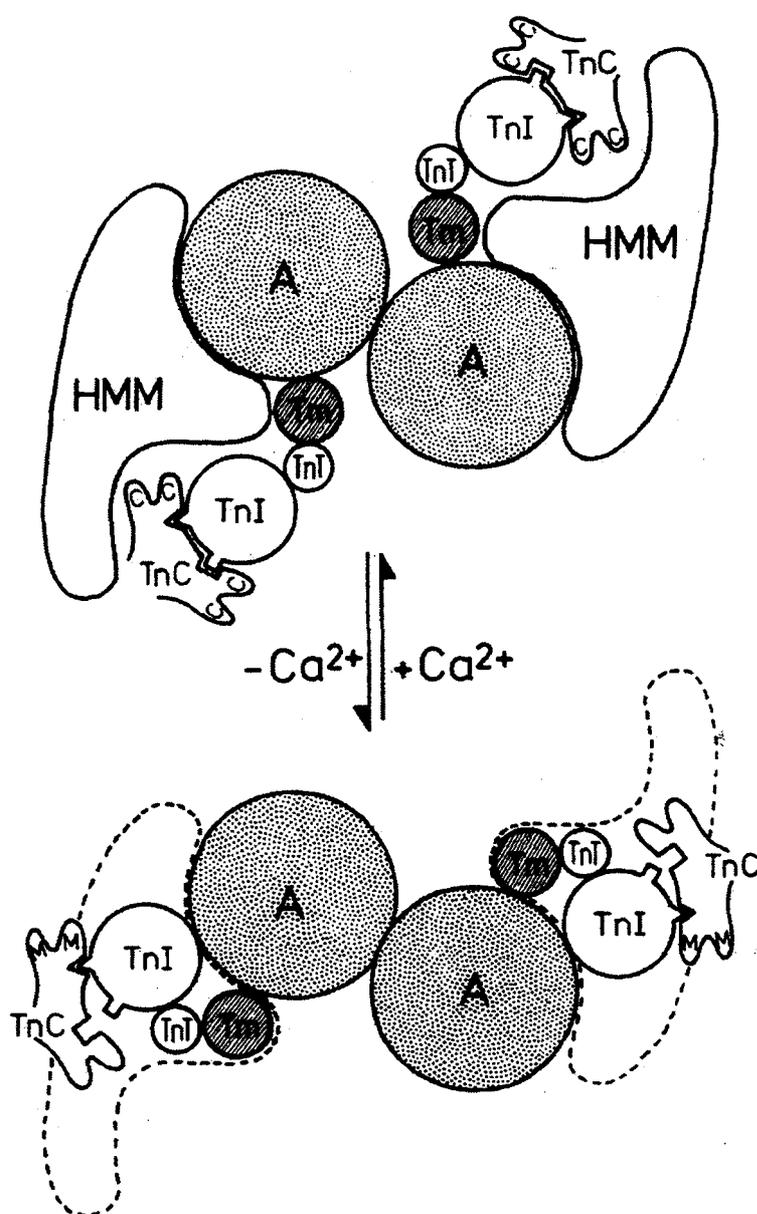


Figure 15 : Modèle de régulation de la contraction musculaire (d'après El-Saleh et coll., 1986). Au repos ($[Ca] = 10^{-7}$ M) le site de fixation de la myosine (HMM) à l'actine (A) est masqué par les protéines régulatrices qui sont la tropomyosine (TM) et les troponines (Tn). Suite à l'augmentation de la concentration interne de calcium ($[Ca] = 10^{-5}$ M), la troponine C fixe le calcium et le complexe tropomyosine/troponines bascule dans la gorge formée par le double filament d'actine et libère ainsi le site de fixation de la myosine à l'actine.

Chaque cycle, résumé à la figure 16, comporte les étapes suivantes :

- (1) La tête S1 de la myosine possède une forte affinité pour l'actine. Suite à la fixation du calcium sur la TnC, le site de fixation sur l'actine est libéré. La tête S1 de la myosine s'y fixe en formant un angle de 90° .
- (2) Libération de l'énergie d'hydrolyse de l'ATP et rotation de la tête S1 de myosine suivant un angle de 45° . Ceci provoque le déplacement du filament fin par rapport au filament épais de l'ordre de 10 nm.
- (3) Une nouvelle molécule d'ATP vient se fixer sur la tête de myosine, ce qui diminue l'affinité de l'actine pour la myosine et permet la rupture de la liaison actine-myosine.
- (4) L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi permet de repositionner la tête S1 de myosine (angle de 90°) et un nouveau cycle recommence.

La molécule d'ATP hydrolysée par l'activité ATPasique portée par la tête S1 de la myosine, constitue la source d'énergie immédiate pour la contraction musculaire. Cette source d'énergie est régénérée soit par la dégradation de la créatine phosphate (créatine phosphate + ADP + Pi \rightarrow créatine + ATP, réaction catalysée par la créatine phosphokinase), soit par l'intermédiaire de la glycolyse ou de la glycogénolyse.

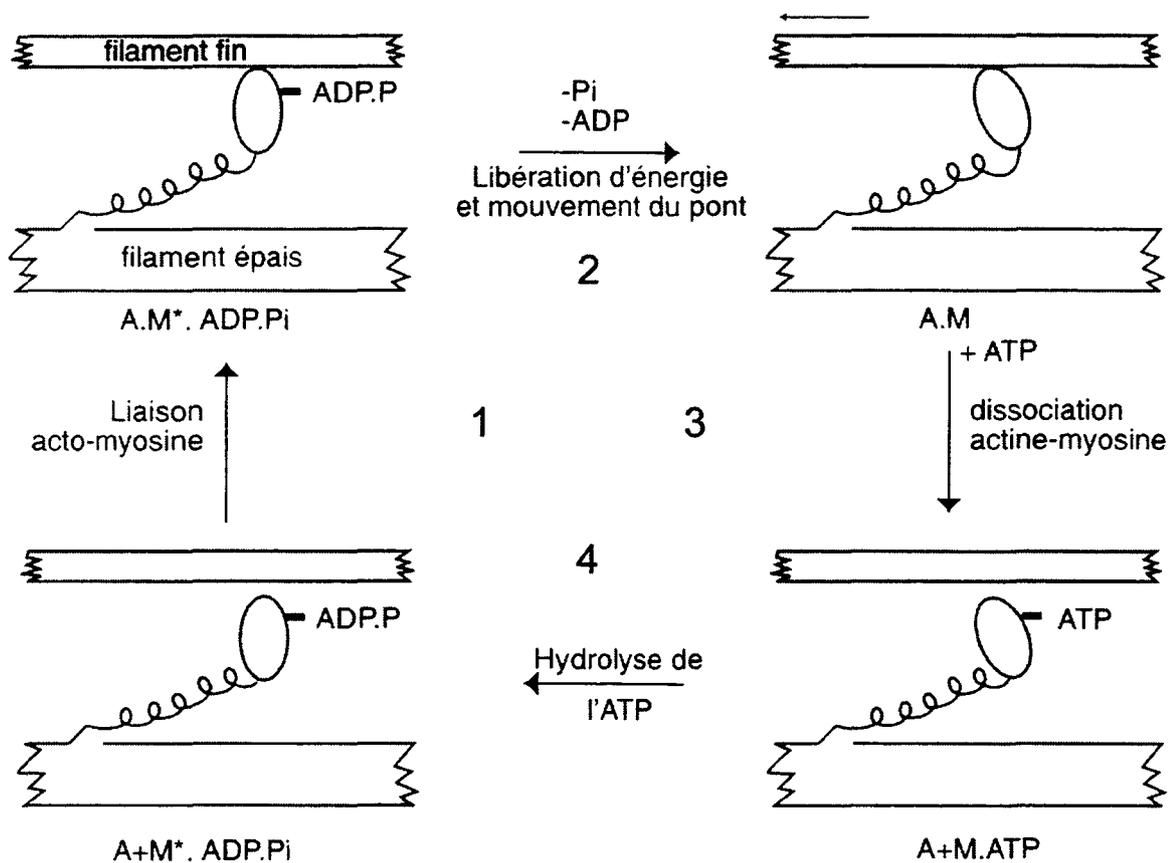


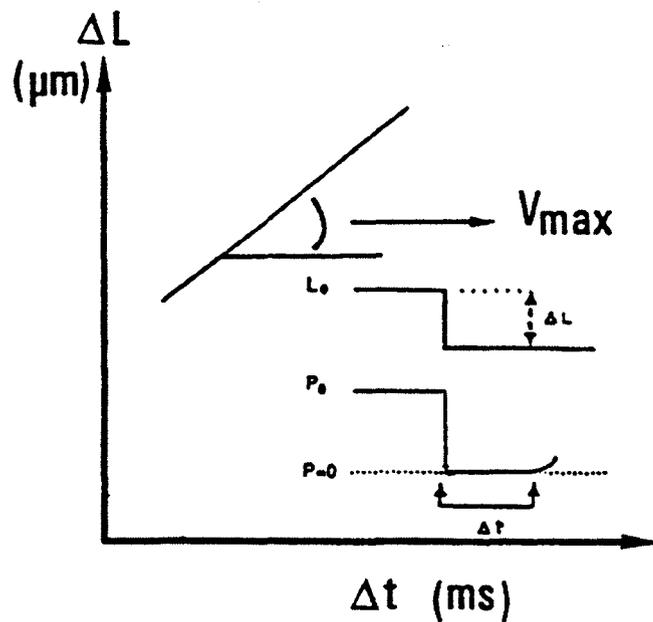
Figure 16 : Représentation schématique d'un cycle d'attachement-détachement des ponts actine-myosine lors de la contraction (d'après Lymn et Taylor, 1971).

B - VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT (V_0)

Une méthode simple pour déterminer la vitesse maximale de raccourcissement des myofilaments (V_0) sur fibre isolée a été développée par Edman (1979). Cette méthode, ou "slack test", consiste à appliquer sur une fibre en contraction isométrique maximale (P_0) une série de détentes rapides d'amplitudes variables (ΔL) induisant l'annulation de la tension P_0 . On mesure alors le temps nécessaire (Δt) pour que la fibre re-développe une tension. Ainsi, pendant la valeur de temps Δt , on peut admettre que la fibre se raccourcit contre une charge nulle. La représentation graphique de l'évolution de ΔL en fonction de Δt est une droite dont la pente représente V_0 , vitesse de raccourcissement sans charge (figure 17-A). Sur fibre isolée, Edman (1979) a montré que V_0 était peu différente de V_{max} calculée à partir de la relation force-vitesse proposée par Hill (1970).

La vitesse maximale de raccourcissement des myofilaments étant fonction de l'activité ATPasique de la tête de myosine (Barany, 1967), la grande hétérogénéité de cette protéine contractile doit entraîner des différences de V_0 tant sur muscle entier que sur fibre. Il a ainsi été montré que le type de MHC exprimée dans une fibre est corrélé à la valeur de V_0 (Reiser et coll., 1985). Les fibres lentes de type I ont une V_0 plus faible que les fibres de type rapide exprimant soit la MHC IIA, soit la MHC IIB (Larsson et Moss, 1993 ; Rome et coll., 1990 ; Sweeney et coll., 1988). Par ailleurs, Bottinelli et coll. (1991) ont montré à partir de la relation force-vitesse que la valeur de V_{max} diminue en fonction du type de MHC rapide présent dans la fibre suivant l'ordre : $V_{max, MHC IIB} > V_{max, MHC IID(X)} > V_{max, MHC IIA}$. Toutefois, ces auteurs ont décrit que les valeurs de V_{max} se recouvraient et s'épalaient sur une large gamme. Ce résultat peut s'expliquer par la co-existence de différentes isoformes de MHC dans une même fibre (Bottinelli et coll., 1994a ; Reiser et coll., 1985, 1988). Cependant, une telle variabilité des valeurs de V_0 pour les fibres de type rapide a été retrouvée pour des fibres n'exprimant qu'une seule isoforme de MHC (Bottinelli et coll., 1994b).

A



B

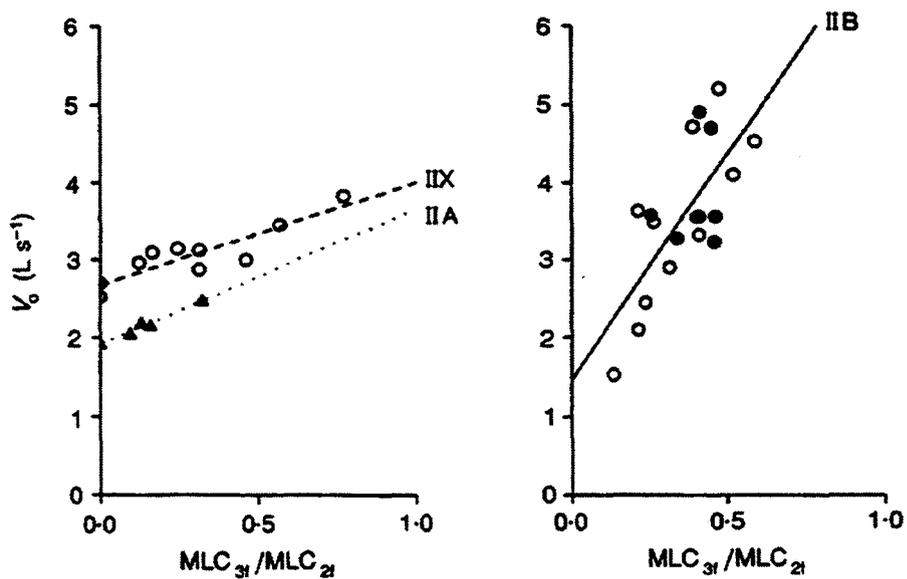


Figure 17 : A : Méthode de mesure de la vitesse maximale de raccourcissement (V_0) par la méthode du slack test.

B : Relations entre la valeur de V_0 et la composition en chaînes légères essentielles de myosine (MLC_{3f}), pour des fibres rapides ne contenant qu'une seule isoforme de chaînes lourdes de myosine (IIA, IID(X) ou IIB) (d'après Bottinelli et coll., 1994b).

Une autre interprétation pour expliquer le phénomène de variabilité de V_0 pour les fibres rapides, est de considérer une contribution des chaînes légères de myosine à la modulation de V_0 . Une étude menée sur fibre isolée par Bottinelli et coll. (1994b) a décrit l'influence de la proportion relative des chaînes légères essentielles rapides (MLC 1f et MLC 3f) sur la valeur de V_0 , en ne considérant que les fibres de type rapide ne contenant qu'une seule isoforme de MHC (IIA, IID(X) ou IIB). Ces auteurs ont ainsi pu montrer que pour les fibres de type rapide, V_0 était proportionnelle au contenu relatif en MLC 3f, lui-même trouvé plus important dans les fibres exprimant la MHC IIB que dans les fibres contenant la MHC IID(X) ou la MHC IIA (figure 17-B). Quant au rôle joué par les chaînes légères régulatrices, leur intervention est admise depuis les travaux de Larson et Moss (1993). Ces auteurs ont en effet montré que des fibres humaines exprimant la MHC IIA et uniquement la MLC 2f avaient des valeurs de V_{max} supérieures à celles de fibres de même type exprimant à la fois la MLC 2f et la MLC 2s.

D'autres protéines myofibrillaires seraient également susceptibles de moduler V_0 . C'est le cas de la troponine T (TnT), impliquée dans le processus d'activation par le calcium des fibres musculaires (Ebashi, 1980) et présentant une grande diversité moléculaire (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino, 1996). Greaser et coll. (1988) ont ainsi montré sur fibres pelées de lapin une étroite corrélation entre la valeur de V_0 et le type d'isoforme de TnT exprimé.

C - ELASTICITE INSTANTANEE. PROPRIETES ELASTIQUES DE LA CES

L'étude des propriétés élastiques de la CES, se fait en réalisant sur une fibre maintenue en contraction isométrique maximale, une série de détentes rapides d'amplitude contrôlée. Lors de l'activation, la composante contractile se raccourcit et étire la CES. Les variations de longueurs appliquées à la fibre ont pour effet une chute brutale de la tension, qui n'est attribuable qu'à la détente de la CES dans la mesure où la fibre reste contractée de façon maximale. Les mesures étant réalisées dans le domaine des extensions négatives, c'est-à-dire en détente, les résultats sont de ce fait représentés sous la forme de relations Tension/détente. Sur une fibre isolée et pelée, la CES est essentiellement composée de la fraction active localisée dans le segment S2 (modèle de Shorten).

En appliquant des perturbations de longueurs très rapides à une fibre musculaire isolée de grenouille et tétanisée à 0°C, Huxley et Simmons (1971) puis Ford et coll. (1977) ont proposé une description et une interprétation des variations transitoires de tension consécutives à la variation de longueur de la fibre.

La figure 18-A reprend les différentes phases de la relation Tension/détente :

- *la phase 1* : elle correspond à la variation de tension en réponse à la variation de longueur. La tension la plus basse alors atteinte est appelée T_1 et est une fonction linéaire de l'amplitude de la perturbation appliquée. Cette élasticité instantanée est caractérisée par une valeur de raideur donnée par la pente de la relation Tension/détente. L'intersection de la relation Tension/détente avec l'axe des abscisses permet de mesurer la valeur maximale du relâchement nécessaire pour annuler la tension (figure 18-B).

On peut remarquer que pour des détentes d'amplitude importante, les valeurs expérimentales de T_1 sont généralement plus élevées que prévu (figure 18-B). Ceci est dû à la résolution limitée de l'appareillage utilisé et au fait que la mesure est réalisée alors que le début de la phase 2 est amorcée. Pour cette raison, l'élasticité instantanée est étudiée en appliquant des variations de longueurs d'amplitudes modérées et la CES est caractérisée par la valeur de sa compliance (inverse de la raideur), donnée par l'intersection avec l'axe des abscisses du prolongement de la partie linéaire de la relation Tension/détente (courbe théorique).

- *la phase 2* : elle correspond au re-développement rapide de la tension, le niveau de tension atteint à la fin de cette phase est appelée T_2 .

- *la phase 3* : elle correspond à un maintien en plateau de la tension T_2 ; elle est suivie par une augmentation de la tension qui retourne progressivement à sa valeur isométrique maximale.

Huxley et Simmons (1971) ont proposé un modèle pour expliquer ces différentes phases (figure 18-C). Ainsi, lors d'une détente rapide la phase T_1 est attribuée à l'élasticité instantanée du fragment S2 de la tête de myosine, alors que la phase T_2 est liée à la rotation de la tête S1 qui va ré-étirer le fragment S2.

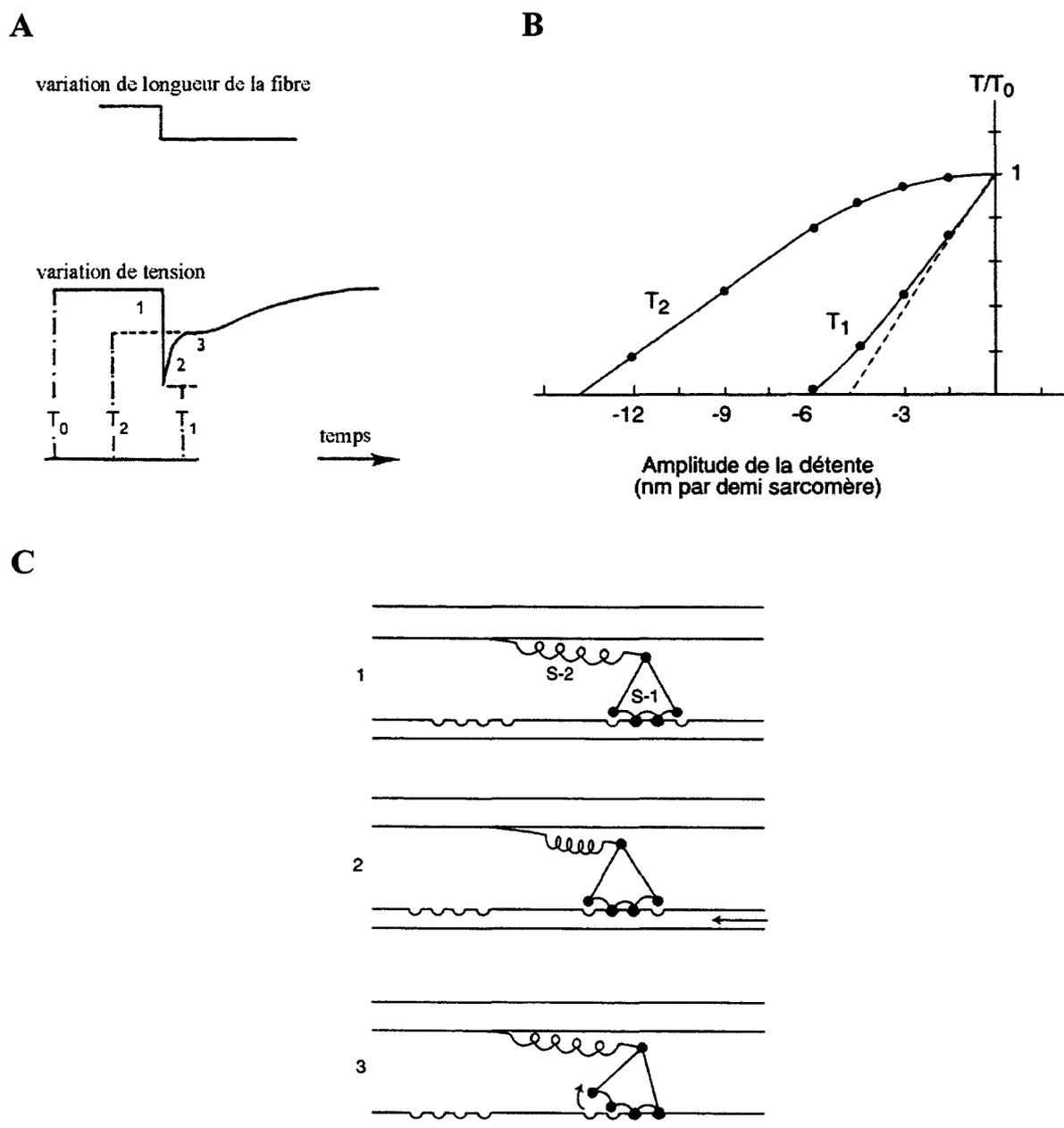


Figure 18 : A : Schématisation de la variation de tension suite à une détente rapide de la fibre durant le plateau tétanique. T_0 : tension tétanique, T_1 : tension atteinte à la fin de la détente, T_2 : tension atteinte après la phase de re-développement rapide de la tension.

B : Evolution des valeurs normalisées de T_1 et T_2 en fonction de l'amplitude de la détente. La droite en pointillés représente la courbe Tension/détente théorique ; l'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses donne la valeur de compliance moyenne de la composante élastique série de la fibre (d'après Ford et coll., 1977).

C : Modélisation de la détente rapide au niveau des ponts actine-myosine. S1 tête de la molécule de myosine, S2 élément élastique. 1 : position moyenne d'un pont durant la contraction tétanique. 2 : durant la détente rapide, l'élément S2 est détendu (phase T_1). 3 : suite à la détente rapide, la tête S1 pivote et re-étire l'élément élastique S2 (phase T_2) (d'après Huxley et Simmons, 1971).

L'éventualité d'une différence de compliance de la CES selon le type de fibre musculaire est à envisager. Dès 1965, Wells a montré sur le rat que la CES d'un muscle lent, le soleus, est à force égale plus raide que celle d'un muscle rapide, le jambier antérieur. Toutefois, sur muscle entier, le rôle joué par la fraction tendineuse n'est pas négligeable et une explication en terme de différence de longueur de tendon (Close, 1972) n'est pas à exclure. Plus tard, Bosco et coll. (1982) ont suggéré que les fibres de types I et II présentent des propriétés élastiques différentes de leur CES pour expliquer le fait que le vastus lateralis de sujets humains, riche en fibres de type II, peut emmagasiner une plus grande quantité d'énergie potentielle au cours de sauts verticaux. Par ailleurs, quelques données relatives à l'expérimentation animale vont dans le sens d'une différence d'élasticité de la CES selon le type de fibre musculaire. Ainsi, Kawai et Schachat (1984) ont montré par analyse sinusoïdale un comportement élastique différent entre des fibres musculaires de lapin de type lent et rapide. De plus, d'autres auteurs ont montré que l'augmentation de raideur du soleus de rat est associée à une augmentation de la proportion de fibres de type I, alors qu'à l'inverse une diminution de la raideur est associée à une augmentation de la proportion de fibres de type II (Goubel et Marini, 1987 ; Pousson et coll., 1991).

Cependant, à l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles concernant l'analyse des structures élastiques de fibres musculaires isolées associée à leur composition en MHC, à l'exception des travaux récents de Galler et coll. (1996) et de Galler et Hilber (1998). En appliquant des détentes rapides sur des fibres pelées de rat, ces auteurs n'ont montré aucune différence de propriété élastique entre des fibres musculaires lentes et rapides. De tels résultats amènent à interpréter avec prudence les relations Tension/détente, en tenant compte des différentes conditions expérimentales utilisées.

D - ELASTICITE PASSIVE. PROPRIETES ELASTIQUES DE LA TITINE

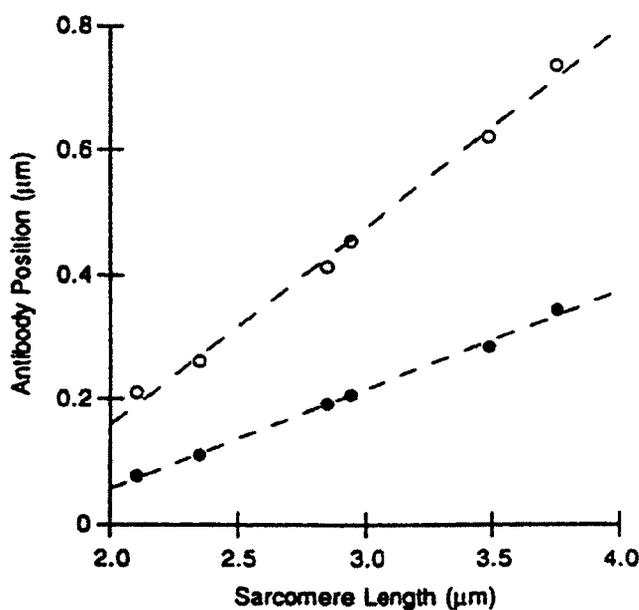
La détermination des propriétés élastiques passives d'une fibre musculaire isolée se fait en étudiant la relation entre la tension passive et la longueur de sarcomère en conditions de repos. Dans cette situation, des deux composantes élastiques (voir le modèle de Shorten), seule la CEP est sollicitée puisque la composante contractile est supposée n'offrir aucune résistance à l'étirement. Sur fibre musculaire isolée et pelée, les fractions de la CEP localisées dans le tissu conjonctif et le sarcolemme sont absentes et le comportement élastique de la fibre ne peut être attribué qu'aux propriétés élastiques de la titine.

1 - Mise en évidence des propriétés élastiques de la titine

Le rôle joué par la molécule de la titine au sein du sarcomère a été mis en évidence grâce à de nombreux travaux. Ainsi, des expériences de dégradation de cette protéine soit par irradiation soit par clivage enzymatique ou son extraction, ont été montrées comme diminuant fortement le niveau de tension passive généré par les fibres musculaires (Funatsu et coll., 1990 ; Granzier et Irwing, 1995 ; Horowitz et coll., 1986 ; Salviati et coll., 1990). Des expériences de section pratiquées à la jonction des bandes A et I du sarcomère ont clairement montré en microscopie électronique (Trombitas et coll., 1993) la rétraction de la titine jusqu'à la ligne N_1 (voir figure 11). De plus, l'observation lors d'un étirement des sarcomères, de la mobilité de certains sites de la titine marqués par des anticorps monoclonaux, a permis de déterminer d'une part l'organisation de la titine au sein des sarcomères et d'autre part, d'identifier dans la protéine des régions possédant des propriétés élastiques distinctes.

Le résultat d'une telle étude est représenté à la figure 19-A. La position de l'épitope marqué par l'anticorps SM1 voit sa position changer par rapport à la ligne Z (cercle évidé) et par rapport à l'extrémité de la bande A (cercle plein), en fonction de la longueur de sarcomère. Cette observation est en accord avec l'hypothèse qu'un élément élastique fixé à la ligne Z relie l'extrémité des filaments épais de myosine (Horowitz et coll., 1989). La figure 19-B illustre un récapitulatif des principaux anticorps monoclonaux et de leurs épitopes le long de la molécule de titine, mis en évidence par différents auteurs. Les résultats de ces travaux montrent clairement que la titine s'étend de la strie Z à la ligne M et qu'elle est liée au filament épais dans la bande A. La région de la molécule comprise dans la bande I sert de lien élastique entre la strie Z et la bande A.

A



B

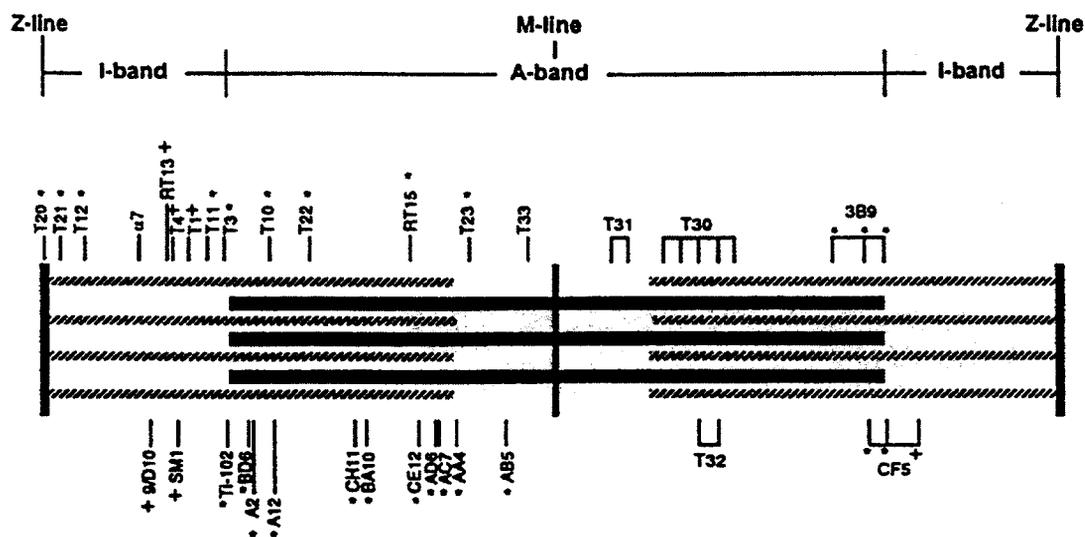


Figure 19 : A : Distance entre l'épitope marqué par l'anticorps SM1 et la ligne Z (o), ou l'extrémité de la bande A (•), en fonction de la longueur de sarcomère (d'après Horowitz et coll., 1989).

B : Représentation schématique d'un sarcomère et de la position des épitopes de différents anticorps anti-titine issus de diverses sources bibliographiques (d'après Horowitz, 1999).

2 - Étirement de la molécule de titine et relation Tension passive/longueur de sarcomère

Les travaux de Wang et coll. (1991, 1993) sur différents types de fibres musculaires, ont permis de préciser la relation entre le niveau de tension passive développé et la longueur de sarcomère. En utilisant l'anticorps RT13, ces auteurs ont montré que lorsque le sarcomère est étiré, la distance qui sépare cet épitope situé à proximité du milieu de la bande I (voir figure 19-B) par rapport à la ligne Z augmente. Toutefois, pour des longueurs de sarcomère extrêmes la pente de cette relation chute. Ainsi, la relation Tension passive/longueur de sarcomère a été divisée en 4 phases (figure 20), qui traduisent le comportement de la molécule de titine en fonction de son étirement. Dans ce modèle, la portion de la molécule comprise dans la bande I présente un comportement élastique non linéaire :

- *la phase I* : elle correspond au développement d'un niveau de tension passive nul ou faible, suite à l'étirement de la fibre à partir de sa longueur de sarcomère au repos "au slack" (SL_0). L'étirement de la molécule de titine fortement repliée sur elle-même ne produit pas d'augmentation de longueur de celle-ci.
- *la phase II* : à partir d'un point nommé SL_e , le niveau de tension passive généré augmente de manière exponentielle avec l'étirement de la fibre. Cette seconde phase correspond à l'élongation de la molécule de titine proprement dite.
- *la phase III* : on observe une rupture de l'augmentation exponentielle de la tension passive, c'est le point SL_y . Le segment de titine compris dans la bande I est complètement étiré. Tout relâchement de la fibre avant ce point produit un retour de la titine à sa longueur initiale.
- *la phase IV* : au-delà du point SL_y , tout étirement de la fibre sollicite le recrutement d'une partie de la titine comprise dans la bande A et liée à la myosine. Ceci s'accompagne par des changements irréversibles au niveau du filament de titine ainsi que d'une désorganisation au niveau des sarcomères.

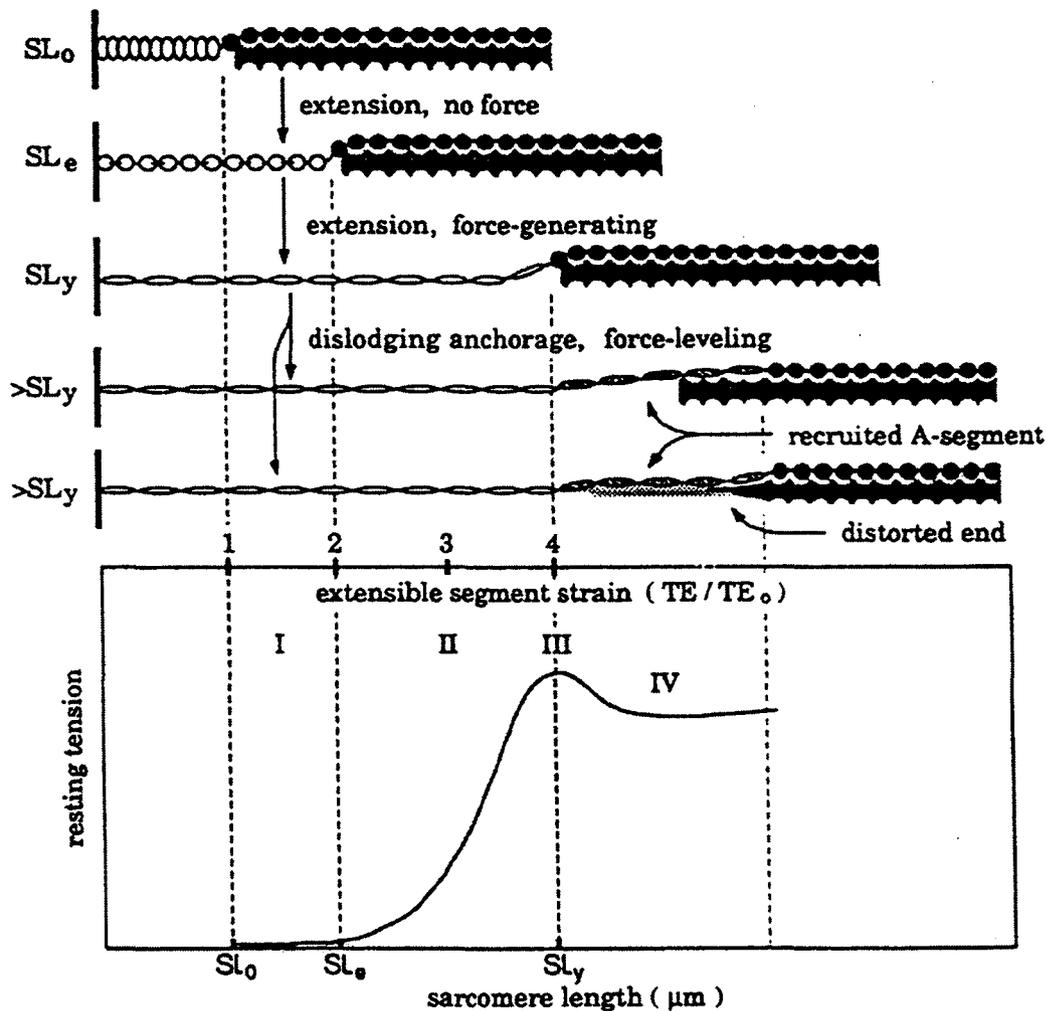


Figure 20 : Schéma représentant les différentes phases de la relation Tension passive/longueur de sarcomère en fonction de l'étirement de la molécule de titine. L'étirement progressif de la titine à partir de la longueur de sarcomère au repos "au slack" (SL₀) jusqu'au point SL_e, ne génère pratiquement pas de tension passive (phase I). A partir du point SL_e, l'extension linéaire de la titine entraîne une augmentation exponentielle de la tension passive (phase II) jusqu'au point SL_y (phase III). Au-delà du point SL_y (phase IV), tout nouvel étirement de la titine entraîne le recrutement du segment non extensible lié à la myosine dans la bande A et provoque une désorganisation irréversible de la structure de la molécule et du sarcomère (d'après Wang et coll., 1991).

La détermination de la séquence en acides aminés de la molécule de titine (Labeit et Kolmerer, 1995), a permis de décrire au niveau moléculaire le comportement élastique du segment de la molécule compris dans la bande I, en fonction des différents domaines immunoglobuline (Ig) et PEVK (figure 21). A la longueur de sarcomère au repos "au slack", les domaines Ig compris dans la bande I sont compactés. Tout étirement de la molécule provoque alors l'élongation de la chaîne polypeptidique composée par ces domaines et engendre le développement d'un faible niveau de tension passive (Gautel et Goulding, 1996 ; Granzier et Irving, 1995 ; Linke et coll., 1996 ; Trombitas et coll., 1995). Il a été démontré que ce faible niveau de tension passive ne pouvait être provoqué par le propre déploiement des domaines Ig, ces derniers étant en effet thermodynamiquement stables (Politou et coll., 1996). Pour des élongations plus importantes (figure 21), c'est l'extension du domaine PEVK qui est responsable de l'augmentation exponentielle de la tension passive (Gautel et Goulding, 1996 ; Labeit et Kolmerer, 1995 ; Linke et coll., 1996).

Ainsi, dans les conditions physiologiques, les domaines Ig et PEVK constituent deux ressorts agissant en série et sont responsables de la génération de tension passive lors de l'étirement du sarcomère. En outre, il a été également montré pour des élongations extrêmes dans des conditions non physiologiques, que la génération de tension passive peut être due au déploiement de chaque domaine Ig (Erickson, 1994 ; Trombitas et coll., 1995).

Des données récentes ont permis la modélisation du comportement élastique de la titine. En conditions physiologiques cette molécule agit comme un ressort entropique, rendant compte de l'élongation des domaines Ig et PEVK partiellement comprimés à la longueur de sarcomère au repos (Erickson, 1997 ; Kellermayer et coll., 1997 ; Rief et coll., 1997 ; Tskhovrebova et coll., 1997). Un modèle élastique (WLC : worm like chain) applicable aux biopolymères (Marko et Siggia, 1995) a été proposé pour modéliser les propriétés élastiques de la titine. Toutefois, ce concept de ressort entropique n'apparaît être un modèle valide que pour rendre compte de l'élasticité générée par l'élongation des domaines Ig (Linke et coll., 1998a ; Trombitas et coll., 1998). Ainsi, le comportement élastique du domaine PEVK a été analysé récemment (Linke et coll., 1998b) et assimilé à un ressort enthalpique. Ce dernier tire ses propriétés élastiques des interactions électrostatiques et hydrophobiques établies entre les différents acides aminés composant ce segment (Linke et coll., 1998b).

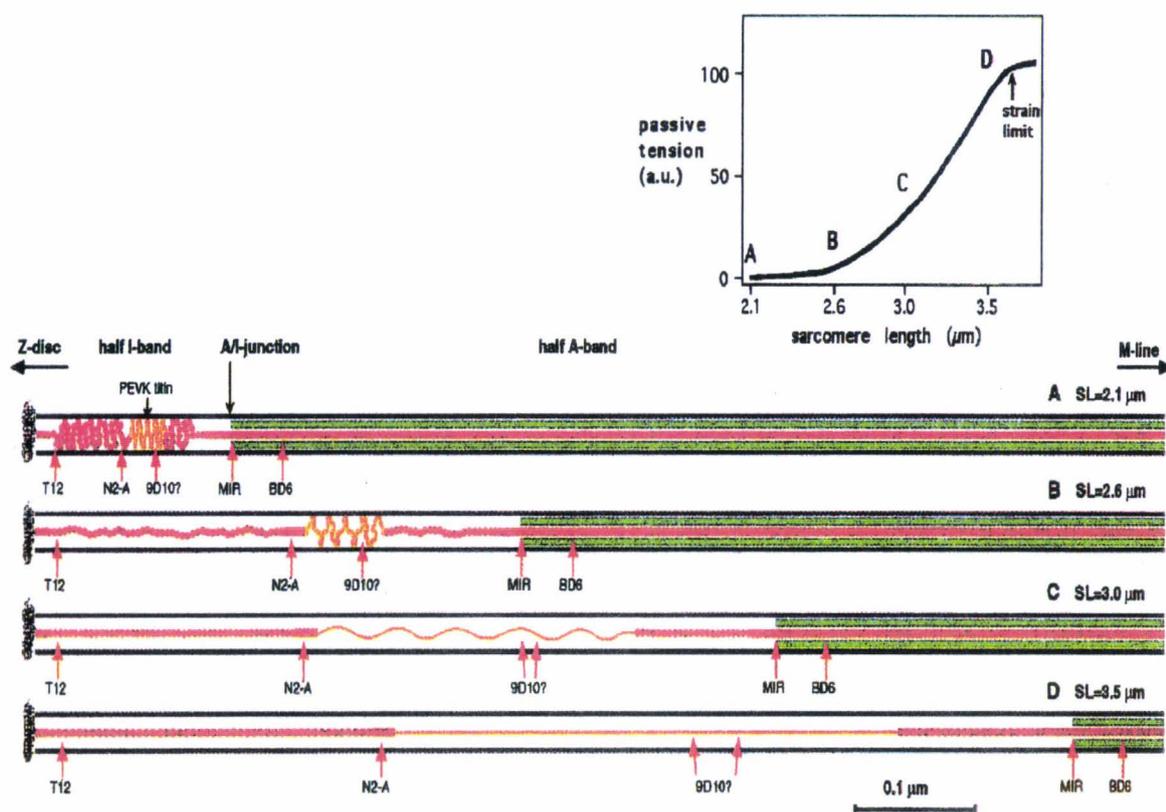


Figure 21 : Modèle moléculaire de l'extension de la molécule de titine en fonction de la longueur de sarcomère (d'après Labeit et coll., 1997).

Enfin, des travaux viennent de montrer qu'au niveau moléculaire, un domaine autre que les domaines Ig et PEVK peut également rendre compte des propriétés élastiques de la molécule de titine (Holmes et coll., 1999). Ces auteurs ont en effet montré que l'isoforme cardiaque N2-B de titine peut s'étirer d'une longueur plus importante que ne le permet la longueur totale de son segment élastique contenu dans la bande I. Ils en concluent que ce gain d'extension n'est pas dû au déploiement des domaines Ig, mais plutôt à l'extension de la séquence unique N2-B localisée entre le domaine Ig proximal (près de la partie NH₂-terminale de la titine) et le domaine PEVK (voir figure 12). Ces données viennent d'être confirmées par Linke et coll. (1999) qui proposent que l'isoforme de titine cardiaque N2-B est composée de trois éléments élastiques : les domaines Ig, le domaine PEVK et la séquence N2-B. De plus, ces auteurs suggèrent que le domaine N2-B contient à son extrémité NH₂-terminale une séquence unique qui serait directement ou indirectement impliquée dans la stabilité structurale du filament fin (Linke et coll., 1999).

3 - Tension passive et isoformes de titine

L'expression de différentes isoformes de titine rend compte des propriétés passives des fibres provenant de différents muscles squelettiques. Une étude de Wang et coll. (1991) a comparé les propriétés mécaniques passives aux isoformes de titine de fibres musculaires issues de six muscles squelettiques différents. Ces auteurs ont pu montrer que les fibres musculaires qui expriment l'isoforme de titine de plus haut poids moléculaire, développent des niveaux de tension passive plus faibles et présentent un point de rupture (point SL_y) à des longueurs de sarcomère plus élevées, que les fibres qui expriment une isoforme de titine de plus faible poids moléculaire. D'autres équipes ont confirmé le fait que des fibres musculaires qui expriment la plus petite isoforme de titine, présentent des niveaux de tension passive plus forts (Granzier et Wang, 1993a ; Horowitz, 1992 ; Linke et coll., 1996). Ainsi, les fibres contenant l'isoforme cardiaque de titine, qui est la plus petite isoforme de titine rencontrée à ce jour, développent à même longueur de sarcomère des niveaux de tension passive beaucoup plus élevés que les fibres qui expriment les isoformes squelettiques (Granzier et Irving, 1995 ; Granzier et coll., 1996 ; Linke et coll., 1994, 1996 ; Trombitas et coll.; 1995).

En outre, les variations de propriétés passives de fibres contenant différentes isoformes de titine, peuvent aisément s'expliquer par le fait que celles-ci possèdent des régions extensibles localisées dans la bande I de tailles différentes (Granzier et Irving, 1995 ; Granzier et coll., 1996 ; Linke et coll., 1996 ; Wang et coll., 1991). Cette variation de longueur des segments extensibles a d'ailleurs été confirmée par l'analyse des ADNc de titine clonés à

partir de différents muscles et serait due à des épissages alternatifs variables des domaines PEVK et Ig entre les différentes isoformes (Labeit et Kolmerer, 1995).

III - PLASTICITE MUSCULAIRE ET CHAINES LOURDES DE MYOSINE

Il est à présent bien établi que les fibres musculaires sont des structures dynamiques capables de modifier leur composition moléculaire et leurs propriétés contractiles sous l'influence de différents facteurs comme l'âge (développement et vieillissement), l'innervation, les facteurs de croissance, les hormones, l'activité neuromusculaire et la charge mécanique imposée. Les chaînes lourdes de myosine (MHC) sont des protéines particulièrement adaptées pour étudier les effets de ces différents facteurs sur le muscle. Il existe en effet une étroite corrélation entre l'isoforme de MHC exprimée et les propriétés contractiles des fibres musculaires, telles que la force développée et la vitesse maximale de raccourcissement (Reiser et coll., 1985 ; Wells et coll. 1996). Il est en outre possible, grâce à des modèles animaux, de faire varier les effets des différents facteurs influençant la régulation des MHC. Certains modèles comme l'hypodynamie-hypokinésie ou l'immobilisation plâtrée, permettent de réduire l'activité neuromusculaire tout en gardant intacte l'intégrité du système neuromusculaire. Au contraire, lors d'expériences de dénervation ou de section de la moelle, la commande nerveuse est altérée. Ces perturbations de la fonction neuromusculaire affectent particulièrement les muscles posturaux tel que le soleus et induisent une atrophie, ainsi qu'une transformation de ce muscle initialement lent dans le sens lent → rapide.

A - MICROGRAVITE REELLE OU SIMULEE

Les transformations structurales et fonctionnelles observées après une période de microgravité sont maintenant bien connues pour le système contractile. En effet, une atrophie musculaire est observée et est particulièrement marquée sur les muscles antigravitaires tels que le soleus (Oganov et coll., 1980 ; Stevens et coll., 1993 ; Thomason et Booth, 1990). Ainsi, le muscle soleus de type lent se transforme en un muscle rapide, alors que des muscles rapides tels que le plantaris, le tibialis anterior, l'extensor digitorum longus ou le gastrocnemius ne subissent quasiment pas de modification de leur contenu en protéines contractiles (Baldwin et coll., 1990 ; Diffie et coll., 1991 ; Reiser et coll., 1987 ; Thomason et

Booth, 1990). Le modèle animal d'hypodynamie-hypokinésie par suspension (Morey, 1979 ; Musacchia et coll., 1980) permet de reproduire les modifications structurales et fonctionnelles du système musculaire observées chez l'homme.

De nombreuses études utilisant des techniques histochimiques ont clairement démontré que le modèle de suspension induit dans le muscle soleus une augmentation progressive du pourcentage de fibres de type II au détriment des fibres de type I (Desplanches, 1987 ; Diffie et coll., 1991 ; Oishi et coll., 1998 ; Thomason et Booth, 1990), le nombre total de fibres restant inchangé (Templeton, 1988). Ainsi, différents auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'expression de la MHC IIA de même qu'une induction de l'expression de la MHC IID(X), isoforme jamais exprimée dans le muscle soleus de rat adulte dans des conditions normales (Campione et coll., 1993 ; Diffie et coll., 1991 ; Fauteck et kandarian, 1995 ; Leterme et coll., 1994 ; Mc Donald et Fitts, 1993 ; Oishi et coll., 1993, 1994 ; Stevens et coll., 1999 ; Takahashi et coll., 1991 ; Talmadge et coll., 1996). Par ailleurs, des études ont montré l'apparition de la MHC IIB dans le soleus après une période de microgravité réelle (Allen et coll., 1996 ; Miu et coll., 1990 ; Staron et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996), ou simulée lors d'une période de suspension (Caiozzo et coll., 1998 ; Cros et coll., 1999 ; Fauteck et Kandarian, 1995 ; Oishi et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1999). Il apparaît que ces changements sont plus importants pour des périodes de microgravité prolongée (réelle ou simulée), avec une expression accrue des isoformes de MHC IID(X) et de MHC IIB.

L'évolution de l'expression des MHC au niveau des ARN messagers (ARNm) a également été étudiée pour le muscle soleus après une période de microgravité. Certains auteurs ont montré une diminution de l'expression de la MHC I sans diminution significative de la quantité de l'ARNm correspondant, suggérant ainsi une importante dégradation de cette isoforme au niveau protéique (Caiozzo et coll., 1996a ; Stevens et coll., 1999 ; Thomason et coll., 1989). La situation semble être plus complexe pour les isoformes rapides de MHC. En effet, certains travaux ont mis en évidence l'augmentation de l'expression de la MHC IIA et de la MHC IIB, sans changement d'expression de leurs ARNm correspondants (Caiozzo et coll., 1996a ; Diffie et coll., 1991). Cependant, une étude sur le muscle soleus au cours de différentes périodes de suspension (4, 7, 15 et 28 jours) (Stevens et coll., 1999), a montré que l'évolution des MHC de type rapide à l'échelon des protéines était bien accompagnée de la modification de l'expression de leurs ARNm. Toutefois, les différentes isoformes de MHC rapides ne semblent pas être régulées de façon identique au cours de la suspension. En particulier, ces auteurs ont montré que l'expression de la MHC IIA représente une étape

précoce du processus de transformation, dans la mesure où elle est augmentée transitoirement après 7 jours de suspension, alors que l'ARNm correspondant n'atteint son maximum d'expression qu'après 15 jours. L'ensemble de ces résultats suggère donc des mécanismes complexes de régulation des transformations, deux processus intervenant en même temps lors de la suspension ; 1) l'atrophie musculaire et 2) des modifications pré et/ou post-transcriptionnelles de l'expression génétique des différentes isoformes de MHC.

L'étude sur le soleus de rat de la cinétique de l'évolution des transformations des MHC en fonction du temps de suspension (Stevens et coll., 1999), ainsi que la description de l'apparition d'un grand nombre de fibres hybrides après microgravité (réelle : Allen et coll., 1996 ; Caizzo et coll., 1996b ; Miu et coll., 1990 ; Ohira et coll., 1992 ; Staron et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996 ; simulée : Oishi et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1990, 1993 ; Talmadge et coll., 1996) suggère que, conformément à l'hypothèse présentée par Pette et Staron (1997) dans le cas d'une transformation rapide → lent après électrostimulation, les transitions de MHC ont lieu dans l'ordre séquentiel suivant : MHC I → MHC IIA → MHC IID(X) → MHC IIB. Toutefois, l'observation de fibres hybrides co-exprimant les isoformes de MHC I et de MHC IID(X) après suspension (Allen et coll., 1996 ; Caiozzo et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996) ou après action combinée de la suspension et de l'hormone thyroïdienne T3 (Caiozzo et coll., 1998 ; Haddad et coll., 1998) apparaît être en contradiction avec le schéma classique de l'expression séquentielle des isoformes de MHC décrit précédemment et suggère plutôt une expression simultanée de certaines isoformes de MHC. Enfin, les travaux de Stevens et coll., (1999) ont montré une expression transitoire de la MHC I α (au niveau protéique et ARNm) dans les fibres de soleus de rats. Cette isoforme caractéristique des fibres intrafusales, pourrait représenter une étape de transition supplémentaire entre la MHC I et la MHC IIA (Peuker et coll., 1999).

B - TENOTOMIE ET IMMOBILISATION EN POSITION RACCOURCIE

La ténotomie est l'un des premiers modèles utilisés pour l'étude de l'inactivité musculaire. En effet, la section du tendon entraîne le raccourcissement du muscle : ce dernier n'étant plus soumis à aucune tension s'atrophie (Jakubieck-Puka et coll., 1992 ; McLachlan, 1981 ; Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992 ; Vrbova, 1963). Cette atrophie serait plus importante pour un muscle lent tel que le soleus que pour un muscle rapide (Jakubieck-Puka et coll., 1992). Après ténotomie, la jonction nerf-muscle reste intacte, mais une baisse de l'activité des motoneurones est observée suite à la diminution de l'activité du système afférent (Jozsa et coll., 1988 ; Vrbova, 1963). Par ailleurs, la position raccourcie entraîne la réorganisation du système contractile avec une diminution du nombre de sarcomères (Baker et Hall-Craggs, 1978 ; Jakubiec-Puka et Carraro, 1991 ; Williams et Goldspink, 1973).

L'analyse électrophorétique du contenu en MHC indique pour le muscle soleus une diminution de la proportion de MHC I (Jakubieck-Puka et coll., 1992 ; Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992). En outre, l'isoforme de MHC embryonnaire n'a jamais été détecté dans ce muscle après ténotomie (Jakubieck-Puka et coll., 1992).

L'immobilisation en position raccourcie est également responsable du développement d'une atrophie musculaire (Goldspink, 1977 ; Nonaka et coll., 1997 ; Spector, 1982 ; Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992). Le muscle soleus semble être plus touché qu'un muscle de type rapide (Booth, 1982 ; Fitts et coll., 1986). De plus, il a été montré que le soleus maintenu en position raccourcie s'adapte en diminuant le nombre de sarcomères en série (Heslinga et coll., 1995). Par ailleurs, contrairement à l'atrophie développée après suspension, une désorganisation des myofibrilles situées en position centrale est observée en microscopie électronique (Nonaka et coll., 1997).

L'analyse au niveau des ARNm indique une augmentation des ARNm codant pour la MHC IIB après seulement trois jours d'immobilisation en position raccourcie du muscle soleus (Loughna et coll., 1990), accompagnée d'une diminution de la quantité des ARNm codant pour la MHC I (Goldspink et coll., 1992). D'une manière générale l'immobilisation en position raccourcie d'un muscle lent tel que le soleus, provoque la sur-expression des ARNm codant les MHC de type rapide et une diminution de l'expression des ARNm codant pour la MHC I. Pour des muscles rapides tels que le plantaris ou le gastrocnemius, l'immobilisation en position raccourcie induit la diminution de l'expression des ARNm codant pour la MHC IIA (Jänkälä et coll., 1997 ; Nonaka et coll., 1997). Une étude récente sur le soleus a montré

que les ARNm codant pour la MHC IID(X) sont les premiers à être sur-exprimés (Jänkälä et coll., 1997), résultat déjà obtenu sur le soleus en réponse à différents stimuli (Caiozzo et coll., 1996a). Contrairement aux changements observés au niveau des ARNm, les changements au niveau protéique sont plus lents. Ainsi, après 4 jours d'immobilisation du soleus en position raccourcie, certains auteurs n'indiquent aucun changement du contenu en MHC (Szczepanowska et Jakubiec-Puka, 1992). Ce résultat s'explique par la durée trop courte des périodes étudiées comparée au "turn-over" des protéines (Booth, 1988).

Le facteur déterminant de ces transformations du muscle soleus dans le sens lent → rapide semble être la charge qui est diminuée en position d'immobilisation raccourcie. Mais contrairement au modèle de suspension celle-ci n'est pas complètement supprimée, ce qui explique des modifications structurales et fonctionnelles plus lentes. Le rôle joué par l'information nerveuse dans ces transformations n'est pas à exclure. En effet, des expériences de suspension couplées à l'immobilisation en position étirée du muscle soleus (Leterme et coll., 1994) empêchent à la fois l'atrophie et la conversion du soleus vers un type rapide, généralement observées après suspension. De même, il a été montré que l'immobilisation du muscle soleus en position raccourcie sur des animaux nouveaux nés (Picquet et coll., 1998) retardait la maturation post-natale de ce muscle encore sous innervation de type polyneurale. Au contraire, une immobilisation du muscle soleus ayant acquis son innervation monosynaptique, induit sa transformation vers un type rapide (Picquet et coll., 1998).

C - DENERVATION

Les propriétés des fibres musculaires dépendent de l'activité électrique délivrée par les motoneurones (Alford et coll., 1987 ; Blewett et Elder, 1993). L'élimination chirurgicale de l'activité neuromusculaire a pour effet d'induire une atrophie musculaire et d'altérer les propriétés phénotypiques des muscles cibles. Par ailleurs, la dénervation ne permet pas l'action des facteurs neurotrophiques sur le muscle. Ces substances semblent influencer les caractéristiques biochimiques et mécaniques du muscle (Roy et coll., 1996 ; Szczepanowska et coll., 1998) mais les mécanismes d'action restent à déterminer. Bien que les effets de la dénervation soient fonction de l'âge et de l'espèce étudiée (Gutmann et coll., 1972), celle-ci conduit généralement à l'altération des propriétés contractiles aussi bien des muscles de type rapide que des muscles de type lent. Ainsi, chez le rat et le lapin, un muscle rapide tel que

l'extensor digitorum longus (EDL) acquiert des caractéristiques de muscle lent, alors qu'un muscle lent tel que le soleus devient rapide (Gutmann et coll., 1972 ; Syrový et coll., 1972). Ces modifications des propriétés contractiles correspondent à des changements d'expression des isoformes de MHC (Ansved et Larsson, 1990 ; D'albis et coll., 1994 ; Schiaffino et coll., 1988). Cependant, certains travaux sur le rat ont souligné des nuances dans le degré de transformation entre un muscle rapide et un muscle lent. Ainsi, la dénervation effectuée sur l'EDL conduit à la persistance de MHC de type rapide, mais présente une diminution de l'expression de la MHC IIB au profit de la MHC IIA (Jakubiec-Puka et coll., 1990, 1999). Par contre, la dénervation du soleus induit une diminution de l'expression de la MHC I au profit de la MHC IIA (Jakubiec-Puka et coll., 1990 ; Midrio et coll., 1992).

Il apparaît par ailleurs que l'augmentation d'expression des isoformes rapides de MHC est fonction de la durée de la dénervation (Gundersen, 1985 ; Huey et Bodine, 1998 ; Jakubiec-Puka, 1990). Les auteurs décrivent généralement sur le soleus après deux semaines de dénervation une diminution d'expression de la MHC I et une augmentation d'expression de la MHC IIA. Toutefois, dans un grand nombre de ces études, les isoformes de MHC IIA et IID(X) ne sont pas séparables par la méthodologie utilisée. Il est donc possible que l'augmentation de l'expression des isoformes de type rapide concerne également l'isoforme IID(X). Ainsi, des travaux récents ont mis en évidence une augmentation de l'expression de l'isoforme de MHC IID(X) dans le muscle soleus de rat après dénervation (Huey et Bodine, 1998 ; Jakubiec-Puka et coll., 1999 ; Talmadge et coll., 1995a).

A côté de ces exemples de réponse spécifique à l'espèce sur la distribution des isoformes de MHC, il apparaît également après dénervation des cas d'expression de certaines isoformes de MHC normalement non présentes dans les fibres musculaires adultes. Ainsi, certains auteurs ont mis en évidence la présence des isoformes de MHC embryonnaire et néonatale après dénervation (Bacou et coll., 1996 ; Haddad et coll., 1997 ; Schiaffino et coll., 1989). Hämäläinen et Pette (1994, 1997) ont également pu mettre en évidence après la dénervation du muscle EDL de lapin, l'expression de l'isoforme de MHC I α , alors que celle-ci est normalement exprimée dans le cœur. L'apparition de cette isoforme a récemment été décrite dans le muscle soleus de rat comme étape intermédiaire dans la conversion des fibres lentes vers un type rapide après suspension (Stevens et coll., 1999).

De nombreuses études se sont intéressées à l'évolution de l'expression des isoformes de MHC après dénervation, mais à ce jour seule une étude a analysé à la fois le contenu en ARNm et l'expression protéique des isoformes de MHC correspondantes sur un muscle lent et un muscle rapide (Huey et Bodine, 1998). Ces auteurs ont ainsi pu montrer sur le soleus de

rat une diminution des ARNm codant pour la MHC I et sur le tibialis anterior (TA) une diminution des ARNm codant pour la MHC IIB dès 4 jours de dénervation. Après 7 jours de dénervation, les muscles soleus et TA présentent une augmentation des ARNm codant pour la MHC IIA. Par ailleurs, pour le muscle soleus, le taux d'ARNm codant pour l'isoforme de MHC IID(X) n'apparaît qu'après 30 jours de dénervation alors qu'au cours de la suspension celui-ci augmente dès le 4^e jour (Stevens et coll., 1999). Enfin, Huey et Bodine (1998) ont pu mettre en évidence que ces changements précoces au niveau de l'expression des ARNm après dénervation n'étaient pas suivis par les changements correspondants au niveau protéique. Ainsi, le soleus ne présente une diminution de la MHC I et une augmentation de la MHC IIA qu'après 7 jours de dénervation. L'augmentation de MHC IID(X) apparaît quant à elle au bout de 30 jours. De plus, pour le tibialis anterior, aucun changement significatif au niveau protéique entre les différentes isoformes de MHC n'est observé tout au long des 30 jours de dénervation. Ces résultats suggèrent une adaptation des mécanismes de la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, soit en diminuant la stabilité des ARNm, soit en augmentant le "turn-over" des protéines nouvellement synthétisées.

D - SUPPRESSION PHARMACOLOGIQUE DU MESSAGE NERVEUX

A l'inverse de la dénervation, l'application locale de tétrodotoxine (TTX) sur un nerf périphérique permet de différencier le rôle joué par le message nerveux de celui joué par les substances trophiques transportées par le flux axonal. En effet, cette toxine empêche la propagation des potentiels d'action nerveux par l'inactivation spécifique des canaux sodiques, sans altérer le transport axoplasmique rapide (Betz et coll., 1980). Toutefois, l'effet de cette toxine sur le transport axoplasmique lent et rétrograde n'est actuellement pas connu (Talmadge et coll., 1995b). Le traitement par la TTX permet d'étudier les conséquences d'une inactivité musculaire sur les changements des propriétés musculaires indépendamment d'autres influences physiologiques. En effet, alors que l'expression des protéines myofibrillaires est sous le contrôle étroit de l'activité neuromusculaire (Pette et Vrbova, 1985, 1992), l'influence des facteurs neurotrophiques sur l'expression de ces protéines myofibrillaires est également suggérée (Gunning et Hardeman, 1991 ; Salviati et coll., 1986a). Bien que très peu de données soient disponibles concernant les effets de la TTX sur l'expression des MHC, Spector (1985a, 1985b) a observé sur le muscle soleus une augmentation du pourcentage de fibres de type II après 2 et 4 semaines d'administration de

TTX. Il existe des similitudes entre la réponse du muscle soleus suite à l'administration de TTX et les résultats d'expériences de dénervation ou après une période de suspension (Falempin et Fodili, 1995). Outre l'atrophie sévère des fibres musculaires (Dunn et Michel, 1999), l'isoforme de MHC IID(X) est également exprimée dans ce muscle (Dunn et Michel, 1999 ; Midrio et coll., 1998) et est préférentiellement co-exprimée avec les isoformes de MHC I et de MHC IIA (Dunn et Michel, 1999). De plus, l'isoforme de MHC embryonnaire semble également être exprimée dans le muscle soleus après administration de TTX (Dunn et Michel, 1999 ; Midrio et coll., 1998 ; Schiaffino et coll., 1988). Ces résultats soulignent l'importance du rôle du message nerveux dans le maintien des propriétés fonctionnelles du muscle, mais suggèrent également des mécanismes de régulation cellulaire spécifiques pour les différentes isoformes de MHC.

E - SECTION ET ISOLEMENT DE LA MOELLE EPINIÈRE

Les expériences de section et d'isolement de la moelle épinière sont des modèles de dénervation dans lesquels la connection nerf-muscle est préservée, autorisant l'influence des facteurs neurotrophiques. Lors de la section de la moelle au niveau thoracique, on observe une diminution de l'activité électromyographique des muscles innervés en dessous de la section (Alaimo et coll., 1984). L'isolement de la moelle épinière consiste en la section de celle-ci au niveau thoracique et sacral, accompagnée d'une dé-afférentation bilatérale complète entre les sites de section. Cette opération induit l'absence totale de tonus musculaire et d'activité électromyographique (Pierotti et coll., 1991 ; Steinbach et coll., 1980).

L'effet majeur des expériences de section de la moelle est la transformation des muscles vers un type plus rapide. Ainsi, chez le chat certains auteurs ont observé par analyse histochimique une augmentation des fibres de type II dans les muscles soleus et gastrocnemius (Jiang et coll., 1990a, 1990b ; Mayer et coll., 1984). De même, par analyse électrophorétique Talmadge et coll. (1993) trouvent la présence de MHC IIA et de MHC IIB dans le muscle soleus de chat après 6 mois de section de la moelle, bien que l'isoforme prédominante reste l'isoforme de MHC I. Une adaptation plus complète vers un typage rapide a lieu pour le muscle soleus de rat. Ainsi un an après la section de la moelle, le pourcentage de fibres de type II de ce muscle atteint 98 % (Lieber et coll., 1986a). Par contre, aucun changement de composition ne semble avoir lieu pour le muscle EDL (Lieber et coll., 1986a, 1986b). Des études combinant la séparation électrophorétique et l'analyse immunochimique

des isoformes de MHC, ont montré après 15 jours de section de la moelle pour le muscle soleus de rat une augmentation du pourcentage de MHC IID(X) accompagnée d'une diminution du contenu en MHC IIA. Aucune modification de proportion n'a été observée pour la MHC I (Roy et coll., 1993 ; Talmadge et Roy, 1995a). Par contre, après un mois de section de la moelle, ces auteurs décrivent une diminution de la proportion de la MHC I accompagnée d'une plus forte expression de MHC IID(X) et de l'apparition d'une faible proportion de MHC IIB. Un grand nombre de fibres hybrides co-exprimant la MHC I avec une ou plusieurs MHC rapides est retrouvé comme au cours d'une période de suspension, suggérant la transformation séquentielle du type lent vers le type rapide (Pette et Staron, 1997). Toutefois, cette conclusion doit être modulée car certaines fibres exprimant la MHC I semblent avoir la capacité d'exprimer la MHC IID(X) sans exprimer la MHC IIA (Roy et coll., 1993 ; Talmadge et coll., 1995a). La faible proportion de MHC IIB trouvée dans le muscle soleus de rat un mois après une section de la moelle suggère une transformation incomplète de ce muscle vers un type rapide. Aucune étude n'ayant été réalisée pour identifier les effets à long terme de la section de la moelle sur un muscle lent ou rapide de rat, il est nécessaire de se reporter aux études sur des sujets humains atteints de lésions de la moelle. Il a ainsi été observé une diminution de la capacité oxydative des fibres de type II, ce qui suggère leur conversion en des fibres probablement de type IIB (Martin et coll., 1992). Par ailleurs, chez ces patients, la plupart des fibres sont capables de se transformer en des fibres de type IIB et le degré de transformation est fonction de la durée de la lésion.

Si quelques données sont disponibles chez l'homme, aucun animal autre que le chat n'a été soumis à des expériences d'isolement de la moelle épinière. Graham et coll. (1992) ont montré que le muscle soleus de chat présentait après 6 mois d'isolement de la moelle une augmentation du pourcentage des fibres de type II. Toutefois, alors qu'avec ce modèle toutes les fibres musculaires sont inactives, seule la moitié des fibres de soleus se transforme vers un type rapide. Cette observation est similaire à celle faite lors d'expériences de section de moelle chez le chat, où quelques fibres gardent une activité électrique. Il semble que certains facteurs autres que ceux liés à l'activité neuromusculaire influencent l'expression du type de MHC dans le soleus. D'autres muscles de la patte (plantaris, vastus intermédiaire, semi-tendineux, quadratus femoris et gastrocnemius médium) présentent également une augmentation du pourcentage de fibres rapides accompagnée d'une diminution du nombre de fibres lentes (Jiang et coll., 1991 ; Roy et coll., 1992). Par ailleurs, il a également été montré dans le muscle soleus l'apparition d'isoformes de MHC développementales accompagnant

l'augmentation d'expression des isoformes de MHC IIA et de MHC IIB (Talmadge et coll., 1993). Ainsi, l'absence d'activité neuromusculaire qui résulte de l'isolement de la moelle, induit chez le chat la transformation des muscles lents et rapides vers un typage plus rapide avec l'augmentation de l'expression des isoformes de MHC IIA et de MHC IIB. Les muscles lents posturaux tels que le soleus semblent subir les transformations les plus fortes.

L'ensemble de ces données indique que le système musculaire est capable de modifier son phénotype (transitions type lent ↔ rapide) pour répondre à des stimuli liés aux caractéristiques propres du muscle ou à son environnement. Cette plasticité du muscle squelettique est non seulement basée sur la grande diversité des types de fibres mais également sur l'existence d'une multitude de protéines composant ces fibres. La notion de plasticité musculaire repose sur la quantité (équilibre synthèse/dégradation) et le polymorphisme des protéines myofibrillaires et en particulier celui des chaînes lourdes de myosine.

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

A - MODELE D'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE

1 - Animaux

Le modèle d'hypodynamie-hypokinésie est utilisé dans nos protocoles pour induire une atrophie musculaire sur des rats mâles de souche Wistar pesant entre 260 et 300 g. Ce modèle a été mis au point par Morey (1979) pour mimer les effets de l'absence de pesanteur sur le système musculo-squelettique de rat. Dans ce modèle, les animaux sont suspendus par la queue durant une période de 14 jours afin que les pattes postérieures de l'animal ne supportent plus le poids du corps. Une atrophie musculaire se développe sur les muscles posturaux alors non sollicités. Un système de poulie permet aux animaux de se déplacer sur les pattes antérieures et d'accéder librement à l'eau et à la nourriture.

2 - Muscles étudiés

Deux muscles sont utilisés dans cette étude. L'un, le soleus, muscle extenseur de la cheville, est un muscle postural de type lent. Il est composé majoritairement de fibres de type I (84 %) et minoritairement de fibres de type IIA (16 %) (Delp et Duan, 1996). Ce muscle est particulièrement affecté lors d'une atrophie résultant de la non-utilisation des membres postérieurs.

L'autre muscle étudié est l'extensor digitorum longus (EDL), muscle fléchisseur de la cheville, qui est un muscle de type rapide. Ce muscle est essentiellement composé de fibres rapides de type IIB (38 %), IID(X) (38 %), IIA (20 %) et contient un faible pourcentage de fibres de type I (4 %) (Delp et Duan, 1996). Ce muscle nous servira de témoin pour la détermination des propriétés contractiles et élastiques de fibres musculaires rapides. Il nous permettra également d'identifier sur les gels d'électrophorèse les niveaux de migration des isoformes rapides de la myosine, des protéines régulatrices et de la titine.

B - MODELE DE DEGENERESCENCE DU MOTONEURONE

1 - Animaux

Des souris atteintes d'une maladie dégénérative du motoneurone ont été utilisées. Ces souris présentent la mutation autosomique récessive wobbler. Elles nous ont été fournies par le Docteur F. Rieger (INSERM, Laboratoire de Neuromodulations Interactives et Neuropathologies, Paris).

Chez les animaux atteints, on observe dès la quatrième semaine post-natale une atrophie musculaire qui touche principalement les muscles du cou et des pattes antérieures. Elle s'étend ensuite progressivement aux muscles des membres inférieurs (Duchen et coll., 1966, 1968). Les animaux mutants sont issus d'une souche de souris C57BL/6J, ils sont homozygotes (wr/wr) pour le gène wobbler (wr), et sont identifiés sur la base de signes cliniques. Les animaux wobbler sont plus petits que leurs congénères et présentent un tonus musculaire diminué. De plus, leur démarche est incertaine et l'agrippage des pattes avant est particulièrement affecté (Duchen et coll., 1968). Au niveau neurologique, on observe dans la corne ventrale de la moelle épinière cervicale une dégénérescence neuronale de type vacuolaire, accompagnée d'une diminution du nombre de motoneurones (Baulac et coll., 1983 ; Blot et coll., 1995 ; Duchon et coll., 1966, 1968). Les travaux de Hantaz-Ambroise et coll. (1994), puis de Blondet et coll. (1995) ont montré une augmentation de réactivité des cellules gliales qui progresse avec la maladie. Enfin Hantaz-Ambroise et coll. (1994) ont suggéré un dysfonctionnement du mécanisme régulant la synthèse de la glutamine dans les astrocytes des animaux wobbler, et une modification dans la distribution des récepteurs au glutamate a été mise en évidence par Tomiyama et coll. (1994).

Les animaux issus de la même portée que les mutants mais présentant un phénotype normal (+/wr ?) sont utilisés comme témoins. L'étude de la maladie est réalisée d'une part sur des animaux âgés de 5 semaines, âge à partir duquel les premiers signes cliniques sont clairement décelables et d'autre part sur des animaux âgés de 7 semaines, âge où les signes cliniques sont bien affirmés (Duchen et coll., 1968).

2 - Muscles étudiés

Deux muscles sont choisis pour ce travail. Le sternocleidomastoïd (SCM), qui est un muscle à la base du cou particulièrement affecté lors de la maladie et le soleus, muscle postural de la patte postérieure qui est atteint plus tardivement et à un degré moindre (Duchen et coll., 1968).

C - PRELEVEMENTS

Les prélèvements musculaires sont réalisés sur des animaux anesthésiés à l'éthylcarbamate (30 mg/kg). Les animaux sont ensuite sacrifiés par injection d'une dose mortelle d'anesthésique.

1 - Animaux suspendus

Sur les animaux contrôles, les muscles soleus et EDL sont prélevés, ce dernier servant de témoin de muscle rapide. Sur les animaux suspendus, seuls les muscles soleus sont prélevés. Chaque muscle est divisé en 2 parties, la première (1/3) est congelée dans l'isopentane refroidi par l'azote liquide, puis stockée à -80°C en vue d'une analyse biochimique. La deuxième partie (2/3) est soumise au protocole de pelage. Des fibres musculaires sont isolées à partir de ces biopsies dans le but d'étudier leurs propriétés contractiles et élastiques, avant d'analyser leur contenu en protéines myofibrillaires par électrophorèse.

2 - Souris wobbler

La dégénérescence des motoneurones affecte de manière bilatérale les muscles des animaux wobbler (Duchen et coll., 1968). Un muscle SCM et un muscle soleus sont prélevés sur chaque animal et congelés dans l'isopentane en vue d'une analyse biochimique. Les deux autres muscles sont soumis au protocole de pelage. Des fibres musculaires sont isolées à partir de chaque biopsie et leurs propriétés contractiles sont étudiées en relation avec leur contenu en chaînes lourdes de myosine.

D - PRINCIPE DU PELAGE

Le protocole utilisé est un pelage chimique à l'EGTA (éthylène glycol bis [β aminoéthyl éther N, N' tetra-acide acétique]), agent chélateur des cations bivalents qui perméabilise le sarcolemme des muscles striés squelettiques sans altérer les structures sous-jacentes (Eastwood et coll., 1979). Ainsi, l'utilisation de fibres musculaires pelées (sarcolemme perméabilisé) permet d'avoir un accès direct aux protéines contractiles et de déterminer leurs caractéristiques d'activation par les ions calcium.

Le protocole de pelage utilisé au laboratoire (Mounier et coll., 1989) est une version simplifiée de la technique de Wood et coll. (1975). Après prélèvement, chaque biopsie est fragmentée dans le sens longitudinal des fibres en 2 ou 3 morceaux, et immédiatement transférée dans la solution de pelage à 0°C. Quatre heures plus tard, la solution de pelage est renouvelée par de la solution fraîche et la biopsie est laissée 24 heures à 0°C. Le lendemain, un deuxième rinçage complète la procédure et les biopsies sont transférées dans une solution de conservation contenant du glycérol, ce qui permet de les garder à - 20°C pendant 2 mois. Pour la détermination des propriétés passives des fibres musculaires de rat, les biopsies ne sont gardées que 2 semaines après prélèvement. De cette manière, on évite une détérioration trop importante de la titine, protéine particulièrement sensible aux protéases (Granzier et Wang, 1993b).

De plus, pour éviter toute dégradation protéique, les solutions de pelage et de conservation contiennent les inhibiteurs de protéase suivants : leupeptine (20 µg/ml), aprotinine (5 µg/ml) et pepstatine A (1 µg/ml).

II - MESURE DES PROPRIETES CONTRACTILES ET ELASTIQUES DES FIBRES MUSCULAIRES

A - ISOLEMENT ET MONTAGE

Chaque expérimentation se fait dans une pièce dont la température est maintenue à $19 \pm 1^\circ\text{C}$. A partir de chaque biopsie, un nombre variable de fibres musculaires (2-3 mm long) peut être isolé à l'aide de pinces fines sous binoculaire. Pour chaque fibre isolée, un fil de soie est noué à l'une de ses extrémités et l'ensemble est transféré dans une cuve expérimentale contenant de la solution relaxante R.

Le fil de soie est fixé par un système de clip sur le bras d'un vibreur électromagnétique (Cambridge Technology Inc, Watertown, USA ; modèle 6350) dont le système d'asservissement est piloté par ordinateur. L'autre extrémité de la fibre est collée (grâce à de l'acétate de cellulose dissous dans de l'acétone) à un crochet monté sur une jauge de contrainte (AE 801, AME, Horton, Norway ; fréquence de résonance dans l'air 4.52 kHz) (figure 22).

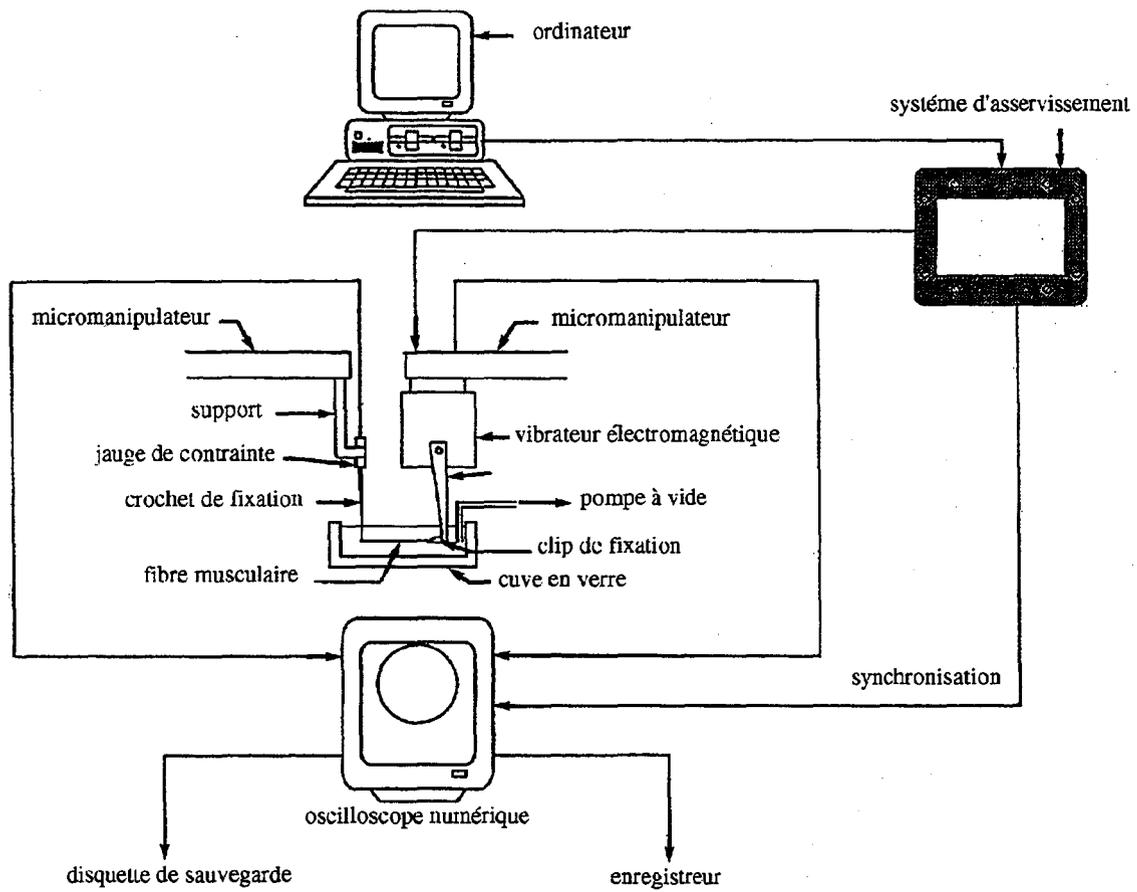


Figure 22 : Schéma du dispositif de montage d'une fibre musculaire.

La tension ainsi que la position du moteur sont visualisées sur un enregistreur papier (Gould ; modèle 40-8474-02) et sur un oscilloscope numérique (Nicolet ; modèle 310).

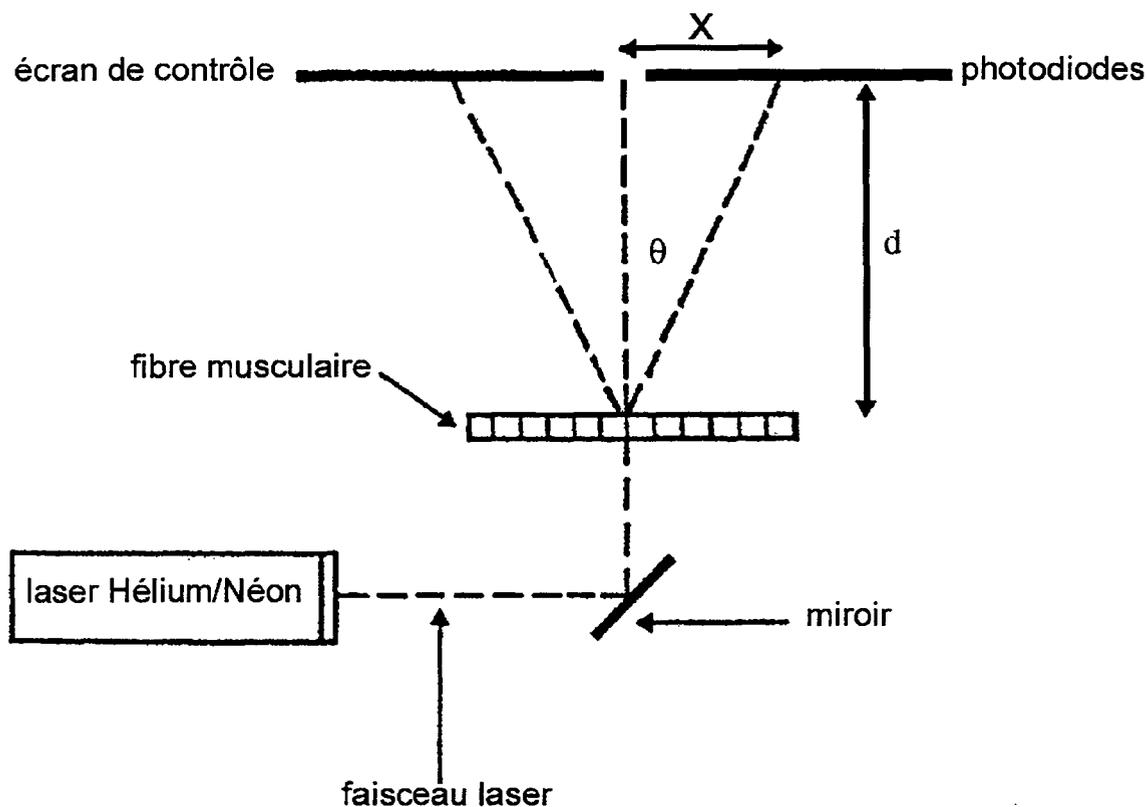
La fibre ainsi montée est pré-étirée à 120 % de sa longueur initiale, ce qui correspond à une longueur de sarcomère d'environ 2.6 μm pour les fibres musculaires de rats, et voisine de 2.5 μm pour les fibres musculaires de souris. Cette longueur d'étirement est fixée après avoir vérifié qu'elle permet le développement d'une tension maximale. Elle est maintenue constante et vérifiée durant toute l'expérimentation.

La longueur de sarcomère de la fibre est mesurée à l'aide d'un laser Hélium/Néon (Melles-Griot, Carlsbad, USA ; longueur d'onde 632.8 nm, puissance 10 mW) dirigé perpendiculairement à la fibre (figure 23). La position médiane de la première raie de diffraction est détectée par une rampe de 512 photodiodes (TSL 218, Texas Instrument, Dallas, USA). Elle est convertie en une tension proportionnelle à la longueur de sarcomère grâce à un système électronique. L'utilisation d'un réseau de diffraction de striations connues permet de calibrer le système de détection.

Toute fibre musculaire présentant une diffraction diffuse, ce qui suggère des sarcomères endommagés, est écartée. De même, sont également écartées pour les expériences les fibres qui présentent, lors du pré-étirement, un niveau de tension passive supérieur à 5 % du niveau de la tension isométrique maximale. La longueur maximale de la fibre au repos pour laquelle aucune tension passive n'est développée (L_s) (longueur de la fibre "au slack"), de même que la longueur de la fibre préétirée (L_0) et le diamètre de celle-ci sont mesurés à la loupe binoculaire (x 80) grâce à un oculaire micrométrique.

B - MESURE DE LA TENSION ISOMETRIQUE

La fibre musculaire est tout d'abord laissée 20 minutes dans une solution de Brij (2 % p/v), de manière à détruire le réticulum sarcoplasmique. Elle est ensuite rincée 3 fois grâce à une solution W puis remise dans une solution R. Après retrait de la solution R, la fibre est lavée à l'aide de la solution W de manière à enlever toute trace d'EGTA avant d'aborder l'expérimentation.



Un sarcomère est assimilé à une fenêtre de diffraction, sa longueur est donnée par la formule :

$$S = n\lambda / \sin \theta n$$

avec S = longueur du sarcomère

n = ordre de la frange de diffraction

λ = longueur d'onde de la source lumineuse utilisée pour obtenir le réseau de diffraction ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$)

θn = angle sous-tendu par la frange d'ordre 0 et le frange d'ordre n

A l'aide des formules trigonométriques, l'équation devient :

$$S = \lambda(x^2 + d^2)^{0.5} / x$$

x = distance entre les franges d'ordre 0 et d'ordre 1

d = distance entre la fibre et l'écran

Figure 23 : Dispositif expérimental et principe de mesure de la longueur de sarcomère.

Le protocole expérimental suivant est appliqué. Une contraction maximale d'amplitude P_0 est induite à l'aide d'une solution calcique de pCa 4.2 ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$) permettant de saturer tous les sites calciques libres de la troponine C impliqués dans le développement de la contraction. On applique ensuite une solution relaxante R ce qui permet le relâchement de la fibre. La longueur de sarcomère de la fibre est vérifiée. La fibre est de nouveau lavée avec la solution W et des solutions de concentrations calciques croissantes définies (pCa X) sont ensuite appliquées, chacune étant suivie de la solution de pCa 4.2 qui induit la tension maximale. Ceci permet de normaliser chaque tension P obtenue pour chaque pCa X à la tension maximale P_0 et d'établir le rapport P/P_0 . Entre chaque solution de pCa X, la fibre est relâchée à l'aide de la solution relaxante R. Cette procédure permet de s'affranchir d'une éventuelle variation de P_0 au cours de l'expérience ainsi que de la variabilité des tensions entre les différentes catégories de fibres. Un exemple de cycle expérimental est donné à la figure 24.

L'application des solutions de différentes concentrations calciques permet d'obtenir la relation Tension/pCa (T/pCa). Cette relation se présente sous la forme d'une sigmoïde (figure 25) et peut être décrite par l'équation de Hill et coll. (1980) suivante :

$$P/P_0 = ([Ca^{2+}]/K)^{n_H} / (1 + ([Ca^{2+}]/K)^{n_H}) \text{ où}$$

- P/P_0 représente la tension normalisée
- $[Ca^{2+}]$ = concentration en calcium ($[Ca^{2+}] = 10^{-pCa}$)
- K = constante de dissociation apparente
- n_H = coefficient de Hill.

Différents paramètres peuvent être déduits de cette relation T/pCa illustrant les propriétés contractiles des différentes fibres étudiées. Ces paramètres sont :

- pCa seuil ou seuil d'activation calcique : valeur de pCa la plus faible générant le développement d'une tension minimale, elle reflète la sensibilité calcique du système contractile ;
- pCa_{50} : valeur de pCa induisant 50 % de la tension maximale, elle traduit l'affinité calcique du système contractile ;

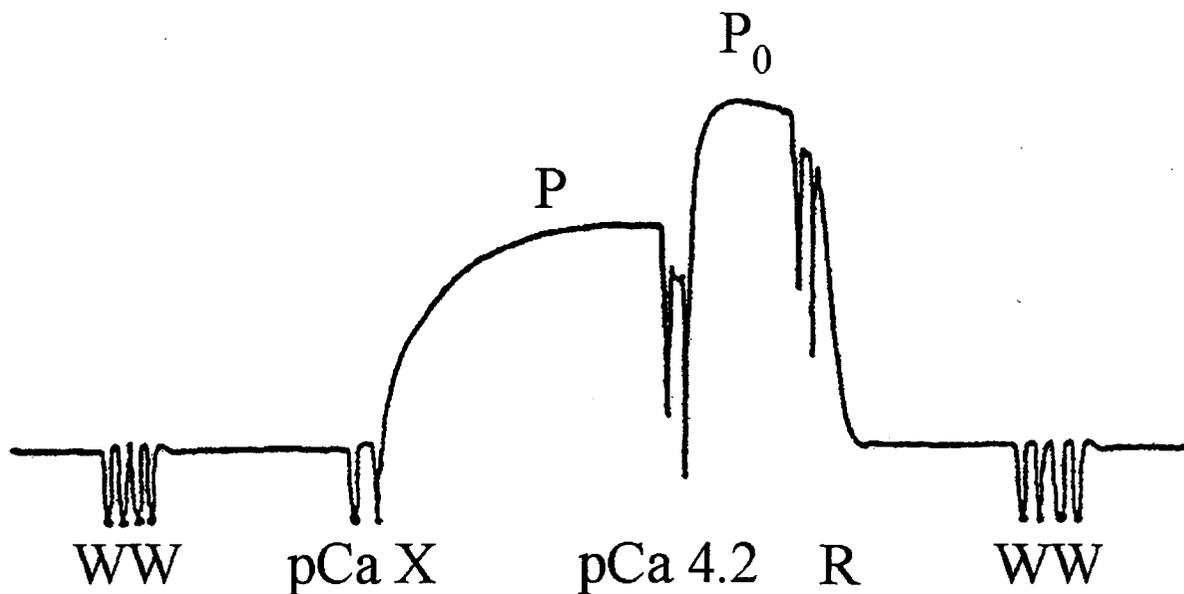
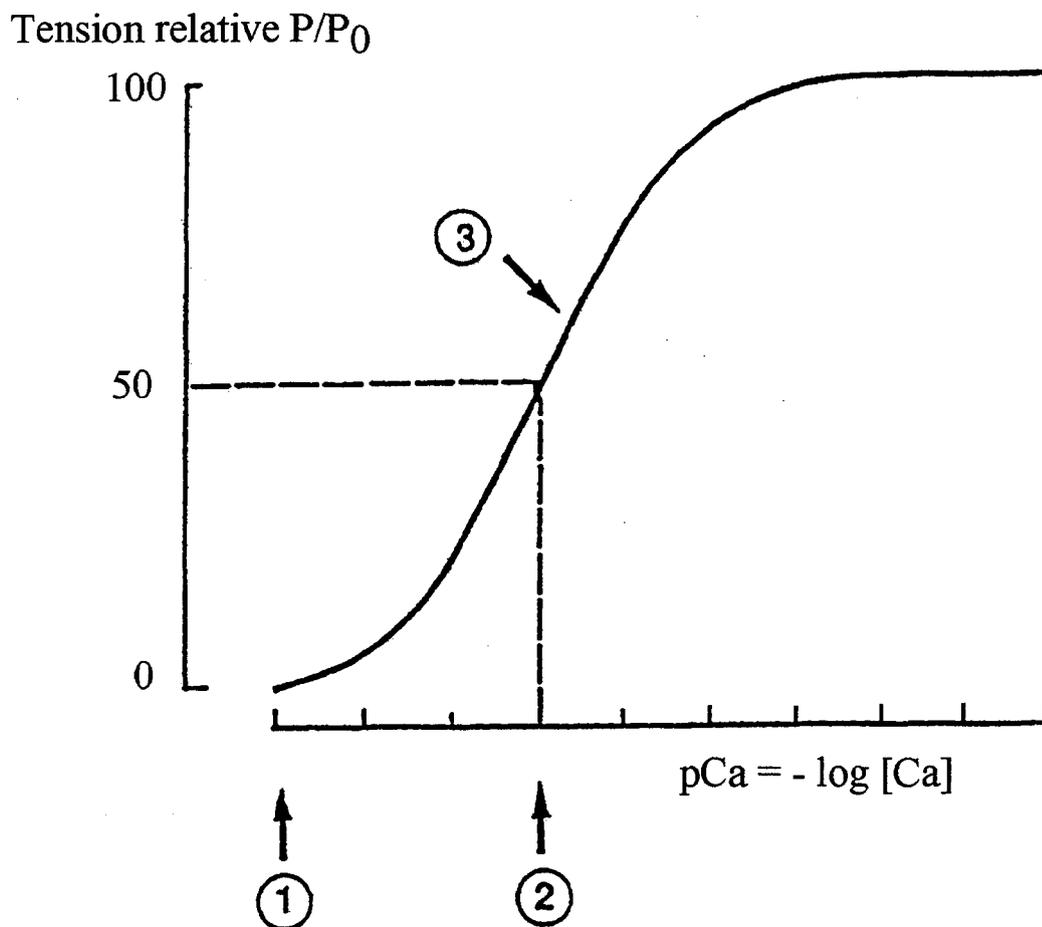


Figure 24 : Exemple d'enregistrement d'une contraction développée par une fibre musculaire. La tension (P) induite par une solution de pCa donnée ($pCa X$) est suivie d'une tension maximale (P_0). R désigne l'application de la solution relaxante et W l'application de la solution de lavage. Les déflexions rapides correspondent à des artéfacts dus à l'application ou au retrait des solutions.



1 = pCa seuil : seuil d'activation

2 = pCa_{50} : affinité calcique du système contractile

3 = pente de la relation : le coefficient de Hill (n_H) correspond à la pente de la relation dans sa partie linéaire

Figure 25 : Illustration de la relation entre la tension développée par une fibre musculaire isolée et le taux de calcium (Tension/ pCa). La relation est ajustée à l'aide de l'équation de Hill, les points 1, 2, et 3 sont les paramètres caractéristiques issus de cette équation.

- n_H ou coefficient de Hill : pente de la partie linéaire de la courbe, indicateur du degré de coopérativité entre les différents sites calciques impliqués dans la contraction musculaire et entre les différentes protéines du filament fin.

La relation T/pCa est différente selon le type de fibre, lente ou rapide (Laszevski-Williams et coll., 1989 ; Mounier et coll., 1989) et les paramètres déduits rendent compte de la composition de ces fibres en protéines contractiles et régulatrices.

Sur chaque fibre soumise au protocole d'établissement de la relation T/pCa, les propriétés d'activation par les ions strontium sont étudiées et une relation T/pSr est établie. Le protocole est identique à celui décrit à la figure 24, mais la tension maximale en présence de strontium est obtenue à l'aide d'une solution de pSr 3.4. Dans le cas de la relation T/pSr, la valeur de la pSr₅₀ est un paramètre important puisque la différence pCa₅₀ - pSr₅₀ (Δ) sert à typer fonctionnellement la fibre étudiée sur la base de son affinité relative vis-à-vis des ions Ca²⁺ et Sr²⁺. En effet, des études réalisées sur des fibres pelées de muscles de différentes espèces animales montrent que la sensibilité au calcium est nettement plus importante que celle vis-à-vis du strontium pour les fibres rapides alors que, les deux sensibilités sont minimales voir identiques pour les fibres lentes (Stephenson et Williams, 1981 ; Takagi et Endo, 1977). Ainsi, la valeur de Δ sera élevée (environ une unité pCa ou pSr) pour une fibre de type rapide et faible ou nulle (0.3 à 0 unité pCa ou pSr) pour une fibre de type lent (figure 26).

C - MESURE DE LA VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT (V_0)

La vitesse maximale de raccourcissement (V_0) de la composante contractile est mesurée grâce à la méthode du slack test (Edman, 1979). La fibre est tout d'abord activée maximale à l'aide d'une solution de pCa 4.2. On applique alors une série de 5 à 6 détentes rapides (1 ms) d'amplitudes variables (ΔL), mais suffisantes pour annuler la force en relâchant complètement la fibre. Le temps nécessaire (Δt) pour que la fibre développe à nouveau une tension est mesurée. Les différentes variations d'amplitude ΔL sont normalisées à L_0 et portées graphiquement en fonction de Δt (figure 27). La relation est une droite dont la pente représente V_0 . Pour les expériences réalisées sur les fibres musculaires de rat, la relation

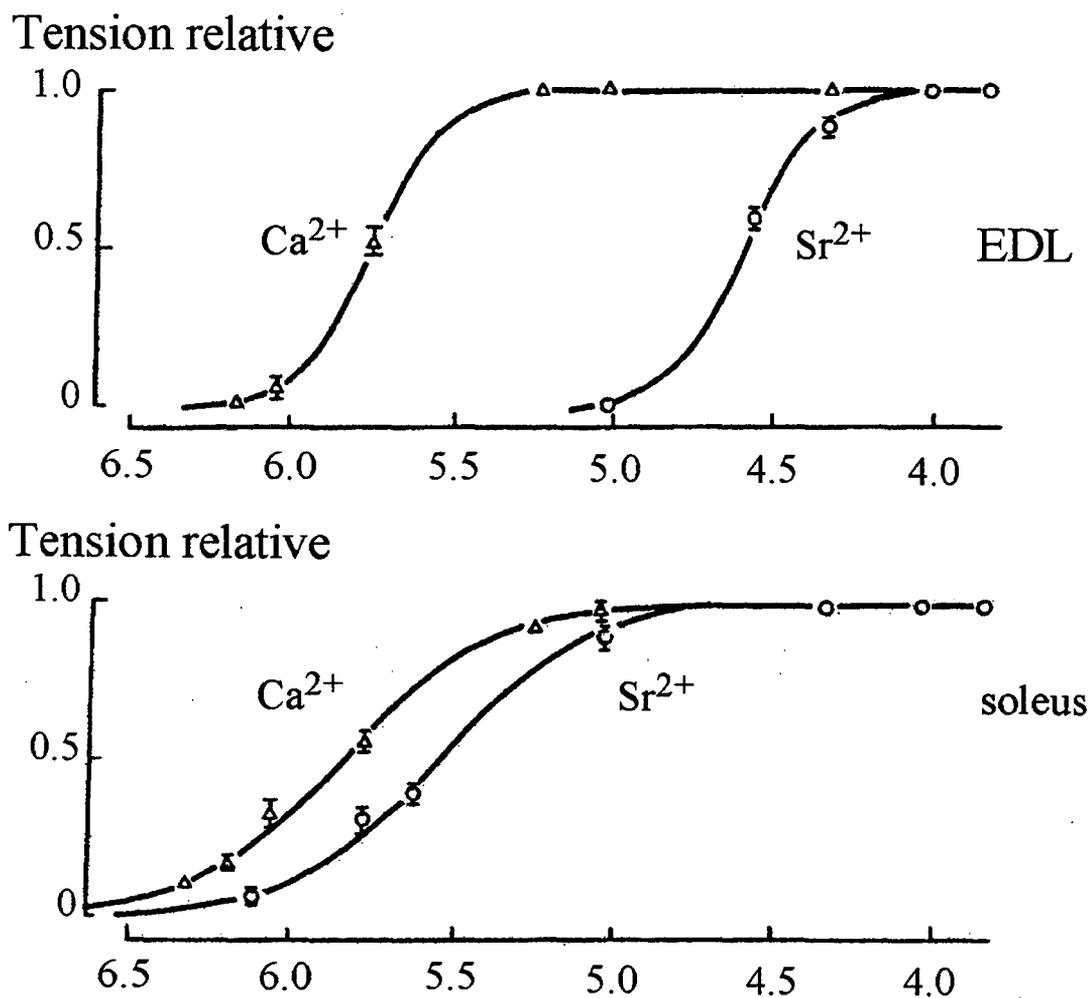


Figure 26 : Identification d'une fibre de type rapide (Extensor Digitorum Longus, EDL) et d'une fibre de type lent (soleus) par le test strontium (d'après Stephenson et Williams, 1981).

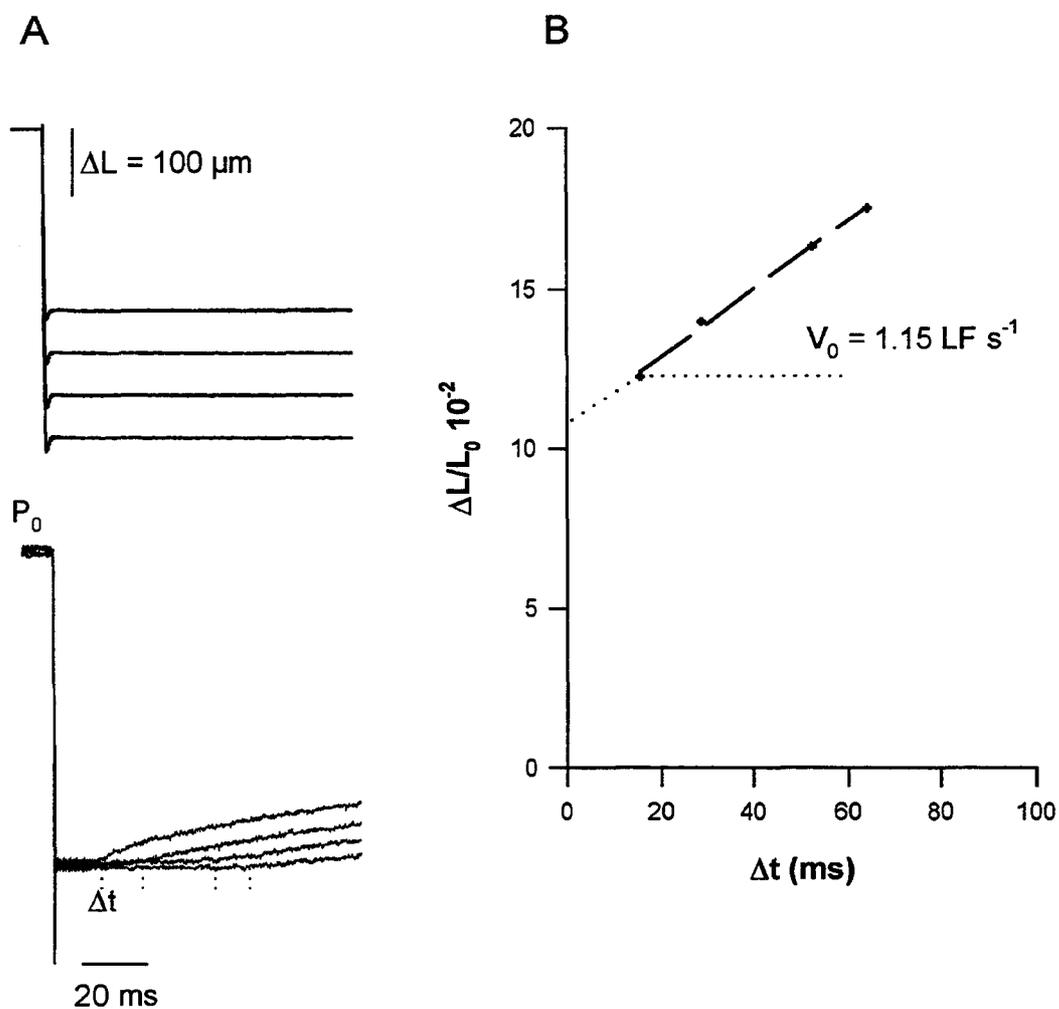


Figure 27 : Mesure de la vitesse maximale de raccourcissement (V_0) par la méthode du slack test sur une fibre de soleus de rat.

A : Superposition des tracés des variations de longueurs imposées et des réponses en tension consécutives. Δt : temps nécessaire au re-développement de la tension, P_0 : tension isométrique maximale.

B : Relation entre l'amplitude du relâchement normalisée à la longueur de la fibre pré-étirée (L_0) et Δt . La pente de la relation représente V_0 , qui est exprimée en longueur de fibre par seconde (LF s^{-1}).

est linéarisée dans la gamme $20 \text{ ms} \leq \Delta t \leq 60 \text{ ms}$ avec un coefficient de corrélation linéaire $r > 0.95$. V_0 est exprimée en longueur de fibre par seconde (LF s^{-1}).

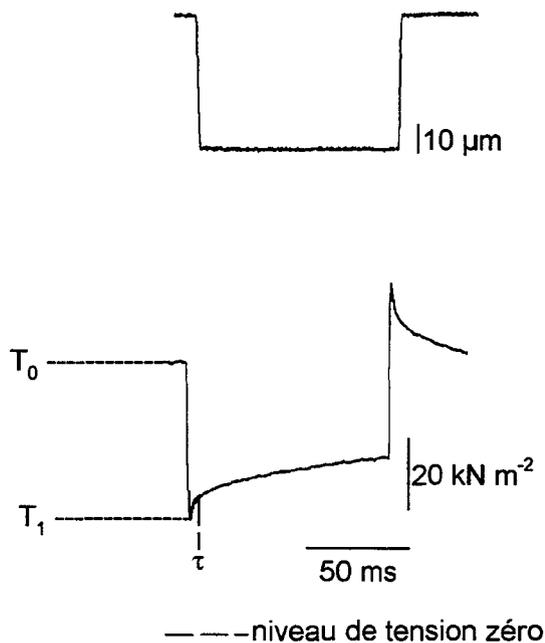
D - RELATIONS Tension/détente

Les propriétés élastiques de la CES d'une fibre musculaire (voir Données Bibliographique de Base) peuvent être caractérisées par la détermination de la relation Tension/détente ou courbe T_1 . Dans cette partie expérimentale, la notion de tension maximale sera dénommée T_0 au lieu de P_0 pour respecter les nomenclatures plus couramment utilisées dans les études des propriétés élastiques.

La fibre musculaire est tout d'abord activée maximale par une solution de pCa 4.2 et est rapidement relâchée (0.85 à 1ms pour les plus grandes variations de longueurs) en appliquant une série de variations de longueur (ΔL) d'une durée de 100 ms. Pour éviter d'endommager les sarcomères au cours des cycles détente/extension, un nombre limité de ΔL est appliqué dont l'amplitude varie entre $0.19 \pm 0.01 \%$ et $2.23 \pm 0.06 \%$ de L_0 . A chaque variation de longueur ΔL correspond une chute brutale de la tension qui passe de sa valeur isométrique maximale T_0 à une valeur minimale appelée T_1 (Huxley et Simmons, 1971), ensuite la tension se re-développe (figure 28-A). Pour chaque fibre musculaire étudiée, la courbe Tension/détente est déterminée en reportant chaque valeur T_1 normalisée à T_0 (T_1/T_0) en fonction des variations de longueurs normalisées à L_0 ($\Delta L/L_0$) correspondantes. Dans la partie 0.6 - 1.0 T_1/T_0 de la courbe, une relation linéaire peut être tracée à travers les points expérimentaux (coefficient de corrélation linéaire $r \geq 0.99$). L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses permet de caractériser la valeur de la compliance de la fibre étudiée (figure 28-B).

De plus, la phase rapide du re-développement de la tension, qui est consécutive à la variation de longueur, peut être caractérisée par une constante de temps τ (figure 28-A). Cette constante correspond au temps nécessaire pour obtenir 63 % de la valeur de la tension mesurée 10 ms après le relâchement rapide de la fibre. Comme τ varie en fonction de l'amplitude du relâchement, cette constante est toujours mesurée après un même relâchement d'une amplitude correspondant à une variation de longueur de la fibre de $0.97 \pm 0.03 \%$ de L_0 .

A



B

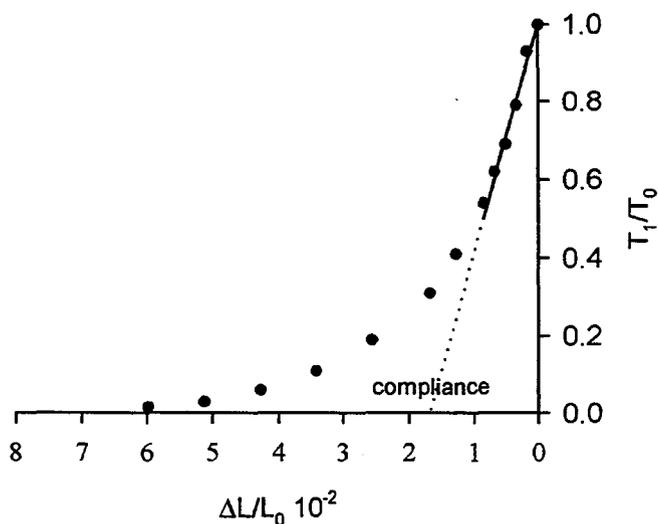


Figure 28 : Relation Tension/détente d'une fibre de soleus de rat.

A : Enregistrement de la variation de tension (tracé inférieur) consécutive à une détente rapide de la fibre (tracé supérieur), appliquée durant l'activation maximale de celle-ci. T_0 : tension isométrique maximale, T_1 : tension atteinte à la fin de la détente, τ : constante de temps caractérisant la phase rapide de re-développement de la tension.

B : Relation Tension/détente. Celle-ci est linéaire dans la gamme 0.6-1.0 T_1/T_0 . Le prolongement de cette droite représente la courbe théorique, son intersection avec l'axe des abscisses donne la valeur de compliance de la fibre étudiée.

E - ELASTICITE PASSIVE

Les propriétés élastiques passives des fibres musculaires sont étudiées en imposant à une fibre placée en conditions relaxantes une rampe d'étirements d'amplitudes variables, à faible vitesse d'étirement.

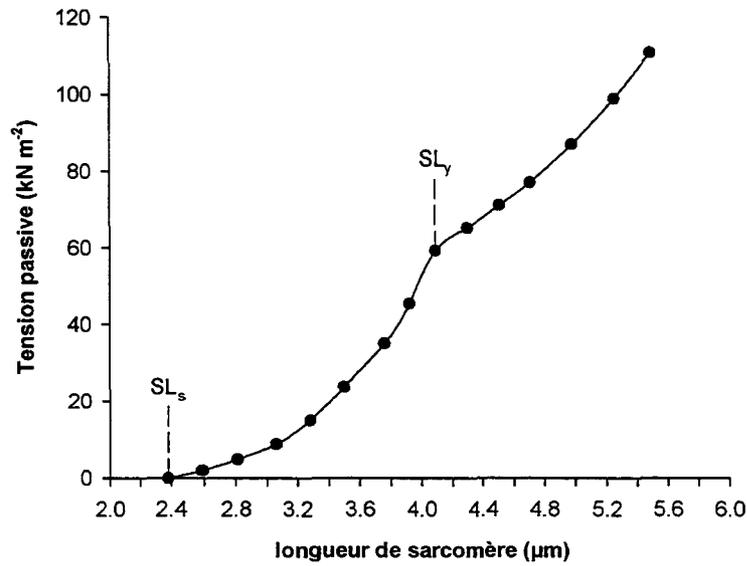
La fibre musculaire est d'abord baignée pendant 20 min dans une solution R contenant du Brij (2 % p/v) et du Triton x 100 (1 % v/v). Ce protocole permet non seulement de détruire le réseau du réticulum sarcoplasmique, mais également le sarcolemme ou tissu conjonctif restant après pelage. Cette dernière précaution nous permet de mesurer uniquement les propriétés élastiques passives des sarcomères, sans intervention d'autres éléments élastiques parallèles. Après cette procédure, la fibre est lavée 3 fois grâce à une solution de lavage W et est remise dans une solution relaxante R.

La fibre est alors soumise à un cycle d'étirements-relâchements à partir de sa longueur de repos "au slack" (L_s). Celle-ci est étirée lentement (10 % de L_s) en 15 secondes. A la fin de chaque étirement, la longueur de la fibre est maintenue constante pendant 180 secondes. Ceci permet à la tension développée de décroître de manière exponentielle vers une valeur plateau (Wang et coll., 1991, 1993). Après un cycle de 14 étirements (étirement de 140 % à partir de L_s) la fibre est relâchée pas à pas de la même manière. La tension diminue et se stabilise à une valeur plateau à chaque relâchement.

Pour chaque expérience, une relation entre la tension passive et la longueur de sarcomère est tracée (figure 29-A). De cette courbe, on peut déduire la longueur de sarcomère à partir de laquelle tout étirement de la fibre provoque la génération d'un niveau de tension passive (SL_s) ou longueur de sarcomère au "slack". La relation présente également un point de rupture ou "yield point" (SL_y). Ce point correspond à la valeur de longueur de sarcomère pour laquelle la variation de tension passive marque une rupture en fonction de l'étirement.

Lors de l'étude des propriétés élastiques passives des fibres atrophiées, la lecture de la longueur de sarcomère n'a pu se faire de manière rigoureuse par notre système de détection, du fait de la trop faible intensité de la première raie de diffraction laser des sarcomères. C'est pourquoi, la variation de longueur de sarcomère est remplacée par la variation de longueur de la fibre et les résultats sont exprimés sous la forme d'une relation entre la tension passive et la déformation de la fibre (figure 29-B).

A



B

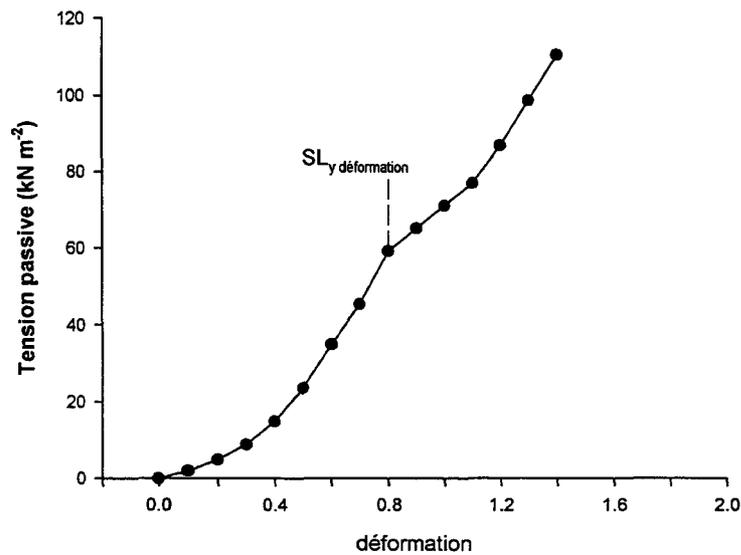


Figure 29 : A : Relation Tension passive/longueur de sarcomère. SL_s : longueur de sarcomère de la fibre au repos « au slack ». SL_y : longueur de sarcomère pour laquelle l'augmentation de tension passive présente une rupture.

B : Relation Tension passive/déformation. La déformation de la fibre pour un étirement L est donnée par $(L/L_s) - 1$, avec L_s la longueur de la fibre au repos « au slack ». Le point SL_y déformation correspond au point de rupture de la relation.

La phase de croissance exponentielle de la tension passive en fonction de la longueur de sarcomère (ou de la déformation de la fibre) peut être ajustée mathématiquement par une équation qui initialement a été utilisée pour modéliser le comportement élastique du tendon (Elden, 1968), suivant :

$$\sigma = E \epsilon^2 \text{ avec}$$

- σ : tension passive normalisée au diamètre de la fibre
- E : est le module de Young complexe
- ϵ : déformation de la fibre

Pour le calcul de la déformation en fonction de la longueur de fibre :

$$\epsilon \text{ correspond au rapport } \frac{L - L_0}{L_0} \text{ avec}$$

- L : longueur de la fibre à l'étirement donné
- L_0 : longueur de la fibre au repos "au slack"

La fixation de la fibre dans notre système expérimental est vérifiée en traçant pour chaque fibre étudiée, la relation entre la longueur de la fibre et la longueur de sarcomère. La relation obtenue est une droite dont le coefficient de corrélation linéaire est utilisé comme critère de rigidité des points d'attache de la fibre. Ceci nous permet de vérifier la linéarité de l'étirement et d'exclure toute fibre ne présentant pas une valeur de coefficient linéaire $r \geq 0.99$.

F - DEPOLYMERISATION DU FILAMENT EPAIS DE MYOSINE

Les propriétés élastiques de la portion de la titine localisée dans la bande A, peuvent être étudiées après la dépolymérisation partielle des filaments de myosine par une solution de KCl de forte force ionique. Le protocole expérimental suivant est appliqué. Après montage, la fibre est étirée par palier comme décrit précédemment jusqu'à une valeur de $0.7 L_0$. Le maximum d'étirement passif étant inférieur au point de rupture de la fibre, après retour à sa longueur initiale ses caractéristiques passives ne sont pas altérées (voir Données Bibliographiques de Base).

La fibre est ensuite pré-étirée à une valeur de longueur de sarcomère de 3.0 μm . Après une période de 3 minutes dans une solution relaxante R, une tension isométrique maximale de référence est développée par application d'une solution de pCa 4.2, puis la fibre est relâchée par application de deux lavages avec une solution relaxante R.

Une solution de dépolymérisation contenant 540 mM de KCl est alors appliquée pendant 20 minutes (Higuchi et Ishiwata, 1985).

Après dépolymérisation, la fibre est lavée deux fois avec la solution de dépolymérisation et remise en condition relaxante dans une solution R. Le contrôle de la dépolymérisation est obtenu par application d'une solution de pCa 4.2, où aucun développement de tension active ne doit être obtenu. Après deux lavages avec la solution R, la fibre est relâchée et laissée pendant 5 minutes à sa longueur de repos "longueur au slack". Après la dépolymérisation, le protocole d'étirement passif décrit à la section précédente est appliqué.

III - TECHNIQUES ELECTROPHORETIQUES

A - DISSOLUTION DES ECHANTILLONS

La composition en protéines contractiles et régulatrices des fibres musculaires étudiées ou des muscles entiers est déterminée par électrophorèse mono-dimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS PAGE) selon la technique de Laemmli (1970). Les électrophorèses sont réalisées dans une cuve verticale (Hoeffer, modèle SE 600). La température est maintenue constante à 12°C pendant toute la durée de la migration.

Après chaque expérimentation, la fibre musculaire est placée dans un eppendorf en présence de 10 μl de tampon de solubilisation (62.5 mM Tris-Hcl (pH 6.8), 10 % glycérol (v/v), 2 % SDS (p/v), 5 % β -mercaptoéthanol (v/v), 0.02 % bleu de bromophenol (p/v)). L'échantillon est ensuite passé au bain-marie à 80°C pendant 3 minutes puis conservé jusqu'à l'analyse électrophorétique à - 80°C.

Pour l'analyse électrophorétique sur muscle entier, des coupes musculaires sont dissoutes dans une solution d'EDTA (6.35 mM, pH 7.0). L'échantillon est alors centrifugé à 13.000 tours/minute pendant 10 minutes à 4°C. Le dépôt est lavé 2 fois à l'aide d'une solution de KCl 50 mM puis dissout dans le tampon de solubilisation avant d'être passé au bain marie à 80°C pendant 3 minutes. La quantité de protéine de chaque échantillon est estimée grâce à la méthode de Lowry et coll. (1951) et est ajustée à 1 µg/µl. Les échantillons sont ensuite stockés à - 80°C jusqu'à l'analyse électrophorétique.

B - SEPARATION DES ISOFORMES DES CHAINES LOURDES DE MYOSINE (MHC)

La séparation des différentes isoformes de MHC est réalisée grâce à un gel de concentration de 4.5 % et un gel de séparation de 7.5 % (Wada et coll., 1995). Le tampon de migration a une composition de 190 mM de Glycine, 25 mM de Tris et 0.1 % de SDS (p/v). La migration est réalisée pendant 24 heures à 180 volts constants avec une intensité de 10 mA dans le gel de concentration et 13 mA dans le gel de séparation par plaque de 0.75 mm d'épaisseur. La quantité d'échantillon déposée par puits est équivalente à 1 µg de protéine pour l'analyse sur muscle entier. Pour l'analyse des fibres de rat, la moitié du segment étudié est déposé. Pour les expériences réalisées sur les fibres de souris, la totalité de la fibre est déposée.

C - SEPARATION DES ISOFORMES DES CHAINES LEGERES DE MYOSINE (MLC) ET DES ISOFORMES DE TROPONINE C (TnC)

Deux types de techniques électrophorétiques ont été utilisées dans cette étude.

Lors des expériences réalisées sur les fibres musculaires de rat, la séparation des isoformes de MLC et de TnC est réalisée grâce à un gel de concentration de 6 % et un gel de séparation de 12 % (Giulian et coll., 1983). Le tampon de migration a une composition de 300 mM de Glycine, 50 mM de Tris et 0.1 % de SDS (p/v). La migration est réalisée pendant 6 heures avec une intensité constante de 10 mA dans le gel de concentration et de 16 mA dans le gel de séparation par plaque de 0.75 mm d'épaisseur. La quantité d'échantillon déposé par puit correspond à la moitié de la fibre étudiée.

Pour les expériences réalisées sur les muscles entiers de souris, la séparation électrophorétique des isoformes de MLC et de TnC s'effectue selon un gradient linéaire 10-20 %, avec un gel de concentration de 4.5 % (Laemmli, 1970). Le tampon de migration a une composition identique à celui utilisé pour la séparation des isoformes de MHC. La migration est réalisée pendant 6 h 30 avec une intensité constante de 10 mA dans le gel de concentration et de 13 mA dans le gradient par plaque de 0.75 mm d'épaisseur. La quantité d'échantillon déposée par puits est équivalente à 1 µg de protéines.

D - SEPARATION DES ISOFORMES DE TITINE

La séparation des isoformes de titine a été réalisée en collaboration avec le Pr. Granzier (Washington State University, Pullman, USA). Celle-ci est effectuée sur un gradient linéaire 3.3-12 % (Granzier et Wang, 1993b). La titine étant une protéine de très haut poids moléculaire ($\cong 3$ Mda), aucun gel de concentration n'est utilisé pour faciliter sa pénétration dans le gel. Le tampon de migration utilisé (Fairbanks et coll., 1971) est composé de 40 mM de Tris-acétate, 20 mM d'acétate de sodium, 2 mM d'EGTA et de 0.1 % de SDS (p/v). La migration est effectuée pendant 5 heures avec une intensité de 11 mA par plaque à température ambiante.

E - COLORATION DES GELS

La technique de coloration utilisée est une coloration à l'argent ammoniacal. Cette technique d'une très grande sensibilité permet la détection de 2 à 5 ng de protéines par bande et est particulièrement adaptée à la détection de la faible quantité de protéine myofibrillaire contenue dans une fibre musculaire.

Après migration, le gel est fixé pendant 30 minutes dans une solution contenant 50 % (v/v) de méthanol et 10 % (v/v) d'acide acétique. Une deuxième fixation est réalisée pendant une heure dans une solution contenant 5 % (v/v) de méthanol et 7 % (v/v) d'acide acétique. Le gel est ensuite laissé toute la nuit dans une solution de glutaraldéhyde à 10 % (v/v). Un rinçage à l'eau distillée pendant 2 h 30 avec un changement de bain toutes les 20 minutes permet d'éliminer l'excès de glutaraldéhyde du gel.

Les gels ayant servi à la migration des protéines myofibrillaires issues de fibres musculaires sont ensuite plongés dans une solution contenant 5 µg/ml de dithiothreitol pendant 30 minutes à l'abri de la lumière. Cette manipulation supplémentaire pour ce type de gel permet d'accentuer la détection et d'augmenter la reproductibilité de la coloration pour les échantillons de faible concentration en protéines.

Le gel est ensuite coloré pendant 20 minutes à l'abri de la lumière dans une solution d'argent ammoniacal composée de 0.5 % (v/v) d'ammoniaque 0.075 % (v/v) de soude et de 0.8 % (p/v) de nitrate d'argent.

Après 5 rinçages d'une minute chacun à l'eau distillée, la révélation est initiée à l'aide d'une solution de citrate de sodium (0.5 % p/v) et de formaldéhyde (0.18 % v/v). La révélation est arrêtée après obtention de l'intensité de coloration désirée en plongeant le gel dans une solution d'acide acétique (1 % v/v) pendant 5 minutes, suivi d'un lavage de 10 minutes à l'eau distillée.

Le gel est alors photographié et une analyse densitométrique (Quantiscan, Biosoft, Cambridge, Angleterre) des gels permet de déterminer les proportions relatives de chaque isoforme des protéines myofibrillaires étudiées. L'identification des différentes isoformes de chaque protéine est réalisée en fonction de son poids moléculaire, selon les données de la littérature et, pour certaines d'entre elles, par analyse par immunoblot. Par ailleurs, l'identification de l'isoforme rapide de TnC est effectuée par la migration de TnC rapide purifiée.

F - IMMUNOBLOTS

Pour les expériences réalisées sur les muscles de souris, les isoformes lentes et rapides de TnC sont séparées sur un gradient linéaire 10-20 %, alors que les isoformes de MHC sont séparées sur un gel à 7.5 % (voir paragraphes précédents). Après électrophorèse, les protéines sont transférées selon la méthode de Towbin et coll. (1979) à voltage constant de 60 volts pendant 6 heures, sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) de porosité de 0.2 µm pour les isoformes de TnC ou 0.45 µm pour les isoformes de MHC.

Après transfert, la membrane de nitrocellulose est incubée à température ambiante pendant 2 heures dans une solution tampon de PBS (pH 7.4) contenant 3 % (p/v) de sérum

albumine bovine (BSA) et 0.02 % (p/v) d'azide de sodium. La membrane est ensuite incubée toute la nuit dans la solution tampon PBS/BSA contenant le premier anticorps dilué au 1/200.

Pour l'identification des isoformes de TnC, le premier anticorps utilisé est un anticorps monoclonal de souris reconnaissant la TnC cardiaque (NCL-TROPC, Novocastra, Ltd, New castle, Angleterre). La membrane est ensuite lavée 2 fois 15 minutes à l'aide du tampon PBS et incubée pendant 1 heure avec un deuxième anticorps anti IgG de souris marqué à la biotine (B 6398, Sigma, St Louis, USA) dilué au 1/500. Après 4 lavages de 5 minutes chacun avec du tampon PBS, la membrane est incubée 1 heure avec le substrat extravidine-peroxidase (E 8386, Sigma, St Louis, USA) dilué au 1/500 dans du tampon PBS. La révélation est réalisée par le diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB). La coloration est arrêtée par lavage à l'eau distillée.

Pour l'identification des isoformes de MHC, le premier anticorps utilisé est un anticorps monoclonal de souris reconnaissant soit l'isoforme lente de MHC (NCL-MHCs, Novocastra Ltd, New Castle, Angleterre), soit les isoformes rapides de MHC (NCL-MHCf, Novocastra Ltd, New Castle, Angleterre). Le second anticorps utilisé est un anticorps anti IgG de souris marqué à la peroxidase (A-2554, Sigma, St Louis, USA) dilué au 1/500. La révélation est réalisée par le diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB). La coloration est arrêtée par lavage à l'eau distillée.

L'intensité de la coloration est quantifiée par analyse densitométrique et les résultats sont exprimés en pourcentage du signal total.

IV - SOLUTIONS

Les produits chimiques entrant dans la composition des solutions proviennent de Sigma Chemical (St Louis, USA). La composition des solutions est déterminée à l'aide du programme de Fabiato (1988), en utilisant les constantes d'association données par Orentlicher et coll. (1977) pour les solutions pCa et par Moisescu et Thieleczek (1979) pour les solutions pSr. Toutes les solutions ont une force ionique de 200 mM et un pH de 7.00 ± 0.01 et sont réalisées dans des conditions stériles.

La solution de lavage (W) est composée d'adénosine triphosphate (ATP, 2.5 mM), d'acide 3-morpholino-propane sulfonique (MOPS, 20 mM), de propionate de potassium (185 mM) et d'acétate de magnésium (2.5 mM).

La solution relaxante ou de pelage est composée d'ATP (2.5 mM), de MOPS (20 mM), de propionate de potassium (170 mM), d'acétate de magnésium (2.5 mM) et de K₂ EGTA (5 mM).

Les solutions activatrices pCa ($pCa = -\log [Ca^{2+}]$) ou pSr sont constituées de la solution W, additionnée de quantités variables de calcium ou de strontium tamponnées par l'EGTA et mélangées en proportion adéquates pour obtenir les pCa (ou pSr) voulues.

La solution de dépolymérisation est composée de MOPS (20 mM), d'acétate de magnésium (2.5 mM), de K₂ EGTA (5mM) et de KCl (540 mM). Cette solution a une force ionique finale de 570 mM et un pH de 7.00 ± 0.01 .

V - ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

Tous les résultats sont exprimés sous forme de moyennes affectées de leur erreur standard à la moyenne ($X \pm E.S.M.$). La comparaison entre les différents groupes est réalisée par une analyse de variance suivie d'un test de student, $p \leq 0.05$ est choisi comme seuil de signification.

RESULTATS

PREMIERE PARTIE

Etude des propriétés contractiles et élastiques de fibres musculaires de soleus de rat après une période d'hypodynamie-hypokinésie.

La première partie de ce travail vise à montrer les transformations du muscle à l'échelon des protéines contractiles, en particulier de la MHC. La deuxième partie décrit les propriétés contractiles (activation par les ions calcium et strontium), la vitesse maximale de raccourcissement (V_0), ainsi que les propriétés élastiques actives (courbes T_1) et passives de fibres musculaires isolées et pelées de soleus de rat. Deux groupes d'animaux ont été utilisés, un groupe d'animaux contrôles et groupe d'animaux ayant subi une période de 14 jours de suspension. Les propriétés contractiles et élastiques des fibres musculaires de soleus ont été comparées à celles de l'extensor digitorum longus (EDL), muscle de type rapide. Chaque fibre musculaire a été caractérisée à partir de sa composition en chaînes lourdes et légères de myosine par technique électrophorétique. Les résultats présentés ne concernent que des fibres musculaires dont l'ensemble des propriétés fonctionnelles et structurales a pu être obtenu.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans *Experimental Physiology*, (1999), **84**, 93-107.

I - MISE EN EVIDENCE DES TRANSFORMATIONS DU MUSCLE SOLEUS EN CONDITIONS D'HYPODYNAMIE-HYPOKINESIE

La transformation des muscles soleus après suspension est étudiée par technique électrophorétique. Lors du prélèvement, une partie du muscle est gardée pour l'analyse des chaînes lourdes de myosine (MHC). L'ensemble des résultats a été obtenu sur 5 animaux contrôles et 8 animaux suspendus. La figure 30 et le tableau 2 donnent l'analyse électrophorétique des MHC pour chaque groupe de muscles étudiés.

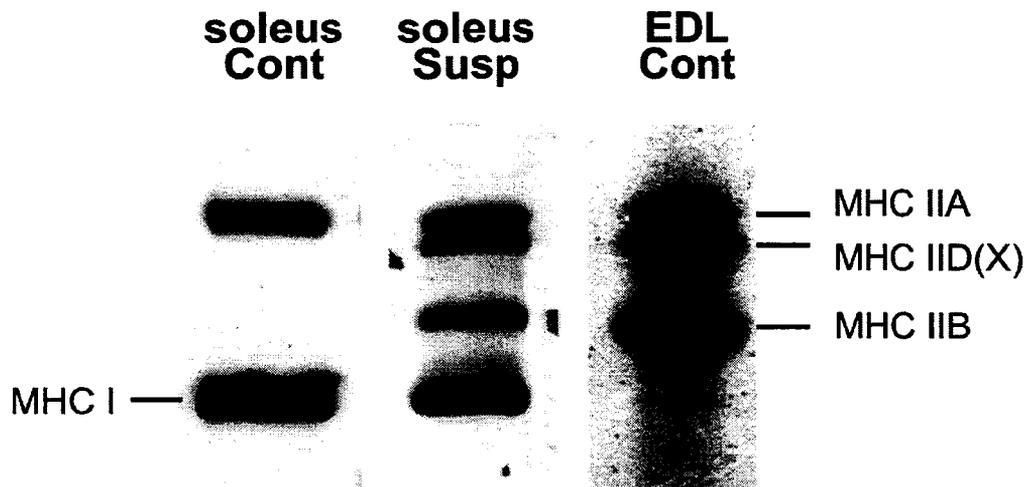


Figure 30 : Séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosines (MHC) sur gel SDS-PAGE à 7.5 % de muscles soleus contrôles (soleus Cont), de muscles soleus suspendus (soleus Susp) et de muscles EDL contrôles (EDL Cont).

	soleus Cont (n = 5)	soleus Susp (n = 8)
<u>Composition en</u> <u>MHC (%)</u>		
MHC I	69.95 ± 2.9	48.66 ± 2.76 [†]
MHC IIA	30.05 ± 2.7	20.65 ± 1.26 [†]
MHC II D(X)	-	18.57 ± 1.67
MHC IIB	-	12.12 ± 3.33

Tableau 2 : Composition en chaînes lourdes de myosine (MHC) des muscles soleus contrôles (soleus Cont) et des muscles soleus suspendus (soleus Susp). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de muscles étudiés. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont.

Les muscles soleus contrôles expriment les isoformes de MHC I et de MHC IIA, l'isoforme lente étant prédominante. Les muscles d'EDL contrôles ont été utilisés pour le repérage des différentes isoformes : MHC I, MHC IIA, MHC IID(X), MHC IIB.

Après suspension, la distribution des isoformes de MHC dans les muscles soleus est modifiée et laisse apparaître la présence des isoformes rapides de MHC IID(X) et de MHC IIB. Ce profil électrophorétique montre l'existence en quantité approximativement égale d'isoforme lente de MHC I et d'isoformes rapides de MHC IIA, IID(X) et IIB. De plus, la présence des isoformes rapides de MHC IID(X) et de MHC IIB dans les muscles soleus après atrophie, alors que ces isoformes ne sont jamais exprimées dans les muscles contrôles, indique la transformation des muscles soleus suite à une période d'hypodynamie-hypokinésie. Il s'agit d'une transition dans le sens lent → rapide.

II - ATROPHIE MUSCULAIRE

A - EVOLUTION DU POIDS DES SOLEUS

L'analyse du poids des muscles après 14 jours de suspension indique que les soleus présentent une perte de poids de 49.9 % par rapport aux muscles contrôles. La valeur moyenne du poids du soleus passe en effet d'une valeur de 130.9 ± 3.8 mg (n = 5) pour les rats contrôles, à 65.6 ± 2.8 mg (n = 8) pour les rats suspendus. Le rapport entre le poids du muscle et le poids des animaux passe de 0.37 ± 0.01 pour les animaux contrôles à 0.23 ± 0.01 après suspension (tableau 3).

	soleus Cont (n = 5)	soleus Susp (n = 8)	EDL Cont (n = 5)
Poids des muscles (mg)	130.89 ± 3.81 [§]	65.57 ± 2.76 ^{†§}	144.40 ± 4.18 [†]
Poids des muscles/Poids des animaux (mg/g)	0.37 ± 0.01 [§]	0.23 ± 0.01 ^{†§}	0.41 ± 0.01 [†]

Tableau 3 : Evolution du poids des muscles soleus (soleus Cont) et EDL (EDL Cont) chez les animaux contrôles et des muscles soleus après 14 jours de suspension (soleus Susp). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de muscles étudiés. † indique un différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont.

	soleus Cont (n = 18)	soleus Susp L (n = 19)	soleus Susp R (n = 17)	EDL Cont (n = 15)
Diamètre (μm)	73.25 \pm 1.80	57.79 \pm 2.49 ^{†§*}	51.50 \pm 0.93 ^{†§*}	73.26 \pm 1.13
P ₀ (mN)	0.33 \pm 0.02 [§]	0.22 \pm 0.05 ^{†§}	0.13 \pm 0.01 ^{†§}	0.45 \pm 0.03 [†]
P ₀ (kN m ⁻²)	78.89 \pm 4.19 [§]	70.29 \pm 8.81 [§]	60.21 \pm 2.07 ^{†§}	105.99 \pm 3.66 [†]

Tableau 4 : Evolution du diamètre et de la tension maximale (mN et kN m⁻²) des fibres musculaires de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont, * indique une différence significative entre les fibres des groupes soleus Susp L et soleus Susp R.

B - DIAMETRE DES FIBRES ET TENSIONS MAXIMALES

Le tableau 4 résume les résultats obtenus pour l'ensemble des fibres des muscles des animaux contrôles et suspendus identifiées par analyse électrophorétique (paragraphe III-A).

Les fibres de soleus et d'EDL contrôles présentent des diamètres équivalents. Après 14 jours de suspension, il apparaît une nette atrophie des fibres musculaires de soleus de rat. En effet, le diamètre moyen diminue significativement de 21 % pour les fibres lentes soleus suspendus et de 29.7 % pour les fibres de venues rapides par rapport au diamètre des fibres de soleus contrôles. L'effet de l'atrophie apparaît donc plus marqué pour les fibres devenues rapides après suspension.

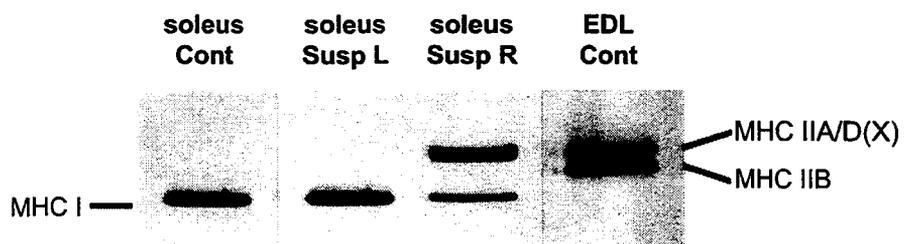
La tension maximale (P_0) développée par les fibres musculaires est induite par une solution de pCa 4.2 (voir Matériel et Méthodes). Les fibres d'EDL contrôles développent une tension maximale plus importante que les fibres de soleus contrôles. Après 14 jours de suspension, la capacité des fibres musculaires à produire une tension maximale est diminuée de 33.3 % pour les fibres lentes de soleus suspendus et de 60.6 % pour les fibres rapides de soleus suspendus. Toutefois, lorsque cette tension maximale est rapportée à l'unité de surface (kN m^{-2}), aucune différence significative n'est observée pour les fibres lentes de soleus, alors qu'une diminution de 23.7 % demeure pour les fibres de soleus devenues rapides par rapport aux fibres contrôles. Ceci suggère que la chute de force peut être directement reliée à la diminution du diamètre dans le cas des fibres lentes de soleus suspendus, tandis que des interprétations complémentaires doivent être proposées dans le cas des fibres devenues rapides. Celles-ci seront envisagées dans le chapitre discussion..

III - PROPRIETES CONTRACTILES ET ELASTIQUES DE FIBRES MUSCULAIRES SOUMISES A UNE ACTIVATION CALCIQUE

A - CARACTERISATION ELECTROPHORETIQUE DES FIBRES

L'analyse électrophorétique des chaînes lourdes (MHC) et légères (MLC) de myosine a été effectuée sur un ensemble de 69 fibres. Un profil électrophorétique des différents types de fibres est représenté à la figure 31 et les proportions relatives en chaînes lourdes et légères de myosine sont reportées dans le tableau 5.

A



B

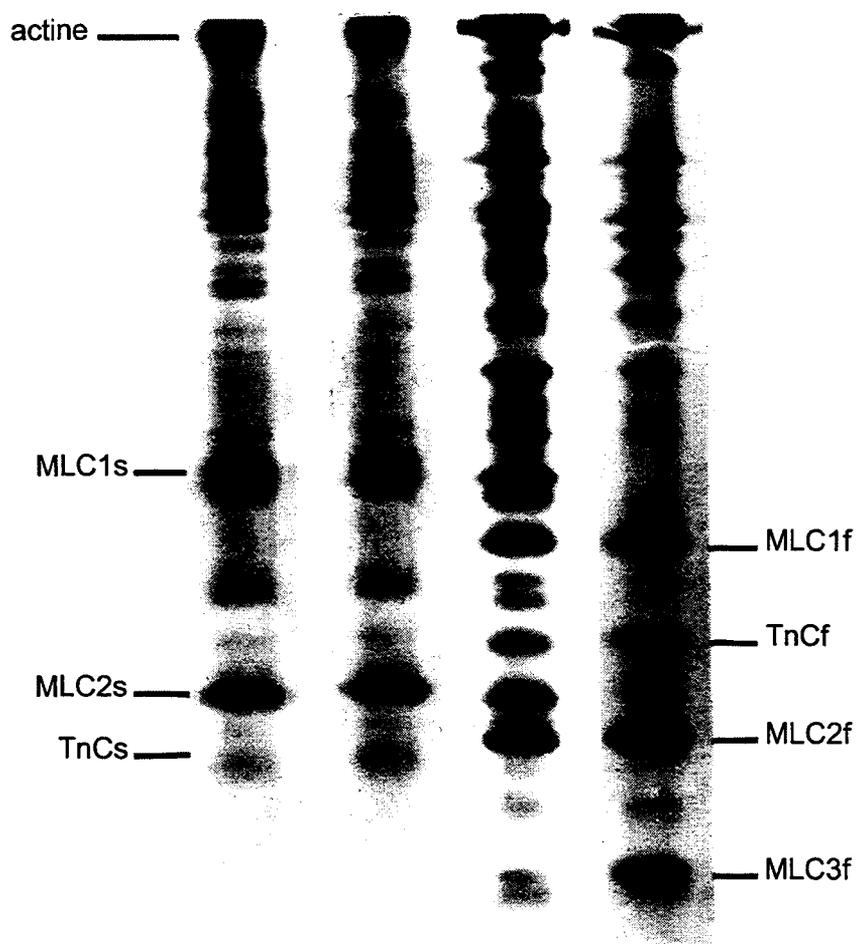


Figure 31 : Profils électrophorétiques caractéristiques de fibres de soleus contrôles (soleus Cont), de fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et de fibres d'EDL contrôles (EDL Cont).

A : Séparation des isoformes de chaînes lourdes de myosines (MHC) sur gel SDS-PAGE à 6 %.

B : Séparation des isoformes de chaînes légères de myosines (MLC) et de la troponine C (TnC) sur gel SDS-PAGE à 12 %.

	soleus Cont (n = 18)	soleus Susp L (n = 19)	soleus Susp R (n = 17)	EDL Cont (n = 15)
<u>Composition en</u>				
<u>MHC (%)</u>				
MHC I	100	100	23.8 ± 6.9 ^{†*}	-
MHC IIA/IID(X)	-	-	76.2 ± 6.9 [§]	48.5 ± 7.9
MHC IIB	-	-	-	52.4 ± 7.9
<u>Composition en</u>				
<u>MLC (%)</u>				
MLC1s	60.3 ± 1.2	61.1 ± 1.6 [*]	39.2 ± 3.9 ^{†*}	-
MLC2s	39.7 ± 1.2	38.9 ± 1.6 [*]	11.2 ± 1.4 ^{†*}	-
MLC1f	-	-	28.9 ± 1.2 [§]	45.3 ± 2.5
MLC2f	-	-	19.9 ± 2.7 [§]	43.9 ± 2.6
MLC3f	-	-	2.7 ± 0.4 [§]	10.7 ± 1.2

Tableau 5 : Evolution de la composition en chaînes lourdes (MHC) et légères (MLC) de myosine des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et d'EDL contrôles (EDL Cont). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont, * indique une différence significative entre les fibres des groupes soleus Susp L et soleus Susp R.

Il faut noter ici qu'au moment où ces expériences ont été réalisées (début de notre thèse), notre protocole expérimental ne nous permettait pas de séparer les isoformes de MHC IIA et de MHC IID(X).

Les fibres de soleus contrôles (soleus Cont, n = 18) expriment l'isoforme lente de MHC I et les isoformes lentes de MLC essentielles et régulatrices (MLC 1s et MLC 2s respectivement). Les fibres d'EDL contrôles (EDL Cont, n = 15) co-expriment les isoformes rapides MHC IIA/D(X) et MHC IIB, ainsi que les isoformes rapides des MLC essentielles et régulatrices (MLC 1f, MLC 3f et MLC 2f respectivement). Sur les fibres étudiées, nous n'avons pas détecté l'expression de MHC I bien que celle-ci soit présente à l'échelon du muscle entier (voir tableau 2). L'analyse des fibres musculaires de soleus après suspension (n = 36) révèle deux populations de fibres. Dix neuf fibres expriment de manière homogène les isoformes lentes de MHC et MLC et présentent le même profil électrophorétique que les fibres de soleus contrôles (figure 31). Cette population est identifiée comme une population de fibres lentes : soleus Susp L. D'autres expériences électrophorétiques réalisées sur des soleus de rats suspendus ont permis de déceler une très faible population (n = 2) de fibres co-exprimant une ou deux isoformes rapides de MHC avec la MHC I. Ces fibres ont été appelées hybrides lentes (voir figure 37). Ce type de fibre n'a pu être décelé dans cette série de muscles. La deuxième population (n = 17) présente un profil électrophorétique hybride correspondant à la co-expression de l'isoforme lente de MHC I et de l'isoforme rapide de MHC IIA/D(X). Cette co-expression est caractérisée par la prédominance de l'isoforme rapide et la population est identifiée comme une population de fibres hybrides rapides : soleus Susp R. Ces fibres co-expriment également les isoformes lentes et rapides des chaînes légères de myosine en proportions équivalentes (50 % de MLC lentes 1s et 2s, 50 % de MLC rapides 1f, 2f et 3f). Par ailleurs, les fibres rapides de soleus suspendus présentent une proportion plus importante de MLC 2f que de MLC 2s (19.9 ± 2.7 % contre 11.2 ± 1.4 %), alors que pour la MLC 1 l'isoforme lente est présente en proportion plus importante que l'isoforme rapide (39.2 ± 3.9 % contre 28.9 ± 1.2 %).

Lors de l'analyse électrophorétique des chaînes légères de myosine, il nous a également été permis d'analyser les différentes isoformes de troponine (TnC) exprimées dans les fibres. Les fibres lentes de soleus contrôles et de soleus suspendus expriment l'isoforme lente de TnC (TnCs). Par contre, les fibres rapides d'EDL contrôles et de soleus suspendus contiennent l'isoforme rapide de TnC (TnCf). Toutefois, pour ces deux populations de fibres la présence (ou absence) de TnCs ne peut être déterminée, du fait de la co-migration de la TnCf avec la MLC 2f.

B - RELATIONS Tension/pCa ET Tension/pSr

Les relations Tension/pCa et Tension/pSr établies pour les fibres d'animaux contrôles et suspendus sont illustrées à la figure 32 et les caractéristiques déduites de ces relations sont résumées dans le tableau 6.

L'analyse des différents paramètres caractérisant les relations Tension/pCa, indique que les fibres lentes de soleus contrôles présentent des caractéristiques d'activation calcique classiquement différentes de celles des fibres rapides d'EDL contrôles, à savoir une sensibilité plus forte (seuil d'activation plus bas) et une pente (n_H) plus faible. Par contre, ces deux types de fibres présentent une affinité équivalente vis-à-vis des ions calcium (valeurs de pCa_{50} non significativement différentes). L'étude des relations Tension/pCa et Tension/pSr des fibres contrôles en terme d'affinité relative vis-à-vis du calcium et du strontium (paramètre Δ) montre que les fibres de soleus contrôles présentent une valeur moyenne de Δ faible (tableau 6), alors que les fibres d'EDL contrôles possèdent une valeur de Δ nettement plus importante. Ceci se traduit par des relations Tension/pCa et Tension/pSr très proches pour les fibres lentes de soleus et décalées pour les fibres rapides d'EDL contrôles.

Après atrophie, on observe des différences entre les deux populations de fibres de soleus suspendus. Les fibres lentes de soleus suspendus ont des caractéristiques très proches de celles des fibres de soleus contrôles. Par contre, les fibres de soleus devenues rapides après suspension présentent des caractéristiques de fibres rapides (type EDL), se traduisant par :

- une perte d'affinité calcique : diminution significative de la valeur de la pCa_{50}
- une évolution significative des valeurs de seuil et de pente vers des valeurs de type rapide. Cette évolution est fortement marquée sur la valeur du seuil, qui indique une sensibilité calcique plus faible que celle observée pour les fibres d'EDL Cont.

La relation Tension/pCa des fibres rapides de soleus suspendus est ainsi décalée vers des concentrations calciques plus élevées.

Par ailleurs, l'analyse du paramètre Δ permet de retrouver les deux catégories de fibres présentes dans le muscle soleus après suspension, à savoir une catégorie de fibres lentes (soleus Susp L) caractérisées par une valeur de Δ faible et des relations Tension/pCa et Tension/pSr proches, ainsi qu'une catégorie de fibres rapides (soleus Susp R) qui possède une valeur de Δ élevée et des relations Tension/pCa et Tension/pSr très distinctes (figure 32).

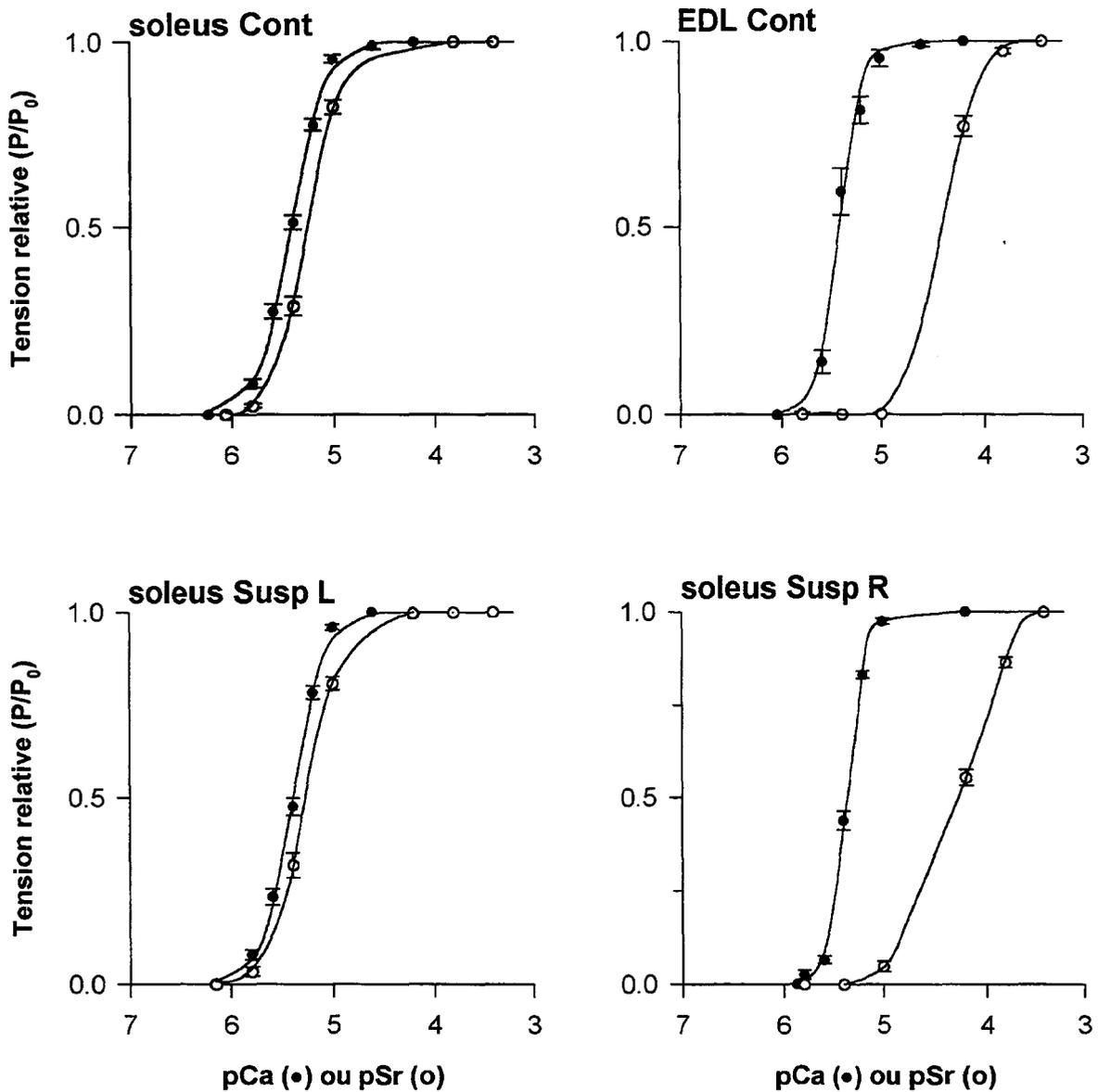


Figure 32 : Relations Tension/pCa (●) et Tension/pSr (○) des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Ces relations sont ajustées à l'aide de l'équation de Hill.

	soleus Cont (n = 18)	soleus Susp L (n = 19)	soleus Susp R (n = 17)	EDL Cont (n = 15)
pCa seuil	6.23 ± 0.05 [§]	6.16 ± 0.03 [*]	5.87 ± 0.04 ^{†§*}	6.05 ± 0.05 [†]
pCa ₅₀	5.41 ± 0.02	5.41 ± 0.01 ^{§*}	5.35 ± 0.01 ^{†§*}	5.40 ± 0.02
pSr ₅₀	5.24 ± 0.02 [§]	5.21 ± 0.03 ^{§*}	4.28 ± 0.03 ^{†*}	4.31 ± 0.02 [†]
Δ	0.16 ± 0.01 [§]	0.19 ± 0.02 ^{§*}	1.07 ± 0.02 ^{†*}	1.02 ± 0.07 [†]
n _H	2.91 ± 0.13 [§]	3.14 ± 0.14 ^{§*}	4.68 ± 0.36 ^{†*}	3.82 ± 0.18 [†]

Tableau 6 : Evolution des propriétés d'activation par les ions Ca²⁺ et Sr²⁺ des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). pCa seuil : plus faible valeur de pCa qui permet le développement d'une tension, pCa₅₀ (pSr₅₀) : valeur de pCa (pSr) qui induit 50 % de la tension maximale, Δ : valeur de pCa₅₀ – pSr₅₀, n_H : pente de la relation Tension/pCa. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont, * indique une différence significative entre les fibres des groupes soleus Susp L et soleus Susp R.

C - VITESSE MAXIMALE DE RACCOURCISSEMENT (V_0)

La valeur de V_0 est déterminée grâce à la méthode du slack test (voir Matériel et Méthodes). Les histogrammes de répartition des valeurs de V_0 sont représentés à la figure 33 et les valeurs moyennes de V_0 obtenues pour les différentes catégories de fibres sont indiquées dans le tableau 7.

Les fibres rapides d'EDL contrôles ont une valeur moyenne de V_0 plus élevée que celle des fibres lentes de soleus contrôles. De plus, la figure 33 indique que les fibres de soleus contrôles présentent une distribution unimodale centrée sur leur valeur moyenne de V_0 , alors que les fibres d'EDL Cont sont positionnées dans une gamme de V_0 plus élevée.

Pour le groupe des animaux suspendus, les fibres lentes de soleus ont des valeurs de V_0 réparties de façon équivalente à celle des fibres de soleus contrôles et présentent la même valeur moyenne (tableau 7). Par contre, l'histogramme de répartition des valeurs de V_0 pour les fibres rapides de soleus est décalé vers des valeurs de V_0 plus élevées, mais intermédiaires entre celles des fibres de soleus et d'EDL contrôles.

D - PROPRIETES ELASTIQUES DES FIBRES ACTIVEES MAXIMALEMENT.

RELATIONS Tension/détente

La figure 34 montre les enregistrements de la réponse en tension d'une fibre de soleus et d'EDL de rat contrôles, suite à une série de détentes rapides. Sur cette figure et dans la suite de ce paragraphe, la tension maximale sera notée T_0 et la tension mesurée après une détente rapide appliquée à une fibre activée maximalement est désignée par T_1 (voir Matériel et Méthodes).

La constante de temps τ qui caractérise la phase de re-développement de la tension à partir de son niveau T_1 , indique que les fibres rapides d'EDL contrôles re-développent une tension plus rapidement que les fibres lentes de soleus contrôles (tableau 7).

Après une période de 14 jours de suspension, les fibres lentes de soleus ont une constante τ de valeur équivalente à celle des fibres de soleus contrôles, alors que les fibres rapides de soleus suspendus présentent une diminution de la valeur moyenne τ qui devient comparable à celle observée pour les fibres rapides d'EDL contrôles.

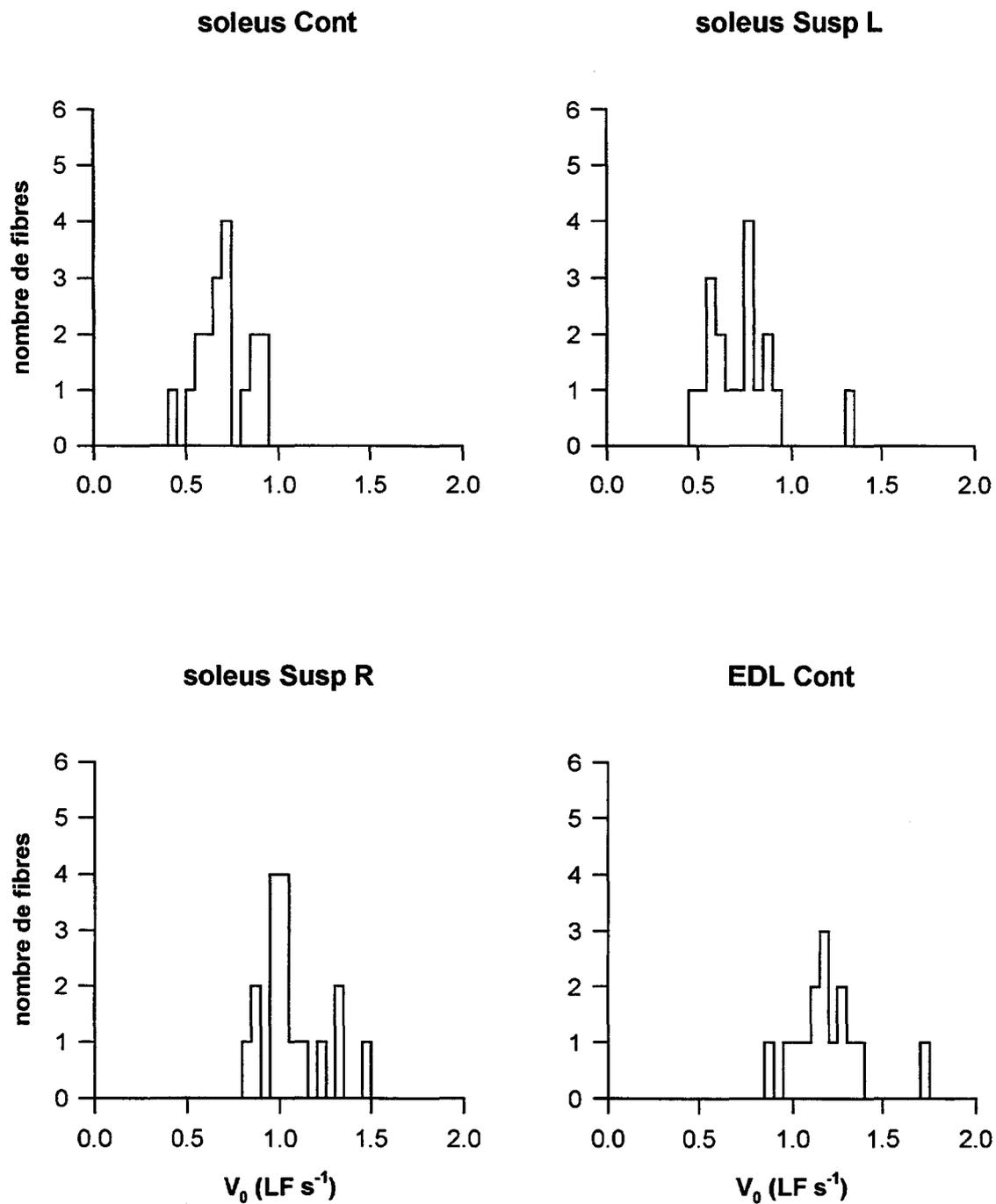


Figure 33 : Histogrammes de répartition des valeurs de la vitesse maximale de raccourcissement (V_0) des fibres de soleus contrôles, des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). V_0 est exprimée en longueur de fibre par seconde (LF s⁻¹).

	soleus Cont (n = 18)	soleus Susp L (n = 19)	soleus Susp R (n = 17)	EDL Cont (n = 15)
V_0 (LF s ⁻¹)	0.71 ± 0.03 [§]	0.72 ± 0.06 ^{§*}	1.02 ± 0.03 ^{§†*}	1.21 ± 0.06 [†]
τ (ms)	3.92 ± 0.11 [§]	3.74 ± 0.12 [§]	3.43 ± 0.14 [†]	3.31 ± 0.10 [†]
Compliance ($\Delta L/L_0$ 10 ⁻²)	1.73 ± 0.06 [§]	1.88 ± 0.07 ^{§*}	2.21 ± 0.05 ^{†*}	2.23 ± 0.08 [†]

Tableau 7 : Evolution des paramètres cinétiques et élastiques des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. V_0 : vitesse maximale de raccourcissement exprimée en longueur de fibre par seconde, τ : constante de temps du re-développement de la tension suite à une détente rapide de la fibre, compliance : paramètre élastique. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont, * indique une différence significative entre les fibres des groupes soleus Susp L et soleus Susp R.

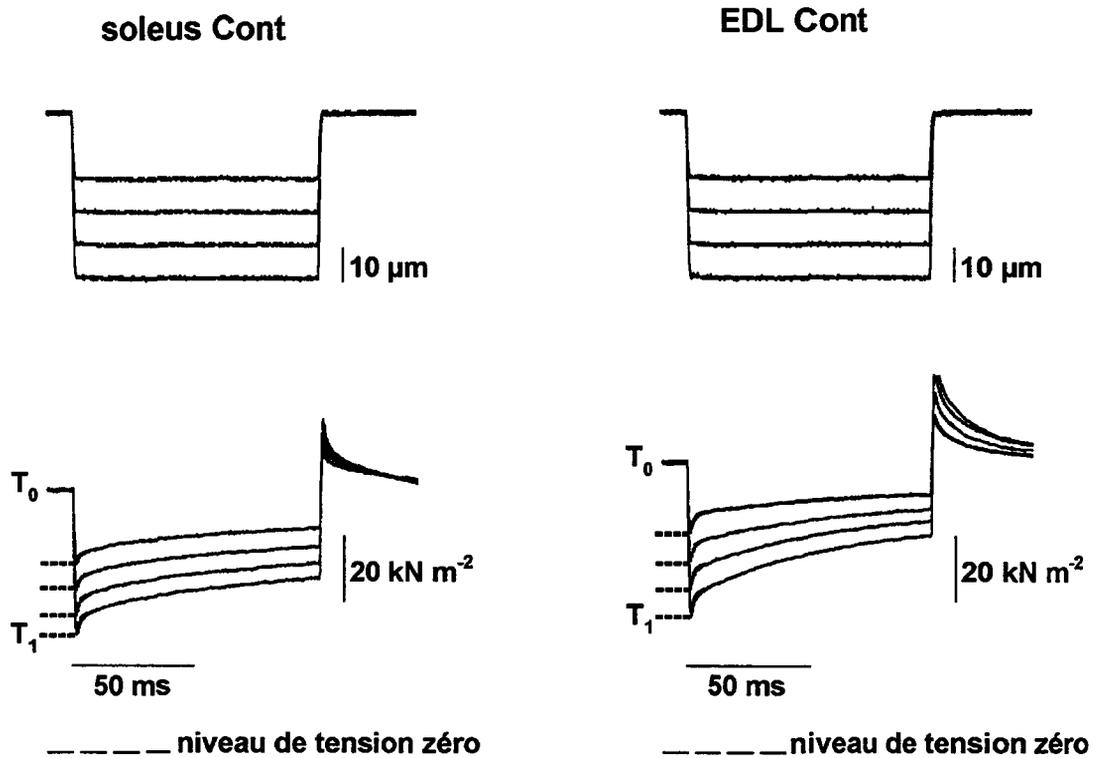


Figure 34 : Exemples d'enregistrements des variations de tension (tracés inférieurs) suite à des variations de longueur (tracés supérieurs) imposées à une fibre de soleus contrôle (soleus Cont) et d'EDL contrôle (EDL Cont) en contraction isométrique maximale. A chaque relâchement, la tension isométrique maximale T_0 chute à un niveau de valeur T_1 .

La valeur de la tension T_1 est fonction de l'amplitude du relâchement de la fibre et varie linéairement dans la gamme 0.6 - 1.0 T_1/T_0 (figure 35). L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses donne une valeur expérimentale de la compliance instantanée de la fibre étudiée (voir Matériel et Méthodes). Les fibres d'EDL contrôles présentent une valeur moyenne de compliance significativement plus élevée que les fibres de soleus contrôles (tableau 7). Après atrophie, on observe une légère augmentation de la compliance des fibres lentes de soleus suspendus bien que celle-ci ne soit pas significative. Par contre, les fibres rapides de soleus suspendus ont une valeur de compliance significativement augmentée, devenant équivalente à celle trouvée pour les fibres rapides d'EDL contrôles.

Ainsi, les fibres lentes de soleus contrôles et de soleus suspendus qui expriment l'isoforme lente de MHC I, ont une valeur de compliance plus faible que les fibres d'EDL contrôles qui co-expriment les isoformes rapides de MHC IIA/D(X) et MHC IIB. De plus, les fibres de soleus devenues rapides après suspension et qui co-expriment l'isoforme lente de MHC I et rapide de MHC IIA/D(X), ont une valeur de compliance équivalente à celle trouvée pour les fibres d'EDL contrôles.

IV - PROPRIETES ELASTIQUES PASSIVES

A - COMPOSITION EN ISOFORMES DE TITINE DES MUSCLES ENTIERS

L'analyse électrophorétique indique pour les muscles soleus et EDL contrôles la présence d'une bande majeure et de même niveau de migration, qui est trouvée être intermédiaire à celle des isoformes T1 des muscles cardiaque de rat et soleus humain (figure 36). Cette bande a été identifiée comme la bande T1 de titine pour les muscles soleus et EDL contrôles et indique l'expression de la même isoforme dans ces deux muscles. En outre, on peut observer pour les muscles soleus contrôles, la présence d'une bande diffuse au dessus de la bande T1 de titine (Granzier et Wang, 1993b). A cause de sa plus faible mobilité électrophorétique, celle-ci ne peut correspondre à un produit de dégradation de la titine et n'a pas été identifiée.

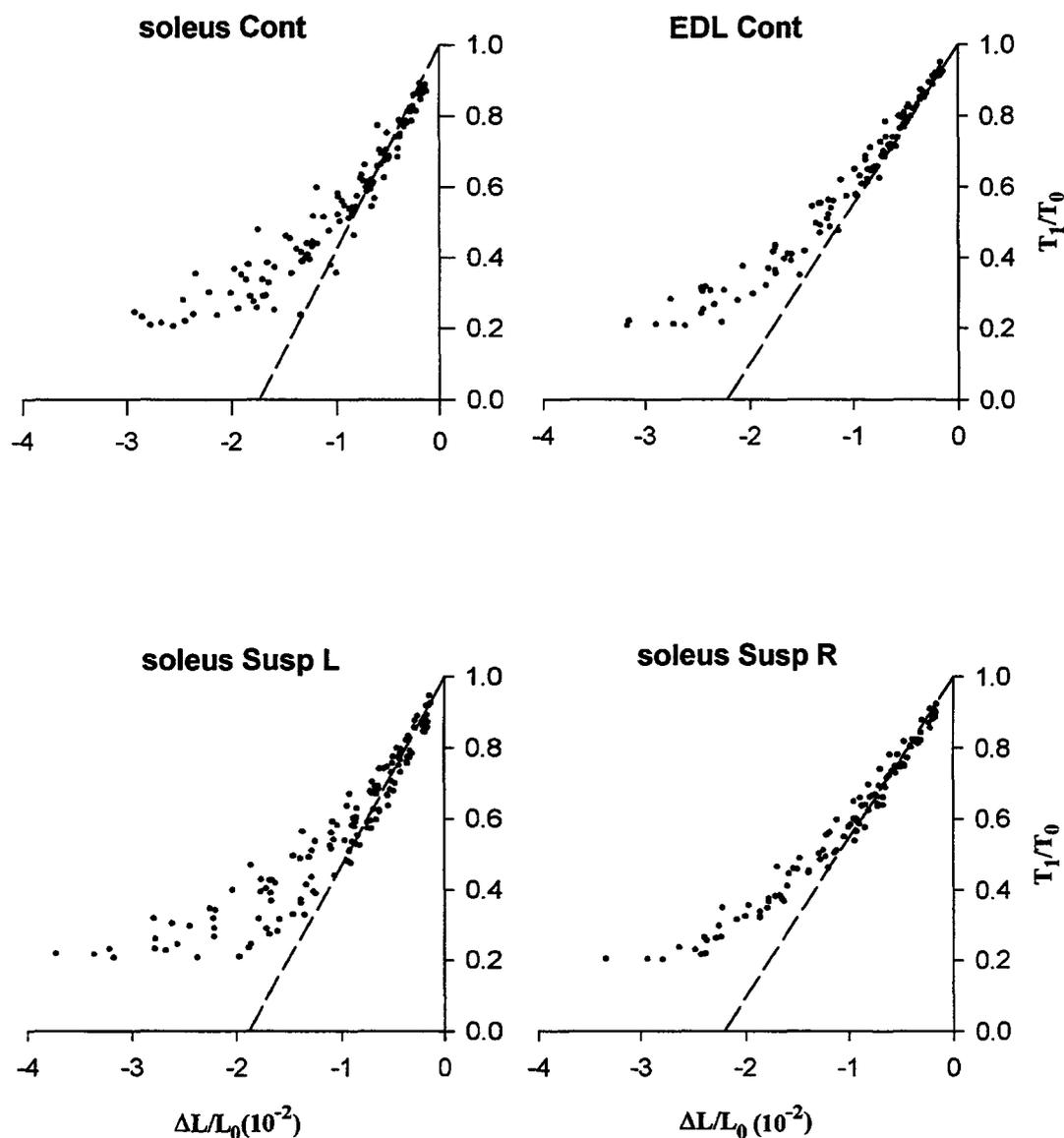


Figure 35 : Relations Tension/détente des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Les tensions T_1 sont normalisées à la tension isométrique maximale T_0 , les variations de longueurs ΔL sont normalisées à la longueur L_0 de la fibre. Pour chaque relation une droite est tracée à travers les points expérimentaux ($0.6-1.0 T_1/T_0$) en utilisant la méthode des moindres carrés ($r \geq 0.99$). L'intersection de cette droite avec l'axe des abscisses donne la valeur de compliance moyenne de l'ensemble des fibres étudiées.

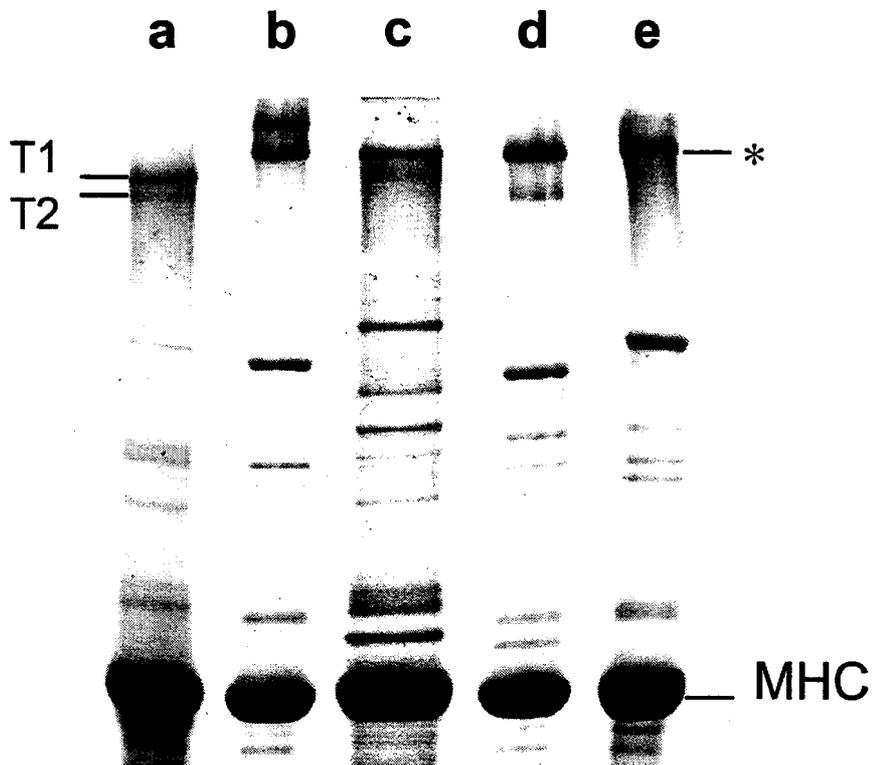


Figure 36 : Identification électrophorétique de l'expression des isoformes de titine.

T1 et T2 : bandes T1 et T2, respectivement, de titine de coeur de rat. * niveau de migration des isoformes de titine exprimées dans les muscles soleus contrôles, soleus suspendus et EDL contrôles de rat.

a : cœur de rat.

b : muscle soleus contrôle.

c : muscle soleus suspendu.

d : muscle EDL contrôle.

e : muscle soleus humain.

Après suspension, les muscles soleus présentent une bande de migration de même mobilité électrophorétique que la bande T1 de titine des muscles soleus et EDL contrôles. Ce résultat contraste avec l'analyse des chaînes lourdes de myosine, où après suspension on observe l'apparition d'isoformes qui ne sont pas exprimées dans les muscles soleus contrôles.

B - CARACTERISTIQUES DES FIBRES SOUMISES A CES EXPERIENCES

Pour cette partie de l'étude, un autre groupe d'animaux contrôles et suspendus a été utilisé. Les biopsies ont été pelées et conservées avec des inhibiteurs de protéases pour éviter la dégradation de la titine, protéine très sensible du fait de son haut poids moléculaire (voir Matériel et Méthodes). Par ailleurs, les biopsies sont conservées au maximum 15 jours.

Les fibres musculaires sont identifiées après chaque expérience par analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine. Les résultats sont représentés à la figure 37. L'ensemble des fibres de soleus contrôles (n = 13) expriment uniquement l'isoforme lente de MHC I. Les fibres d'EDL contrôles (n = 14) expriment les isoformes rapides de MHC IIA, IID(X) et IIB. L'isoforme lente de MHC I n'est pas détectée dans les fibres d'EDL étudiées ici, mais nous savons que cette isoforme est présente dans les muscles entiers, cependant en faible quantité.

Après atrophie, l'hétérogénéité de la population de fibres trouvées reflète la composition en MHC au niveau des muscles entiers. On distingue ainsi deux types de fibres, des fibres de type lent (n = 15) qui expriment soit uniquement, soit majoritairement l'isoforme lente de MHC I et des fibres de type rapide (n = 13), qui expriment principalement l'isoforme rapide de MHC IIA associée en proportion variable aux autres types de MHC.

La suspension provoque l'apparition de fibres hybrides rapides co-exprimant des MHC de type rapide de façon prédominante par rapport à la MHC I. Sur ce lot d'animaux, des fibres de type hybride lent apparaissent : une en condition contrôle et deux après suspension. Les transformations sont relativement plus marquées que dans le lot précédent (paragraphe II-A) puisque des fibres ne contenant que des isoformes de MHC rapides sans co-expression de MHC I ont pu être détectées. Les MHC de type rapide sont ici outre la MHC IIA, les MHC IID(X) et MHC IIB.

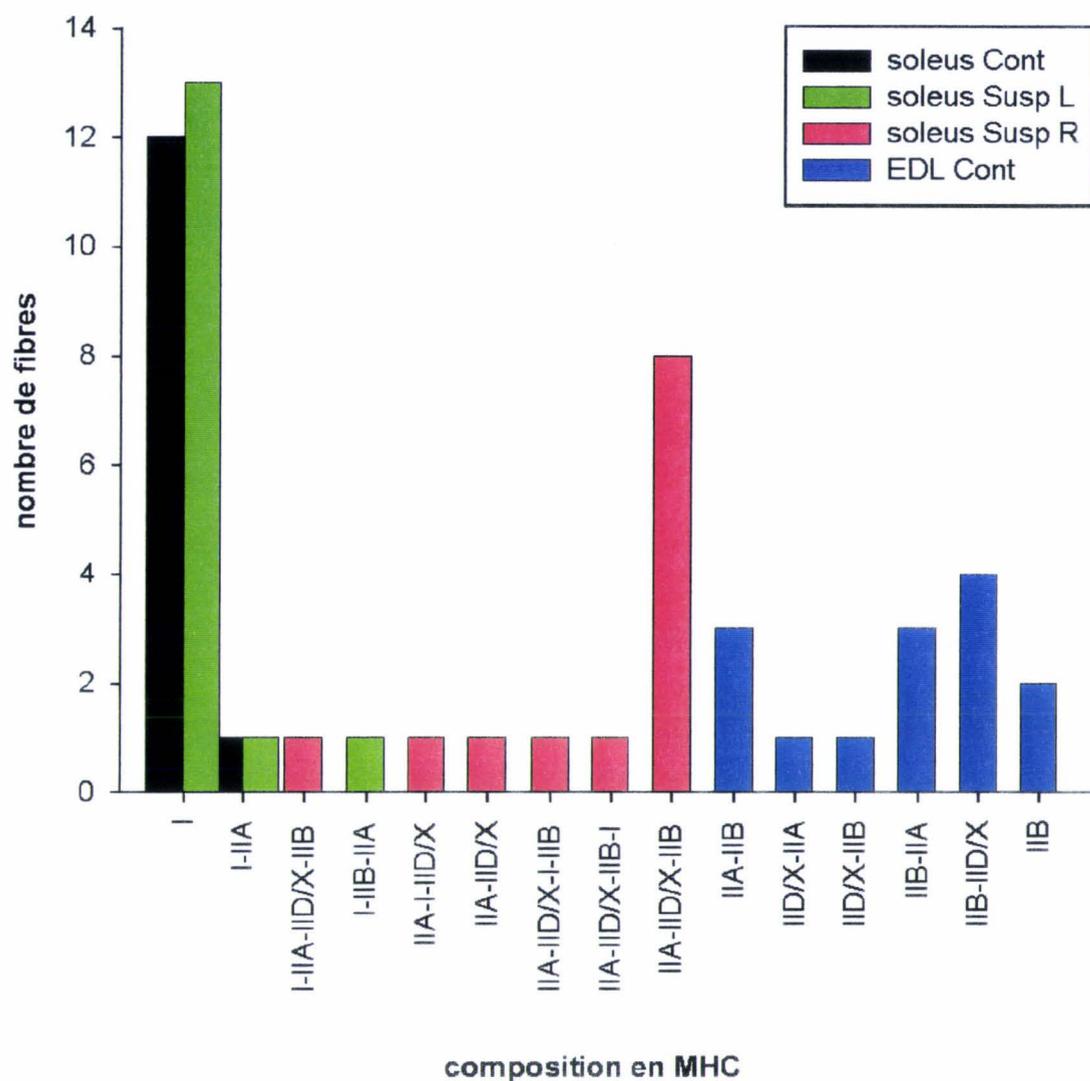


Figure 37 : Histogramme de répartition de la composition en chaînes lourdes de myosine (MHC) des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). La composition en MHC de chaque fibre est indiquée en fonction de l'ordre décroissant de la quantité relative de chaque isoforme.

De plus, l'analyse des diamètres moyens des fibres musculaires de soleus après suspension (figure 38), indique une atrophie importante à la fois pour les fibres lentes (54.3 %) et pour les fibres devenues rapides (47.3 %) par rapport au diamètre des fibres de soleus contrôles.

C - RELATIONS Tension passive/longueur de sarcomère

Les courbes Tension passive/longueur de sarcomère sont obtenues suite à l'étirement passif des fibres musculaires (voir Matériel et Méthodes). Avant chaque expérience, un traitement des fibres par une solution de Triton X100 et de Brij permet de renforcer le protocole de pelage. Les fibres ainsi obtenues ont, outre la perméabilisation du sarcolemme, un réticulum sarcoplasmique détruit, ce qui enlève à ces structures toute possibilité de participer à la génération de tension passive. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases dans les solutions permet de préserver l'intégralité de la molécule de titine au cours de l'expérience.

Lorsque une fibre musculaire est étirée (puis relâchée) passivement, elle présente une réponse mécanique de type visco-élastique. A chaque étirement, la tension augmente rapidement vers une valeur pic, puis diminue de façon exponentielle vers une valeur "plateau". De la même manière, à chaque relâchement la tension chute puis remonte légèrement vers une valeur "plateau". Ce phénomène de relaxation visco-élastique s'effectue sans variation de longueur de sarcomère (figure 39). Nous avons défini expérimentalement la valeur de tension plateau, la tension atteinte à la fin des 3 minutes du temps de relaxation qui suit chaque étirement/relâchement de la fibre. Notre objectif dans cette étude est de corréler les propriétés élastiques passives des fibres musculaires à l'isoforme de titine exprimée. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier suite à un étirement réalisé à faible vitesse, les variations de tension survenant après le phénomène de relaxation, plutôt que l'analyse dynamique de ce phénomène, qui dépend de l'amplitude et de la vitesse de l'étirement.

La relation Tension passive/longueur de sarcomère met en évidence un phénomène d'hystérésis lors de la phase de relâchement (figure 40). La valeur de la tension passive est toujours plus importante lors de l'étirement que lors du relâchement pour une longueur de sarcomère donnée. Ce phénomène est toujours observé sur des tissus biologiques ayant des

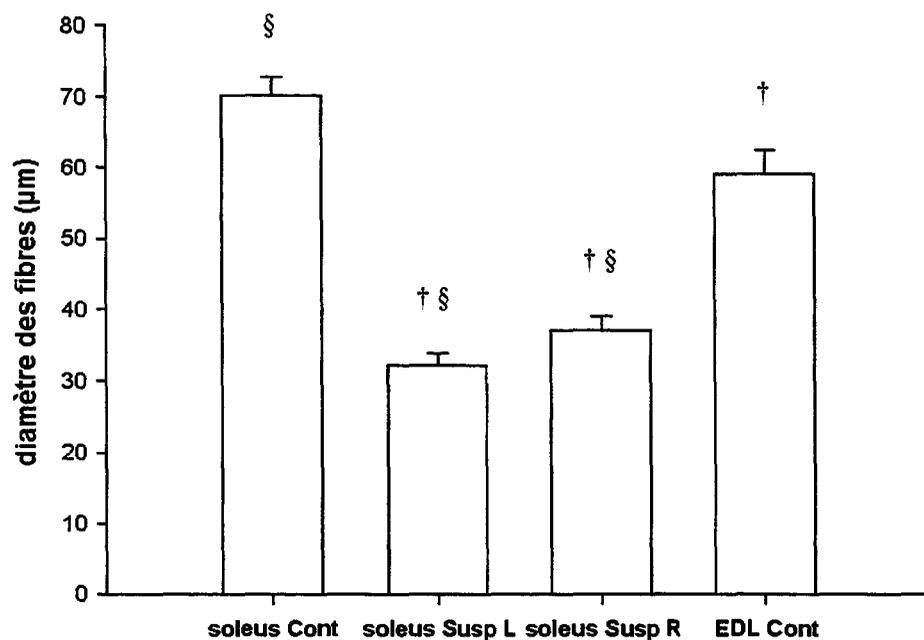


Figure 38 : Evolution du diamètre des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). † indique un différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont.

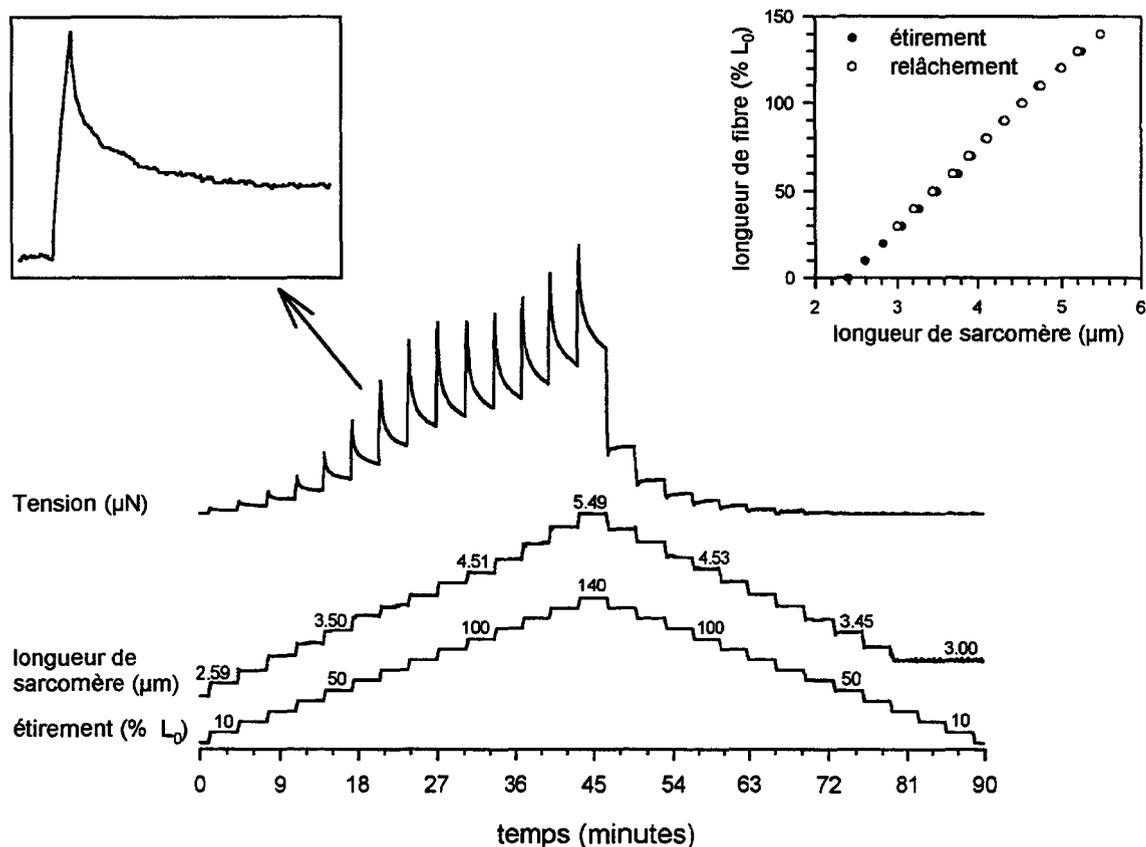


Figure 39 : Illustration du protocole expérimental d'étirements passifs sur une fibre d'EDL contrôle de rat. Les variations de la tension passive, la longueur du sarcomère et les changements de longueur de la fibre sont enregistrés. La fibre qui baigne dans une solution relaxante est étirée puis relâchée par pas de 10 % en 15 secondes. A la fin de chaque étirement/relâchement la longueur de la fibre est maintenue constante pendant 3 minutes. La tension augmente pendant l'étirement puis décroît pour se stabiliser à une valeur "plateau" choisit arbitrairement à la fin des 3 minutes du temps de relaxation. Lors de la phase de relâchement, la tension décroît pour se stabiliser également à une valeur "plateau" (illustrée dans l'encadrement en haut à gauche). La relation entre la longueur de la fibre et la longueur de sarcomère est illustrée en encart, la linéarité de cette relation atteste de la rigidité de notre système expérimental.

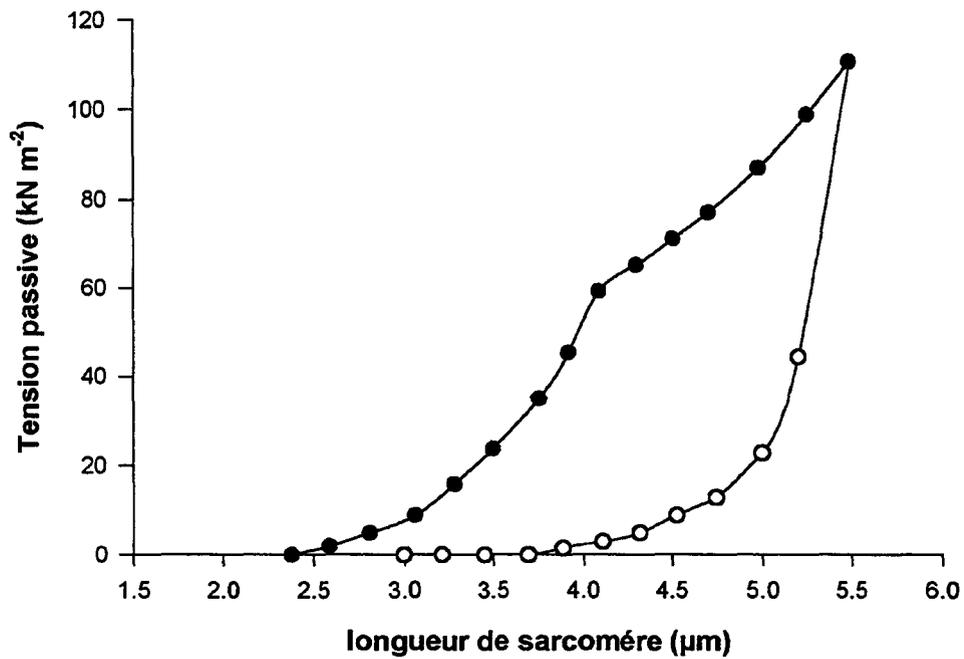


Figure 40 : Illustration de la relation Tension passive/longueur de sarcomère pour une fibre d'EDL contrôlée. Au cours de la phase de relâchement (○), la tension obtenue à une longueur de sarcomère donnée est plus faible qu'au cours de l'étirement (●) et la fibre développe un niveau de tension passive nulle avant son relâchement complet. Ce phénomène d'hystérésis est décrit pour les structures visco-élastiques.

propriétés visco-élastiques et indique que la structure répond en fonction de l'amplitude et du sens de la contrainte imposée (étirement ou relâchement).

Pour contrôler les points d'attache de chaque fibre au système de mesure, la relation longueur de la fibre/longueur de sarcomère est tracée pour chaque expérience (figure 39, encart). La relation linéaire obtenue est utilisée comme indicateur d'une fixation rigide de l'ensemble expérimental ($r \geq 0.98$). Par conséquent, la tension mesurée reflète le comportement élastique passif de la fibre étudiée.

Dans un premier temps, des expériences contrôles ont été réalisées sur des fibres de soleus et de psoas de lapin. Ces expériences ont pour but de reproduire les données décrites dans la littérature et de valider notre protocole expérimental. Ces résultats sont illustrés à la figure 41. Les relations Tension passive/longueur de sarcomère de ces deux types de fibres présentent un tracé distinct. Les fibres de psoas développent des niveaux de tension passive plus élevés que les fibres de soleus. De plus, les fibres de psoas présentent un point de rupture SL_y beaucoup plus faible ($3.82 \pm 0.07 \mu\text{m}$) que les fibres de soleus ($4.40 \pm 0.05 \mu\text{m}$). Ces résultats sont en accord avec ceux déjà décrits par différents auteurs (Granzier et Wang, 1993a ; Granzier et Irving, 1995 ; Linke et coll., 1996 ; Wang et coll., 1991).

Les relations Tension passive/longueur de sarcomère obtenues pour les fibres de soleus et d'EDL contrôles de rat sont illustrées à la figure 42 et les paramètres issus de ces relations sont reportés dans le tableau 8.

Les fibres de soleus et d'EDL contrôles présentent des relations Tension passive/longueur de sarcomère multiphasiques, classiquement décrites dans la littérature pour des fibres de muscle squelettique. Suite à l'étirement, la tension passive croît progressivement à partir de la longueur de repos "au slack" des sarcomères (SL_s). Cette augmentation de tension passive s'effectue de façon exponentielle jusqu'à un point de rupture (SL_y). Après ce point, la tension passive continue d'augmenter progressivement en fonction de l'étirement mais de façon plus faible. Les valeurs de SL_s sont différentes entre les fibres de soleus et d'EDL contrôles. Par contre, ces deux types de fibres présentent des relations Tension passive/longueur de sarcomère similaires, avec un point SL_y non significativement différent (tableau 8). Les fibres de soleus contrôles semblent toutefois développer des niveaux de tension passive légèrement supérieurs à ceux observés pour les fibres d'EDL. Cette différence est plus marquée pour des étirements au-delà du point SL_y .

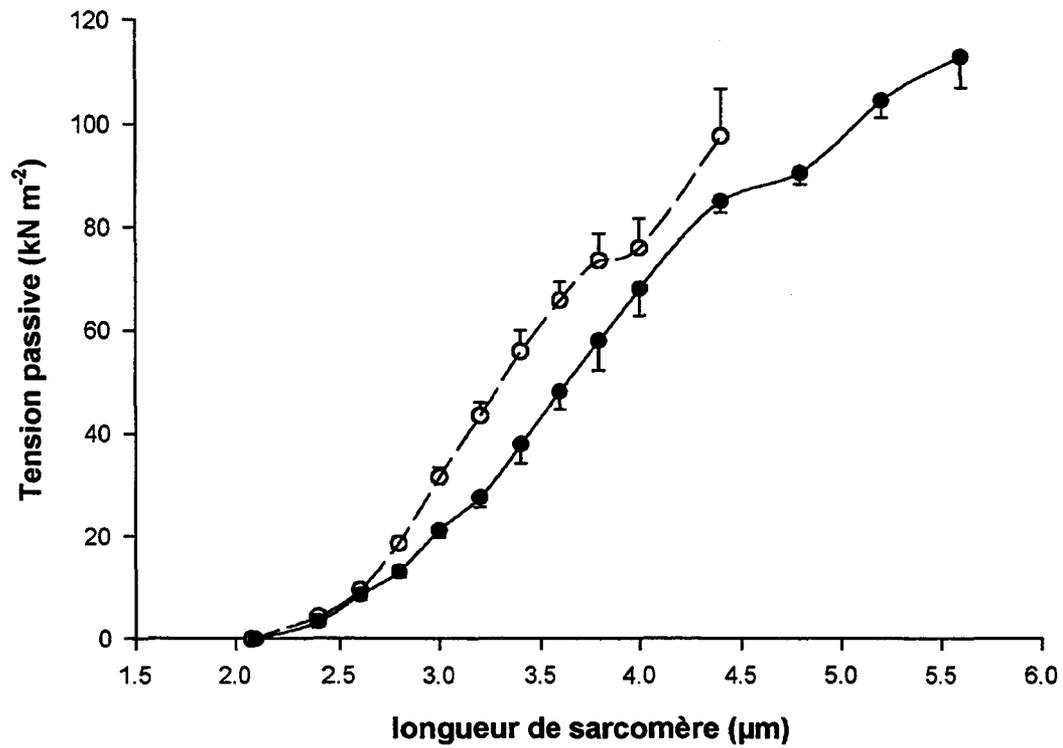


Figure 41 : Relations Tension passive/longueur de sarcomère pour les fibres contrôles de soleus (●) et de psoas (○) de lapin.

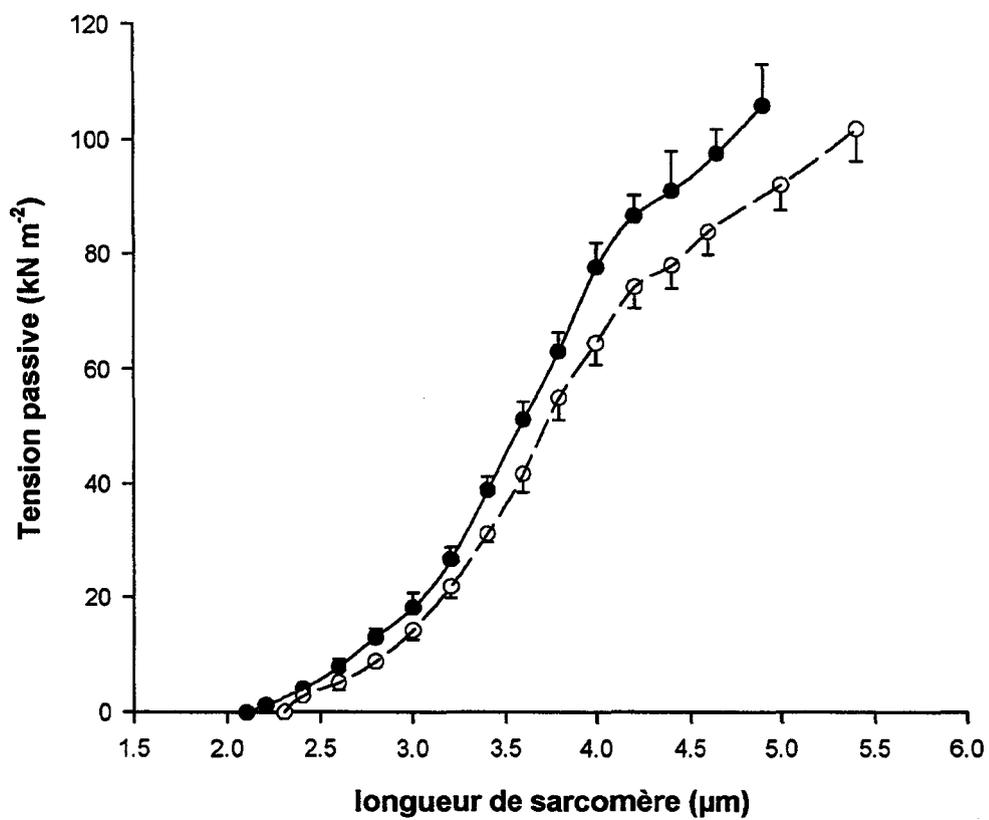


Figure 42 : Relations Tension passive/longueur de sarcomère pour les fibres de soleus contrôles (●) et d'EDL contrôles (○) de rat.

	soleus Cont (n = 13)	soleus Susp L (n = 15)	soleus Susp R (n = 13)	EDL Cont (n = 14)
Longueur de fibre (μm)	1800 \pm 58	1602 \pm 34	1765 \pm 85	1636 \pm 40
SL _s (μm)	2.10 \pm 0.03 [§]	2.20 \pm 0.05	2.19 \pm 0.04	2.28 \pm 0.04 [†]
SL _y (μm)	4.11 \pm 0.04	-	-	4.17 \pm 0.04
SL _y déformation	0.99 \pm 0.03 [§]	0.98 \pm 0.03	0.97 \pm 0.03	0.87 \pm 0.02 [†]
E (kN m ⁻²)	93.40 \pm 2.17 [§]	80.94 \pm 1.95 ^{†§*}	72.88 \pm 1.15 ^{†§*}	98.87 \pm 1.03 [†]

Tableau 8 : Evolution des propriétés élastiques des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. SL_s : longueur de sarcomère au repos "au slack", SL_y : longueur de sarcomère à laquelle la relation Tension passive/longueur de sarcomère marque une rupture, SL_y déformation : valeur de déformation de la fibre à laquelle la relation Tension passive/déformation marque une rupture, E : module de Young complexe. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont, * indique une différence significative entre les fibres des groupes soleus Susp L et soleus Susp R.

D - RELATIONS Tension passive/déformation

Les fibres de soleus suspendus possèdent un niveau de diffraction laser très faible, ce qui rend difficile la lecture des longueurs de sarcomère. Un autre mode de représentation a donc été choisi et nous avons décrit les variations de tension passive en fonction de la déformation de la fibre suivant :

$$\text{déformation de la fibre} = \frac{L}{L_s} - 1 \text{ avec}$$

L = longueur de la fibre à un étirement donné

L_s = longueur initiale de la fibre lorsque les sarcomères sont au repos "au slack".

La figure 43 représente les relations Tension passive/déformation pour les fibres de soleus et d'EDL contrôles. Les deux relations apparaissent confondues pour des faibles niveaux de déformations. Toutefois, les fibres d'EDL contrôles présentent un point de rupture ($SL_{y \text{ déformation}}$) plus faible que celui observé pour les fibres de soleus contrôles (tableau 8).

Après suspension, les fibres lentes de soleus présentent une courbe Tension passive/déformation équivalente à celle obtenue pour les fibres de soleus contrôles (figure 44-A). Par contre, la relation Tension passive/déformation des fibres rapides de soleus suspendus est sensiblement différente de celle obtenue pour les fibres de soleus contrôles. En effet, pour une même valeur de déformation, on observe un niveau de tension passive plus faible pour les fibres rapides de soleus suspendus que pour les fibres de soleus contrôles (figure 44-B). Par contre, après suspension, les deux catégories de fibres de soleus ont une valeur de $SL_{y \text{ déformation}}$ identique à celle obtenue pour les fibres de soleus contrôles (tableau 8).

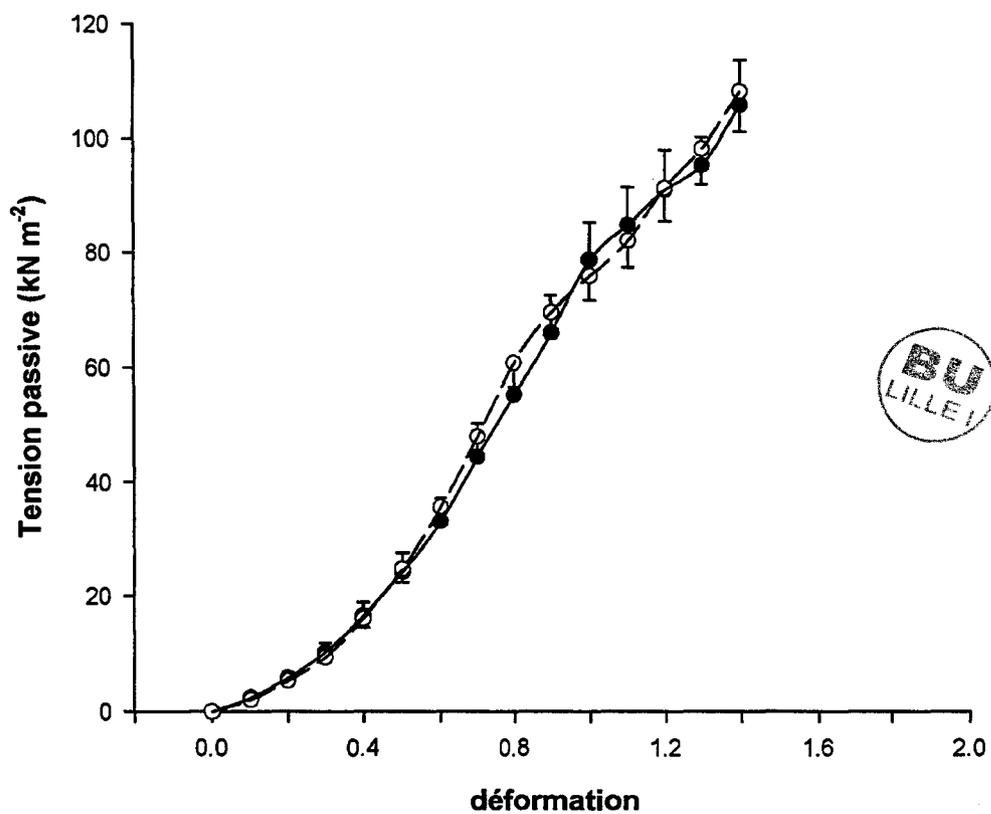
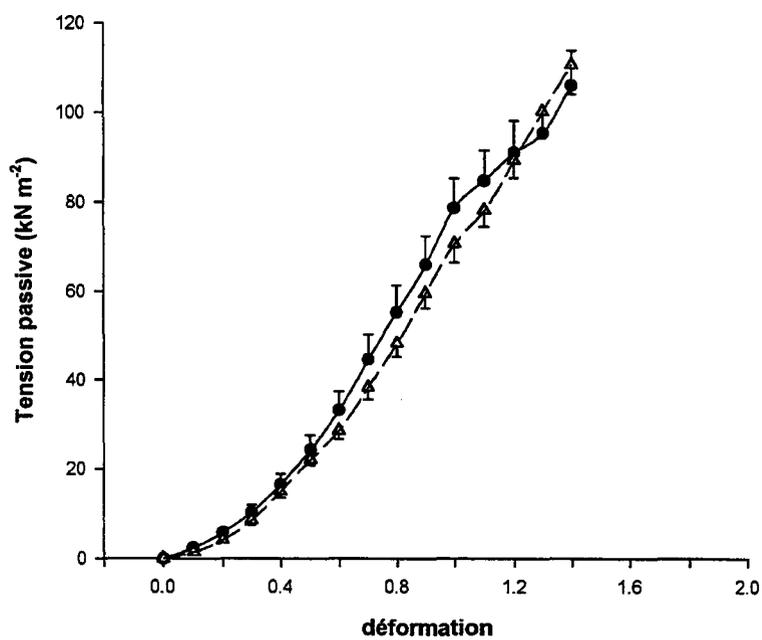


Figure 43 : Relations Tension passive/déformation pour les fibres de soleus contrôles (●) et d'EDL contrôles (○).

A



B

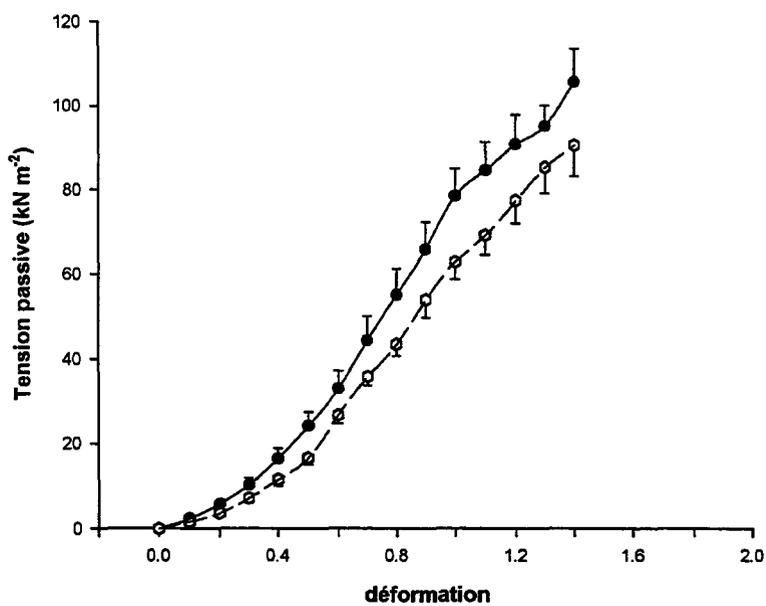


Figure 44 : Relations Tension passive/déformation.

A : fibres de soleus contrôles (●) et fibres lentes de soleus suspendus (Δ).

B : fibres de soleus contrôles (●) et fibres rapides de soleus suspendus (◊).

La phase de croissance exponentielle des relations Tension passive/déformation peut être ajustée par la relation :

$$\sigma = E \varepsilon^2 \text{ où}$$

σ = tension passive (kN m^{-2})

E = module de Young complexe

ε = déformation de la fibre ($\frac{L}{L_s} - 1$) voir paragraphe précédent.

L'ajustement des relations a été effectué jusqu'à une valeur de déformation de la fibre de 0.7, valeur en dessous des valeurs de $SL_{y \text{ déformation}}$ trouvées pour les différents groupes de fibres. Le tableau 8 reprend les valeurs de module de Young complexe trouvées pour les différentes catégories de fibres.

Les fibres de soleus contrôles ont un module de Young complexe de valeur sensiblement plus faible que celle obtenue pour les fibres d'EDL contrôles. Ceci se traduit au niveau des relations Tension passive/déformation par une pente légèrement plus faible pour les fibres de soleus, comparée aux fibres d'EDL contrôles (figure 43).

Après suspension, les fibres lentes et rapides de soleus indiquent une diminution de la valeur de leur module de Young complexe, comparé à celle trouvée pour les fibres de soleus contrôles. Les fibres rapides de soleus suspendus présentent la plus forte diminution.

E - EXPERIENCES DE DEPOLYMERISATION

Le segment de la molécule de titine qui participe à la génération de tension passive suite à un étirement correspond à la partie libre localisée au niveau de la bande I. Toutefois, la portion de la molécule de titine liée à la myosine dans la bande A peut également présenter des propriétés élastiques et participer à la génération de tension passive. Dans cette partie du travail, nous avons étudié les propriétés élastiques de la portion de la molécule de titine localisée dans la bande A suite à la dépolymérisation partielle des filaments épais de myosine. La dépolymérisation est réalisée à l'aide d'une solution de KCl 540 mM pendant 20 minutes (voir Matériel et Méthodes).

La dépolymérisation sélective du filament épais de myosine par la solution de KCl est contrôlée grâce à l'électrophorèse des chaînes lourdes de myosine de chaque fibre. Comme l'actine n'est pratiquement pas extraite avec la solution de KCl de forte force ionique (Higuchi et Umazume, 1985), cette protéine est utilisée comme standard de calibration pour

chaque fibre lors de l'analyse densitométrique des gels. Certains auteurs ont constaté après suspension une diminution de la quantité de l'ARN messager codant pour l'actine (Stevens et coll., 1999 ; Thomason et Booth, 1990). C'est pourquoi, les rapports MHC/actine pré et post-dépolymérisation sont comparés pour un même groupe. Dans ce cas, le pourcentage de dépolymérisation n'est pas influencé par la quantité relative d'actine et peut être comparé d'un groupe à l'autre. Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

Les conditions expérimentales utilisées entraînent une dépolymérisation homogène d'environ 50 % du filament épais de myosine, quel que soit le type de fibre étudié. Les relations Tension passive/déformation pour chaque catégorie de fibres sont illustrées aux figures 45 et 46. Les paramètres de l'ajustement mathématique de la phase de croissance exponentielle de ces relations sont reportés dans le tableau 10.

Les fibres de soleus et d'EDL contrôles montrent après dépolymérisation une modification de leurs propriétés élastiques passives. En effet, celles-ci développent après dépolymérisation des niveaux de tension passive plus faibles (figure 45). De plus, on observe pour ces deux types de fibres une diminution équivalente, non statistiquement différente, de la valeur de leur module de Young complexe. Ceci suggère que la portion de titine libérée suite à la dépolymérisation présente des propriétés élastiques identiques dans les deux types de fibres.

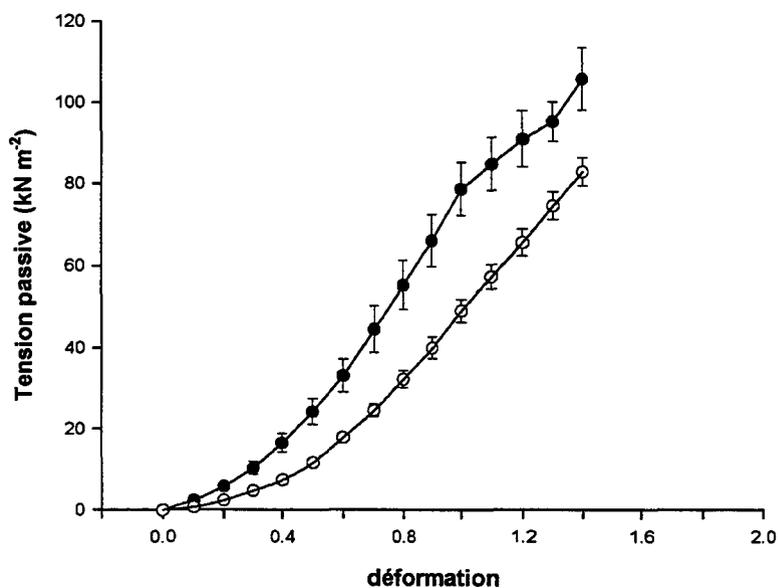
Les fibres lentes et rapides de soleus suspendus développent également après dépolymérisation des tensions passives plus faibles (figure 46). La diminution équivalente de la valeur du module de Young complexe pour ces deux catégories de fibre après dépolymérisation (tableau 10), suggère des propriétés élastiques passives identiques de la portion de titine libérée entre les fibres de soleus suspendus, comme pour les fibres de soleus et d'EDL contrôles.

Ainsi, les conditions de dépolymérisation ayant été identiques quel que soit le type de fibre étudié, ces résultats indiquent qu'aucune modification de la portion de la titine liée à la myosine dans la bande A n'a été induite après atrophie.

	soleus Cont	soleus Susp L	soleus Susp R	EDL Cont
<u>pré-</u> <u>dépolymérisation</u> rapport MHC/actine	4.34 ± 0.50 [§] (n = 13)	4.16 ± 0.50 [§] (n = 15)	5.59 ± 0.49 [§] (n = 13)	7.59 ± 0.65 [†] (n = 14)
<u>post-</u> <u>dépolymérisation</u> rapport MHC/actine	2.03 ± 0.20 [§] (n = 8)	1.91 ± 0.29 [§] (n = 5)	2.51 ± 0.58 (n = 5)	3.74 ± 0.17 [†] (n = 5)
pourcentage de dépolymérisation	47 %	46 %	45 %	49 %

Tableau 9 : Analyse de la quantité relative de chaînes lourdes de myosine (MHC) par rapport à celle d'actine, pour des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. Les résultats ont été obtenus avant (pré) et après (post) la dépolymérisation du filament épais de myosine par une solution KCl à 540 mM. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont.

Soleus Cont



EDL Cont

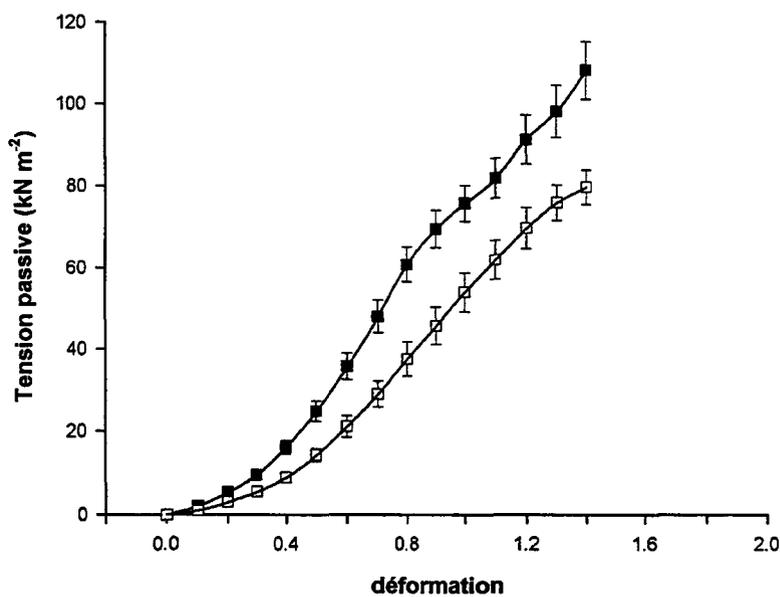
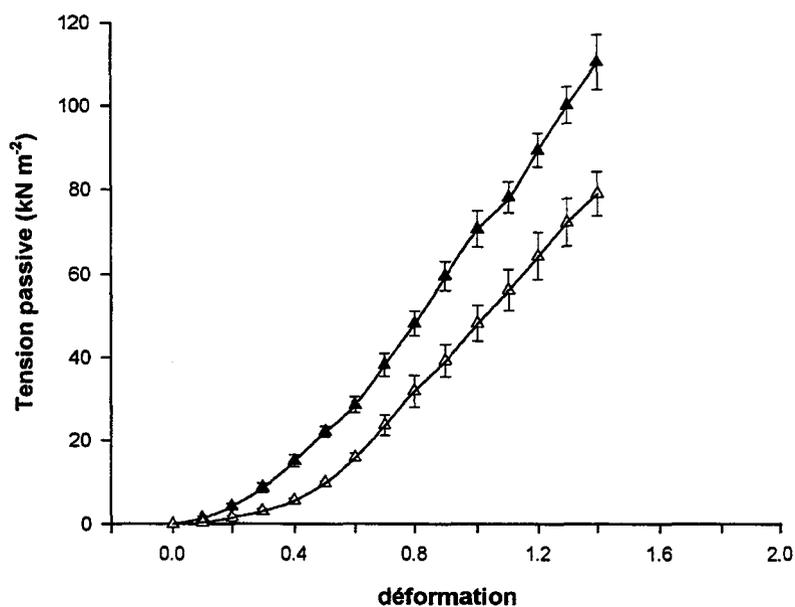


Figure 45 : Relations Tension passive/déformation pour les fibres de soleus contrôles (soleus Cont) et d'EDL contrôles (EDL Cont), avant (symboles pleins) et après (symboles évidés) dépolymérisation du filament épais de myosine par une solution de KCl 540 mM.

Soleus Susp L



Soleus Susp R

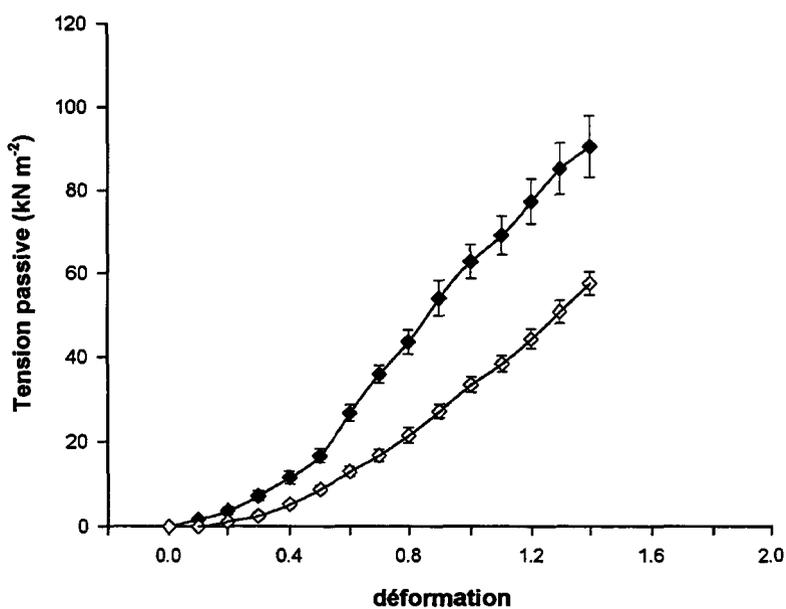


Figure 46 : Relations Tension passive/déformation pour des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus, avant (symboles pleins) et après (symboles évidés) dépolymérisation du filament épais de myosine par une solution de KCl 540 mM.

	soleus Cont	soleus Susp L	soleus Susp R	EDL Cont
<u>pré-</u> <u>dépolymérisation</u> E (kN m ⁻²)	93.40 ± 2.17 [§] (n = 13)	88.94 ± 1.95 ^{†§*} (n = 15)	72.88 ± 1.15 ^{†§*} (n = 13)	98.87 ± 1.03 [†] (n = 14)
<u>post-</u> <u>dépolymérisation</u> E (kN m ⁻²)	49.53 ± 0.61 [§] (n = 8)	44.69 ± 1.64 ^{†§*} (n = 5)	34.56 ± 0.56 ^{†§*} (n = 5)	58.50 ± 0.60 [†] (n = 5)
Diminution (%)	47 %	45 %	53 %	41 %

Tableau 10 : Evolution du module de Young complexe avant (pré) et après (post) dépolymérisation du filament épais de myosine pour des fibres de soleus contrôles (soleus Cont), des fibres lentes (soleus Susp L) et rapides (soleus Susp R) de soleus suspendus et des fibres d'EDL contrôles (EDL Cont). Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. † indique une différence significative avec le groupe soleus Cont, § indique une différence significative avec le groupe EDL Cont, * indique une différence significative entre les fibres des groupes soleus SuspL et soleus Susp R.

DEUXIEME PARTIE

Etude des propriétés contractiles de fibres musculaires de souris atteintes d'une maladie dégénérative du motoneurone.

Cette deuxième partie du travail décrit les propriétés contractiles d'activation par les ions calcium et strontium de fibres isolées des muscles sternocleidomastoïd (SCM) et soleus de souris. Les animaux utilisés sont des souris wobbler qui présentent une dégénérescence des motoneurons situés dans la corne ventrale de la moelle épinière cervicales. Deux stades d'évolution de la maladie ont été choisis : 5 et 7 semaines. Les effets de la pathologie et sa progression ont été suivis d'une part sur muscles entiers, par l'analyse électrophorétique des chaînes lourdes (MHC) et légères (MLC) de myosine ainsi que de la troponine C et d'autre part, par l'étude des propriétés contractiles de fibres musculaires isolées.

Ce travail fait l'objet d'une publication dans *Experimental Neurology* (actuellement en révision après corrections).

I - EVOLUTION DES PROPRIETES STRUCTURALES DES MUSCLES SOLEUS ET SCM DE SOURIS

A - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES MUSCLES ENTIERS

La détermination électrophorétique des isoformes des chaînes lourdes (MHC) et légères (MLC) de myosine, ainsi que celle des isoformes de TnC a été réalisée sur l'ensemble des muscles étudiés. Toutefois, seule l'étude des MLC à 7 semaines a été réalisée sur le muscle soleus. Les résultats sont reportés dans le tableau 11.

	soleus				SCM			
	5 semaines		7 semaines		5 semaines		7 semaines	
	contrôle (n = 2)	wobbler (n = 2)	contrôle (n = 5)	wobbler (n = 6)	contrôle (n = 2)	wobbler (n = 2)	contrôle (n = 6)	wobbler (n = 6)
MHC (%)								
MHC I	29.40 ± 1.50	49.91 ± 0.98*	37.19 ± 1.86	62.07 ± 5.94*	0	12.35 ± 1.25*	0	4.93 ± 1.64*
MHC IIA/D(X)	62.00 ± 7.90	50.09 ± 0.97	57.98 ± 2.46	36.73 ± 5.83*	17.34 ± 2.56	53.10 ± 8.60	42.73 ± 1.64 [†]	68.12 ± 5.42*
MHC IIB	9.10 ± 9.10	0	5.79 ± 3.47	1.20 ± 1.20	82.91 ± 2.31	35.80 ± 6.50*	57.43 ± 1.58 [†]	26.94 ± 5.89*
MLC (%)								
MLC 1s/1s+1f	N.D.	N.D.	50.60 ± 2.20	56.42 ± 2.48	0	8.06 ± 2.38	13.40 ± 4.16	23.06 ± 7.51
MLC 2s/2s+2f	N.D.	N.D.	37.09 ± 3.25	42.51 ± 1.17	0	6.82 ± 2.20	1.24 ± 1.24	11.06 ± 1.91*
MLC 1f/1s+1f	N.D.	N.D.	49.37 ± 2.19	43.58 ± 3.67	100	91.93 ± 2.38	86.59 ± 4.16	76.93 ± 7.51
MLC 2f/2s+2f	N.D.	N.D.	62.90 ± 3.25	57.48 ± 1.17	100	93.17 ± 2.20	98.76 ± 1.24	88.93 ± 1.91*
MLC 3f/1s+1f	N.D.	N.D.	17.91 ± 1.38	20.09 ± 1.63	31.20 ± 2.24	29.47 ± 1.26	37.93 ± 4.25	38.23 ± 4.83
TnC (%)								
TnC lente	62.17 ± 4.51	72.30 ± 1.91	65.57 ± 3.81	79.92 ± 4.27*	12.32 ± 5.85	41.04 ± 4.25	5.33 ± 4.13	30.54 ± 5.33*
TnC rapide	37.81 ± 4.51	27.68 ± 1.91	34.42 ± 3.81	20.07 ± 4.27*	87.67 ± 5.86	58.95 ± 4.25	94.66 ± 4.14	69.46 ± 5.33*

Tableau 11 : Evolution de la composition en chaînes lourdes (MHC) et légères (MLC) de myosine et en troponine C (TnC) des muscles soleus et SCM de souris âgées de 5 et 7 semaines. Les différentes isoformes de MHC sont exprimées en fonction de la quantité totale de MHC. Chaque isoforme de MLC est exprimée en fonction de la quantité totale des isoformes lentes et rapides. La MLC 3f est exprimée en fonction des isoformes de MLC 1. Les isoformes de TnC sont exprimées en fonction du signal total des immunoblots. N.D., non déterminé. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de muscles étudiés.

* indique une différence significative avec le groupe contrôle du même âge.

† indique une différence significative entre 5 et 7 semaines.

A



B

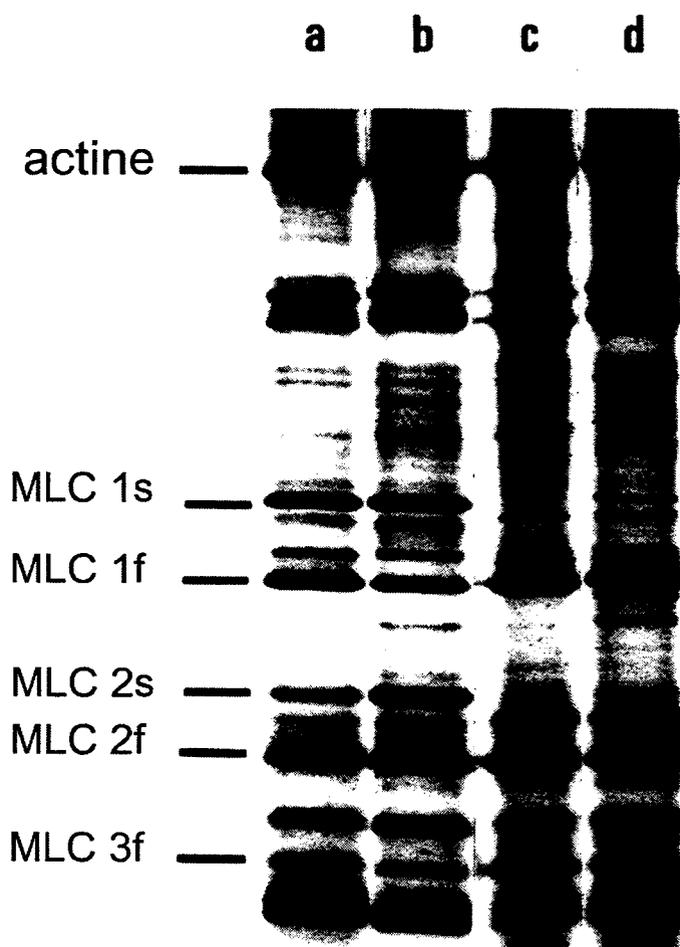


Figure 47 : Profils électrophorétiques caractéristiques des muscles soleus et SCM de souris contrôles et wobbler âgées de 7 semaines. Ligne a : muscle soleus contrôle, ligne b : muscle soleus wobbler, ligne c : muscle SCM contrôle, ligne d : muscle SCM wobbler.

A : séparation des chaînes lourdes de myosine (MHC) sur un gel SDS-PAGE à 7.5 % .

B : séparation des chaînes légères de myosine (MLC) sur un gel SDS-PAGE 10-20 %.

1 - Analyse des isoformes de MHC

Un exemple de profil électrophorétique est illustré à la figure 47-A pour les muscles soleus et SCM à 7 semaines. Les muscles soleus contrôles expriment majoritairement la MHC IIA et IIB. Ces isoformes représentent à 5 semaines 71 % du pourcentage total de MHC et 63 % à 7 semaines (tableau 11). Une légère augmentation de la proportion en MHC I est observée à 7 semaines, bien que celle-ci ne soit pas significative.

Les muscles SCM contrôles expriment uniquement les isoformes de MHC IIA et de MHC IIB. L'isoforme de MHC IIB est principalement exprimée à 5 semaines, alors qu'à 7 semaines les 2 isoformes rapides de MHC sont présentes en quantités équivalentes.

Chez les animaux wobblers, l'analyse électrophorétique révèle pour le muscle soleus une augmentation d'expression de la MHC I accompagnée d'une diminution de l'expression de la MHC IIA. Cette redistribution des isoformes de MHC vers un type lent est observable aussi bien à 5 qu'à 7 semaines (tableau 11). L'analyse électrophorétique des muscles SCM des animaux wobblers indique l'apparition de la MHC I, isoforme non exprimée chez les contrôles. Ceci est observé sur les animaux âgés de 5 et de 7 semaines et est accompagné d'une réorganisation de l'expression des isoformes rapides de MHC. En effet, quel que soit l'âge étudié on observe une nette diminution de l'expression de la MHC IIB accompagnée d'une augmentation de l'expression de l'isoforme de MHC IIA comparée aux animaux contrôles.

L'isoforme de MHC IID(X) n'est jamais exprimée chez les animaux contrôles et wobblers, bien que la technique électrophorétique utilisée nous permet de la détecter dans les muscles de rat.

2 - Analyse des isoformes de MLC

Un profil électrophorétique typique des muscles soleus et SCM à 7 semaines est illustré à la figure 47-B. La proportion de chaque isoforme de MLC est exprimée en fonction de la quantité totale des formes lentes et rapides de l'isoforme considérée. La quantité de MLC 3f est exprimée en fonction des isoformes essentielles de MLC (MLC 1s et 1f) (tableau 11).

Les muscles soleus contrôles co-expriment à 7 semaines l'ensemble des isoformes lentes et rapides des MLC. Les formes lentes et rapides des chaînes légères essentielles (MLC 1) sont présentes en quantité équivalente, alors que pour les MLC régulatrices (MLC 2) l'isoforme rapide de MLC 2f est exprimée de façon prédominante. Les muscles SCM contrôles expriment à 5 semaines uniquement les formes rapides de MLC. A sept semaines,

on observe l'apparition d'une faible quantité d'isoformes lentes des chaînes légères essentielles et régulatrices.

Les muscles soleus d'animaux wobblers ne montrent pas de changement dans leur contenu en MLC à 7 semaines. Par contre, pour les muscles SCM, on observe l'apparition des isoformes lentes de MLC à 5 semaines. Leur proportion augmente à 7 semaines de manière significative pour la MLC 2s. Toutefois, l'expression des formes rapides des MLC reste prédominante dans les muscles d'animaux wobblers quel que soit l'âge étudié.

3 - Analyse des isoformes de TnC

L'analyse par immunoblot de l'expression des isoformes de troponine C (TnC) a également été réalisée sur l'ensemble des muscles étudiés. La figure 48 montre un immunoblot caractéristique des muscles soleus et SCM à 7 semaines. L'anticorps anti TnC cardiaque utilisé reconnaît une bande dans un extrait de muscle cardiaque, identifiée comme étant de la TnC lente cardiaque (figure 48, ligne a). L'utilisation de cet anticorps sur un extrait de troponines purifiées issu de muscles rapides (figure 48, ligne b), nous permet d'identifier deux bandes. Tout d'abord, une bande minoritaire dont le niveau de migration est équivalent à celui présenté par la TnC cardiaque. Cette bande minoritaire est identifiée comme étant de la TnC lente squelettique. Cet anticorps reconnaît également une bande majoritaire, de niveau de migration sensiblement plus élevé que celui de la TnC lente identifiée dans cet extrait de muscle rapide comme étant de la TnC rapide squelettique.

Les muscles soleus contrôles expriment à 5 et 7 semaines les isoformes lentes et rapides de TnC squelettiques. Le signal correspondant à l'isoforme lente est plus importante que celui de l'isoforme rapide (62 % et 38 %, respectivement). Les muscles SCM contrôles expriment de manière prédominante à 5 et 7 semaines l'isoforme rapide de TnC (tableau 11).

Chez les animaux wobblers âgés de 5 semaines, seuls les muscles SCM présentent une redistribution de l'expression des isoformes de TnC. On observe une augmentation du signal correspondant à la TnC lente, accompagnée d'une diminution du signal de la TnC rapide mais la différence n'apparaît pas significative par rapport aux muscles contrôles. Chez les animaux wobblers âgés de 7 semaines, l'analyse par immunoblot indique pour les muscles soleus et SCM une augmentation du signal de la TnC lente, parallèlement à une diminution de celui correspondant à la TnC rapide. Toutefois, pour le muscle SCM l'isoforme de TnC rapide reste co-exprimée de manière prédominante par rapport à l'isoforme lente.



Figure 48 : Analyse par immunoblot de l'expression des isoformes de troponin C (TnC) dans les muscles soleus et SCM de souris contrôles et wobbler âgées de 7 semaines.

TnCf : isoforme lente de TnC, TnCf : isoforme rapide de TnC.

a : cœur de rat.

b : extrait de troponines.

c : muscle soleus contrôle.

d : muscle soleus wobbler.

e : muscle SCM contrôle.

f : muscle SCM wobbler.

Les muscles soleus et SCM issus des animaux wobblers semblent donc acquérir une quantité plus importante d'isoformes lentes des protéines contractiles et régulatrices et s'orienter vers un typage plus lent. Cet effet apparaît plus marqué avec l'évolution de la maladie.

B - ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES FIBRES MUSCULAIRES

Après l'étude des paramètres contractiles, chaque fibre musculaire est analysée en électrophorèse pour déterminer sa composition en MHC. L'histogramme à la figure 49 illustre la distribution des différentes fibres étudiées en fonction de leur contenu en MHC.

Pour les muscles de soleus contrôles, la majorité des fibres expriment à 5 et 7 semaines uniquement de la MHC IIA (71.4 % et 80.0 % à 5 et à 7 semaines, respectivement). Les autres fibres co-expriment la MHC IIA avec la MHC I, où présentent uniquement de la MHC I. Les fibres issues des muscles SCM contrôles expriment à 5 semaines soit de la MHC IIB seule (45.0 %), soit de la MHC IIB et de la MHC IIA (55.0 %). Par contre, à 7 semaines, les fibres trouvées ne contiennent que de la MHC IIB.

Chez les animaux wobblers, la plupart des fibres de soleus obtenues à 5 et à 7 semaines soit expriment uniquement de la MHC I (52.2 % et 45.8 %, respectivement), soit co-expriment les isoformes de MHC I et de MHC IIA et sont donc hybrides. Un faible pourcentage de fibres n'exprimant que de la MHC IIA a été trouvée à 5 et à 7 semaines (17.39 % et 16.6 %, respectivement). Pour les muscles SCM, la majorité des fibres prélevées à 5 et 7 semaines (58.8 % et 45.7 %, respectivement) sont de type hybride et contiennent différentes proportions de MHC IIB et de MHC IIA. Des fibres ne contenant que de la MHC IIA et quelques fibres co-exprimant cette isoforme avec de la MHC I ont également été trouvées.

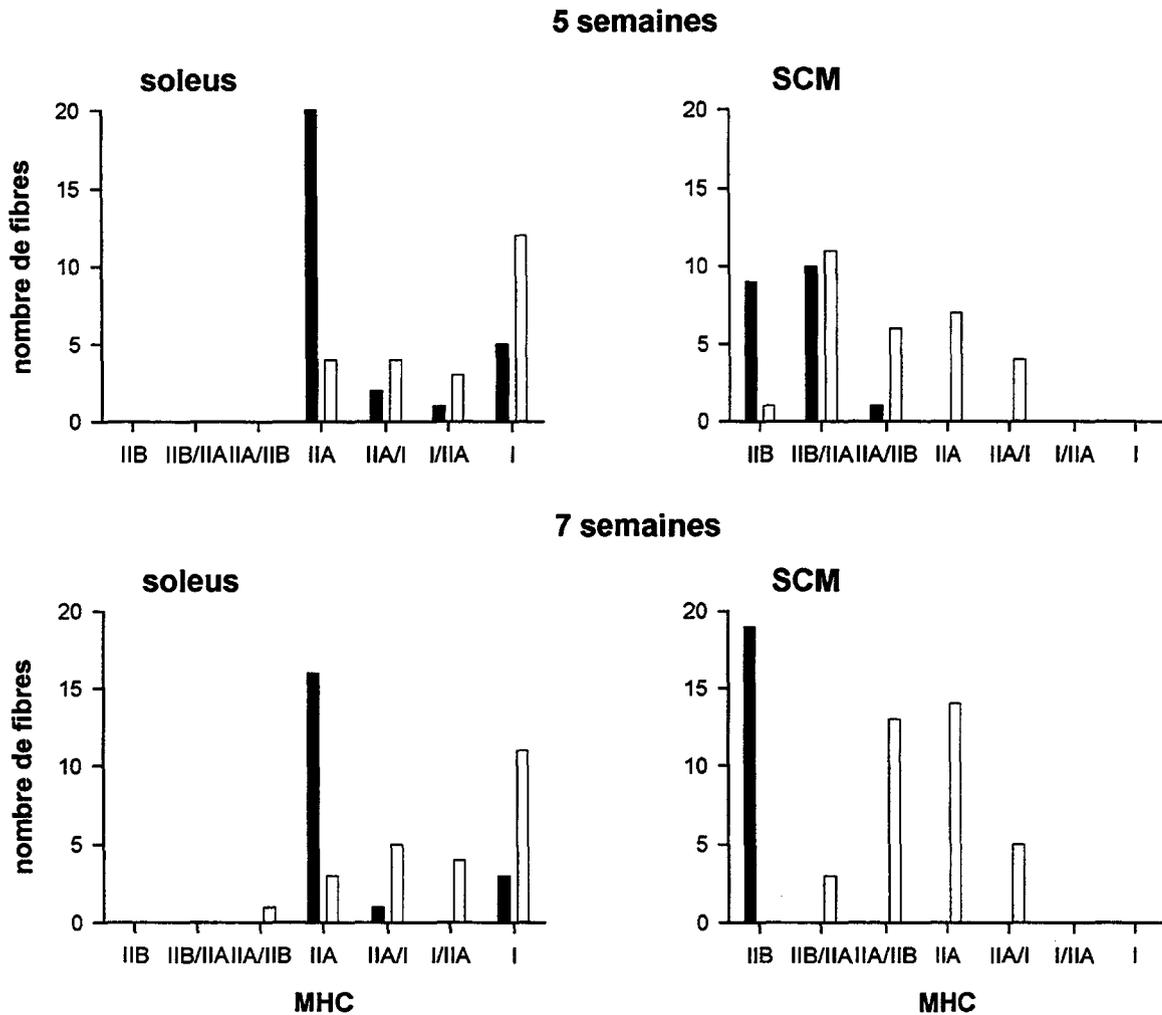


Figure 49 : Histogramme de répartition de la composition en chaînes lourdes de myosine (MHC) des fibres de soleus et de SCM de souris contrôles (barres noires) et wobbler (barres blanches). La composition en MHC de chaque fibre est indiquée en fonction de l'ordre décroissant de la quantité relative de chaque isoforme.

II - ATROPHIE MUSCULAIRE

A - EVOLUTION DU DIAMETRE DES FIBRES

Le tableau 12 reprend les valeurs des diamètres moyens mesurés pour les différents types de fibres étudiées.

Les fibres lentes et rapides de soleus contrôle ne présentent pas de différence significative de leur valeur de diamètre, aussi bien à 5 qu'à 7 semaines. Par contre, les fibres rapides de soleus et SCM montrent un diamètre plus important avec l'âge.

Chez les animaux wobblers à 5 semaines, seules les fibres de SCM présentent une diminution de leur diamètre moyen, tandis que les fibres de soleus ne sont pas atrophiées. A sept semaines, les fibres rapides de soleus et de SCM montrent une diminution de la valeur moyenne de leur diamètre.

B - TENSIONS MAXIMALES

Les valeurs des tensions maximales établies pour chaque type de fibre sont également reportées dans le tableau 12.

Chez les animaux contrôles, les fibres rapides de soleus développent à 5 semaines une force absolue (μN) significativement inférieure à celle obtenue pour les fibres lentes. Avec l'âge, cette différence disparaît et les deux types de fibres développent des tensions maximales équivalentes. De plus, quel que soit le muscle étudié, les tensions développées sont plus fortes à 7 semaines comparées à celles obtenues à 5 semaines.

Chez les animaux wobblers âgés de 5 semaines, les fibres rapides de soleus présentent toujours une force sensiblement inférieure à celle observée pour les fibres lentes. Toutefois la force développée par les fibres wobblers est légèrement inférieure à celle mesurée sur les fibres contrôles, bien que celle-ci ne soit pas significative.

Les fibres de SCM d'animaux wobblers présentent une diminution de 58.5 % de leur valeur de tension maximale comparée aux fibres contrôles.

Pour les animaux wobblers âgés de 7 semaines, seules les fibres rapides de soleus présentent une diminution de la valeur de la tension maximale (chute de 31.58 %). Les fibres de SCM présentent, quant à elles, une diminution plus forte de la tension maximale (chute de 65.20 %) comparée à 5 semaines.

	diamètre (μm)	P_0 (μN)	P_0 (kN m^{-2})
5 semaines			
<u>soleus contrôle</u>			
lente (n=6)	28.12 \pm 2.13	85.79 \pm 7.74	143.17 \pm 8.77
rapide (n=22)	25.85 \pm 0.62	64.43 \pm 3.45 [¶]	126.54 \pm 6.67
<u>soleus wobblers</u>			
lente (n=15)	27.08 \pm 0.79	72.27 \pm 5.96	126.57 \pm 8.09
rapide (n=8)	25.00 \pm 1.18	54.35 \pm 2.69 [¶]	116.70 \pm 10.30
<u>SCM contrôle</u>			
rapide (n=20)	35.62 \pm 1.70	132.66 \pm 9.17	141.51 \pm 9.87
<u>SCM wobblers</u>			
rapide (n=29)	25.21 \pm 0.79 [*]	55.04 \pm 3.30 [*]	114.45 \pm 7.57 [*]
7 semaines			
<u>soleus contrôle</u>			
lente (n=3)	33.33 \pm 2.08	135.38 \pm 6.93 [†]	159.91 \pm 12.31
rapide (n=17)	35.96 \pm 1.39 [†]	129.20 \pm 8.70 [†]	141.73 \pm 18.75
<u>soleus wobblers</u>			
lente (n=15)	34.00 \pm 1.64 [‡]	134.59 \pm 14.14 [‡]	144.64 \pm 10.01
rapide (n=9)	29.86 \pm 1.39 ^{*‡}	88.39 \pm 9.85 ^{*‡¶}	123.39 \pm 9.58
<u>SCM contrôle</u>			
rapide (n=19)	46.84 \pm 1.16 [†]	211.50 \pm 14.19 [†]	135.89 \pm 7.16
<u>SCM wobblers</u>			
rapide (n=35)	26.01 \pm 0.89 [*]	73.59 \pm 4.20 ^{*‡}	125.96 \pm 5.43

Tableau 12 : Evolution des diamètres et tensions maximales (μN et kN m^{-2}) des fibres de soleus et SCM de souris contrôles et wobblers. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées. * indique une différence significative avec le groupe contrôle du même âge, † indique une différence significative avec le groupe contrôle 5 semaines, ¶ indique une différence significative entre les fibres lentes et rapides du même groupe et ‡ indique une différence significative avec le groupe wobblers 5 semaines.

Lorsque la valeur de la tension maximale est rapportée à l'unité de surface (kNm^{-2}), aucune diminution significative de la force n'est observée pour les fibres d'animaux wobblers comparée aux contrôles. La perte de force (μN) observée pourrait être attribuée à la diminution de diamètre et donc à une diminution du nombre de ponts actine-myosine. Toutefois, les fibres de SCM wobblers présentent à 5 semaines une diminution de la force (kNm^{-2}) accompagnée d'une diminution de diamètre. Pour ces fibres, la perte de force (μN) observée pourrait rendre compte d'un phénomène différent associant une diminution du nombre de ponts formés entre l'actine et la myosine et une perte de force par pont.

III - RELATIONS Tension/pCa

Les relations Tension/pCa établies pour les différentes fibres étudiées sont représentées à la figure 50 et les paramètres issus de ces relations sont indiqués dans le tableau 13.

Les fibres lentes de soleus contrôles ont des paramètres d'activation par les ions calcium différents de ceux obtenus pour les fibres rapides de soleus, aussi bien à 5 qu'à 7 semaines. Ainsi, les fibres de type rapide présentent une sensibilité plus faible vis-à-vis du calcium que les fibres lentes (valeurs du seuil d'activation plus faible) et possèdent une pente de la relation Tension/pCa (n_H) plus forte que celle des fibres lentes. Par ailleurs, à 5 semaines les deux types de fibres possèdent la même valeur de pCa_{50} , alors qu'à 7 semaines les fibres rapides ont une valeur de pCa_{50} plus faible que celle des fibres lentes. Enfin, avec l'âge on observe une diminution de l'affinité calcique pour l'ensemble des fibres étudiées, avec un décalage des relations Tension/pCa vers des concentrations calciques plus élevées.

Chez les animaux wobblers, les fibres lentes et rapides de soleus ne présentent pas de modification de leurs paramètres d'activation calcique à 5 semaines. Par contre, à 7 semaines, les fibres lentes et rapides de soleus présentent un décalage vers la droite de leur relation Tension/pCa. Il se produit donc une perte de sensibilité calcique. Le degré de coopérativité entre les protéines (paramètre n_H) n'apparaît pas être modifié pour les fibres de soleus wobblers.

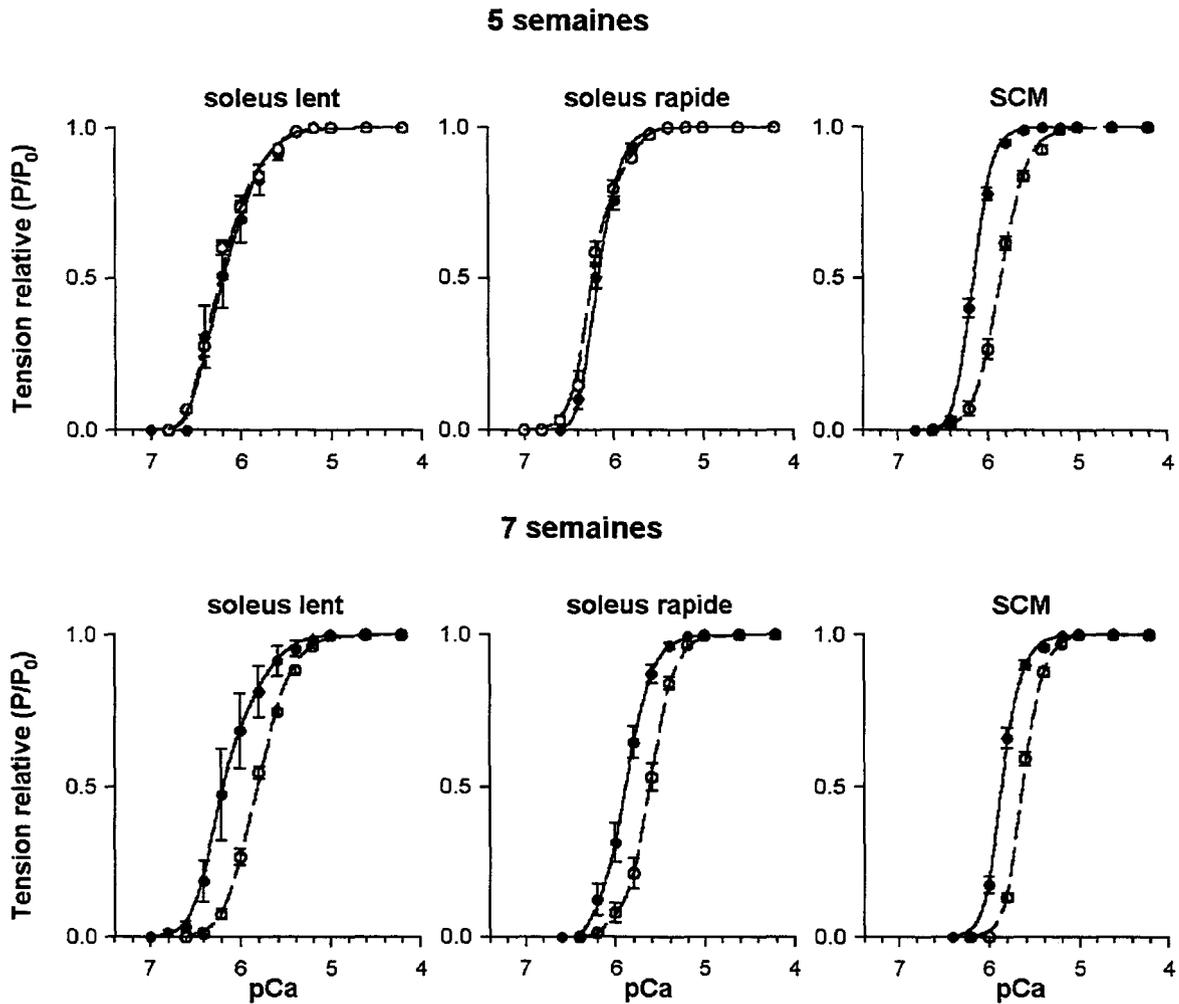


Figure 50 : Relations Tension/pCa des fibres de soleus et SCM de souris contrôles (●) et wobbler (○) à 5 et 7 semaines. Ces relations sont ajustées à l'aide de l'équation de Hill.

	PCa seuil	pCa₅₀	n_H
5 semaines			
<u>soleus contrôle</u>			
lente (n=6)	6.80 ± 0.06	6.18 ± 0.09	2.36 ± 0.27
rapide (n=22)	6.63 ± 0.03 [¶]	6.15 ± 0.02	4.28 ± 0.35 [¶]
<u>soleus wobbler</u>			
lente (n=15)	6.85 ± 0.01	6.15 ± 0.02	2.29 ± 0.05
rapide (n=8)	6.84 ± 0.05*	6.16 ± 0.03	3.22 ± 0.27 [¶]
<u>SCM contrôle</u>			
rapide (n=20)	6.54 ± 0.02	6.11 ± 0.01	5.35 ± 0.35
<u>SCM wobbler</u>			
rapide (n=29)	6.60 ± 0.03	5.83 ± 0.02*	3.07 ± 0.18*
7 semaines			
<u>soleus contrôle</u>			
lente (n=3)	6.92 ± 0.06	6.09 ± 0.10	2.46 ± 0.40
rapide (n=17)	6.41 ± 0.04 ^{†¶}	5.79 ± 0.02 ^{†¶}	3.77 ± 0.22 [¶]
<u>soleus wobbler</u>			
lente (n=15)	6.61 ± 0.03* [‡]	5.78 ± 0.02* [‡]	2.61 ± 0.11 [‡]
rapide (n=9)	6.30 ± 0.10 ^{†¶}	5.64 ± 0.04* ^{†¶}	3.72 ± 0.33 [¶]
<u>SCM contrôle</u>			
rapide (n=19)	6.41 ± 0.04 [†]	5.83 ± 0.02 [†]	4.21 ± 0.27 [†]
<u>SCM wobbler</u>			
rapide (n=35)	6.14 ± 0.02* [‡]	5.61 ± 0.01* [‡]	4.60 ± 0.23 [‡]

Tableau 13 : Evolution des paramètres d'activation calcique des fibres de soleus et SCM de souris contrôles et wobbler. pCa seuil : seuil d'activation calcique, pCa₅₀ plus faible concentration de Ca²⁺ qui induit une tension, n_H : pente de la relation Tension/pCa. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de fibres étudiées.

* indique une différence significative avec le groupe contrôle du même âge.

† indique une différence significative avec le groupe contrôle 5 semaines.

¶ indique une différence significative entre les fibres lentes et rapides du même groupe.

‡ indique une différence significative avec le groupe wobbler 5 semaines.

Les fibres de SCM contrôles présentent à 7 semaines une sensibilité et une affinité plus faible vis-à-vis du calcium par rapport à 5 semaines. Ceci est représenté par un décalage vers des concentrations calciques plus fortes de la relation Tension/pCa. De plus, ces fibres ont une valeur de n_H plus élevée.

Chez les animaux wobblers, on observe une diminution de la valeur de la pCa_{50} aussi bien à 5 qu'à 7 semaines, accompagnée d'une diminution du seuil d'activation pour les fibres les plus âgées. Les variations des différents paramètres d'activation calcique sont équivalentes pour les fibres IIB et IIA des muscles SCM contrôles et wobblers.

DISCUSSION

PREMIERE PARTIE

Etude des propriétés contractiles et élastiques de fibres musculaires de soleus de rat après une période d'hypodynamie-hypokinésie.

I - EVOLUTION STRUCTURALE

Les effets de la suspension ont été étudiés par l'analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine des muscles soleus. Les résultats indiquent une modification de la distribution des isoformes de MHC après atrophie. En effet, on observe une diminution d'expression de l'isoforme lente de MHC I, accompagnée de l'augmentation du pourcentage de la MHC IIA et de l'apparition des isoformes rapides de MHC IID(X) et de MHC IIB, isoformes jamais exprimées dans le muscle soleus durant les différents stades de son développement normal (Sugiura et coll., 1992). Une telle expression d'isoformes rapides indique une conversion des muscles soleus dans le sens lent → rapide et est caractéristique de modifications induites par des situations d'atrophies fonctionnelles (voir Données Bibliographiques de Base). Cependant la majorité des travaux décrivent en général après suspension une évolution de l'expression de la MHC I vers les MHC IIA et IID(X) (Campioni et coll., 1993 ; Fauteck et Kandarian, 1995 ; Oishi et coll., 1998), mais l'apparition de la MHC IIB est moins fréquemment décelée, que ce soit au niveau protéique (Caiozzo et coll., 1998 ; Fauteck et Kandarian, 1995 ; Oishi et coll., 1998 ; Stevens et coll., 1999 ; Talmadge et coll., 1996), ou au niveau ARNm (Diffie et coll., 1991 ; Stevens et coll., 1999).

Dans ce travail, nous montrons la possibilité d'induire une expression importante (environ 50 % du total des MHC) des isoformes rapides de MHC dans le muscle soleus de rat après suspension.

L'augmentation du taux relatif des isoformes rapides se retrouve au niveau des profils électrophorétiques des fibres isolées, avec l'apparition d'un grand nombre de fibres hybrides après suspension qui ont été classées en différentes catégories. La première catégorie de fibres (minoritaire, n = 2) est de type hybride lent et est caractérisée par des fibres qui co-expriment la MHC I avec une (MHC IIA) ou plusieurs (MHC IIA et IIB) isoformes rapides. La deuxième catégorie est composée de fibres hybrides rapides (n = 21) qui co-expriment la

MHC I avec la MHC IIA (majoritaire) ou avec différentes associations de MHC rapides. Enfin, nous avons également mis en évidence des fibres de type rapide ($n = 9$) qui co-expriment soit les isoformes de MHC IIA et de MHC IID(X), soit l'ensemble des MHC rapides (majoritaires). Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux qui décrivent dans le muscle soleus après une période d'hypodynamie-hypokinésie réelle ou simulée, l'apparition de fibres hybrides qui co-expriment différentes combinaisons des isoformes lentes et rapides de MHC (Allen et coll., 1996 ; Caiozzo et coll., 1996a ; Miu et coll., 1990 ; Ohira et coll., 1992 ; Oishi et coll., 1998 ; Talmadge et coll., 1996).

Cette apparition d'un grand nombre de fibres hybrides dans le muscle soleus, suggère une transformation séquentielle des MHC suivant le schéma proposé chez le lapin par Pette et Staron (1997) : MHC I \leftrightarrow MHC IIA \leftrightarrow MHC IID(X) \leftrightarrow MHC IIB. Toutefois, la présence dans notre étude d'une fibre hybride lente co-exprimant la MHC I avec les MHC IIB et IIA, de même que la présence d'une faible proportion de fibres hybrides de type I/IID(X) décrite dans le muscle soleus de rat après une période de microgravité réelle ou simulée (Talmadge et coll., 1996), nous amène à moduler le schéma proposé de la plasticité séquentielle des MHC. Par ailleurs, des travaux récents utilisant la suspension combinée à l'injection d'hormone thyroïdienne T3, ont montré l'apparition de fibres hybrides qui co-expriment soit la MHC I et la MHC IIB, soit les MHC I, IID(X) et IIB. De plus, l'analyse au niveau des ARNm a montré que la sur-expression des isoformes de MHC IID(X) et de MHC IIB précédait celle de la MHC IIA (Caiozzo et coll., 1998 ; Haddad et coll., 1998). L'ensemble de ces données récentes suggèrent une expression simultanée plutôt que séquentielle de certaines isoformes de MHC et est également rapportée par Stevens et coll. (1999). Ces auteurs ont en effet décrit l'augmentation en parallèle des ARNm codant pour les MHC IIA et IID(X) dans le muscle soleus de rat après suspension.

Ainsi, l'apparition d'une multitude de fibres hybrides qui co-expriment, en quantité variable, différentes isoformes de MHC permet des transitions fines des fibres musculaires et rend compte d'une gradation dans la transformation du muscle soleus après suspension.

L'apparition des isoformes rapides des chaînes légères de myosine et de TnC dans les fibres de soleus devenues rapides après suspension, complète la transformation de ces fibres au niveau des protéines régulatrices. Ceci est en accord avec une étude de Esser et Hardeman (1995) qui ont mis en évidence dans le muscle soleus de rat après un séjour de 9 jours en microgravité réelle, l'augmentation de la quantité d'ARNm codant pour l'isoforme rapide de la TnC, accompagnée de la diminution du taux d'ARNm de l'isoforme lente.

II - ATROPHIE MUSCULAIRE

L'atrophie de non-utilisation se manifeste par une perte de la masse musculaire, ce que nous observons dans ce travail sur les muscles soleus (diminution de 50 %). Cette diminution importante de masse musculaire est généralement décrite dans les études animales (Fitts et coll., 1986 ; Gardetto et coll., 1989 ; McDonald et Fitts, 1993, 1995 ; Widrick et coll., 1996). Elle est particulièrement marquée sur les muscles lents posturaux tels que le soleus, alors que des muscles rapides tels que l'EDL, le plantaris ou le gastrocnemius médium sont moins affectés (Falempin et coll., 1990 ; Oganov et coll., 1980 ; Stevens et coll., 1993). Par ailleurs, cette atrophie survient très rapidement. Ainsi, on observe une diminution de la masse musculaire du soleus après 5 jours de microgravité réelle (Holy et Mounier., 1991). Par ailleurs, une perte de 10 % de la masse du soleus apparaît dès 3 jours de suspension (Abouddrar et coll., 1993) et peut atteindre 37 % après 7 jours (Desplanches et coll., 1987 ; Thomason et Booth, 1990). De plus, bien que la perte de masse musculaire évolue avec la période de suspension, celle-ci se stabilise après 15 jours de suspension pour atteindre un plateau et ne montre pas de variation supplémentaire pour des périodes de suspension plus importantes (Desplanches et coll., 1987 ; Falempin et coll., 1990 ; Ohira et coll., 1992 ; Stevens et coll., 1999 ; Thomason et Booth, 1990).

La diminution de la masse musculaire est en général associée à une chute du diamètre des fibres. Par contre, leur nombre reste identique après suspension (Templeton et coll., 1984). Ainsi, la baisse du diamètre observée après suspension pour les fibres lentes et rapides de soleus, serait associée à une diminution du contenu total en protéines myofibrillaires classiquement décrite après une atrophie de non-utilisation (McDonald et Fitts, 1995 ; Thomason et coll., 1989). De plus, il est établi que cette baisse est due à une réduction de la synthèse et à une augmentation du catabolisme des protéines myofibrillaires (Booth et Kelso, 1979).

L'atrophie marquée des fibres lentes et rapides de soleus est également observée par une chute de la tension maximale P_0 exprimée en valeur absolue (mN). Toutefois, lorsque celle-ci est rapportée à l'unité de surface (kN m^{-2}), seules les fibres devenues rapides présentent une chute de force. On peut alors suggérer pour les fibres lentes que la chute de tension (mN) est directement corrélée à la diminution du diamètre des fibres et donc à la perte de protéines contractiles. Par contre, pour les fibres devenues rapides, la forte diminution de la tension maximale exprimée en valeur absolue (mN) ou rapportée à l'unité de surface (kN m^{-2}), peut être expliquée par la perte de protéines musculaires à laquelle s'ajoute une

modification des propriétés fonctionnelles des ponts actine-myosine. Ainsi, une perte de force par pont associée à un nombre différent de ponts lors de l'activation de la fibre pourrait rendre compte de cette baisse de P_0 (kN m^{-2}) également observée lors d'une atrophie de non-utilisation par d'autres auteurs (Gardetto et coll., 1989 ; McDonald et Fitts, 1993 ; McDonald et coll., 1994). Par ailleurs, cette diminution de la tension maximale rapportée à l'unité de surface n'est pas toujours observée après une période de microgravité réelle (Stevens et coll., 1993) ou simulée (Stevens et coll., 1990) et peut également survenir sur des muscles posturaux de type rapide tels que le gastrocnemius (Holy et Mounier, 1991 ; Stevens et coll., 1993). Il apparaît alors que la perte de force et le degré d'atrophie dépendent plutôt de la fonction du muscle, les muscles antigravitaires étant préférentiellement atrophiés.

Enfin, l'observation récente de la diminution du module élastique (E_0) mesuré lors de l'activation maximale de la fibre associée à la diminution de la tension maximale (kN m^{-2}) après suspension (Jeffrey et coll., 1996 ; McDonald et Fitts, 1995), suggère une diminution du nombre de ponts suite à la perte de protéines contractiles. De plus, cette perte de ponts actine/myosine provoquerait une augmentation de l'espace entre les myofilaments ce qui induirait une diminution de la force développée par chaque pont (Goldman et Simmons, 1986), de même qu'un décalage de la relation Tension/pCa vers des concentrations calciques plus importantes (Metzger et Moss, 1988), traduisant une diminution de l'affinité calcique des protéines contractiles.

III - PROPRIETES D'ACTIVATION CALCIQUE

L'ensemble de nos résultats montre que les propriétés d'activation calcique des fibres lentes de soleus et rapides d'EDL sont différentes. En effet, les fibres rapides présentent une valeur du seuil d'activation plus faible (pCa seuil) et une pente de la relation Tension/pCa plus élevée comparées aux fibres lentes. Ces différences sont typiques et identiques à celles rapportées dans la bibliographie sur des fibres musculaires isolées de mammifères (Danieli-Betto et coll., 1990 ; Laszewski-Williams et coll., 1989 ; Mounier et coll., 1989). Toutefois, nos résultats indiquent une valeur de pCa₅₀ identique pour ces deux types de fibre. Ce paramètre rend compte de l'affinité des protéines contractiles et notamment de la troponine C pour les ions. Ainsi, des expériences d'échange des isoformes de TnC sur fibre musculaire ont montré que l'introduction de TnCs dans une fibre squelettique rapide est responsable d'un

déplacement de la relation Tension/pCa vers la gauche et d'une diminution de la pente de la relation (Moss et coll., 1986). Des expériences inverses (introduction de TnCf dans une fibre cardiaque) induisent un décalage de la relation Tension/pCa vers la droite et une augmentation de la pente de relation (Gulati et coll., 1988). Le type de TnC contribue donc au positionnement et au décours de la relation Tension/pCa. Le paramètre pCa_{50} doit cependant être considéré avec prudence car des valeurs relativement (Danieli-Betto et coll., 1990 ; Gardetto et coll., 1989), ou bien voisines (Lazsewski et Williams, 1989 ; Stephenson et Williams, 1981 ; Stevens et coll., 1993 ; Takagi et Endo, 1977) peuvent être trouvées entre une fibre lente et une fibre rapide. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la TnC ne serait pas seule responsable des différences entre les relations Tension/pCa obtenues pour les fibres de muscles rapides et celles de muscles lents. Il a ainsi été montré que le complexe Tm-TnT influençait également la valeur de la pente et de la pCa_{50} de la relation Tension/pCa et plus précisément le type d'isoforme de TnT présente (Brandt et coll., 1984 ; Greaser et coll., 1988 ; Schachat et coll., 1987).

Après atrophie, les fibres de soleus ont pu être séparées en deux populations par leur profil électrophorétique : une population de fibres peu ou pas transformées et une population de fibres transformées (devenues rapides). Ces résultats sont confirmés par l'identification fonctionnelle réalisée à l'aide du test strontium, avec une population de fibres qui présentent une valeur faible de Δ , non significativement différente de celle des fibres de soleus contrôles et une deuxième population qui présente une valeur de Δ proche de celle des fibres d'EDL. Les propriétés d'activation calcique des fibres lentes de soleus après suspension sont identiques à celles observées pour les fibres de soleus contrôles. Par contre, pour les fibres de soleus devenues rapides après suspension, on observe une diminution des valeurs de pCa_{50} et de pCa seuil, ainsi qu'une augmentation de la pente de la relation Tension/pCa (n_H). L'ensemble de ces résultats indique une évolution des fibres lentes de soleus vers un type rapide (Gardetto et coll., 1989 ; Moss et coll., 1986 ; Stevens et coll., 1990). Les modifications fonctionnelles observées après suspension pour les fibres rapides de soleus sont à corréler à l'apparition des isoformes rapides des protéines contractiles et régulatrices. En effet, la relation Tension/pCa des fibres rapides de soleus montre après suspension un décalage vers la droite, plus important que celui observé pour les fibres rapides d'EDL qui peut être expliqué par l'expression dominante de l'isoforme de MHC IIA dans ces fibres. Ainsi, il a été montré que des fibres rapides d'EDL ne contenant que l'isoforme de MHC IIA, avaient une relation Tension/pCa décalée vers la droite, comparée à des fibres du même muscle n'exprimant que l'isoforme de MHC IIB (Danielli-Betto et coll., 1990).

La perte d'affinité calcique (diminution de la valeur de pCa_{50}) observée pour les fibres de soleus transformées après suspension, peut également s'expliquer par une modification des propriétés de fixation du calcium sur la TnC. L'augmentation de la pente de la relation Tension/pCa traduit un mécanisme de coopérativité accru entre les différentes protéines régulatrices du filament fin après suspension. Ainsi, l'expression des isoformes rapides de TnT et TnI dans le muscle soleus après suspension (Campione et coll., 1993) pourrait rendre compte de l'augmentation de la pente et de la perte d'affinité calcique observée dans ce travail (Greaser et coll., 1988 ; Schachat et coll., 1987).

IV - PARAMETRES CINETIQUES V_0 et τ

Nos résultats montrent, comme de nombreux travaux, que les fibres rapides d'EDL ont une valeur de V_0 significativement supérieure à celle des fibres lentes de soleus. Une bonne corrélation est établie entre la valeur de V_0 et le type de MHC (lente ou rapide) exprimée (Bottinelli et coll., 1994a ; Reiser et coll., 1985 ; Sweeney et coll., 1988).

Après suspension, les deux populations de fibres de soleus, présentent elles aussi, des valeurs de V_0 significativement différentes. La population des fibres qui expriment exclusivement la MHC I a une V_0 équivalente à celle obtenue pour les fibres lentes de soleus contrôle. Par contre, les fibres hybrides rapides qui co-expriment les isoformes de MHC I et de MHC IIA, avec une expression dominante de l'isoforme de MHC IIA, montrent une valeur de V_0 plus importante que celle mesurée pour les fibres de soleus contrôle. Cette valeur de V_0 est intermédiaire entre les valeurs obtenues pour les populations de fibres de soleus et d'EDL contrôles. On peut envisager que cette valeur de V_0 reste inférieure à celle des fibres d'EDL du fait du maintien de l'expression de l'isoforme de MHC I (Bottinelli et coll., 1994a ; Reiser et coll., 1985, 1988).

D'autres protéines peuvent être responsables de la détermination de V_0 . Un rôle des MLC de type alcalin a été avancé, notamment celui de la MLC 3f et des études ont montré que la présence de cette isoforme augmentait la valeur de V_0 (Bottinelli et coll., 1994b ; Greaser et coll., 1988 ; Moss et coll., 1990 ; Sweeney et coll., 1988). Ainsi, dans notre étude, l'isoforme de MLC 3f apparaît dans les fibres de soleus devenues rapides après suspension et pourrait également contribuer à l'augmentation de V_0 , bien que cette isoforme soit faiblement exprimée. Cette faible quantité de MLC 3f peut ne pas surprendre dans la mesure où cette

isoforme est préférentiellement associée à la MHC IIB (Wada et Pette, 1993), isoforme exprimée en faible proportion suivant le degré de transformation des muscles.

Un rôle joué par la MLC 2 sur la détermination de V_0 peut être envisagé. En effet, sur des fibres de muscles soleus et vastus lateralis humain, une étude a montré que des valeurs de V_0 , lorsque la MHC IIA est exprimée avec la MLC 2f uniquement, sont trouvées supérieures à celles des fibres de même type exprimant à la fois la MLC 2f et la MLC 2s (Larson et Moss, 1993). Dans notre étude, les fibres de soleus devenues rapides après suspension co-expriment les isoformes lentes et rapides de MLC 1 et MLC 2, la MLC 2f étant exprimée de façon plus importante que la MLC 2s. Au contraire, pour la MLC 1, l'isoforme lente reste exprimée de façon prédominante. Ces données peuvent contribuer à expliquer les accroissements relativement modérés des valeurs de V_0 que nous avons obtenues après suspension.

L'étude de la constante de temps τ indique des différences dans la cinétique de re-développement de la tension après une détente rapide, entre les différents types de fibres étudiés. Ainsi, les fibres de soleus contrôles qui n'expriment que l'isoforme lente de MHC I ont une valeur de τ plus élevée que celle trouvée pour les fibres d'EDL contrôles qui expriment les isoformes rapides de MHC IIA et MHC IIB. Des différences plus importantes ont été trouvées entre des fibres lentes et rapides de muscles de rats dans la valeur de cette constante de temps (Galler et coll., 1996). Toutefois, ces auteurs ont défini cette constante de temps comme le temps nécessaire pour obtenir 50 % du niveau de tension T_2 , alors que dans notre étude celle-ci correspond au temps nécessaire pour obtenir 63% de la valeur de la tension mesurée 10 ms après le relâchement rapide de la fibre. En outre, cette constante de temps dépend de l'amplitude du relâchement comme l'ont montré Galler et coll. (1996). Ainsi, l'amplitude relativement importante du relâchement (1 % L_0 contre 0.15 % L_0 pour Galler et coll., 1996) et la différence dans la méthode de mesure de cette constante pourrait expliquer la plus faible différence de valeur observée dans notre étude entre les fibres lentes et rapides.

Après suspension, on observe une diminution de la valeur de τ à la fois sur les fibres lentes et rapides de soleus, bien que cette baisse ne soit statistiquement différente que pour les fibres devenues rapides. De plus, pour ces dernières, la valeur de τ devient proche de celle observée pour les fibres d'EDL contrôles qui co-expriment les isoformes rapides de MHC IIA et de MHC IIB. Ainsi, l'expression accrue d'isoformes de MHC rapides pourrait expliquer la diminution de la valeur de τ pour les fibres de soleus transformées après suspension.

V - RELATIONS Tension/détente

Un point important dans notre travail est l'analyse des propriétés élastiques des fibres musculaires en parallèle avec leurs propriétés contractiles. Les propriétés élastiques d'une fibre musculaire peuvent être étudiées par la relation Tension/détente. L'intersection de la partie linéaire de cette relation avec l'axe des abscisses reflète l'élongation totale des structures en série dans le sarcomère. Cette valeur nous sert d'indice de complianc e de la fibre durant son activation maximale. Ce travail réalisé sur fibre isolée et pelée nous permet de nous affranchir de la partie passive de la CES représentée par la fraction tendineuse du muscle et le tissu conjonctif. La valeur de complianc e de la fibre correspond alors à la partie active de la CES localisée au niveau de la tête de myosine (fragment S2).

L'observation dans cette étude du fait que les fibres lentes de soleus présentent une valeur de complianc e plus faible que celle observée pour les fibres d'EDL, confirme plusieurs résultats obtenus sur muscle entier. Ainsi, Bosco et coll. (1982) ont montré que les fibres de type I avaient des propriétés élastiques différentes de celles de type II. Ces auteurs ont en effet observé sur des sujets humains pratiquant des sauts verticaux, que les fibres rapides du vastus lateralis pouvaient stocker une plus grande énergie élastique que les fibres lentes. Par ailleurs, plusieurs travaux utilisant des protocoles d'entraînement sur des rats, ont suggéré qu'une forte proportion de fibres de type II dans le soleus augmente la complianc e de ce muscle (Pousson et coll. 1991). Au contraire, une augmentation de la proportion de fibres lentes induit une diminution de la complianc e du soleus (Goubel et Marini, 1987). De plus, Petit et coll. (1990) ont observé sur le muscle peroneus longus de chat, pour des valeurs de tension tétanique comparables, que les unités motrices de type lent présentaient une plus faible complianc e que les unités motrices de type rapide.

Après suspension, la population de fibres qui conserve des propriétés contractiles de même qu'un profil électrophorétique de type lent possède une valeur de complianc e équivalente à celle des fibres de soleus contrôles. Par contre, les fibres transformées qui présentent à la fois des propriétés contractiles et un profil électrophorétique de type rapide montrent une augmentation de la valeur de complianc e, valeur qui se rapproche de celle d'une fibre typiquement rapide. Cette observation va dans le même sens que les travaux réalisés sur fibres pelées (Jeffrey et coll., 1996 ; McDonald et Fitts, 1995) ou sur muscle entier (Canon et Goubel, 1995) qui indiquent une augmentation de complianc e du soleus après suspension. Si nous considérons que la complianc e d'une fibre activée maximale est localisée au niveau des têtes de myosine (Ford et coll., 1981), l'évolution des propriétés élastiques des fibres de

soleus devenues rapides après suspension est à mettre en parallèle avec l'apparition de l'expression d'isoformes rapides des protéines contractiles. Toutefois, des études récentes réalisées sur des fibres musculaires de rat (Galler et coll., 1996, 1998) suggèrent que la valeur de compliance déduite de la relation Tension/détente est indépendante de l'isoforme de MHC exprimée.

La différence de résultat obtenue entre notre étude et celle de Galler et coll. (1996) pourrait provenir de la différence de température expérimentale utilisée. Une plus forte température dans notre étude (19°C contre 6°C) pourrait augmenter la force développée par pont actine-myosine (Goldman et coll., 1987) et induire une augmentation du rapport tension isométrique/raideur (Galler et coll., 1998), l'effet de la température étant plus important sur les fibres rapides. Une autre explication pourrait également provenir d'un niveau de tension passive initial différent entre les groupes de fibres étudiées. Une attention particulière a été portée dans ce travail au niveau de la standardisation des longueurs des fibres et du niveau de tension passive initial (voir Matériel et Méthodes). Ainsi, les différences de compliance observées entre les fibres lentes et rapides ne peuvent être attribuées à une extension différente des éléments élastiques en série dans les sarcomères au repos. Enfin, on peut envisager que les caractéristiques techniques de notre moteur affecte la mesure de la compliance des fibres. Les variations de longueurs imposées par ce moteur sont réalisées en 1 ms pour les plus grandes variations ($2.23 \pm 0.06 \% L_0$). Il est possible que le re-développement de la tension commence avant la fin du relâchement complet de la fibre. Il en résulterait alors un déplacement de la relation Tension/détente vers des valeurs de compliance plus élevées, en particulier pour les fibres rapides. Néanmoins, dans la gamme 0.06 - 1.0 T_1/T_0 , la relation est linéaire ($r \geq 0.99$) pour l'ensemble des fibres étudiées (Galler et coll., 1996, 1998). Cette zone de la relation correspond à des relâchements de faibles amplitudes et est peu affectée par la vitesse de relâchement (Bressler et Clinch, 1974).

Ainsi, la différence de compliance observée entre les fibres lentes et rapides pourrait être attribuée à un comportement mécanique différent des chaînes lourdes de myosine entre les différents types de fibres. Des propriétés physiques différentes au niveau de l'hélice α , qui transmet le mouvement de la tête S1 de myosine au reste de la molécule, entre les différentes isoformes de chaînes lourdes de myosine pourraient ainsi expliquer les valeurs de compliances observées entre les fibres lentes et rapides. Par ailleurs, il peut être suggéré que d'autres structures sarcomériques soient impliquées dans la détermination des propriétés élastiques des fibres musculaires. Ainsi, des expériences de diffraction aux rayons X (Huxley

et coll., 1994 ; Wakabayashi et coll., 1994), de même que des études mécaniques (Higuchi et coll., 1995) ont mis en évidence une participation du filament d'actine dans les propriétés élastiques du sarcomère.

VI - PROPRIETES ELASTIQUES PASSIVES

Les conditions d'hypodynamie-hypokinésie provoquent une atrophie des muscles lents posturaux tels que le soleus. Nous avons décrit précédemment l'ensemble des modifications subies par le muscle soleus à la fois au niveau biochimique et contractile. Nous avons également mis en évidence une modification des propriétés élastiques de la composante élastique série, principalement localisée dans ce travail au niveau du fragment S2 de la tête de myosine. Toutefois, à ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant l'évolution des propriétés élastiques de la composante élastique parallèle au cours d'une atrophie de non-utilisation. Sur fibre musculaire isolée et pelée, cette composante se situe principalement au niveau du sarcomère qui contient les filaments élastiques de titine, protéine qui relie les filaments de myosine à la strie Z (Fürst et coll., 1988 ; Itoh et coll., 1988 ; Maruyama, 1986 ; Wang, 1985 ; Whiting et coll., 1989).

A - EXPRESSION DES ISOFORMES DE TITINE

L'analyse électrophorétique montre que les muscles soleus et EDL de rats contrôles expriment la même isoforme de titine. Ce résultat est en contradiction avec certaines données montrant des isoformes de titine spécifiques selon le type de fibre et le type de muscle étudié (Granzier et Wang, 1993a ; Horowitz, 1992 ; Hu et coll., 1986 ; Wang et coll., 1991, 1993). Ainsi, les muscles rapides expriment des isoformes de titine de plus faible poids moléculaire que les muscles squelettiques lents. Par contre, le muscle cardiaque de rat, muscle lent, exprime une isoforme de titine de plus faible poids moléculaire que les muscles squelettiques (Granzier et Irving, 1995). Le degré de déformation du segment extensible de titine est le déterminant principal du niveau de tension passive développé (Granzier et Wang, 1993a ; Horowitz, 1992 ; Wang et coll., 1991, 1993). Ainsi, la fibre musculaire cardiaque développe un niveau de tension passive beaucoup plus important en fonction de son étirement que ne le

font les fibres musculaires squelettiques (Granzier et Irwing, 1995 ; Granzier et coll., 1996 ; Trombitas et coll., 1995). Toutefois, les études citées ne concernent que des comparaisons avec des fibres de muscles squelettiques de lapin. Récemment, une étude sur l'homme (Fry et coll., 1997) a montré des profils électrophorétiques de titine identiques aussi bien pour un muscle lent (soleus) que pour un muscle rapide (vastus lateralis).

Sur les gels d'électrophorèse de titine, on peut observer pour les muscles de soleus contrôles une bande diffuse au-dessus de la bande de titine T1. Une telle bande dont la composition est actuellement inconnue, a déjà été décrite par Granzier et Wang (1993b). Ces auteurs suggèrent que celle-ci peut être due à un agrégat de titine. Par ailleurs, il semblerait que cette bande disparaisse en augmentant la solubilisation de la titine pour les muscles soleus (communication personnelle du Pr. Granzier). Plusieurs suppositions peuvent être faites pour expliquer cette deuxième bande. Tout d'abord, il est possible que ces deux bandes représentent deux isoformes distinctes de titine. Il a ainsi été montré que le myocarde humain exprimait deux isoformes de titine générées par épissage alternatif, les isoformes N2A et N2B (Labeit et Kolmerer, 1995). Il est également possible que la bande T1 de titine résulte de la dégradation par protéolyse de la titine observée à la bande de niveau de migration supérieur, cette protéine étant fortement sensible aux protéases (Granzier et Wang, 1993b). Toutefois, ceci nous paraît improbable dans la mesure où l'ensemble des échantillons ont été traités de la même manière et en même temps. Enfin, il a été montré que la titine possédait des sites de phosphorylation et qu'elle pouvait être phosphorylée à la fois *in vivo* (Somerville et Wang, 1987) et *in vitro* (Sebestyen et coll., 1995). Des niveaux de phosphorylation différents pourraient être responsables de la présence de ces deux bandes de poids moléculaires distincts.

Après suspension, l'analyse électrophorétique de titine des muscles soleus montre une bande de migration, qui présente la même mobilité que la bande prédominante observée sur les muscles soleus et EDL contrôles. Alors qu'après une période de 14 jours de suspension les muscles soleus présentent une transformation au niveau de l'expression des isoformes de MHC, aucune modification de l'expression de la titine n'est observée. Il semblerait donc que la titine, protéine structurale sarcomérique, ne soit pas modifiée au cours d'une atrophie de non-utilisation comme le sont les protéines contractiles et régulatrices.

B - PROPRIETES ELASTIQUES PASSIVES

Les points SL_y des relations Tension passive/longueur de sarcomère obtenues pour des fibres de psoas ($SL_y = 3.82 \pm 0.07 \mu\text{m}$) et de soleus ($SL_y = 4.40 \pm 0.05 \mu\text{m}$) de lapin, sont équivalents à ceux classiquement décrits dans la littérature. Ainsi, pour le psoas de lapin des valeurs de $3.6 \mu\text{m}$ (Granzier et Wang, 1993a ; Granzier et Irving, 1995 ; Linke et coll., 1996), à $3.8 \mu\text{m}$ (Wang et coll., 1991, 1993) sont généralement retrouvées. Pour le muscle soleus, Linke et coll., (1996) et Wang et coll., (1991) décrivent un point SL_y à $4.2 \mu\text{m}$ et $4.8 \mu\text{m}$ respectivement. Le fait que nous retrouvions dans les muscles soleus et psoas de lapin les valeurs de SL_y classiquement décrites dans la littérature atteste la validité de notre protocole expérimental.

Les fibres de soleus et d'EDL contrôles présentent des relations Tension passive/longueur de sarcomère équivalentes. En effet, ces deux types de fibres génèrent des niveaux de tension passive similaires et ont les mêmes points SL_y . Ce résultat est en accord avec l'analyse électrophorétique des isoformes de titine, qui indique l'expression de la même isoforme de titine dans les muscles soleus et EDL de rats contrôles.

Lors de la description de notre protocole expérimental, nous avons montré que l'augmentation de la longueur de sarcomère était proportionnelle au degré d'étirement de la fibre. La relation linéaire obtenue nous a servi à valider notre procédure d'étirement passif. Comme l'étirement de la portion de la titine localisée dans la bande I détermine le niveau de tension passive généré (Granzier et Wang, 1993a ; Wang et coll., 1991) et par conséquent la relation Tension passive/longueur de sarcomère, nous avons aussi exprimé les résultats en fonction de l'étirement de la fibre qui reflète également le niveau d'étirement des sarcomères. Les relations Tension passive/déformation des fibres de soleus et d'EDL contrôles sont sensiblement différentes. Les fibres d'EDL contrôles ont un point de rupture SL_y déformation beaucoup plus bas que les fibres de soleus contrôles. Ceci suggère que la portion de titine contenue dans le segment I présente des propriétés élastiques différentes entre les fibres de soleus et d'EDL contrôles. Toutefois, ces deux types de fibres possèdent des longueurs de sarcomère différentes au repos. Ainsi, en considérant la longueur de sarcomère initiale et le niveau de déformation pour chaque type de fibre, on obtient des valeurs de SL_y attendues de $4.18 \mu\text{m}$ pour les fibres de soleus et de $4.26 \mu\text{m}$ pour les fibres d'EDL. Ces valeurs ne présentent qu'une erreur de 1.7 % et de 2.16 % pour les fibres de soleus et d'EDL, respectivement, et sont comparables à celles réellement mesurées. La différence de valeur des

points $SL_{y \text{ déformation}}$ entre les fibres de soleus et d'EDL contrôles, peut s'expliquer par le fait que ces deux types de fibres présentent des longueurs de sarcomère initiales différentes, ne nécessitant pas le même niveau de déformation pour atteindre le point $SL_{y \text{ déformation}}$. Par conséquent, les fibres de soleus et d'EDL contrôles présentent un segment I de la titine possédant les mêmes caractéristiques élastiques.

L'ajustement mathématique des relations Tension passive/déformation, nous permet de déterminer un module élastique complexe. Celui-ci reflète le comportement élastique de la fibre suite à un étirement. Les fibres rapides d'EDL contrôles ont une valeur de module élastique complexe plus importante que celle obtenue pour les fibres lentes de soleus contrôles. Ceci se traduit au niveau des relations Tension passive/déformation par une pente plus raide pour les fibres d'EDL contrôles. Cette différence entre les fibres lentes et rapides contrôles, alors qu'elles expriment la même isoforme de titine, pourrait s'expliquer par la différence de longueur de sarcomère initiale observée.

Après suspension, les fibres lentes et rapides de soleus possèdent les mêmes valeurs de $SL_{y \text{ déformation}}$ que celles des fibres de soleus contrôles. Toutefois, ces relations présentent des niveaux de tension passive et une pente plus faibles que ceux observés pour les fibres de soleus contrôles, l'effet étant plus important pour les fibres devenues rapides après suspension. Le comportement élastique passif d'une fibre musculaire est caractérisé par l'isoforme de titine présente et notamment par la taille du segment PEVK (Labeit et Kolmerer, 1995). Les modifications mécaniques observées sur les fibres de soleus après suspension pourraient s'expliquer par la présence d'une isoforme de titine différente. En effet, cette protéine de très haut poids moléculaire est très difficile à analyser en électrophorèse (Granzier et Wang, 1993b), il se peut alors que des modifications subtiles de la protéine, non détectées en électrophorèse, soient apparues après suspension.

Après atrophie, on observe pour les fibres lentes et rapides de soleus une diminution de la tension isométrique maximale (mN) qui est associée à la diminution de diamètre et à la perte de protéines myofibrillaires généralement décrites après suspension. Par conséquent, la diminution du niveau de tension passive et de la valeur du module élastique complexe observée après atrophie pourrait rendre compte d'une quantité plus faible de titine au niveau des sarcomères. Par ailleurs, les modifications plus importantes observées pour les fibres devenues rapides après suspension, ne peuvent s'expliquer par une perte plus importante de protéines myofibrillaires. En effet, celles-ci subissent une diminution de diamètre équivalente à celle des fibres restées lentes. On peut alors suggérer une organisation différente de la

protéine au sein du sarcomère après suspension, ou une fixation fragilisée au niveau de la strie Z et/ou aux filaments épais de myosine.

C - EFFETS DE LA DEPOLYMERISATION

Les expériences de dépolymérisation ont permis d'étudier les propriétés élastiques de la portion de titine située dans la bande A et liée aux filaments épais de myosine. Dans les conditions physiologiques, cette partie de la protéine ne participe pas au développement de tension passive sauf lors d'étirements importants ($> SL_y$) où elle est alors détachée de la myosine (Wang et coll., 1991). Les fibres sont traitées à l'aide d'une solution de KCl qui extrait sélectivement et de façon homogène la myosine dans la bande A (Higuchi et Ishiwata, 1985). La dépolymérisation de l'ensemble des fibres est vérifiée par analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine. Les résultats suggèrent une dépolymérisation homogène d'environ 50 % sur l'ensemble des fibres, ce qui nous permet de comparer directement les différents groupes de fibres étudiées.

Après dépolymérisation, on observe pour les fibres de soleus et d'EDL contrôles une chute de la tension passive ainsi que du module élastique complexe comparée aux contrôles pré-dépolymérisation respectifs. L'extraction de la myosine a permis de libérer une partie de la titine liée au filament épais. La diminution comparable de la valeur du module complexe entre ces deux populations de fibres laisse supposer que la portion de la molécule liée à la myosine possède les mêmes caractéristiques élastiques et est identique entre les fibres de soleus et d'EDL contrôles.

Après suspension, on observe également une diminution de la tension passive et de la valeur du module élastique complexe suite à la dépolymérisation. Les effets de la dépolymérisation sont être plus marqués pour les fibres de soleus devenues rapides, alors que le degré de dépolymérisation est équivalent entre les fibres lentes et rapides de soleus.

Ces résultats suggèrent que la portion de la molécule de titine localisée dans la bande A ne semble pas avoir subi de modification après suspension et garde des propriétés élastiques équivalentes à celles des fibres de soleus contrôles.

EN RESUME

L'atrophie musculaire développée après 14 jours de suspension, modifie l'expression des protéines contractiles et régulatrices et induit une évolution dans le sens lent → rapide des fibres de soleus. Ces modifications structurales entraînent une évolution fonctionnelle vers un type plus rapide des fibres de soleus, à la fois au niveau des propriétés contractiles et des propriétés élastiques de la composante élastique série localisée dans la tête de la myosine. Par contre, les propriétés élastiques passives liées à la titine, protéine sarcomérique élastique, ne semblent pas être modifiées après suspension. Son rôle structural important au niveau des sarcomères et lors de la contraction musculaire pourrait expliquer que cette protéine, qui ne subit pas de modification, contribue à un bon maintien de l'intégrité des sarcomères et de l'organisation myofibrillaire des muscles atrophiés après une période d'hypodynamie-hypokinésie.

DEUXIEME PARTIE

Etude des propriétés contractiles de fibres musculaires de souris atteintes d'une maladie dégénérative du motoneurone.

Dans la première partie de notre thèse, nous avons étudié les transformations structurales et fonctionnelles survenant lors d'une atrophie de non-utilisation. Les perturbations observées peuvent avoir pour origine soit des modifications d'origine purement myogène, soit des changements de la commande nerveuse (origine neurogène), ou une combinaison des deux.

Notre objectif dans cette deuxième partie est d'étudier le rôle du message nerveux dans le déclenchement des transformations induites dans des conditions de dysfonctionnement neuromusculaires. Le modèle expérimental utilisé est la souris wobbler. Ces animaux sont atteints de la mutation récessive wobbler et développent une maladie dénégérative du motoneurone. Les syndromes cliniques de cette mutation se manifestent au niveau musculaire dès la quatrième semaine post-natale par une atrophie très marquée des muscles du cou et des pattes antérieures, puis se poursuit au niveau des muscles des pattes postérieures (Duchen et coll., 1966, 1968). Alors que les caractéristiques morphologiques et cliniques des mutants wobbler sont largement décrites (Baulac et coll., 1983 ; Duchen et coll., 1966, 1968), il n'existe aucune donnée concernant les propriétés contractiles des fibres musculaires. Ainsi, cette étude nous a permis d'établir la relation entre le contenu en protéines contractiles et régulatrices avec les propriétés contractiles des fibres musculaires, à deux étapes du développement de la maladie.

I - EVOLUTION STRUCTURALE

L'analyse électrophorétique des chaînes lourdes de myosine réalisée sur muscles entiers montre que les muscles soleus ont un profil de type rapide avec seulement 29.4 % de MHC I à 5 semaines et 37.2 % à 7 semaines. Par contre, les muscles SCM ont un profil purement rapide avec l'expression prédominante de la MHC IIB à 5 semaines et l'expression mixte des isoformes rapides de la MHC IIA et de la MHC IIB à 7 semaines. Le glissement vers un profil plus lent des muscles soleus et SCM entre 5 et 7 semaines peut être dû à l'effet âge. En effet, aux âges étudiés, 5 et 7 semaines post-natales, les souris se trouvent au stade développemental pour atteindre l'âge adulte vers 14 semaines (Rowe et Goldspink, 1969 ; Wirtz et coll., 1983).

Les résultats obtenus pour les muscles soleus sont différents de ceux décrits chez le rat, où le soleus présente un profil de type lent (Delp et Duan, 1996). Des études histochimiques ont montré que le muscle soleus de souris a une composition en MHC différente de celle d'autres mammifères, avec environ 40 % de fibres de type I à l'âge adulte (14 semaines) (Dribin et Simpson, 1977) et seulement 25 % dans les premiers mois après la naissance (Parry et Parslow, 1981).

L'isoforme de MHC IID(X) n'a jamais été détectée dans notre étude, bien que notre protocole électrophorétique nous permette de séparer les trois isoformes rapides de MHC dans les muscles de rat. Des études par immunoblot et des analyses immunohistochimiques ont révélé la présence de la MHC IID(X) dans les muscles des pattes postérieures et le diaphragme de souris adultes, mais jamais dans le muscle soleus (Parry et Zardini, 1990 ; Zardini et Parry, 1994). Ces auteurs concluent que chez la souris l'isoforme de MHC IID(X) co-migre avec celle de la MHC IIA. Ainsi, nous ne pouvons exclure l'hypothèse que cette isoforme soit exprimée dans les muscles SCM.

Chez les souris wobbler, les muscles soleus et SCM montrent une évolution dans leur composition en MHC vers un profil plus lent. Des évolutions similaires dans l'expression des MHC du type rapide vers le type lent mettant en cause le message nerveux, ont déjà été observées après des expériences de dénervation sur des muscles rapides chez le lapin (d'Albis et coll., 1994), ou le rat (Jakubiec-Puka et coll., 1990 ; Windisch et coll., 1998) ou après électrostimulation chez le lapin (Pette et Vrbova, 1999). Une modification de l'expression des MHC a également été décrite lors de pathologies musculaires. Ainsi, une augmentation des

formes lentes de MHC a été observée chez les souris *dy/dy* (Reggiani et coll., 1992) ou *kyphoscoliotique* (Maréchal et coll., 1996).

Dans les muscles des animaux *wobbler*, aucune isoforme de MHC développementale n'a été détectée. Il apparaît en outre que la période où le phénotype *wobbler* se manifeste nettement correspond à un âge compris entre 3 et 6 semaines post-natales (Pollin et coll., 1990). Ainsi, les modifications dans l'expression des MHC des muscles soleus et SCM chez les animaux *wobbler* pourraient être attribuées à une transformation des fibres musculaires, plutôt qu'à un processus de dégénération/régénération. De plus, l'apparition d'un grand nombre de fibres hybrides qui expriment différentes combinaisons des isoformes rapides et lentes des MHC, semble suggérer un phénomène de transformation des fibres musculaires dans le sens rapide → lent, plutôt qu'une dégénérescence préférentielle des fibres musculaires de type rapide chez les animaux *wobbler*. Toutefois, l'influence d'une réinnervation partielle des fibres musculaires n'est pas à exclure. Il a ainsi été montré que l'innervation motrice des muscles squelettiques devenait anormale chez les animaux *wobbler* avec la présence de collatérales qui innervent plusieurs fibres musculaires (Blondet et coll., 1992 ; Duchen et coll., 1968). Ce phénomène de réinnervation a déjà été décrit suite à des expériences de dénervation partielle (Hoffman, 1950) et a également été observé lors de myopathies chez des souris *med* (motor end plate disease) (Duchen, 1970 ; Pinçon-Raymond et Rieger, 1981) et dystrophiques (Harris et Ribchester, 1979).

L'analyse des chaînes légères de myosine sur les muscles SCM indique pour les animaux *wobbler* une augmentation de l'isoforme lente des chaînes légères régulatrices (MLC 2s), accompagnée d'une diminution de l'isoforme rapide de MLC 2f. Par contre, pour les muscles soleus, aucune modification des chaînes légères essentielles et régulatrices n'est observée. Il semblerait pour les muscles soleus que l'expression des chaînes légères de myosine ne suit pas celle des MHC, comme cela a déjà été montré dans des conditions pathologiques (Salviati et coll., 1986b). Il apparaît en outre que la proportion de l'isoforme rapide des chaînes légères essentielles de myosine MLC 3f est inchangée chez les animaux *wobbler*, à la fois pour les muscles soleus et SCM. Ceci peut être expliqué par les mécanismes cellulaires qui régulent différemment l'expression des chaînes légères essentielles et régulatrices de myosine. Ainsi, des expériences d'électrostimulation conduisant à la transformation du muscle *tibialis anterior* de lapin dans le sens rapide → lent, ont mis en évidence la co-expression d'isoformes rapides et lentes des chaînes légères essentielles avec des isoformes lentes et rapides de chaînes lourdes de myosine (Leeuw et Pette, 1996).

Une autre protéine régulatrice, la troponine C (TnC), qui possède un rôle important dans la régulation de la contraction musculaire a également été étudiée. Les muscles soleus contrôlés expriment à la fois les isoformes lentes et rapides de TnC, le signal correspondant à l'isoforme lente étant prédominant. Toutefois, les muscles soleus contrôlés expriment majoritairement les isoformes rapides de MHC, ce qui montre qu'une co-expression de l'isoforme lente de TnC avec des isoformes rapides de MHC peut être rencontrée. Il en est de même pour les muscles SCM contrôlés qui expriment de la TnC lente alors que la MHC I n'est jamais détectée. Cette association non-conventionnelle entre une isoforme lente de TnC et des isoformes rapides de protéines contractiles n'a jamais été décrite sur des muscles contrôlés (Pette et Staron, 1990 ; Schiaffino et Reggiani, 1996), mais a déjà été observée dans des fibres de lapin de type IIA au cours d'une transition dans le sens rapide → lent après électrostimulation (Leeuw et Pette, 1993).

Chez les animaux wobblers, on observe une augmentation d'expression du signal correspondant à l'isoforme lente de TnC accompagnée d'une diminution de celui correspondant à l'isoforme rapide. Ces modifications d'expression des isoformes de TnC suivent la même évolution que celle des isoformes lentes des chaînes légères et lourdes de myosine dans les muscles soleus et SCM.

Ainsi, chez les animaux wobblers, on observe la transformation des muscles soleus et SCM vers un type plus lent à la fois pour les protéines contractiles et régulatrices. Il semblerait en outre que ces modifications structurales au niveau musculaire suivent le processus de dégénération des motoneurones décrit chez ces animaux et particulièrement actif aux deux âges étudiés (Pollin et coll., 1990).

II - ATROPHIE MUSCULAIRE

Les fibres des muscles soleus et SCM contrôlés présentent avec l'âge une augmentation de la valeur de la tension maximale développée (P_0 , μN). Toutefois, lorsque la tension maximale est exprimée en fonction du diamètre des fibres (kN m^{-2}) aucune différence significative n'est observée entre 5 et 7 semaines. L'augmentation de la tension maximale

(μN) est donc à associer à l'augmentation du diamètre des fibres due au développement normal des animaux.

Chez les animaux wobblers, on observe dès 5 semaines une diminution de la tension maximale développée pour les fibres des muscles SCM, alors qu'elle n'apparaît qu'à 7 semaines pour les fibres des muscles soleus. Lorsque la tension maximale est exprimée en fonction du diamètre des fibres, aucune modification n'est observée par rapport aux fibres des muscles contrôles. Ces résultats suggèrent que les ponts actine-myosine développent la même force dans les fibres musculaires d'animaux wobblers et contrôles. Ainsi la chute de tension maximale observée chez les animaux wobblers peut être associée à la diminution du diamètre des fibres et à une perte en protéines contractiles. De plus, l'évolution différentielle de l'atrophie musculaire observée à la fois pour les muscles soleus et SCM entre 5 et 7 semaines est en accord avec d'autres travaux qui ont montré une susceptibilité différente des régions cervicales et lombaires de la moelle épinière à la dégénération des motoneurones lors de la maladie wobblers (Baulac et coll., 1983 ; Duchen et coll., 1968).

III - PROPRIETES D'ACTIVATION CALCIQUE

Les fibres lentes et rapides de soleus ont à 5 et 7 semaines des propriétés d'activation calcique différentes. Les fibres rapides possèdent un seuil d'activation plus élevé (plus faible valeur de $p\text{Ca}$ seuil) et une valeur de pente de la relation Tension/ $p\text{Ca}$ (paramètre n_H) plus grande, comparés aux fibres lentes. De plus, ces deux types de fibres possèdent à 5 semaines la même affinité calcique ($p\text{Ca}_{50}$), alors qu'à 7 semaines les fibres rapides ont une affinité calcique plus faible que celle des fibres lentes. Les fibres rapides de SCM contrôles ont des caractéristiques d'activation calcique équivalentes à celles trouvées pour les fibres rapides de soleus. Les relations Tension/ $p\text{Ca}$ des fibres rapides de soleus et SCM montrent avec l'âge un décalage vers des concentrations calciques plus élevées.

La position et/ou l'allure de la relation Tension/ $p\text{Ca}$ est classiquement associée à l'affinité calcique des myofilaments (Danieli-Betto, 1990 ; Takagi et Endo, 1977). Ainsi, l'augmentation de l'expression de l'isoforme rapide de TnC dans les muscles SCM à 7 semaines, comparée à 5 semaines, pourrait expliquer la baisse d'affinité calcique observée pour les fibres rapides. De plus, des hypothèses suggèrent que la sensibilité des fibres

musculaires vis-à-vis du calcium serait également modulée par des isoformes de TnT (Schachat et coll., 1987). Des transitions dans l'expression des différentes isoformes de TnT entre 5 et 7 semaines pourraient également expliquer la plus faible d'affinité calcique observée pour les fibres rapides de soleus.

Chez les animaux wobbler, les relations Tension/pCa indiquent une perte d'affinité calcique (diminution de la pCa_{50}) pour les fibres rapides de SCM à la fois à 5 et à 7 semaines et uniquement à sept semaines pour les fibres de soleus confirmant l'évolution différentielle de la pathologie sur l'animal. L'analyse des protéines contractiles et régulatrices au niveau des muscles entiers montre une augmentation d'expression des isoformes lentes chez ces animaux wobbler. Cette modification d'expression de ces protéines vers des isoformes de type lent pourrait laisser prévoir, chez les animaux wobbler, un déplacement des relations Tension/pCa vers des concentrations calciques plus faibles, c'est-à-dire dans le sens d'une augmentation d'affinité vis-à-vis du calcium, ce qui n'est pas le cas. L'apparition d'un grand nombre de fibres hybrides chez les animaux wobbler qui accompagne la transformation dans le sens rapide → lent, suggère donc, comme mentionné précédemment, une modification d'expression d'autres protéines régulatrices pouvant influencer l'affinité calcique du système contractile. Il a ainsi été montré lors d'expériences d'électrostimulation chez le lapin (Härtner et coll., 1989 ; Leeuw et Pette, 1993) une transition ordonnée des isoformes rapides de TnT vers les isoformes lentes.

EN RESUME

Nos résultats décrivent chez les animaux wobbler une modification des propriétés biochimiques et structurales dans le sens rapide → lent des muscles soleus et SCM. Le degré de transformations de ces deux muscles est fonction de l'évolution différentielle de la pathologie chez l'animal.

CONCLUSION GENERALE

Ce travail a contribué à mettre en évidence la nature dynamique du muscle squelettique, démontrée par sa capacité d'adaptation face à des facteurs modifiant sa mise en jeu tels que la diminution de la charge et la modification du message nerveux moteur (hypodynamie-hypokinésie ou pathologie wobbler).

Cette capacité d'adaptation du muscle squelettique se traduit par une modification des caractéristiques structurales et fonctionnelles des fibres qui le composent. Le tableau 14 résume l'ensemble des principaux résultats obtenus après une période d'hypodynamie-hypokinésie et au cours de la pathologie wobbler.

La capacité d'adaptation du muscle squelettique à ces dysfonctionnements se traduit par les grandes caractéristiques suivantes :

1) l'apparition d'un grand nombre de fibres hybrides, indiquant une transformation du phénotype musculaire marquée par une modification d'expression en isoformes des protéines myofibrillaires, notamment de la MHC. Deux schémas de transformation, de sens opposés, peuvent être déduit de notre étude. Dans le développement de l'atrophie de non-utilisation, les co-expressions au niveau des fibres de soleus des isoformes de MHC I + IIA, IIA + IID(X) et IIA + IID(X) + IIB indiquent une transformation du muscle soleus dans le sens lent → rapide suivant un ordre d'expression des MHC : I → IIA → IID(X) → IIB. Au contraire, au cours de la pathologie wobbler, on observe pour les muscles soleus et SCM une transformation dans le sens rapide → lent selon un ordre d'expression des MHC : IIA/D(X) → I pour le muscle soleus et IIB → IIA/D(X) → I pour le muscle SCM.

Ainsi, la redistribution des isoformes de MHC observée après les dysfonctionnements neuromusculaires étudiés, a permis de confirmer l'hypothèse de transition entre les différentes isoformes de MHC selon un ordre préférentiel conforme au schéma de transformation des fibres proposé par Pette et Staron (1997) : I ↔ IIA ↔ IID(X) ↔ IIB. Il est clair que cette plasticité séquentielle des isoformes de MHC intègre la co-expression de certaines isoformes de MHC.

Enfin, la redistribution des isoformes des protéines myofibrillaires a également été observée au niveau des protéines régulatrices telles que les MLC et TnC. Toutefois, la co-expression inhabituelle d'isoformes rapides de MHC avec des isoformes lentes de certaines protéines régulatrices indique des processus de régulation spécifiques pour chaque protéine et ses différentes isoformes.

Hypodynamie-hypokinésie		wobbler				
<i>Lent → rapide</i>		Transformation phénotypique du muscle	<i>Rapide → lent</i>			
<u>fibres lentes</u>	<u>fibres rapides</u>	Atrophie des fibres musculaires	<u>Soleus 5 semaines</u>	<u>Soleus 7 semaines</u>	<u>SCM 5 semaines</u>	<u>SCM 7 semaines</u>
<i>Diminution</i> - diamètre - P ₀ (mN)	<i>Diminution</i> - diamètre - P ₀ (mN) - P ₀ (kN m ⁻²)			<i>Pas de modifications</i>	<i>fibres rapides :</i> <i>Diminution</i> - diamètre - P ₀ (μN)	<i>Diminution</i> - diamètre - P ₀ (μN)
<i>Pas de modifications</i>	<i>Diminution</i> - pCa seuil - pCa ₅₀ <i>Augmentation</i> - n _H - V ₀ - τ - compliance	Propriétés fonctionnelles des fibres musculaires soumises à une activation calcique	<i>Pas de modifications</i>	fibres lentes et rapides <i>Diminution</i> - pCa ₅₀	<i>Diminution</i> - pCa ₅₀	<i>Diminution</i> - pCa seuil - pCa ₅₀
<i>Pas de modifications</i>		Propriétés élastiques passives des fibres musculaires	<i>Non testées</i>			

Tableau 14 : Résumé des *principaux résultats* obtenus avec les différents modèles utilisés.

2) pour les deux situations conduisant à une atrophie, une modification des caractéristiques contractiles des fibres musculaires apparaît, tout spécialement une diminution de l'affinité calcique.

3) une atrophie musculaire qui se traduit pour l'ensemble des fibres par des diminutions du diamètre et de la tension maximale, celles-ci étant plus importantes pour les fibres rapides. Pour ces dernières, la perte de force peut être liée, non seulement à une perte du nombre de ponts actine-myosine, mais aussi à une diminution de la force développée par chaque pont en relation avec la baisse d'affinité calcique des protéines contractiles et/ou, avec un espace interfilaire modifié.

Il apparaît en plus, pour le soleus de rat après une période d'hypodynamie-hypokinésie, une modification des propriétés élastiques des fibres musculaires soumises à une activation calcique qui évoluent vers celles d'un muscle rapide. Ces transformations semblent être liées à des modifications du contenu en protéines contractiles (MHC). Par contre, aucune évolution des propriétés élastiques passives liées à la titine n'est observée sur les fibres de soleus. Le rôle structural important de cette protéine dans le sarcomère permettrait d'expliquer la préservation structurale des muscles après une atrophie de non-utilisation telle que l'hypodynamie-hypokinésie.

La part revenant au message nerveux dans les deux types de transformation est intéressante à examiner.

Au cours de la pathologie wobbler, la modification du message nerveux moteur provoque la transformation des caractéristiques structurales (expression des isoformes lentes des protéines contractiles et régulatrices) et fonctionnelles (diminution du diamètre, de la force et de l'affinité calcique) musculaires. Des transformations plus prononcées sont décrites pour le muscle SCM, lequel est particulièrement affecté au cours de la pathologie wobbler. Le message nerveux délivré aux muscles apparaît être une composante essentielle dans le maintien des caractéristiques musculaires.

Dans le développement de l'atrophie de non-utilisation, les conditions d'hypodynamie-hypokinésie entraînent des transformations fonctionnelles comparables (diminution du diamètre, de la force et de l'affinité calcique). Par contre, les modifications structurales vont dans le sens d'une augmentation des isoformes rapides des protéines contractiles et régulatrices. Outre la diminution de la charge qui est un facteur clef dans le déclenchement de

l'atrophie musculaire de non-utilisation, le rôle du message nerveux moteur, attesté clairement par des modifications de l'EMG (Alford et coll., 1987 ; Blewett et Elder, 1993 ; Leterme et Falempin, 1998), est également à prendre en compte dans l'interprétation des transformations observées après une période d'hypodynamie-hypokinésie. En effet, des expériences d'électrostimulation couplées à la suspension (Furby et coll., 1993 ; Leterme et Falempin, 1994) provoquent la récupération des cinétiques de contraction, mais pas de l'atrophie (pertes de masse et de force). Un des aspects des modifications du message nerveux se situe au niveau du message afférent. Ainsi, une étude menée au laboratoire (Falempin et Fodili-In-Albon, 1999) a montré que des vibrations tendineuses appliquées chaque jour peuvent enrayer partiellement la perte de masse musculaire et la diminution du diamètre des fibres de soleus. Les vibrations limitent également les transformations de la cinétique de mise sous tension lors de la secousse isométrique du muscle. Par contre, elles ne permettent pas de prévenir les transformations structurales observées après une période d'hypodynamie-hypokinésie. Ces données mettent donc en évidence la place du message nerveux dans les transformations des caractéristiques musculaires du soleus en situation d'hypodynamie-hypokinésie. Modifier ou restaurer ces messages ouvre des perspectives en termes de contre-mesure.

Les résultats obtenus dans cette étude sur les propriétés fonctionnelles des fibres musculaires, ont montré que, parmi les protéines régulatrices de la contraction, l'expression de la troponine C était modifiée. Cependant, nos résultats (notamment le positionnement et la pente de la relation Tension/pCa) indiquent que d'autres protéines régulatrices pourraient être impliquées dans les changements des propriétés contractiles des fibres transformées, notamment la troponine T. En effet, cette protéine participe à la sensibilité calcique des fibres musculaires et existe sous de nombreuses isoformes. Une étude approfondie des variations d'expression des isoformes de la troponine T, de même que leur influence sur les propriétés d'activation de la tension par le calcium serait intéressante à entreprendre sur des fibres musculaires normales et atrophiées. En particulier, au niveau de la fibre musculaire, une telle étude pourrait permettre de suivre la corrélation entre l'activité fonctionnelle de la fibre, sa composition en chaînes de myosine et sa composition en troponine C et troponine T. Une telle approche, au niveau de la fibre, devrait nous conduire à mieux comprendre les co-expressions possibles des différentes protéines contractiles et régulatrices et leurs conséquences sur le fonctionnement de la fibre musculaire. En outre, il serait intéressant de déterminer si des co-

expressions d'isoformes lentes et rapides de TnT peuvent exister sur une même fibre, comme nous l'avons observé pour la TnC, et de définir les combinaisons possibles d'expression des isoformes lentes et rapides de TnT et TnC. De telles interactions souligneraient le fait que les cellules musculaires ont à leur disposition un système extrêmement performant pour moduler la sensibilité de leur machinerie contractile au calcium et répondre à diverses conditions de fonctionnement. Enfin, la corrélation entre les expressions d'isoformes de TnT et TnC et l'expression des MLC et des MHC nous permettrait de définir s'il existe des programmes coordonnés d'expression des différentes protéines contractiles.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- ABOUDRAR S., SEMPORE B., KOUBI H., DECHAUD H. and DESPLANCHES D. (1993). Effects of adrenalectomy or RU 486 on rat muscle fibers during hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **75**, 2767-2773.
- ALAIMO M.A., SMITH J.L., ROY R.R. and EDGERTON V.R. (1984). EMG activity of slow and fast ankle extensors following spinal cord transection. *J. Appl. Physiol.*, **56**, 1608-1613.
- ALFORD E.K., ROY R.R., HODGSON J.A. and EDGERTON V.R. (1987). Electromyography of rat soleus, medial gastrocnemius and tibialis anterior during hindlimb suspension. *Exp. Neurol.*, **96**, 635-649.
- ALLEN D.L., YAHUI W., TANAKA T., OHIRA Y., NAGAOKA S., SEKIGUCHI C., HINDS W.E., ROY R.R. and EDGERTON V.R. (1996). Myonuclear number and myosin heavy chain expression in rat soleus single muscle fibers after spaceflight. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 145-151.
- ANSVED T. and LARSSON L. (1990). Effects of denervation on enzyme-histochemical and morphometrical properties of the rat soleus muscle in relation to age. *Acta Physiol. Scand.*, **139**, 297-304.
- BACOU F., ROUANET P., BARJOT C., JANMOT C., VIGNERON P. and D'ALBIS A. (1996). Expression of myosin isoforms in denervated, cross-reinnervated and electrically stimulated rabbit muscles. *Eur. J. Biochem.*, **236**, 539-547.
- BAKER J.H. and HALL-CRAGGS E.C. (1978). Changes in length of sarcomeres following tenotomy of the rat soleus muscle. *Anat Rec.*, **192**, 55-58.
- BALDWIN K.M., HERRICK R.E., ILYINA-KAKUEVA E.I. and OGANOV V. (1990). Effects of zero-gravity on myofibril content and isomyosin distribution in rodent skeletal muscle. *FASEB J.*, **4**, 79-83.
- BARANY M. (1967). ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J. Gen. Physiol.*, **50**, 197-218.
- BARTON P.J. and BUCKINGHAM M.E. (1985). The myosin alkali light chain proteins and their genes. *Biochem. J.*, **231**, 249-261.
- BAULAC M., RIEGER F. and MEININGER V. (1983). The loss of motoneurons corresponding to specific muscles in the wobbler mutant mouse. *Neurosci Lett.*, **37**, 99-104.
- BETZ W.J., CALDWELL J.H. and RIBCHESTER R.R. (1980). The effects of partial denervation at birth on the development of muscle fibres and motor units in rat lumbrical muscle. *J. Physiol.*, **303**, 265-279.
- BLEWETT C. and ELDER G.C.B. (1993). Quantitative EMG analysis in soleus and plantaris during hindlimb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 2057-2066.

- BLONDET B., BARLOVATZ-MEIMON G., FESTOFF B.W., SORIA C., SORIA J., RIEGER F. and HANTAĪ D. (1992). Plasminogen activators in the neuromuscular system of the wobbler mutant mouse. *Brain Res.*, **580**, 303-310.
- BLONDET B., HANTAZ-AMBROISE D. AÏT-IKHLEF A., CAMBIER M., MURAWSKY M. and RIEGER F. (1995). Astrocytosis in wobbler mouse spinal cord involves a population of astrocytes which is glutamine synthetase-negative. *Neurosci. Lett.*, **193**, 179-182.
- BLOT S., POIRIER C. and DREYFUS P.A. (1995). The mouse muscle deficient (mdf) is characterized by a progressive motoneuron disease. *J. Neuropath. Exp. Neur.*, **54**, 812-825.
- BOOTH F.W. and KELSO J.R. (1979). Recovery of skeletal muscle after 3 months of hindlimb immobilization in rats. *J. Appl. Physiol.*, **47**, 435-439.
- BOOTH F.W. (1982). Effect of limb immobilization on skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **52**, 1113-1118.
- BOOTH F.W. (1988). Perspectives on molecular and cellular exercise physiology. *J. Appl. Physiol.*, **65**, 1461-1471.
- BORG T.K. and CAULFIELD J.B. (1980). Morphology of the connective tissue in skeletal muscle. *Tissue Cell.*, **12**, 197-207.
- BOSCO C., TIHANYI J., KOMI P.V., FEKETE G. and APOR P. (1982). Store and recoil of elastic energy in slow and fast types of human skeletal muscles. *Acta Physiol. Scand.* **116**, 343-349.
- BOTTINELLI R., SCHIAFFINO S. and REGGIANI C. (1991). Force-velocity relations and myosin heavy chain isoform compositions of skinned fibres from rat skeletal muscle. *J. Physiol.*, **437**, 655-672.
- BOTTINELLI R., BETTO R., SCHIAFFINO S. and REGGIANI C. (1994a). Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibres of rat skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell M.*, **15**, 413-419.
- BOTTINELLI R., BETTO R., SCHIAFFINO S. and REGGIANI C. (1994b). Unloaded shortening velocity and myosin heavy chain and alkali light chain isoform composition in rat skeletal muscle fibres. **478**, 341-349.
- BRANDT P.W., DIAMOND M.S. and SCHACHAT F.H. (1984). The thin filament of vertebrate skeletal muscle cooperativity activates as a unit. *J Mol. Biol.*, **180**, 379-384.
- BRESSLER B.H. and CLINCH N.F. (1974). The compliance of the contracting skeletal muscle. *J. Physiol.*, **237**, 477-493.
- BRESSLER B.H. and CLINCH N.F. (1975). Crossbridges as the major source of compliance in contracting skeletal muscle. *Nature*, **256**, 221-222.

- BRIGGS M.M. and SCHACHAT F. (1993). Origin of fetal troponin T : developmentally regulated splicing of a new exon in the fast troponin T gene. *Devel. Biol.*, **158**, 503-509.
- BRONSON D.D. and SCHACHAT F.H. (1982). Heterogeneity of contractile proteins. Differences in tropomyosin in fast, mixed, and slow skeletal muscles of the rabbit. *J. Biol. Chem.*, **257**, 3937-3944.
- BROOKE M.H. and KAISER K. (1974). Trophic functions of the neuron. II. Denervation and regulation of muscle. The use and abuse of muscle. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **228**, 121-144.
- CAIOZZO V.J., HADDAD F., BAKER M.J. and BALDWIN K.M. (1996a). Influence of mechanical loading on myosin heavy-chain protein and mRNA isoform expression. *J. Appl. Physiol.*, **80**, 1503-1512.
- CAIOZZO V.J., HADDAD F., BAKER M.J., HERRICK R.E., PRIETTO N. and BALDWIN K.M. (1996b). Microgravity-induced transformations of myosin and contractile properties of skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 123-132.
- CAIOZZO V.J., BAKER M.J., and BALDWIN K.M. (1998). Novel transitions in MHC isoforms: separate and combined effects of thyroid hormone and mechanical unloading. *J. Appl. Physiol.*, **85**, 2237-2248.
- CAMPIONE M., AUSONI S., GUEZENNEC C.Y. and SCHIAFFINO S. (1993). Myosin and troponin changes in rat soleus muscle after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 1156-1160.
- CANON F. and GOUBEL F. (1995). Changes in stiffness induced by hindlimb suspension in rat soleus muscle. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **429**, 332-337.
- CARRARO U., CATANI C., DALLA LIBERA L., VASCON M. and 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.
- CLOSE R. (1972). Dynamic properties of mammalian skeletal muscles. *Physiol. Rev.*, **52**, 129-197.
- COHEN C. and HOLMES K.C. (1963). X-ray diffraction evidence for α -helical coiled coils in native muscle. *J. Mol. Biol.*, **6**, 423-432.
- CRAIG R. (1994). The structure of the contractile filaments. In *Myology Basic and Clinical*, 2d edition, ed. by Andrew G., Engl. M.D. and Franzini-Armstrong C. Mc Graw-Hill, INC.
- CROS N., MULLER J., BOUJU S., PIETU G., JACQUET C., LEGER J.J., MARINI J.F. and DECHESNE C.A. (1999). Upregulation of M-creatine kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: two markers of muscle disuse. *Am. J. Physiol.*, **276**, R308-R316.
- CUMMINS P. and PERRY S.V. (1973). The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. *Biochem. J.*, **133**, 765-777.

- D'ALBIS A., GOUBEL F., COUTEAUX R., JANMOT C. and MIRA J.C. (1994). The effect of denervation on myosin isoform synthesis in rabbit slow-type and fast-type muscles during terminal differentiation. Denervation induces differentiation into slow-type muscles. *Eur. J. Biochem.*, **223**, 249-258.
- DANIELI-BETTO D., BETTO R. and MIDRIO M. (1990). Calcium sensitivity and myofibrillar protein isoforms of rat skinned skeletal muscle fibres. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **417**, 303-308.
- DELP M.D. and DUAN C. (1996). Composition and size of type I, IIA, IID/X and IIB fibers and citrate synthase activity of rat muscle. *J. Appl. Physiol.* **80**, 261-270.
- DESPLANCHES D., MAYET M.H., SEMPORE B. and FLANDROIS R. (1987). Structural and functional responses to prolonged hindlimb suspension in rat muscle. *J. Appl. Physiol.*, **63**, 558-563.
- DIFEE G.M., CAIOZZO V.J., HERRICK R.E. and BALDWIN K.M. (1991). Contractile and biochemical properties of rat soleus and plantaris after hindlimb suspension. *Am. J. Physiol.*, **260**, C528-C534.
- DRIBIN L.B. and SIMPSON S.B. (1977). Histochemical and morphological study of dystrophic (C57BL/6J dy^{2J}/dy^{2J}) and normal mice. *Exp. Neurol.*, **56**, 480-497.
- DUCHEN L.W., FALCONER D.S. and STRICH S.J. (1966). Hereditary progressive neurogenic muscular atrophy in the mouse. *J. Physiol.*, **183**, 53-55.
- DUCHEN L.W., STRICH S.J. and FALCONER D.S. (1968). An hereditary motor neuron disease with progressive denervation of muscle in the mouse : the mutant "wobbler". *J. Neurol. Neurosur. Psychiat.*, **31**, 535-542.
- DUCHEN L.W. (1970). Hereditary motor end-plate disease in the mouse : light and electron microscopic studies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **33**, 238-250.
- DUNN S.E. and MICHEL R.N. (1999). Differential sensitivity of myosin-heavy-chain-typed fibers to distinct aggregates of nerve-mediated activation. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **437**, 432-440.
- EASTWOOD A.B., WOOD D.S., BOCK K.L. and SORENSON M.M. (1979). Chemically skinned mammalian skeletal muscle. The structure of skinned rabbit psoas. *Tissue and Cell*, **11**, 553-566.
- EBASHI S. (1980). Regulation of muscle contraction. *Proc. R. Soc.*, **207**, 259-286.
- EDMAN K.A.P. (1979). The velocity of unloaded shortening and its relation to sarcomere length and isometric force in vertebrate muscle fibres. *J. Physiol.*, **291**, 143-159.
- ELDEN H.R. (1968). Physical properties of collagen fibers. In International Review of Connective Tissue Research. Hall, D.A. Ed, Academic Press, pp 283-348.

- ELLIOTT A. and OFFER G. (1978). Shape and flexibility of the myosin molecule. *J. Mol. Biol.*, **123**, 505-519.
- EL-SALEH S.C., WARBER K.D. and POTTER J.D. (1986). The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction. *J. Muscle Res. Cell M.*, **7**, 387-404.
- ELZINGA M., COLLINS J.H., KUEHL W.M. and ADELSTEIN R.S. (1973). Complete amino-acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**, 2687-2691.
- ERICKSON H.P. (1994). Reversible unfolding of fibronectin type III and immunoglobulin domains provides the structural basis for stretch and elasticity of titin and fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10114-10118.
- ERICKSON H.P. (1997). Stretching single protein molecules : titin is a weird spring. *Science.* **276**, 1090-1092.
- ESSER K.A. and HARDEMAN E.C. (1995). Changes in contractile proteins mRNA accumulation in response to spaceflight. *Am. J. Physiol.*, **268**, C466-C471.
- 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.
- FAIRBANKS G., STECK T.L. and WALLACH D.F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.
- FALEMPIN M., LECLERCQ T., LETERME D. and MOUNIER Y. (1990). Time course of muscle-change in and-recovery from disuse atrophy. *Physiologist*, **33**, 88-89.
- FALEMPIN M. and FODILI S. (1995). Effect of the elimination of neural influences in the rat soleus muscle during unweighting. *Basic Appl. Physiol.*, **5**, 155-161.
- FALEMPIN M. and FODILI IN-ALBON S. (1999). Influence of brief-delay-tendon vibration on rat soleus muscle in non-weight-bearing situation. *J. Appl. Physiol.*, **87**, 3-9.
- FAUTECK S.P. and KANDARIAN S.C. (1995). Sensitive detection of myosin heavy chain composition in skeletal muscle under different loading conditions. *Am. J. Physiol.*, **268**, C419-C424.
- FITTS R.H., METZGER J.M., RILEY D.A. and UNSWORTH B.R. (1986). Models of disuse : a comparison of hindlimb suspension and immobilization. *J. Appl. Physiol.*, **60**, 1946-1953.
- FLICKER P.F., PHILLIPS G.N. and COHEN C. (1982). Troponin and its interactions with tropomyosin. An electron microscope study. *J. Mol. Biol.*, **162**, 495-501.

- FORD L.E., HUXLEY A.F. and SIMMONS R.M. (1977). Tension responses to sudden length change in stimulated frog muscle fibres near slack length. *J. Physiol.*, **269**, 441-515.
- FORD L.E., HUXLEY A.F. and SIMMONS R.M. (1981). The relation between stiffness and filament overlap in stimulated frog fibres. *J. Physiol.*, **311**, 219-249.
- FRY A.C., STARON R.S., JAMES C.B.L. and HIKIDA R.S. (1997). Differential titin isoform expression in human skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **161**, 473-479.
- FUNATSU T., HIGUCHI H. and ISHIWATA S. (1990). Elastic filaments in skeletal muscle revealed by selective removal of thin filaments with plasma gelsolin. *J. Cell. Biol.*, **110**, 53-62.
- FURBY A., MOUNIER Y., STEVENS L., LETERME D. and FALEMPIN M. (1993). Effects of chronic electrostimulation on rat soleus skinned fibers during hindlimb suspension. *Muscle Nerve*, **16**, 720-726.
- FÜRST D.O., OSBORN M., NAVE R. and WEBER K. (1988). The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy : a map of ten non repetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line. *J. Cell. Biol.*, **106**, 1563-1572.
- FÜRST D.O., OSBORN M. and WEBER K. (1989). Myogenesis in the mouse embryo : differential onset of expression of myogenic proteins and the involvement of titin in myofibril assembly. *J. Cell Biol.*, **109**, 517-527.
- GAHLMANN R., TROUTT A.B., WADE R.P., GUNNING P. and KEDES L. (1987). Alternative splicing generates variants in important functional domains of human slow skeletal troponin T. *J. Biol. Chem.*, **262**, 16122-16126.
- GALLER S., HILBER K. and PETTE D. (1996). Force responses following stepwise length changes of rat skeletal muscle fibre types. *J. Physiol.*, **493**, 219-277.
- GALLER S., HILBER K., GOHLSCH B. and PETTE D. (1997). Two functionally distinct myosin heavy isoform in slow skeletal muscle fibres. *FEBS Lett.*, **410**, 150-152.
- GALLER S. and HILBER K. (1998). Tension/stiffness ratio of skinned rat skeletal muscle fibre types at various temperatures. *Acta Physiol. Scand.*, **162**, 119-126.
- GARDETTO P.R., SCHLUTER J.M. and FITTS R.H. (1989). Contractile function of single muscle fibers after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **66**, 2739-2749.
- GAUTEL M. and GOULDING D. (1996). A molecular map of titin/connectin elasticity reveals two different mechanisms acting in series. *FEBS Lett.*, **385**, 11-14.
- GIULIAN G.G., MOSS R.L. and GREASER M. (1983). Improved methodology for analysis and quantification of proteins on one dimensional silver stained slab gels. *Anal. Biochem.*, **129**, 277-287.

- GOLDMAN Y.E. and SIMMONS R.M. (1986). The stiffness of frog skinned muscle fibres at altered lateral filament spacing. *J. Physiol.*, **378**, 175-194.
- GOLDMAN Y.E., McCRAY J.A. and RANATUNGA K.W. (1987). Transient tension changes initiated by laser temperature jumps in rabbit psoas muscle fibres. *J. Physiol.*, **392**, 71-95.
- GOLDSPINK D.F. (1977). The influence of immobilization and stretch on protein turnover of rat skeletal muscle. *J. Physiol.*, **264**, 267-282.
- GOLDSPINK G., SCUTT A., LOUGHNA P.T., WELLS D.J., JAENICKE T. and GERLACH G.F. (1992). Gene expression in skeletal muscle in response to stretch and force generation. *Am. J. Physiol.*, **262**, 356-363.
- GOUBEL F. and MARINI J.F. (1987). Fibre type transition and stiffness modification of soleus muscle of trained rats. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **410**, 321-325.
- GOUBEL F. et LENSEL-CORBEIL G. (1998). Biomécanique. Eléments de mécanique musculaire. *Le point en rééducation et en APS*. Ed. Masson
- GRABAREK Z., TAO T. and GERGELY J. (1992). Molecular mechanism of troponin-C function. *J. Muscle Res. Cell M.*, **13**, 383-393.
- GRAHAM S.C., ROY R.R., NAVARRO C., JIANG B., PIEROTTI D., BODINE-FOWLER S. and EDGERTON V.R. (1992). Enzyme and size profiles in chronically inactive cat soleus muscle fibers. *Muscle Nerve*, **15**, 27-36.
- GRANZIER H.L.M. and WANG K. (1993a). Passive tension and stiffness of vertebrate skeletal and insect flight muscles : the contribution of weak cross-bridges and elastic filaments. *Biophys J.*, **65**, 2141-2159.
- GRANZIER H.L.M. and WANG K. (1993b). Gel electrophoresis of giant proteins : solubilization and silver-staining of titin and nebulin from single muscle fiber segments. *Electrophoresis*, **14**, 56-64.
- GRANZIER H.L.M. and IRVING T.C. (1995). Passive tension in cardiac muscle : contribution of collagen, titin, microtubules, and intermediate filaments. *Biophys J.*, **68**, 1027-1044.
- GRANZIER H.L.M., HELMES M. and TROMBITAS K. (1996). Nonuniform elasticity of titin in cardiac myocytes : a study using immunoelectron microscopy and cellular mechanics. *Biophys J.*, **70**, 430-442.
- GREASER M.L., MOSS R.L. and 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.
- GREGORIO C.C., GRANZIER H., SORIMACHI H. and LABEIT S. (1999). Muscle assembly : a titanic achievement ? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 18-25.

- GULATI J., SCORDILIS S. and BABU A. (1988). Effect of troponin C on the cooperativity in Ca activation of cardiac muscle. *FEBS Lett.*, **236**, 441-444.
- GUNDERSEN K. (1985). Early effects of denervation on isometric and isotonic contractile properties of rat skeletal muscles. *Acta Physiol. Scand.*, **124**, 549-555.
- GUNNING P. and HARDEMAN E. (1991). Multiple mechanisms regulate muscle fiber diversity. *FASEB J.*, **5**, 3064-3070.
- GUTMANN E., MELICHNA J. and SYROVY I (1972). Contraction properties and ATPase activity in fast and slow muscle of the rat during denervation. *Exp. Neurol.*, **36**, 488-497.
- HADDAD F., ARNOLD C., ZENG M. and BALDWIN K.M. (1998). Interaction of thyroid state and denervation on skeletal myosin heavy chain expression. *Muscle Nerve*, **20**, 1487-1496.
- HADDAD F., QIN A.X., ZENG M., McCUE S.A. and BALDWIN K.M. (1998). Interaction of hyperthyroidism and hindlimb suspension on skeletal myosin heavy chain expression. *J. Appl. Physiol.*, **85**, 2227-2236.
- HÄMÄLÄINEN N. and PETTE D. (1994). The expression of an additional slow myosin heavy chain isoform in transforming skeletal muscle of the rabbit. *J. Muscle Res. Cell M.*, **15**, 189 (Abstr.).
- HÄMÄLÄINEN N. and PETTE D. (1996). Slow-to-fast transitions in myosin expression of rat soleus muscle by phasic high-frequency stimulation. *FEBS Lett.*, **399**, 220-222.
- HÄMÄLÄINEN N. and PETTE D. (1997). Expression of an α -cardiac like myosin heavy chain in diaphragm, chronically stimulated, and denervated fast-twitch muscles of rabbit. *J. Muscle Res. Cell M.*, **18**, 401-411.
- HANTAZ-AMBROISE D., BLONDET B., MURAWSKY M. and RIEGER F. (1994). Abnormal astrocyte differentiation and defective cellular interactions in wobbler mouse spinal cord. *J. Neurocytol.*, **23**, 179-192.
- HARRIS J.B. and RIBCHESTER R.R. (1979). The relationship between end-plate size and transmitter release in normal and dystrophic muscles of the mouse. *J. Physiol.*, **296**, 245-265.
- HÄRTNER K.T., KIRSCHBAUM B.J. and PETTE D. (1989). The multiplicity of troponin T isoforms. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.*, **179**, 31-38.
- HÄRTNER K.T. and PETTE D. (1990). Fast and slow isoforms of troponin I and troponin C. Distribution in normal rabbit muscles and effects of chronic stimulation. *Eur. J. Biochem.*, **188**, 261-267.

- HASELGROVE J.C. (1983). Structure of vertebrate striated muscle as determined by X-ray diffraction methods. *Handbook of Physiology*. Ed. by Peachey J.D., Adrian R.H. and Geiger G.R. Bethesda : American Physiological Society, pp 143-171.
- HEELEY D.H., DHOOT G.K., FREARSON N., PERRY S.V. and VRBOVA G. (1983). The effect of cross-innervation on the tropomyosin composition of rabbit skeletal muscle. *FEBS Lett.*, **152**, 282-286.
- HERZBERG O. and JAMES M.N.G. (1985). Structure of the calcium regulatory muscle protein troponin-C at 2.8 Å resolution. *Nature*, **313**, 653-659.
- HESLINGA J.W., KRONNIE G. and HUIJING P.A. (1995). Growth and immobilization effects on sarcomeres : a comparison between gastrocnemius and soleus muscles of the adult rat. *Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.*, **70**, 49-57.
- HIGUCHI H. and ISHIWATA S.I. (1985). Disassembly kinetics of thick filaments in rabbit skeletal muscle fibers. Effects of ionic strength, Ca^{2+} concentration, pH, temperature and cross-bridges on the stability of thick filament structure. *Biophys J.*, **47**, 267-275.
- HIGUCHI H. and UMAZUME Y. (1985). Localization of the parallel elastic components in frog skinned muscle fibres studied by the depolymerization of the A- and I-bands. *Biophys. J.*, **48**, 137-147.
- HIGUCHI H (1992). Changes in contractile properties with selective digestion of connectin (titin) in skinned fibers of frog skeletal muscle. *J. Biochem.*, **111**, 291-295.
- HIGUCHI H., YANAGIDA T. and GOLDMAN Y.E. (1995). Compliance of thin filaments in skinned fibres of rabbit skeletal muscle. *Biophys J.*, **69**, 1000-1010.
- HILL A.V. (1938). The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. Roy. Soc.*, **B126**, 136-195.
- HILL A.V. (1970). First and last experiments in muscle mechanics. *Cambridge University Press*.
- HILL D.K. (1968). Tension due to interaction between the sliding filaments in resting striated muscle. The effect of stimulation. *J. Physiol.*, **192**, 637-683.
- HILL T.L., EISENBERG E. and 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.
- HOFFMAN H. (1950). Local reinnervation in partially denervated muscle: a histophysiological study. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **28**, 383-397.
- HOLMES M., TROMBITAS K., CENTNER T., KELLERMAYER M., LABEIT S., LINKE W.A. and GRANZIER H. (1999). Mechanically driven contour-length adjustment in rat cardiac titin's unique N2B sequence titin is an adjustable spring. *Circ. Res.*, **84**, 1339-1352.

- HOLROYDE M.J., ROBERTSON S.P., JOHNSON J.D., SOLARO R.J. and POTTER J.D. (1980). The calcium and magnesium binding sites on cardiac troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **255**, 11688-11693.
- HOLY X. and MOUNIER Y. (1991). Effects of short spaceflights on mechanical characteristics of rat muscles. *Muscle Nerve.*, **14**, 70-78.
- HOROWITS R., KEMPNER E.S., BISHOP M.E. and PODOLSKY R.J. (1986). A physiological role for titin and nebulin in skeletal muscle. *Nature*, **323**, 160-164.
- HOROWITS R. and PODOLSKY R.J. (1988). Thick filament movement and isometric tension in activated skeletal muscle. *Biophys J.*, **54**, 165-171.
- HOROWITS R., MARUYAMA K. and PODOLSKY R.J. (1989). Elastic behavior of connectin filaments during thick filament movement in activated skeletal muscle. *J. Cell. Biol.*, **109**, 2169-2176.
- HOROWITS R. (1992). Passive force generation and titin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Biophys J.*, **61**, 392-398.
- HOROWITS R. (1999). The physiological role of titin in striated muscle. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **138**, 57-96.
- HU D.H., KIMURA S. and MARUYAMA K. (1986). Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis studies of connectin-like high molecular weight proteins of various types of vertebrate and invertebrate muscles. *J. Biochem.*, **99**, 1485-1492.
- HUEY K.A. and BODINE S.C. (1998). Changes in myosin mRNA and protein expression in denervated rat soleus and tibialis anterior. *Eur. J. Biochem.*, **256**, 45-50.
- HUXLEY A.F. (1957). Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophys.*, **7**, 255-318.
- HUXLEY A.F. and SIMMONS R.M. (1971). Proposed mechanism of force generation in striated muscle. *Nature*, **233**, 533-538.
- HUXLEY H.E. and HANSON J. (1954). Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation. *Nature*, **173**, 973-976.
- HUXLEY H.E. (1963). Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.*, **7**, 281-308.
- HUXLEY H.E., STEWART A., SOSA H. and IRVING T. (1994). X-ray diffraction measurements of the extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle. *Biophys. J.*, **67**, 2411-2421.

- ITOH Y., SUZUKI T., KIMURA S., OHASHI K., HIGUCHI H., SAWADA H., SHIMIZU T., SHIBATA M. and MARUYAMA K. (1988). Extensible and less-extensible domains of connectin filaments in stretched vertebrate skeletal muscle as detected by immunofluorescence and immunoelectron microscopy using monoclonal antibodies. *J. Biochem.*, **104**, 504-508.
- JAKUBIEC-PUKA A., KORDOWSKA J., CATANI C. and CARRARO U. (1990). Myosin heavy chain isoform composition in striated muscle after denervation and self-reinnervation. *Eur. J. Biochem.*, **193**, 623-628.
- JAKUBIEC-PUKA A. and CARRARO U. (1991). Remodelling of the contractile apparatus of striated muscle stimulated electrically in a shortened position. *J. Anat.*, **178**, 83-100.
- JAKUBIEC-PUKA A., CATANI C. and CARRARO U. (1992). Myosin heavy-chain composition in striated muscle after tenotomy. *Biochem. J.*, **282**, 237-242.
- JAKUBIEC-PUKA A., CIECHOMSKA I., MORGA J. and MATUSIAK A. (1999). Contents of myosin heavy chains in denervated slow and fast rat leg muscles. *Comp. Biochem. Phys. B.* **122**, 355-362.
- JÄNKÄLÄ H., HARJOLA V.P., PETERSEN N.E. and HÄRKÖNEN M. (1997). Myosin heavy chain Mrna transform to faster isoforms in immobilized skeletal muscle: a quantitative PCR study. *J. Appl. Physiol.*, **82**, 977-982.
- JEWELL B.R. and WILKIE D.R. (1958). An analysis of the mechanical components in frog's striated muscle. *J. Physiol.*, **143**, 515-540.
- JIANG B., ROY R.R. and EDGERTON V.R. (1990a). Enzymatic plasticity of medial gastrocnemius fibers in the adult chronic spinal cat. *Am. J. Physiol.*, **259**, 507-514.
- JIANG B., ROY R.R. and EDGERTON V.R. (1990b). Expression of a fast fiber enzyme profile in the cat soleus after spinalization. *Muscle Nerve*, **13**, 1037-1049.
- JIANG B., ROY R.R., NAVARRO C., NGUYEN Q., PIERROTTI D. and EDGERTON V.R. (1991). Enzymatic responses of cat medial gastrocnemius fibers to chronic inactivity. *J. Appl. Physiol.*, **70**, 231-239.
- JOHNSON F. and SMILLIE L.B. (1975). Rabbit skeletal α -tropomyosin chains are in register. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, **64**, 1316-1322.
- JOHNSON J.D., COLLINS J.H., ROBERTSON S.P. and POTTER J.D. (1980). A fluorescent probe study of Ca^{2+} binding to the Ca^{2+} -specific sites of cardiac troponin and troponin C. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9635-9640.
- JONES D.A. and ROUND J.M. (1990). Skeletal muscle in health and disease. A text book of muscle physiology. Manchester University Press.
- JOZSA L., KVIST M., KANNUS P. and JARVINEN M. (1988). The effect of tenotomy and immobilization on muscle spindles and tendon organs of the rat calf muscles. A histochemical and morphometrical study. *Acta Neuropathol.*, **76**, 465-470.

- KAWAI M. and SCHACHAT F.H. (1984). Differences in the transient response of fast and slow skeletal muscle fibers. Correlations between complex modulus and myosin light chains. *Biophys J.*, **45**, 1145-1151.
- KELLER T.C.S. (1995). Structure and function of titin and nebulin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 32-38.
- KELLERMAYER M.S., SMITH S.B., GRANZIER H.L. and BUSTAMANTE C. (1997). Folding-unfolding transitions in single titin molecules characterized with laser tweezers. *Science*, **276**, 1112-1116.
- KOLMERER B., OLIVIERI N., WITT C., HERRMANN B.G. and LABEIT S. (1996). Genomic organization of the M-line titin and its tissue-specific expression in two distinct isoforms. *J. Mol. Biol.*, **256**, 556-563.
- LABEIT S., GAUTEL M., LAKEY A. and TRINICK J. (1992). Towards a molecular understanding of titin. *EMBO J.* **11**, 1711-1716.
- LABEIT S. and KOLMERER B. (1995). Titins : giant proteins in charge of muscle ultra-structure and elasticity. *Science*, **270**, 293-296.
- LABEIT S., KOLMERER B. and LINKE W.A. (1997). The Giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ. Res.*, **80**, 290-294.
- LAEMMLI U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LARSSON L. and MOSS R. (1993). Maximum shortening velocity in relation to myosin isoform composition in single fibres from human skeletal muscles. *J. Physiol.*, **472**, 595-614.
- LASZEWSKI-WILLIAMS B., LUFF R.L. and GORDON A.M. (1989). Influence of fiber type and muscle source on Ca²⁺ sensitivity of rat fibers. *Am. J. Physiol.*, **256**, C420-C427.
- LEAHY D.J., HENDRICKSON W.A., AUKHIL I. and ERICKSON H.P. (1992). Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science*, **258**, 987-990.
- LETERME D., CORDONNIER C., MOUNIER Y. and FALEMPIN M. (1994). Influence of chronic stretching upon rat soleus muscle during non-weight-bearing condition. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **429**, 274-279.
- LETERME D. and FALEMPIN M. (1994). Compensatory effects of chronic electrostimulation on unweighted rat soleus muscle. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **426**, 155-160.

- LETERME D. and FALEMPIN M. (1998). EMG activity of three rat hindlimb muscles during microgravity and hypergravity phase of parabolic flight. *Aviat. Space Environ. Med.*, **69**, 1065-1070.
- LEEUW T. and PETTE D. (1993). Co-ordinate changes in the expression of troponin subunit and myosin heavy-chain isoforms during fast-to-slow transition of low-frequency-stimulated rabbit muscle. *Eur. J. Biochem.*, **213**, 1039-1046.
- LEEUW T. and PETTE D. (1996). Co-ordinate changes of myosin light and heavy chain during forced fiber type transitions in rabbit muscle. *Dev. Genet.*, **19**, 163-168.
- LI M.X., GAGNE S.M., TSUDA S., KAY C.M., SMILLIE L.B. and SYKES B.D. (1995). Calcium binding to the regulatory N-domain of skeletal muscle troponin C occurs in a stepwise manner. *Biochemistry*, **34**, 8330-8340.
- LIEBER R.L., FRIDEN J.O., HARGENS A.R. and FERINGA E.R. (1986a). Long-term effects of spinal cord transection on fast and slow rat skeletal muscle. II. Morphometric properties. *Exp. Neurol.*, **91**, 435-448.
- LIEBER R.L., JOHANSSON C.B., VAHLSING H.L., HARGENS A.R. and FERINGA E.R. (1986b). Long-term effects of spinal cord transection on fast and slow rat skeletal muscle. I. Contractile properties. *Exp. Neurol.*, **91**, 423-434.
- LIN Z.X., LU M.H., SCHULTHEISS T., CHOI J., HOLTZER S., DILULLO C., FISCHMAN D.A. and HOLTZER H. (1994). Sequential appearance of muscle-specific proteins in myoblasts as a function of time after cell division : Evidence for a conserved myoblast differentiation program in skeletal muscle. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, **29**, 1-19.
- LINKE W.A., POPOV V.I., POLLACK G.H. (1994). Passive and active tension in single cardiac myofibrils. *Biophys J.* **67**, 782-792.
- LINKE W.A., IVEMEYER M., OLIVIERI N., KOLMERER B., RUEGG J.C. and LABELIT S. (1996). Towards a molecular understanding of the elasticity of titin. *J. Mol. Biol.*, **261**, 62-71.
- LINKE W.A., STOCKMEIER M.R., IVEMEYER M., HOSSER H. and MUNDEL P. (1998a). Characterizing titin's I-band Ig domain region as an entropic spring. *J. Cell. Sci.*, **111**, 1567-1574.
- LINKE W.A., IVEMEYER M., MUNDEL P., STOCKMEIER M.R. and KOLMERER B. (1998b). Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8052-8057.
- LINKE W.A., RUDY D.E., CENTNER T., GAUTEL M., WITT C., LABELIT S., and GREGORIO C.C. (1999). I-band titin in cardiac muscle is a three-element molecular spring and is critical for maintaining thin filament structure. *J. Cell Biol.*, **146**, 631-644.
- LOUGHNA P.T., IZUMO S., GOLDSPINK G. and NADAL-GINARD B. (1990). Disuse and passive stretch cause rapid alterations in expression of developmental and adult contractile genes in skeletal muscle. *Development*, **109**, 217-223.

- LOWEY S., SLAYTER H.S., WEEDS A.G. and BAKER H. (1969). Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J. Mol. Biol.*, **42**, 1-29.
- LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. and RANDAL R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- LYMN R.W. and TAYLOR E.W. (1971). Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin. *Biochemisstry*, **10**, 4617-4624.
- MARECHAL G., BECKERS-BLEUKX G., BERQUIN A. and COULTON G. (1996). Isoforms of myosin in growing muscles of ky (kyphoscoliotic) mice. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 916-922.
- MARKO J.F. and SIGGIA E.D. (1995). Stretching DNA. *Macromolecules*, **28**, 8759-8770.
- MARTIN T.P., STEIN R.B., HOEPPNER P.H. and REID D.C. (1992). Influence of electrical stimulation on the morphological and metabolic properties of paralyzed muscle. *J. Appl. Physiol.*, **72**, 1401-1406.
- MARUYAMA K., MATSUBARA S., NATORI Y., NONOMURA Y., KIMURA S., OHASHI K., MURAKAMI F., HANDA S. and EGUCHI G. (1977). Connectin, an elastic protein of muscle : characterization and function. *J. Biochem.*, **82**, 317-337.
- MARUYAMA K., KIMURA S., YOSHIDOMI H., SAWADA H. and KIKUCHI M. (1984). Molecular size and shape of β -connectin, an elastic protein of striated muscle. *J. Biochem.*, **95**, 1423-1433.
- MARUYAMA K. (1986). Connectin, an elastic filamentous protein of striated muscle. *Int. Rev. Cytol.*, **104**, 81-114.
- MARUYAMA K. (1994). Connectin, an elastic protein of striated muscle. *Biophys. Chem.*, **50**, 73-85.
- MARUYAMA K. (1997). Connectin/titin, giant elastic protein of muscle. *FASEB J.*, **11**, 341-345.
- MAYANS O., VAN DER VEN P.F., WILM M., MUES A., YOUNG P., FÜRST D.O., WILMANN M. and GAUTEL M. (1998). Structural basis for activation of the titin kinase domain during myofibrillogenesis. *Nature*, **395**, 863-869.
- MAYER R.F., BURKE R.E., TOOP J., WALMSLEY B. and HODGSON J.A. (1984). The effect of spinal cord transection on motor units in cat medial gastrocnemius muscles. *Muscle Nerve*, **7**, 23-31.
- McDONALD K.S. and FITTS R.H. (1993). Effect of hindlimb unweighting on single soleus fiber maximal shortening velocity and ATPase activity. *J. Appl. Physiol.*, **74**, 2949-2957.

- McDONALD K.S., BLASER C.A. and FITTS R.H. (1994). Force-velocity and power characteristics of rat soleus muscle fibers after hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **77**, 1609-1616.
- McDONALD K.S. and FITTS R.H. (1995). Effect of hindlimb unloading on rat soleus fiber force, stiffness and calcium sensitivity. *J. Appl. Physiol.*, **79**, 1796-1802.
- McLACHLAN E.M. (1981). Rapid atrophy of mouse soleus muscles after tenotomy depends on an intact innervation. *Neurosci. Lett.*, **25**, 269-274.
- MEDFORD R.M., NYUGEN H.T., MEDFORD R.M., DESTREE A.T., MAHDAVI V. and NADAL GINARD B. (1984). A novel mechanism of alternative RNA splicing for the developmentally regulated generation of troponin T isoforms from a single gene. *Cell*, **38**, 409-421.
- METZGER J.M. and MOSS R.L. (1988). Thin filament regulation of shortening velocity in rat skinned skeletal muscle : effects of osmotic compression. *J. Physiol.*, **398**, 165-175.
- MIDRIO M., DANIELI-BETTO D., MEGIGHIAN A., VELUSSI C., CATANI C. and CARRARO U. (1992). Slow-to-fast transformation of denervated soleus muscle of the rat, in the presence of an antifibrillatory drug. *Pflug. Arch. Eur. J. Phys.*, **420**, 446-450.
- MIDRIO M., DANIELI-BETTO D., ESPOSITO A., MEGIGHIAN A., CARRARO U., CATANI C. and ROSSINI K. (1998). Lack of type 1 and 2A myosin heavy chain isoforms in rat slow muscle regenerating during chronic nerve block. *Muscle Nerve*, **21**, 226-232.
- MIU B., MARTIN T.P., ROY R.R., OGANOV V., ILYINA-KAKUEVA E., MARINI J.F., LEGER J.J., BODINE-FOWLER S.C. and EDGERTON V.R. (1990). Metabolic and morphologic properties of single muscle fibers in the rat after spaceflight. *Cosmos 1887. FASEB J.*, **4**, 64-72.
- MOISESCU D.G. and 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.
- MOORE G.E., BRIGGS M.M. and SCHACHAT F.H. (1987). Patterns of troponin T expression in mammalian fast, slow and promiscuous muscle fibres. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **8**, 13-22.
- MOREY E.R. (1979). Spaceflight and bone turnover : correlation with a new rat model of weightlessness. *Bioscience*, **29**, 168-172.
- MORGAN M.J., EARSHAW J.C. and DHOOT G.K. (1993). Novel developmentally regulated exon identified in the rat fast skeletal muscle troponin T gene. *J. Cell. Sci.*, **106**, 903-908.
- MOSS R.L., LAUER M.R., GARY G.G. and GREASER M.L. (1986). Altered Ca^{2+} dependence of tension development in skinned muscle fibres following modification of troponin by partial substitution with cardiac troponin C. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6096-6099.

- MOSS R.L., REISER P.J., GREASER M.L. and EDDINGER T.J. (1990). Varied expression of myosin alkali light chains is associated with altered speed of contraction in rabbit fast-twitch skeletal muscles. In *The Dynamic State of Muscle Fibers*, ed. Pette D., pp 355-368. De Gruyter, Berlin, New York.
- MOUNIER Y., HOLY X. and STEVENS L. (1989). Compared properties of the contractile system of skinned slow and fast rat muscle fibres. *Pflüg. Arch. Eur. J. Phy.*, **415**, 136-141.
- MUSSACHIA X.J., DEAVERS D.A., MEININGER G.A. and DAVID T.P. (1980). A model for hypokinesia : effects on muscle atrophy in the rat. *J. Appl. Physiol.*, **48**, 479-486.
- NAKAYAMA S. and KRETSINGER R.H. (1994). Evolution of the EF-hand family of proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 473-507.
- NONAKA I., MIYAZAWA M., SUKEGAWA T., YONEMOTO K. and KATO T. (1997). Muscle fiber atrophy and degeneration induced by experimental immobiloty and hindlimb suspension. *Int. J. Sports Med.*, **18**, S292-S294.
- OGANOV V.S., SKURATOVA S.A., POTAPOV A.N. and HIRTVINSKAYA M.A. (1980). Physiological mechanisms of adaptation of rat skeletal muscles to weightlessness and similar functional requirements. *The Physiologist*, **23**, S16-S21.
- OHIRA Y., JIANG B., ROY R.R., OGANOV V., ILYINA-KAKUEVA E., MARINI J.F. and EDGERTON V.R. (1992). Rat soleus muscle fiber responses to 14 days of spaceflight and hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **73**, 51S-57S.
- ORENTLICHER M., BRANDT P.W. and REUBEN J.P. (1977). Regulation of tension in skinned muscle fibres : effect of high concentrations of Mg-ATP. *Am. J. Physiol.*, **233**, 127-134.
- OISHI Y. (1993). Relationship between myosin heavy chain IId isoform and fibre types in soleus muscle of the rat after hindlimb suspension. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **66**, 451-454.
- OISHI Y., YAMAMOTO H. and MIYAMOTO E. (1994). Changes in fibre-type composition and myosin heavy-chain IId isoform in rat soleus muscle during recovery period after hindlimb suspension. *Eur. J. Appl. Physiol.*, **68**, 102-106.
- OISHI Y., ISHIHARA A., YAMAMOTO H. and MIYAMOTO E. (1998). Hindlimb suspension induces the expression of multiple myosin heavy chain isoforms in single fibres of the rat soleus muscle. *Acta Physiol. Scand.*, **162**, 121-134.
- PARMACEK M.S. and LEIDEN J.M. (1991). Structure, function and regulation of troponin C. *Circulation*, **84**, 991-1003.
- PARRY D.J. and PARSLOW H.G. (1981). Fiber type susceptibility in the dystrophic mouse. *Exp. Neurol.*, **73**, 674-685.
- PARRY D.J. and ZARDINI D. (1990). Characterisation of IIX fibers in mouse muscles. In *The dynamic State of Muscle Fibers*, W. G. Ed, 343-354.

- PEARLSTONE J.R., JOHNSON P., CARPENTER M.R. and SMILLIE L.B. (1977). Primary structure of rabbit skeletal muscle troponin-T. Sequence determination of the NH₂-terminal fragment CB3 and the complete sequence of troponin-T. *J. Biol. Chem.*, **252**, 983-989.
- PERRY S.V. (1998). Troponin T : genetics, properties and function. *J. Muscle Res. Cell M.*, **19**, 575-602.
- PETIT J., FILIPPI G.M., EMONET-DENAND F., HUNT C.C. and LAPORTE Y. (1990). Changes in muscle stiffness produced by motor unit of different types in peroneus longus muscle of cat. *J. Neurophysiol.*, **63**, 190-197.
- PETTE D. and VRBOVA G. (1985). Invited review : neural control of phenotypic expression in mammalian muscle fibers. *Muscle Nerve*, **8**, 676-689.
- PETTE D. and STARON R.S. (1988). Molecular basis of the phenotypic characteristics of mammalian muscle fibres. IN : Evered D, Whelan J (eds) Plasticity of the neuromuscular system. *Ciba Foundation symposium 138. Wiley, Chichester*, pp 22-34.
- PETTE D. and STARON R.S. (1990). Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **116**, 1-76.
- PETTE D. and VRBOVA G. (1992). Adaptation of mammalian skeletal muscle fibers to chronic electrical stimulation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol*, **120**, 115-202.
- PETTE D. and STARON R.S. (1997). Mammalian skeletal muscle fiber type transitions. *Int. Rev. Cytol.*, **170**, 143-223.
- PETTE D. and VRBOVA G. (1999). What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity ?. *Muscle Nerve*, **22**, 666-677.
- PEUKER H. and PETTE D. (1995). Reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects induction of cardiac-like α myosin heavy chain mRNA in low frequency stimulated rabbit fast-twitch muscle. *FEBS Lett.*, **367**, 132-132.
- PEUKER H., CONJART A., PUTMAN C.T. and PETTE D. (1999). Transient expression of myosin heavy chain MHC I α in rabbit muscle during fast-to-slow transition; *J Muscle Res. Cell M.*, **20**, 147-154.
- PFÜHL M. and PASTORE A. (1995). Tertiary structure of an immunoglobulin-like domain from the giant muscle protein titin : a new member of the I set. *Structure*, **3**, 391-401.
- PICQUET F., STEVENS L., BUTLER-BROWNE G.S. and MOUNIER Y. (1998). Differential effects of a six-day immobilization on newborn rat soleus muscles at two developmental stages. *J. Muscle Res. Cell M.*, **19**, 743-755.
- PIEROTTI D.J., ROY R.R., BODINE-FOWLER S.C., HODGSON J.A. and EDGERTON V.R. (1991). Effects of chronic inactivity on the contractile properties and spatial distribution of the motor units of the cat tibialis anterior. *J. Physiol.*, **444**, 175-192.

- PINCON-RAYMOND M. and RIEGER F. (1981). The motor innervation of skeletal muscles in the "motor endplate disease" mutant mouse. *Biol. Cell.*, **40**, 189-194.
- POLLIN M.M., McHANWELL S. and SLATER C.R. (1990). Loss of motor neurons from the median nerve motor nucleus of the mutant mouse "wobbler". *J. Neurocytol.*, **19**, 29-38.
- POLITOU A.S., THOMAS D.J. and PASTORE A. (1995). The folding and stability of titin immunoglobulin-like modules, with implications for the mechanism of elasticity. *Biophys J.*, **69**, 2601-2610.
- POLITOU A.S., GAUTEL M., IMPROTA S., VANGELISTA L. and PASTORE A. (1996). The elastic I-band region of titin is assembled in a "modular" fashion by weakly interacting Ig-like domains. *J. Mol. Biol.*, **255**, 604-616.
- POUSSON M., PEROT C. and GOUBEL F. (1991). Stiffness changes and fiber type transitions in rat soleus muscle produced by jumping training. *Pflug. Arch. Eur. J. Phy.*, **419**, 127-130.
- REGGIANI C., BROCKS L., WIRTZ P., LOERMANS H. and KRONNIE G. (1992). Myosin isoforms in hindlimb muscles of normal and dystrophic (ReJ129 dy/dy) mice. *Muscle Nerve*, **14**, 199-208.
- REINACH F.C., FARAH C.H., MONTEIRO P.B. and MALNIC B. (1997). Structural interactions responsible for the assembly of the troponin complex on the muscle thin filament. *Cell Struct. Funct.*, **22**, 219-223.
- REISER P.J., MOSS R.L., GIULIAN G.G. and GREASER M.L. (1985). Shortening velocity in single fibres from adult rabbit soleus muscles is correlated with myosin heavy chain composition. *J. Biol. Chem.*, **260**, 9077-9080.
- REISER P.J., KASPER C.E. and MOSS R.L. (1987). Myosin subunits and contractile properties of single fibers from hypokinetic rat muscles. *J. Appl. Physiol.*, **63**, 2293-2300.
- REISER P.J., GREASER M.L. and MOSS R.L. (1988). Myosin heavy chain composition of single cells from avian slow skeletal muscle is strongly correlated with velocity of shortening during development. *Developmental Biol.*, **129**, 400-407.
- RIEF M., GAUTEL M., OESTERHELT F., FERNANDEZ J.M. and GAUB H.E. (1997). Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*, **276**, 1109-1112.
- ROME L.C., SOSNICKI A.A. and GOBLE D.O. (1990). Maximum velocity of shortening of three fibre types from horse soleus muscle: implications for scaling with body size. *J. Physiol.*, **431**, 173-185.
- ROWE R.W.D. and GOLDSPINK G. (1969). Muscle fibre growth in five different muscles in both sexes of mice. I. Normal mice. *J. Anat.*, **104**, 519-530.

- ROY R.K., SRETER F.A. and SARKAR S. (1979). Changes in tropomyosin subunits and myosin light chains during development of chicken and rabbit striated muscles. *Dev. Biol.*, **69**, 15-30.
- ROY R.R., PIEROTTI D.J., FLORES V., RUDOLPH W. and EDGERTON V.R. (1992). Fibre size and type adaptations to spinal isolation and cyclical passive stretch in cat hindlimb. *J. Anat.*, **180**, 491-499.
- ROY R.R., TALMADGE R.J. and EDGERTON V.R. (1993). Short-term effects of complete spinal cord transection on myosin heavy chain properties of rat skeletal muscles. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **19**, 152.
- ROY R.R., ELDRIDGE L., BALDWIN K.M. and EDGERTON V.R. (1996). Neural influence on slow muscle properties : inactivity with and without cross-reinnervation. *Muscle Nerve*, **19**, 707-714.
- SALVIATI G., BETTO R. and 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., BIASIA E. and ALOISI M. (1986a). Synthesis of fast myosin induced by fast ectopic innervation of rat soleus muscle is restricted to the ectopic end-plate region. *Nature*, **322**, 637-639.
- SALVIATI G., BETTO R., DANIELI-BETTO D., BIASIA E., SERENA M., MINI M. and SCARLATO G. (1986b). Myosin light chains and muscle pathology. *Neurology*, **36**, 693-697.
- SALVIATI G., BETTO R., CEOLDO S. and PIEROBON-BORMIOLI S. (1990). Morphological and functional characterization of the endosarcomeric elastic filament. *Am. J. Physiol.*, **259**, C144-C149.
- SCHACHAT F.H., BRONSON D.D. and McDONALD O.B. (1985a). Heterogeneity of contractile proteins A continuum of troponin-tropomyosin expression in mammalian skeletal muscles. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1108-1113.
- SCHACHAT F.H., CANINE A.C., BRIGGS M.A. and REEDY M.C. (1985b). The presence of two skeletal muscle alpha-actinins correlates with troponin-tropomyosin expression and Z-line width. *J. Cell. Biol.*, **101**, 1001-1008.
- SCHACHAT F.H., DIAMOND M.S. and BRANDT P.W. (1987). Effects of different troponin T-tropomyosin combinations on thin filament activation. *J. Mol. Biol.*, **198**, 551-554.
- SCHIAFFINO S., GORZA L., PITTON G., SAGGIN L., AUSONI S., SARTORE S. and LOMO T. (1988). Embryonic and neonatal myosin heavy chain in denervated and paralysed rat skeletal muscle. *Dev. Biol.*, **127**, 1-11.

- SCHIAFFINO S., GORZA L., SARTORE S., SAGGIN L., VIANELLO M., GUNDERSEN K., and LOMO T. (1989). Three myosin heavy chain isoforms in type 2 skeletal muscle fibers. *J. Muscle Res. Cell M.*, **10**, 197-205.
- SCHIAFFINO S. and REGGIANI C. (1996). Molecular diversity of myofibrillar proteins : gene regulation and functional significance. *Physiol. Rev.*, **76**, 371-423.
- SCHMITT T.L. and PETTE D. (1988). Type I protein is a slow isoform of troponin T. *FEBS Lett.*, **234**, 83-85.
- SCHMITT T.L. and PETTE D. (1990). Correlations between troponin and myosin heavy chain isoforms in normal and transformed rabbit muscle fibers. In : *The dynamic State of Muscle Fibers*, edited D. Pette. Berlin : de Gruyter p 293-302.
- SEBESTYEN M.G., WOLFF J.A. and GREASER M.L. (1995). Characterization of a 5.4 kb cDNA fragment from the Z-line region of rabbit cardiac titin reveals phosphorylation sites for proline-directed kinases. *J. Cell Sci.*, **108**, 3029-3037.
- SHORTEN M.R. (1987). Muscle elasticity and human performance. *Med. Sport. Sci.*, **25**, 1-18.
- SJÖSTRAND F.S. (1962). The connections between A-and I-band filaments in striated frog muscle. *J. Ultrastruct. Res.*, **7**, 225-246.
- SMILLIE L.B., GOLOSINSKA K. and REINACH F.C. (1988). Sequences of complete cDNAs encoding four variants of chicken skeletal troponin T. *J. Biol. Chem.*, **263**, 18816-18820.
- SOMERVILLE L.L. and WANG K. (1987). In vivo phosphorylation of titin and nebulin in frog skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **147**, 986-992.
- SORIMACHI H., KINBARA K., KIMURA S., TAKAHASHI M., ISHIURA S., SASAGAWA N., SORIMACHI N., SHIMADA H., TAGAWA K., MARUYAMA K. and SUZUKI K. (1995). Muscle-specific calpain p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.*, **270**, 31158-31162.
- SOTERIOU A., GAMAGE M., TRINICK J. (1993). A survey of interactions made by the giant protein titin. *J. Cell. Sci.*, **104**, 119-123.
- SPECTOR J.A., SIMARD C.P., FOURNIER M., STERNLICHT E. and EDGERTON V.R. (1982). Architectural alterations of rat hindlimb skeletal muscle immobilized at different lengths. *Exp. Neurol.*, **76**, 94-110.
- SPECTOR S.A. (1985a). Effects of elimination of activity on contractile and histochemical properties of rat soleus muscle. *J. Neurosc.*, **5**, 2177-2188.
- SPECTOR S.A. (1985b). Trophic effects on the contractile and histochemical properties of rat soleus muscle. *J. Neurosc.*, **5**, 2189-2196.



- STARON R.S., KRAEMER W.J., HIKIDA R.S., REED D.W., MURRAY J.D., CAMPOS G.E.R. and GORDON S.E. (1998). Comparison of soleus muscles from rats exposed to microgravity for 10 versus 14 days. *Histochem. Cell. Biol.*, **110**, 73-80.
- STEINBACH J.H., SCHUBERT D. and ELDRIDGE L. (1980). Changes in cat muscle contractile proteins after prolonged muscle inactivity. *Exp. Neurol.*, **67**, 655-669.
- STEPHENSON D.G. and WILLIAMS D.A. (1981). Calcium activated force responses in fast and slow twitch skinned muscle fibres of the rat at different temperatures. *J. Physiol.*, **317**, 281-302.
- STEVENS L., MOUNIER Y., HOLY X. and FALEMPIN M. (1990). Contractile properties of rat soleus muscle after 15 days of hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **68**, 334-340.
- STEVENS L., MOUNIER Y. and HOLY X. (1993). Functional adaptation of different rat skeletal muscles to weightlessness. *Am. J. Physiol.*, **264**, 770-776.
- STEVENS L., SULTAN K.R., PEUKER H., GOHLSCH B., MOUNIER Y. and PETTE D. (1999). Time-dependant changes in myosin heavy chain mRNA and protein isoforms in unloaded soleus muscle of rat. *Am. J. Physiol.*, (sous presse).
- STEWART M. (1975). Tropomyosin : evidence for no stagger between chains. *FEBS Lett.*, **53**, 5-7.
- SUGIURA T., MATOBA H., MIYATA H., KAWAI Y. and MURAKAMI N. (1992). Myosin heavy chain transition in ageing fast and slow muscles of the rat. *Acta Physiol. Scand.*, **144**, 419-423.
- SWEENEY H.L., KUSHMERICK M.J., MABUCHI K., SRETER F.A. and GERGELY J. (1988). Myosin alkali light chain and heavy chain variations correlate with altered shortening velocity of isolated skeletal muscle fibers. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9034-9039.
- SYROVY I., GUTMANN E. and MELICHNA J. (1972). The effect of denervation on contraction and myosin properties of fast and slow rabbit and cat muscles. *Physiol. Bohemoslov.*, **21**, 353-359.
- SZCZEPANOWSKA J. and JAKUBIEC-PUKA A. (1992). Myosin heavy chains in striated muscle after immobilization. *Basic Appl. Myol.*, **2**, 97-105.
- SZCZEPANOWSKA J., BOROVNIKOV Y.S. and JAKUBIEC-PUKA A. (1998). Effects of denervation and muscle inactivity on the organization of F-actin. *Muscle Nerve*, **21**, 309-317.
- TAKAGI A. and ENDO M. (1977). Guinea pig soleus and extensor digitorum longus: a study of single-skinned fibers. *Exp Neurol.*, **55**, 95-101.
- TAKAHASHI H., WADA M. and KATSUTA S. (1991). Expression of myosin heavy chain IID isoform in rat soleus muscle during hindlimb suspension. *Acta Physiol Scand.*, **143**, 131-132.

- TAKANO-OHMURO H., NAKAUCHI Y., KIMURA S. and MARUYAMA K. (1992). Autophosphorylation of β -connectin (titin 2) in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **183**, 31-35.
- TALMADGE R.J., ROY R.R., PIEROTTI D.J., BALDWIN K.M. and EDGERTON V.R. (1993). Biochemical adaptation of feline soleus to spinal transection and spinal isolation. *FASEB J.*, Abstr., **7**, 227.
- TALMADGE R.J., ROY R.R. and EDGERTON V.R. (1995a). Prominence of myosin heavy chain hybrid fibers in soleus muscle of spinal cord-transected rats. *J. Appl. Physiol.*, **78**, 1256-1265.
- TALMADGE R.J., ROY R.R., BODINE-FOWLER S.C., PIEROTTI D.J. and EDGERTON V.R. (1995b). Adaptations in myosin heavy chain profile in chronically unloaded muscles. *Basic Appl. Myol.*, **5**, 117-137.
- TALMADGE R.J., ROY R.R. and EDGERTON V.R. (1996). Distribution of myosin heavy chain isoforms in non-weight-bearing rat soleus muscle fibers. *J. Appl. Physiol.*, **81**, 2540-2546.
- TEMPLETON G.H., PADALINO M., MANTON J., GLASBERG M., SILVER C.J., SILVER P., DE MARTINO G., LECONEY T., KLUG G., HAGLER H. and SUTO J.L. (1984). Influence of suspension hypokinesia on rat soleus muscle. *J. Appl. Physiol.*, **56**, 278-286.
- TEMPLETON G.H., SWEENEY H.L., TIMSON B.F., PADALINO M. and DUDENHOEFFER G.A. (1988). Changes in fiber composition of soleus muscle during rat hindlimb suspension. *J. Appl. Physiol.*, **65**, 1191-1195.
- TERMIN A. and PETTE D. (1992). Changes in myosin heavy-chain isoform synthesis of chronically stimulated rat fast-twitch muscle. *Eur. J. Biochem.*, **204**, 569-573.
- THOMASON D.B., HERRICK R.E., SURDYKA D. and BALDWIN K.M. (1987). Time course of soleus muscle myosin expression during hindlimb suspension and recovery. *J. Appl. Physiol.*, **63**, 130-137.
- THOMASON D.B., BIGGS R.B. and BOOTH F.W. (1989). Protein metabolism and β -myosin heavy-chain mRNA in unweighted soleus muscle. *Am. J. Physiol.*, **257**, R300-R305.
- THOMASON D.B. and BOOTH F.W. (1990). Atrophy of the soleus muscle by hindlimb unweighting. *J. Appl. Physiol.*, **68**, 1-12.
- TOMIYAMA M., KANNARI K., NUNOMURA J., OYAMA Y., TAKEBE K. and MATSUNAGA M. (1994). Quantitative autoradiographic distribution of glutamate receptors in the cervical segment of the spinal cord of the wobbler mouse. *Brain Res.*, **650**, 353-357.

- TOWBIN H., STAEHLIN T. and GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- TRINICK J. (1994). Titin and nebulin : protein rulers in muscle ?. *Trends. Biochem. Sci.*, **19**, 405-409.
- TRINICK J. (1996). Titin as a scaffold and spring. *Current Biology*, **6**, 258-260.
- TROMBITAS K., JIN J.P. and GRANZIER H.L.M. (1995). The mechanically active domain of titin in cardiac muscle. *Circ. Res.*, **77**, 856-861.
- TROMBITAS K., POLLACK G.H., WRIGHT J. and WANG K. (1993). Elastic properties of titin filaments demonstrated using a "freeze-break" technique. *Cell Motil Cytoskel*, **24**, 274-283.
- TROMBITAS K., GREASER M., LABEIT S., JIN J.P., KELLERMAYER M., HELMES M. and GRANZIER H. (1998). Titin extensibility in situ : entropic elasticity of permanently folded and permanently unfolded molecular segments. *J. Cell Biol.*, **140**, 853-859.
- TSKHOVREBOVA L., TRINICK J., SLEEP J.A. and SIMMONS R.M. (1997). Elasticity and unfolding of single molecules of the giant muscle protein titin. *Nature*, **387**, 308-312.
- VANDEKERCKHOVE J. and WEBER K. (1979). The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation*, **14**, 123-133.
- VANDEKERCKHOVE J., BUGAISKY G. and BUCKINGHAM M. (1986). Simultaneous expression of skeletal muscle and heart actin proteins in various striated muscle tissues and cells. *J. Biol. Chem.*, **261**, 1838-1843.
- VAN DER LOOP F.T.L., VAN DER VEN P.F.M., FÜRST D.O., GAUTEL M., VAN EYS G.J.J.M. and RAMAEKERS F.C.S. (1996). Integration of titin into the sarcomeres of cultured differentiating human skeletal muscle cells. *Eur. J. Biol.*, **69**, 301-307.
- VRBOVA G. (1963). The effect of motoneurone activity on the speed of contraction of striated muscle. *J. Physiol.*, **169**, 513-526.
- WADA M. and PETTE D. (1993). Relationships between alkali light-chain complement and myosin heavy-chain isoforms in single fast-twitch fibers of rat and rabbit. *Eur. J. Biochem.*, **214**, 157-161.
- WADA M., HÄMÄLÄINEN N. and PETTE D. (1995). Isomyosin patterns of single type IIB, IID and IIA fibers from rabbit skeletal muscle. *J. Muscle Res. Cell M.*, **16**, 237-242.
- WAKABAYASHI K., SUGIMOTO Y., TANAKA H., UENO Y., TAKEZAWA Y. and AMEMINA Y. (1994). X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophys. J.*, **67**, 2422-2435.

- WANG K., McCLURE J. and TU A. (1979). Titin : major myofibrillar components of striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 3698-3702.
- WANG K. (1985). Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Review and hypothesis. *Cell. Muscle Motil.*, **6**, 315-369.
- WANG K., McCARTER R., WRIGHT J., BEVERLY J. and RAMIREZ-MITCHELL M.R. (1991). Regulation of skeletal muscle stiffness and elasticity by titin isoforms : a test of the segmental extension model of resting tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 7101-7105.
- WANG K., McCARTER R., WRIGHT J., BEVERLY J. and RAMIREZ-MITCHELL M.R. (1993). Viscoelasticity of the sarcomere matrix of skeletal muscles. The titin-myosin composite filament is a dual-stage molecular spring. *Biophys J.*, **64**, 1161-1177.
- WANG S.M., GREASER M., SCHULTZ E., BULINSKY J.C., LIN J.J.C. and LESSARD J. (1988). Studies on cardiac myofibrillogenesis with antibodies against titin, tropomyosin and myosin. *J. Cell Biol.*, **107**, 1075-1083.
- WARRICK H.M. and SPUDICH J.A. (1987). Myosin structure and function in cell Motility. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **3**, 379-421.
- WEBER A. and MURRAY J.M. (1973). Molecular control mechanisms in muscle contraction. *Physiol. Rev.*, **53**, 612-673.
- WEBSTER C., SILBERSTEIN L., HAYS A.P. and BLAU H.M. (1988). Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne Muscular Dystrophy. *Cell*, **52**, 503-513.
- WEEDS A.G. and LOWEY S. (1971). Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J. Mol. Biol.*, **61**, 701-725.
- WELLS J.B. (1965). Comparison of mechanical properties between slow and fast mammalian muscles. *J. Physiol.*, **178**, 252-269.
- WELLS L., EDWARDS K.A. and BERNSTEIN S.I. (1996). Myosin heavy chain isoforms regulate muscle function but not myofibril assembly. *EMBO J.*, **15**, 4454-4459.
- WHITING A., WARDALE J. and TRINICK J. (1989). Does titin regulate the length of muscle thick filaments ? *J. Mol. Biol.*, **205**, 263-268.
- WIDRICK J.W, BANGART J.J, KARHANEK M. and FITTS R.H. (1996). Soleus fiber force and maximal shortening velocity after non-weight bearing intermittent activity. *J Appl. Physiol.*, **80**, 981-987.
- WILLIAMS P.E. and GOLDSPINK G. (1973). The effect of immobilization on the longitudinal growth of striated muscle fibres. *J. Anat.*, **116**, 45-55.
- WINDISCH A., GUNDERSEN K., SZABOLES M.J., GRUBER H., and LOMO T. (1998). Fast to slow transformation of denervated and electrically stimulated rat muscle. *J Physiol.*, **510**, 623-632.

- WIRTZ P., LOERMANS H.M.TH., PEER P.G.M. and REINTJES A.G.M. (1983). Postnatal growth and differentiation of muscle fibres in the mouse. I. A histochemical and morphometrical investigation of normal muscle. *J. Anat.*, **137**, 109-126.
- WITT C.C., OLIVIERI N., CENTNER T., KOLMERER B., MILLEVOI S., MORELL J., LABEIT D., LABEIT S., JOCKUSCH H. and PASTORE A. (1998). A survey of the primary structure and the interspecies conservation of I-band titin's elastic elements in vertebrates. *J. Struct. Biol.*, **122**, 206-215.
- WOOD D.S., ZOLLMAN J., REUBEN J.P. and BRANDT P.W. (1975). Human skeletal muscle : properties of the "chemically skinned" fiber. *Science*, **187**, 1075-1076.
- ZARDINI D.M. and PARRY D.J. (1994). Identification, distribution, and myosin subunit composition of type IIX fibers in mouse muscles. *Muscle Nerve*, **17**, 1308-1316.

PUBLICATIONS

I - ARTICLES

TOURSEL T., STEVENS L. and MOUNIER Y. (1999).

Evolution of contractile and elastic properties of rat soleus muscle fibers under unloading conditions. *Experimental Physiology*, **84**, 93-107.

TOURSEL T., BASTIDE B., STEVENS L., RIEGER F. and MOUNIER Y. (1999).

Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobblers mouse muscles. Soumis à *Experimental Neurology* (accepté pour publication).

STEVENS L., TOURSEL T., LENFANT A.M., FALEMPIN M. and MOUNIER Y. (1999).

Suppression of motor innervation induces fiber diversity in soleus muscle. Soumis à *Neuromuscular disorders*.

MOUNIER Y., STEVENS L., SHENKMAN B., KISCHEL P., LENFANT A.M., MONTEL V., CATINOT M.P., TOURSEL T. and PIQUET F. (1999).

Effect of space flight on single fiber function of triceps and biceps muscles from rhesus monkeys. *J. Gravitational Physiol.* (sous presse).

II - COMMUNICATIONS AVEC RESUME

TOURSEL T., STEVENS L., BASTIDE B., KISCHEL P., RIEGER F. and MOUNIER Y. (1999).

Alterations in contractile properties and expression of myofibrillar proteins in wobblers mouse muscles.

European Muscle Congress. York, Angleterre, 4-7 septembre, 1999.

J. Muscle Res. and Cell M. (sous presse).

STEVENS L., TOURSEL T., FALEMPIN M., LENFANT A.M., MONTEL V. and MOUNIER Y. (1997).

Appearance of hybrid and fast fibers in soleus muscle following deafferentation.

European Muscle Congress. Schneverdingen, Allemagne, 21-26 septembre, 1997.

J. Muscle Res. and Cell M., **19**, p. 294, 1998.

TOURSEL T., STEVENS L. and MOUNIER Y. (1996).

Passive tension in slow and fast rat skeletal muscle fibers.

European Muscle Congress. Montpellier, France, 14-17 septembre, 1996.

J. Muscle Res. and Cell M., **18**, p. 247, 1997.

STEVENS L., TOURSEL T., LENSEL-CORBEIL G. and MOUNIER Y. (1995).

Comparison of Vmax and stiffness values of slow and fast skinned fibers from rat soleus muscle after hindlimb suspension.

European Muscle Congress. Florence, Italie, 13-16 septembre, 1995.

J. Muscle Res. and Cell M., **17**, p. 108, 1996.

